

Vermittlerrolle von Annexin A2 bei der apikalen Translokation des renalen Natrium-Kalium-Chlorid- Kotransporters Typ 2

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christin Dathe
aus Leisnig (Sachsen)

2013

Diese Arbeit wurde von Januar 2011 bis August 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Sebastian Bachmann am Institut für Vegetative Anatomie der Charité Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Bachmann, Charité-Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Burghardt Wittig, Freie Universität Berlin

Disputation am 13.02.2014

Danksagung

Beginnen möchte ich mit den Personen, denen meine Dissertation gewidmet ist, mit meinen Eltern und Micha. Ich danke meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und in der Zeit als Doktorand. Sie waren immer für mich da, hatten stets ein offenes Ohr für meine Probleme, haben mich bei Rückschlägen wieder aufgebaut und mich zu gegebenem Zeitpunkt an meine Stärken erinnert.

Ein ganz besonderer Dank gilt jedoch meiner Hauptstütze in den letzten drei Jahren, Micha. Er hat mich immer begleitet und mich jederzeit mit voller Kraft unterstützt, mich in schweren Zeiten abgelenkt und ausgehalten, obwohl ich ihn teilweise sehr strapaziert habe. Trotzdem war er stets für mich da, hat für meine innere Ausgeglichenheit gesorgt und mich an die wichtigen Dinge im Leben erinnert –danke für alles.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Bachmann für die Möglichkeit und Unterstützung in seiner Abteilung diese Arbeit anfertigen zu können. Zudem danke ich Dr. Alexander Paliege für die Überlassung des Forschungsthemas, die Betreuung und besonders für die optimistische Forschungseinstellung.

Ein großes Dankeschön gilt ebenfalls meinen Arbeitskollegen in der AG Bachmann, für die angenehme und überaus freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie jegliche Unterstützung. Dabei ist besonders Dr. Wenke Seifert zu erwähnen, da sie zu jeder Zeit als Ansprechpartner für mich da war und sich die Zeit genommen hat, um sich in das Thema hineinzudenken. Ihre permanente Diskussionsbereitschaft sowie ihre Ideen trugen zum Entstehen dieser Arbeit bei. In diesem Kontext danke ich ebenfalls Dr. Kerim Mutig, der mir stets bei nierenspezifischen Fragen mit hilfreichen, fachlichen Anmerkungen zur Seite stand. Aljona Borschewski und Hanna Neymeyer bin ich besonders für das schöne Arbeitsklima sowie die extensiven (nicht-)fachlichen Gespräche dankbar.

Ganz herzlich möchte ich mich außerdem bei Kerstin Riskowsky und Elisabeth Schindler für ihre tatkräftige und tagtägliche Unterstützung im Labor bedanken. John Horn danke ich für seine Hilfe bei der Elektronenmikroskopie.

Außerhalb der Arbeitsgruppe gilt Prof. Dr. Burghardt Wittig von der Freien Universität Berlin besonderer Dank für die Betreuung meiner Arbeit. Ebenfalls danke ich Dr. Vera Jankowski für die Durchführung der Massenspektrometrie.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Funktionen der Niere.....	1
1.2 Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2.....	3
1.2.1 Wirkungsweise von NKCC2 im Kontext der TAL-Funktion.....	3
1.2.2 Expression, Struktur und Phosphorylierungen von NKCC2.....	5
1.2.3 Regulation der Aktivität von NKCC2.....	7
1.2.4 Verteilung von NKCC2 innerhalb der Zelle.....	8
1.2.5 NKCC2 in <i>Lipid Rafts</i>	9
1.3 Annexin A2 und P11.....	10
1.3.1 Struktur von ANXA2.....	11
1.3.2 Komplex aus ANXA2 und P11.....	13
1.3.3 Lokalisation von ANXA2 in der Niere.....	16
1.4 Fragestellung und methodischer Ansatz.....	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Tierexperimentelle Arbeiten.....	19
2.1.1 Versuchstiere und Behandlung.....	19
2.1.2 Brattleboro Ratten.....	19
2.2 Organentnahme und Gewebepräparation.....	20
2.2.1 Perfusionsfixierung und Gewebeaufbereitung für Immunhistochemie.....	20
2.2.1.1 Herstellung von Kryostatschnitten.....	20
2.2.1.2 Herstellung von Paraffinschnitten.....	21
2.2.2 Gewebeaufbereitung für biochemische Analysen.....	21
2.2.2.1 Gewebeaufbereitung zur Genexpressionsanalyse.....	21
2.2.2.2 Gewebeaufbereitung für Immunpräzipitation und <i>Lipid Raft</i> -Präparation.....	21
2.3 Proteinanalytische Methoden.....	22
2.3.1 Immunhistochemie.....	22
2.3.2 Immunzytochemie.....	22

2.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie	23
2.3.3.1 Ultrastrukturelle Analyse der <i>Lipid Rafts</i>	23
2.3.3.2 Präparation von Plasmamembran- <i>Sheets</i> und Immunogoldmarkierung	23
2.3.4 Separation von Zytosol und Plasmamembran	24
2.3.5 <i>Lipid Raft</i> -Präparation	25
2.3.6 Immunpräzipitation	25
2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	26
2.3.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der BCA-Methode.....	26
2.3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.3.7.3 Coomassie-Färbung.....	27
2.3.7.4 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988)	28
2.3.7.5 Immunblotting	28
2.3.8 Massenspektrometrische Analyse	29
2.3.9 Expression und Affinitätschromatographie von GST-Fusionsproteinen	30
2.3.10 <i>Peptid Spot Array</i>	31
2.3.10.1 Proteolytische Spaltung und Säulen-Chromatographie von Fusionsproteinen	31
2.3.10.2 Herstellung und Durchführung der <i>Peptid Spots</i>	31
2.3.11 GST- <i>Pulldown</i>	32
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.4.1 Genexpressionsanalyse.....	32
2.4.1.1 RNA-Isolation mittels Trizol	32
2.4.1.2 cDNA Synthese mittels Reverser Transkription	33
2.4.1.3 Quantitative <i>Real-Time</i> PCR mit EvaGreen®	33
2.4.2 Klonierung.....	34
2.4.2.1 Klonierungs-PCR	34
2.4.2.2 Kolonie-PCR	36
2.4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	37
2.4.2.4 Restriktionsverdau.....	37
2.4.2.5 Ligation	38
2.4.2.6 Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock.....	38
2.4.2.7 Präparation der Plasmid-DNA und Sequenzierung.....	39
2.5 Zellkultur und Transfektion	39
2.5.1 Zelllinien	39

2.5.2 Transfektion von Expressionsplasmiden.....	39
2.5.3 RNA-Interferenz.....	40
2.5.4 Stimulation der Zellen.....	40
2.5.4.1 Hypotonischer Chloridmangel-Stress	40
2.5.4.2 Behandlung mit PMA und Dynasore	41
2.5.5 Biochemische Aufbereitung der Zellkultur.....	41
2.6 Statistik.....	41
2.7 Material	41
2.7.1 Antikörper	41
2.7.2 Enzyme und zugehörige Agenzien.....	43
2.7.3 Kits	43
2.7.4 Chemikalien und Reagenzien.....	43
2.7.5 Materialien und Chemikalien der Zellkultur.....	45
2.7.6 Verbrauchsmaterial	45
2.7.7 Geräte	46
2.7.8 Software	47
3 Ergebnisse	48
3.1 NKCC2 als <i>Lipid Raft</i> -Protein –Assoziation mit Flotillin-1 und THP	48
3.2 Identifikation von ANXA2 als möglichen Interaktionspartner von NKCC2 in <i>Lipid Rafts</i>	50
3.2.1 Etablierung und Validierung der NKCC2-Immunpräzipitation.....	51
3.2.2 Massenspektrometrie der NKCC2-Immunpräzipitate.....	52
3.3 Verifikation der Interaktion zwischen ANXA2 und NKCC2	55
3.3.1 Lokalisation von ANXA2 und NKCC2 im TAL und der MD.....	55
3.3.2 Lokalisation von ANXA2 und P11 in NKCC2-positiven <i>Lipid Rafts</i>	58
3.3.3 Protein-Protein-Interaktion zwischen ANXA2 und NKCC2	60
3.3.3.1 <i>Pulldown Assay</i>	61
3.3.3.2 <i>Peptid Spot Array</i>	62
3.4 Brattleboro Ratten	65
3.4.1 Translokation von ANXA2, P11 und NKCC2 zur apikalen Plasmamembran unter Behandlung mit dDAVP	65
3.4.2 Interaktion zwischen ANXA2 und pNKCC2 unter Behandlung mit dDAVP	69
3.4.3 Assoziation von ANXA2 und NKCC2 mit cholesterinreichen Membranmikrodomänen unter Behandlung mit dDAVP	71

3.4.4 ANXA2 Expression in der äußeren Medulla von Brattleboro Ratten.....	73
3.5 Funktionelle Analyse der Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2	74
3.5.1 Stimulation von NKCC2 unter Chloridmangel.....	74
3.5.1.1 Überexpression von ANXA2 und P11	74
3.5.1.2 ANXA2-Knockdown mittels RNA-Interferenz	79
3.5.2 Stimulation von ANXA2 mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und Hemmung der Endozytose	82
4 Diskussion	86
4.1 NKCC2 ist ein in spezifischen <i>Lipid Rafts</i> angereichertes Protein.....	86
4.2 NKCC2 interagiert direkt mit dem <i>Scaffold</i> -Protein ANXA2 in <i>Lipid Rafts</i>	88
4.3 Funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2.....	92
4.4 Schlussfolgerung	94
5 Zusammenfassungen.....	98
5.1 Zusammenfassung.....	98
5.2 Summary	100
6 Literatur- und Quellenverzeichnis	VIII
7 Abbildungsverzeichnis	XX
8 Tabellenverzeichnis.....	XXII
Selbstständigkeitserklärung	XXIII

Abkürzungsverzeichnis

A ₅₆₀	Absorption bei 560 nm
A	Alanin
AMPK	<i>5'-AMP-activated protein kinase</i>
ANXA2	Annexin A2
Aqua dest	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BCA	2,2`-Bichinoninsäure
bp	Basenpaar(e)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Research Tool</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CHCA	α -cyano-4-Hydroxizimtsäure
CTX	Cortex, Rinde
D	Asparaginsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dDAVP	1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin (Desmopressin)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleotid(e)
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F-Aktin	filamentöses Aktin
FKS	fötales Kälberserum
fwd	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
Hek293	<i>Human embryonic kidney cells</i>
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G, Gammaglobulin
IM	innere Medulla
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted, laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MALDI-TOF/TOF MS	Kombination von MALDI-TOF MS mit MALDI-Lift fragment mass spectrometry
MD	Macula densa

mM	Millimolar
MMDD1	<i>mouse macula densa-derived 1 cells</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NHE3	Natrium-Protonen-Austauscher Typ 3
NKCC2	Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
OM	äußere Medulla
OSRI	<i>Oxidative stress-responsive 1 protein</i>
PBS	Phosphat gepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCSK9	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
P11	S100 Calcium-bindendes Protein A10 (S100A10)
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
qPCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
raTAL	<i>rat medullary thick ascending limb cells</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
ROMK	renaler Kalium-Kanal (<i>Renal outer medullary potassium channel</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Gelelektrophorese in SDS-haltigem Polyacrylamid
SPAK	<i>STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase</i>
T	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	dicke aufsteigende Henle`Schleife (<i>Thick ascending limb</i>)
TBS	Tris buffered saline
TEA	Trisethanolamin
TI	Triton [®] X-100 lösliche Membranfraktion
TFA	Trifluoressigsäure
THP	Tamm-Horsfall Protein (Uromodulin)
TS	Triton [®] X-100 unlösliche Membranfraktion (<i>Lipid Rafts</i>)
U	Unit
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v/v	<i>volume/volume</i> Verhältnis
WNK-Kinase	<i>With-No-Lysine Kinase</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> Verhältnis
Y	Tyrosin
Zyt	Zytosol

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktionen der Niere

Die Niere gilt als ein lebenswichtiges Ausscheidungsorgan des Körpers (Lüllmann-Rauch, 2009). Vor allem harnpflichtige Substanzen und körperfremde Stoffe wie Pharmaka werden über die Niere ausgeschieden. Zugleich ist die Niere an der Regulation des Wasser-, Säure-Basen- und Elektrolythaushalts im Körper beteiligt. Sie sorgt somit trotz sich ständig ändernder äußerer Bedingungen für die Homöostase des Volumens und der extrazellulären Osmolarität (Lüllmann-Rauch, 2009; Schiebler, 2005; Sobotta et al., 2009). Zudem kontrolliert sie den arteriellen Blutdruck und hält den pH-Wert des Blutes im Normalbereich aufrecht. Weiterhin verfügt die Niere über endokrine Funktionen durch die Bildung verschiedener Hormone und Gewebefaktoren wie Renin, Calcitriol, Erythropoetin sowie den Prostaglandinen und ist gleichzeitig der Abbauort von Peptidhormonen (Klinke et al., 2010; Sobotta et al., 2009).

Das Nierenparenchym wird in unterschiedliche Zonen eingeteilt: die außen gelegene, dunkel gefärbte Nierenrinde (Cortex) und das innere, in 7 bis 9 Pyramiden angeordnete, hellere Nierenmark (Medulla), welches nochmals in eine äußere und innere Medulla untergliedert wird. Die Grenzen zwischen den einzelnen Zonen werden durch die unterschiedlichen Tubulusabschnitte der Nephrone, den eigentlichen Funktionseinheiten der Niere, gebildet, wobei jede Niere ungefähr 1,2 Millionen dieser Einheiten besitzt (Lüllmann-Rauch, 2009; Sobotta et al., 2009). Das Nephron selbst besteht aus dem Nierenkörperchen (Glomerulus mit umgebender Bowman-Kapsel) und dem sich daran anschließenden unverzweigten Tubulusapparat, der in ein Sammelrohr mündet (Schiebler, 2005). In den Nierenkörperchen findet die Ultrafiltration des Blutplasmas statt, wobei täglich durchschnittlich 180 Liter Primärharn (Glomerulusfiltrat) gebildet werden (Briggs et al., 2001; Sobotta et al., 2009). Dabei verfügt die großen- und ladungsselektive glomeruläre Filtrationsbarriere, die Blut-Harn-Schranke, über eine hohe Permeabilität für Wasser und darin gelöste niedermolekulare Bestandteile, wohingegen Bestandteile mit einer Größe über 70 kDa zurückgehalten werden (Chang et al., 1975a; Chang et al., 1975b; Ozgo et al., 2009). Dadurch verbleiben die Blutzellen und ein Großteil der Proteine im Blut. Aus dem Kapselraum gelangt der Primärharn in das Tubulussystem. Ein Nierentubulus ist aus folgenden hintereinandergeschalteten Segmenten aufgebaut: dem proximalen Tubulus, der dünnen ab-

und aufsteigenden Henle-Schleife, der dicken aufsteigenden Henle-Schleife, der Macula densa, dem distalen Tubulus und dem Verbindungstubulus, der schließlich zusammen mit 7 bis 9 weiteren Nephronen im Sammelrohrsystem, bestehend aus einem kortikalen und einem medullären Abschnitt, mündet (Kriz and Bankir, 1988; Lüllmann-Rauch, 2009; Sobotta et al., 2009). Während der Passage der Nierentubuli wird der Primärharn, der über den gleichen Gehalt an niedermolekularen Substanzen wie das Blutplasma verfügt, durch sequentielle Resorptions- und Sekretionsvorgänge zum Endharn aufkonzentriert, sodass letztendlich 1-2 Liter/Tag überschüssiges Wasser mit darin enthaltenen niedermolekularen sowie harnpflichtigen Substanzen in das Nierenbecken gelangen und über die ableitenden Harnwege ausgeschieden werden (Klinke et al., 2010; Sobotta et al., 2009). Trotz der hohen Filterleistung werden letztendlich der Blutproteingehalt sowie das zirkulierende Blutvolumen durch die Filterfunktion der Blut-Harn-Schranke und tubuläre Reabsorption aufrechterhalten (Briggs et al., 2001; Klinke et al., 2010).

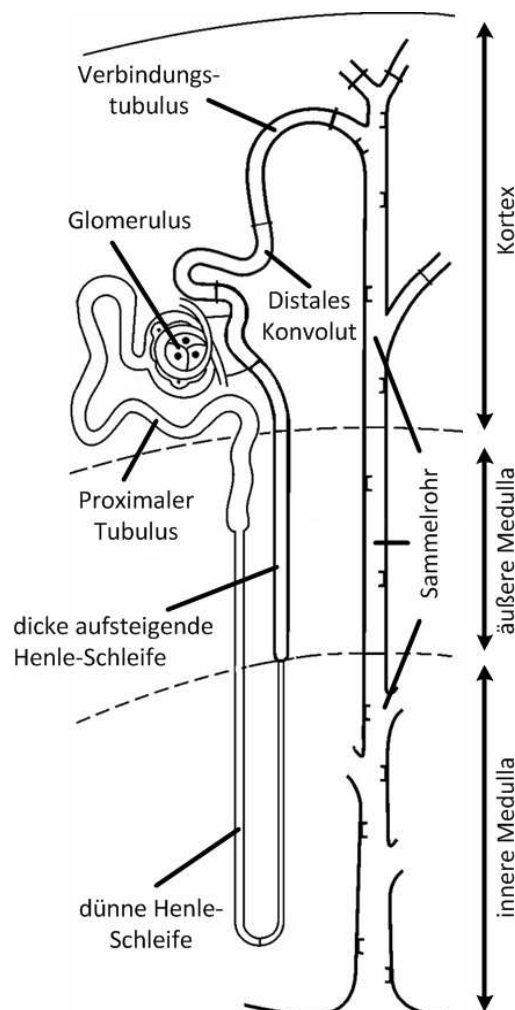


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Säugernephrons.

Darstellung eines Nephrons mit Nierenkörperchen und nachfolgenden Tubulussegmenten sowie deren Lokalisation in den verschiedenen Nierenzonen. Darstellung modifiziert nach Kriz und Bankir (Kriz and Bankir, 1988).

Während der Harnprozessierung sezernieren die Epithelien der Nephronsegmente toxische Substanzen wie Harnstoff, Pharmaka oder Xenobiotika in die Tubulusflüssigkeit. Parallel reabsorbieren die Tubuluszellen einen Großteil des abfiltrierten Wassers (99%) und viele für den Organismus wertvolle Bestandteile des Primärharns, wie Zucker, Aminosäuren und Elektrolyte, die dann dem Blutkreislauf zurückgeführt werden. Dabei werden Elektrolyte und Wasser nach Bedarf reabsorbiert oder sezerniert, um letztendlich die Homöostase des Volumens und der extrazellulären Osmolarität herzustellen (Klinke et al., 2010; Rassow et al., 2012; Sobotta et al., 2009). Da Natrium das Hauptelektrolyt im Extrazellulärraum ist, fungiert sein Gehalt als Stellgröße der Volumenregulation, wobei sowohl positive als auch negative Natriumbilanzen zu Volumenproblemen führen (Luft, 1999). Natrium wird im Nierenkörperchen frei filtriert. Um die Konzentration dieses Elektrolyts und somit das Flüssigkeitsvolumen im Körper konstant halten zu können, muss es innerhalb des Nierentubulus fast vollständig resorbiert werden, sodass die Natriumkonzentration im Endharn gegen Null tendiert (Rassow et al., 2012). Dabei divergieren die Transporteigenschaften jedes einzelnen Tubulusabschnittes für Natrium aufgrund des charakteristischen Vorkommens von verschiedenen Ionenkanälen, Pumpen und Transportern in der apikalen und basolateralen Epithelmembran. Für den Großteil der Rückresorption des filtrierten Natriums sind dabei der Natrium-Protonen-Austauscher Typ 3 (NHE3) und der Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2 (NKCC2) verantwortlich (Rose, 1994). Etwa 65-70% des filtrierten Natriums werden im proximalen Tubulus resorbiert und die Feinregulation der Natriumkonzentration wird durch die Rückresorption im distalen Tubulus und im Sammelrohr bewerkstelligt (Rose, 1994).

1.2 Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2

1.2.1 Wirkungsweise von NKCC2 im Kontext der TAL-Funktion

Die Hauptfunktion der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (*thick ascending limb of the loop of Henle*, TAL) besteht in der Reabsorption von 25% des zuvor glomerulär frei filtrierten Natriumchlorids bei gleichzeitiger Undurchlässigkeit für Wasser. Auf diese Weise kommt es zum Anstieg der Osmolarität im Interstitium der Nierenmedulla sowie zur Verdünnung der Tubulusflüssigkeit (Bennett et al., 1968; Burg, 1976; Russell, 2000). Die Rückresorption von Natriumchlorid erfolgt in zwei Schritten, wobei Natrium-, Kalium- und Chloridionen zunächst über den elektroneutralen Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2 (NKCC2) aus dem Tubuluslumen in die TAL-Zelle transportiert werden. Dabei erfolgt der Transport der Ionen entlang des elektrochemischen Natriumkonzentrationsgradienten. Dieser Gradient wird

durch die in der basolateralen Membran lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase im zweiten Schritt generiert, da sie das intrazelluläre Natrium über die basolaterale Membran nach extrazellulär transportiert (Burg, 1976; Skou, 2004). Parallel verlässt Chlorid basolateral die Zelle über den Chloridkanal ClC-Kb oder im Kcotransport mit Kalium (KCC4) (Kieferle et al., 1994; Kobayashi et al., 2001; Mount and Gamba, 2001). Da die Kaliumkonzentration in der Tubulusflüssigkeit wesentlich geringer ist, wird ein Teil des reabsorbierten Kaliums über den apikalen Kaliumkanal ROMK (*Renal outer medullary potassium channel*) wieder ins Lumen sezerniert (Giebisch, 1993; Wang et al., 1990). Auf diese Weise wird die kontinuierliche Funktion von NKCC2 gewährleistet, da das Fehlen eines Ions den Transportprozess zum Erliegen bringen würde. Die funktionelle Verknüpfung dieser Kanäle, vor allem zwischen NKCC2 und ROMK, ist bedeutend für den Elektrolyt- und Wasserhaushalt (Scheinman et al., 1999).

NKCC2 wird spezifisch im Epithel des TAL und in der Macula densa (MD) exprimiert (Kaplan et al., 1996; Obermuller et al., 1996) und ist nicht nur für die Funktion dieser Nephronsegmente sondern letztlich auch für die Harnkonzentrierung essentiell (Ares et al., 2011; Russell, 2000). In den Zellen der MD wird mit Hilfe von NKCC2 die luminale Chloridkonzentration ermittelt und entsprechend dieser Konzentration werden der Tonus der afferenten glomerulären Arteriole und somit die glomeruläre Filtrationsrate (Briggs and Schnermann, 1987; Thurau and Schnermann, 1965) sowie die Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen reguliert (Schnermann et al., 1976). Dieser tubuloglomeruläre *feedback*-Mechanismus entspricht einer negativen Rückkopplungsschleife, die den quantitativen Natriumchloridtransport zum distalen Nephron stabilisiert, wodurch letztendlich die Ausscheidung von Natriumchlorid reguliert wird (Schnermann and Levine, 2003). Im TAL vermittelt NKCC2 die transepitheliale Reabsorption eines Großteils des zuvor frei filtrierte Chlorids und ist direkt oder indirekt für den gesamten Natriumtransport über die apikale Membran verantwortlich, da letztlich auch der parazelluläre Transport von Natrium, Calcium und Magnesium an die NKCC2-Aktivität gekoppelt ist (Greger, 1985; Hebert and Andreoli, 1986). Die Hemmung von NKCC2 vermindert den ROMK-vermittelten Kaliumtransport in die Tubulusflüssigkeit und führt letztlich zu einer Hemmung der Natriumchlorid Reabsorption und des parazellulären Transports von Calcium und Magnesium (Hebert and Andreoli, 1984; Hebert et al., 1984). Durch das Vorhandensein von NKCC2 in der apikalen Membran dieser polarisierten Zellen und der damit verbundenen Natriumchlorid-Reabsorptionsfähigkeit sowie der Impermeabilität für Wasser ist der TAL ein Schlüsselement der Salz- und Wasserregulation der Niere (Gamba, 2005; Russell, 2000).

Fehlfunktionen in diesem Nephronsegment führen zu signifikanter Polyurie und Dehydratation. Mutationen im NKCC2-kodierenden Gen *Slc12a1* oder ein Defekt an einem an der Natriumchlorid Resorption beteiligten membranständigen Ionenkanals (ROMK, ClC-Kb), die die Funktionsfähigkeit von NKCC2 und damit die Urinkonzentration beeinträchtigen, können sich bei Menschen im Bartter Syndrom manifestieren (Scheinman et al., 1999). Diese autosomal-rezessive Erbkrankheit ist durch einen massiven Elektrolytverlust (Hyponatriämie, Hypochlorämie, Hypokaliämie), metabolische Alkalose und akute Hypovolämie verbunden mit einem niedrigen arteriellen Blutdruck charakterisiert (Bettinelli et al., 1992; Pressler et al., 2006; Simon and Lifton, 1996; Starremans et al., 2003). Im Gegensatz dazu führt eine gesteigerte Aktivität von NKCC2 zu salzsensitivem Bluthochdruck und einem hypertensiven Krankheitsbild (Jung et al., 2011). Trotz der großen Bedeutung von NKCC2 für die Nierenfunktion sind die molekularen Mechanismen der intrazellulären Regulation des Kotransporters, insbesondere die Translokation und die Regulation mittels Protein-Protein-Interaktionen, bis heute kaum verstanden (Gamba, 2005). Um diese Mechanismen aufzuklären, müssen molekulare Determinanten und mit NKCC2 interagierende Proteine identifiziert werden.

1.2.2 Expression, Struktur und Phosphorylierungen von NKCC2

NKCC2 kann in seiner Transportaktivität durch die Schleifendiuretika Bumetanid und Furosemid inhibiert werden (Hannaert et al., 2002) und wird deshalb auch als Bumetanid-sensitiver Kotransporter 1 (BSC-1) bezeichnet. Er gehört zur Superfamilie der elektroneutralen Kationen-gekoppelten Chlorid-Kotransporter (SLC12A) (Russell, 2000). Die Grundstruktur dieses Kotransporters, bestehend aus 1095 Aminosäuren, umfasst einen 174 Aminosäure langen zytoplasmatischen N-Terminus, 12 Transmembrandomänen und eine lange zytoplasmatische C-terminale Region (ca. 470 Aminosäuren) (Abb. 1.2) (Gamba, 2005). Obwohl NKCC2 nur von einem Gen (*Slc12a1*) kodiert wird, entstehen durch die Kombination von unabhängigen alternativen Spleißprozessen mindestens 6 alternative NKCC2-Isoformen, die speziesspezifisch exprimiert werden. Dabei führt das differentielle Spleißen von Exon 4 zu den drei Isoformen A, B und F, die sich in der Aminosäuresequenz der zweiten Transmembrandomäne und in Teilen der anschließenden intrazellulären Schleife von NKCC2 unterscheiden (Igarashi et al., 1995; Payne and Forbush, 1994; Plata et al., 2001). Diese Isoformen divergieren dabei hinsichtlich ihrer Transkriptions- und Translationslevel entlang des TAL sowie in ihrer Ionenaffinität und somit in den Transportcharakteristika (Castrop and Schnermann, 2008; Gimenez et al., 2002; Payne and Forbush,

1994). Der zweite alternative Spleißmechanismus führt zu einem vorzeitigen Stopp-Signal im zytoplasmatischen C-Terminus und somit entsteht eine kurze Isoform von NKCC2 (ca. 770 Aminosäuren), die bisher nur in der Maus nachgewiesen werden konnte (Mount et al., 1999; Plata et al., 1999). Es wird angenommen, dass die unterschiedliche Lokalisation im Nephron sowie die verschiedenen kinetischen Eigenschaften der NKCC2-Isoformen an der Feinregulation der Salzresorption im TAL beteiligt sind (Castrop and Schnermann, 2008).

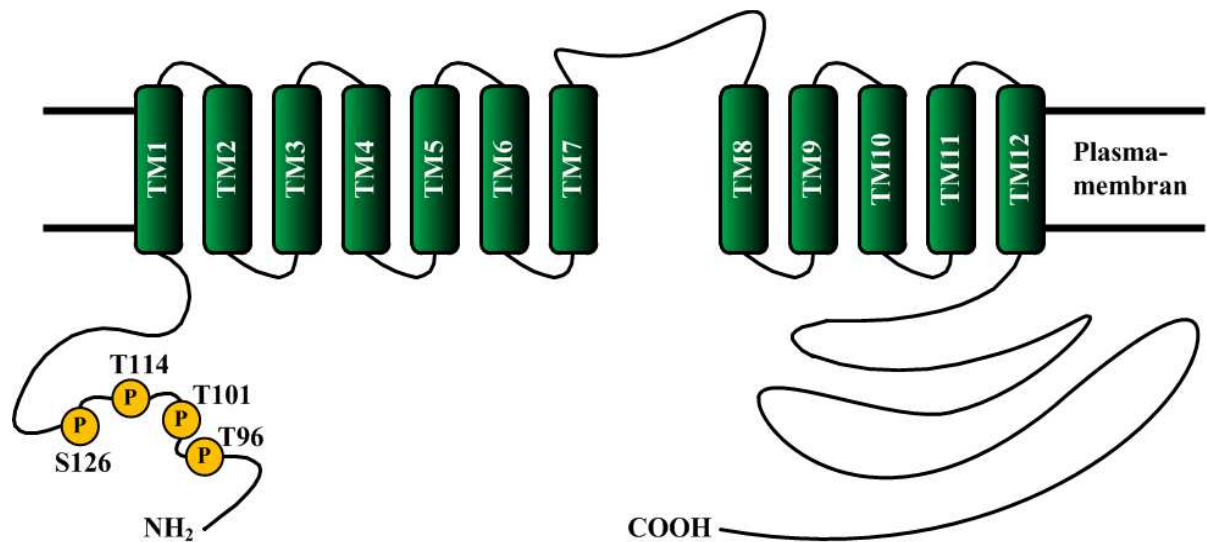


Abbildung 1.2: Schematische Struktur von NKCC2.

Das NKCC2-Protein umfasst 12 Transmembrandomänen (grün) sowie einen zytoplasmatischen N- und C-Terminus. Etablierte Phosphorylierungsstellen sind im Modell des NKCC2-Proteins (Rattensequenz) als gelbe Kreise dargestellt. In Anlehnung an Ares *et al* (Ares et al., 2011).

Der zytoplasmatische C-Terminus von NKCC2 ist in die Reifung des Kotransporters involviert, wobei er eine essentielle Rolle bei der korrekten Expression und Glykosylierung, sowie dem Austritt aus dem endoplasmatischen Retikulum mit der anschließenden Translokation über den Golgi-Apparat zur apikalen TAL-Region spielt (Carmosino et al., 2008; Zaarour et al., 2009). Somit ist er für die Funktion von NKCC2 notwendig. Dennoch befinden sich die meisten der bisher bekannten regulatorischen Phosphorylierungsstellen von NKCC2 im N-Terminus. Diese sind zwischen den verschiedenen Spezies (Mensch, Ratte, Maus) hoch konserviert und bei allen Isoformen von NKCC2 identisch (Abb. 1.3)(Ares et al., 2011; Richardson et al., 2011).

Es handelt sich dabei um die vier Threonine T91, T96, T101 und T114 sowie die zwei Serine S87 und S126 (NKCC2-Sequenz der Ratte; Gimenez and Forbush, 2003; Gimenez and Forbush, 2005; Richardson et al., 2011). Verschiedene Studien zeigten, dass die Phosphorylierung des Threonins T101 und des Serins S126 für die Aktivität von NKCC2 essentiell sind (Ponce-Coria et al., 2008; Richardson et al., 2011). Des Weiteren führt die

gleichzeitige Phosphorylierung von T96, T101 und T114 zu einer Aktivitätssteigerung von NKCC2 (Gimenez and Forbush, 2005) bzw. nicht-phosphomimetische Mutationen resultieren in einer stark verminderten Transportaktivität (Ponce-Coria et al., 2008). Mutationen der anderen beiden Stellen zeigen keine Effekte (Ares et al., 2011; Richardson et al., 2011), deshalb sollen im Folgenden nur vier dieser Stellen näher betrachtet werden (Abb. 1.2 und 1.3).

Außerdem wurde gezeigt, dass die N-terminalen Phosphorylierungen von NKCC2 nicht nur dessen Aktivität, sondern damit verbunden auch seine Translokation zur Plasmamembran regulieren (Gimenez and Forbush, 2003; Gimenez and Forbush, 2005). Diese Ergebnisse suggerieren, dass die Regulation sowie die intrazelluläre Translokation des Kotransporters durch spezifische regulatorische Proteine, die mit seinem N-Terminus interagieren, kontrolliert wird.

NKCC2	96	101	114	126			
Ratte	91- TYYLQ	TFGHN	TMDAVPKIEY	YRNTG	SVSGP	KVNRPS	LQEI -130
Maus	91- TYYLQ	TFGHN	TMDAVPKIEY	YRNTG	SVSGP	KVNRPS	LLEI -130
Human	95- TYYLQ	TFGHN	TMDAVPKIEY	YRNTG	ISGP	KVNRPS	LLEI -134

Abbildung 1.3: Darstellung der Phosphorylierungsstellen im N-Terminus von NKCC2.

Alignment der Aminosäuresequenz im Bereich der regulatorischen Phosphorylierungsstellen im N-Terminus von NKCC2. Die untersuchten Phosphorylierungsstellen (rot) sind in Spezies konserviert. Darstellung in Anlehnung an Ares *et al* (Ares et al., 2011).

1.2.3 Regulation der Aktivität von NKCC2

Die Transportaktivität und Biosynthese von NKCC2 während der Reabsorption von Natriumchlorid im TAL wird durch endo- und parakrine Faktoren beeinflusst (Attmane-Elakeb et al., 2000; Gimenez and Forbush, 2003; Peterson et al., 1993; Wang et al., 2001). Vasopressin, Glukagon, Parathormon, Calcitonin und β -adrenerge Agonisten sind bekannt dafür, dass sie die Reabsorption von Natriumchlorid im TAL über eine Steigerung des intrazellulären cAMP-Gehalts stimulieren (Dublineau et al., 1992; Greger, 1985; Hebert and Andreoli, 1984).

Das am besten untersuchte stimulatorische Hormon ist Vasopressin (AVP, antidiuretisches Hormon), das aus der Neurohypophyse über das Blutgefäßsystem in die Niere gelangt und dort die Rückgewinnung von Wasser durch einen Anstieg der Osmolarität im Interstitium der Nierenmedulla bewirkt (Gegenstromprinzip), wodurch letztlich der Urin konzentriert wird (Hebert et al., 1981a; Hebert et al., 1981b; Hebert et al., 1981c; Knepper et al., 1999). Die Wirkungsweise von Vasopressin wird über V2-Rezeptorbindung vermittelt (Mutig et al., 2007) und führt im TAL über eine Signalkaskade aus G-Protein, Adenylatzyklase VI, cAMP-

Freisetzung und Proteinkinase A innerhalb kürzester Zeit zur Stimulation der NKCC2-Transportaktivität durch Phosphorylierung der regulatorischen Stellen (Amlal et al., 1996; Gimenez and Forbush, 2003; Lolait et al., 1992; Meade et al., 2003; Mutig et al., 2007). Außerdem bilden sich wahrscheinlich makromolekulare Komplexe aufgrund von Interaktionen mit dem Zytoskelett und Adapter- sowie Gerüstproteinen (Bacic et al., 2004). Darüberhinaus bewirkt die kurzzeitige Stimulation mit Vasopressin eine gesteigerte apikale Oberflächenexpression des Kotransporters. Dabei werden subapikal angereicherte NKCC2-tragende Vesikel zur luminalen Membran transportiert und in die Plasmamembran inseriert, wobei sich NKCC2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen (*Lipid Rafts*) anreichert (Gimenez and Forbush, 2003; Meade et al., 2003; Nielsen et al., 1998; Welker et al., 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Langzeitstimulation mit Vasopressin sogar die Neusynthese von NKCC2 in TAL-Zellen steigert (Kim et al., 1999).

Neben Vasopressin können auch Hypotonizität und Chloridmangel die Aktivität von NKCC2 regulieren, indem zunächst der WNK-SPAK-OSR1-Signalweg aktiviert und dadurch die Phosphorylierung der konservierten regulatorischen Stellen im N-Terminus des Kotransporters gesteigert wird (Gimenez and Forbush, 2003; Ponce-Coria et al., 2008; Richardson et al., 2011). Auch in diesem Kontext korreliert die Phosphorylierung von NKCC2 mit dessen Transportaktivität und somit mit seiner Aktivierung.

1.2.4 Verteilung von NKCC2 innerhalb der Zelle

Der funktionelle Anteil der meisten Transmembranproteine sowie deren Vorkommen in der Plasmamembran werden durch die Balance zwischen Endo- und Exozytose determiniert, wobei die Proteine aus verschiedenen intrazellulären Pools stammen. Diese dynamischen Prozesse werden unter dem Begriff Translokation zusammengefasst und finden mit Hilfe spezifischer Vesikel (50-100 nm) statt. Auch NKCC2 wird durch Translokationsprozesse reguliert. Dafür spricht, dass der Kotransporter nicht nur in der apikalen Membran lokalisiert ist, sondern auch abundant in intrazellulären Vesikeln vorkommt, die sich im subapikalen Bereich der TAL-Zelle befinden (Nielsen et al., 1998). Dabei sind im Normalzustand 45% des Kotransporters in einer Entfernung von 140 nm zur apikalen Membran lokalisiert (Gimenez and Forbush, 2003). Diese subapikale, in Vesikeln angereicherte Fraktion wird bei Bedarf recycelt. Im Gegensatz dazu haben unter normalen Bedingungen lediglich ca. 5% des Kotransporters Kontakt zum TAL-Lumen (Gimenez and Forbush, 2003; Ortiz, 2006). Zudem unterliegt der membranassoziierte NKCC2-Pool einer ständigen Erneuerung durch

konstitutive Exozytose- und Endozytosevorgänge, wobei diese kontinuierliche Translokation von NKCC2 auf basalem Niveau stattfindet (Caceres et al., 2009).

Dabei ist dieser geringe NKCC2-Anteil, der in der apikalen Membran lokalisiert ist, vergleichbar mit der Verteilung von anderen apikalen Transportern, die ebenfalls mittels Translokation reguliert werden, wie der epitheliale Natriumkanal (EnaC) und der Natrium-abhängige Phosphat-Kotransporter (NaPi2) (Traebert et al., 2001; Valentijn et al., 1998). Diese Verteilung von NKCC2 innerhalb der Zelle dient wahrscheinlich dazu, die Natriumchlorid Reabsorption schnell und effizient durch die Exozytose geringer Mengen des intrazellulären NKCC2-Pools zu steigern. Die Neusynthese des aktiven Kotransporters würde für die Zelle im Vergleich hierzu einen ineffizienten Weg darstellen, um den Salztransport kurzfristig zu erhöhen.

1.2.5 NKCC2 in *Lipid Rafts*

In Vorarbeiten wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Bachmann gezeigt, dass NKCC2 innerhalb der Plasmamembran in sogenannten Lipidmikrodomänen (*Rafts*) lokalisiert ist (Welker et al., 2008). Bei *Lipid Rafts* handelt es sich um spezialisierte dynamische Membranmikrodomänen, die reich an Glykosphingolipiden und Cholesterin sind. Sie zeichnen sich im Gegensatz zum Großteil der Membran durch eine geringe Fluidität und einen höheren Sättigungsgrad der Fettsäuren aus (Simons and Ikonen, 1997). Biochemisch definiert sind sie als detergensresistente Membranmikrodomänen. Sie sind im exoplasmatischen Teil der Lipiddoppelschicht (*Bilayer*) lokalisiert. *Lipid Rafts* dienen als Plattformen, die bei der polaren Anordnung von Membranproteinen sowie deren Interaktionspartnern eine wichtige Rolle spielen (Simons and Toomre, 2000). Sie sind in diverse regulatorische Prozesse wie Signaltransduktionen, Sortierungsprozesse, Recycling und Turnover involviert (Brown, 2006; Lippincott-Schwartz, 2004; Schuck and Simons, 2006). Zudem sind sie bei Proteintranslokationen zwischen dem trans-Golgi-Apparat, exozytotischen Vesikeln sowie den Recycling-Endosomen beteiligt (Helms and Zurzolo, 2004; Lippincott-Schwartz, 2004). *Rafts* und die darin vorkommenden Proteine können beim zellulären Membranumbau mittels Endozytose aus der Plasmamembran entfernt und durch Exozytose in die Doppellipidschicht integriert werden. Auch bei der lateralen Proteindiffusion in der Plasmamembran sind sie von Bedeutung (Inoue et al., 2004).

Die in *Lipid Rafts* inserierten Proteine verfügen entweder über Transmembrandomänen oder sie besitzen einen speziellen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker), der ein Sortierungssignal für die apikale Membran darstellt. Neben NKCC2 sind auch andere renale

transmembrane Ionenporter und Kanäle in *Lipid Rafts* lokalisiert. Das gilt für den mit NKCC2 verwandten renalen Natrium-Chlorid-Kotransporter (NCC), den epithelialen Natriumkanal (EnaC), den Natrium-Protonen-Austauscher (NHE3) und die Natrium-Kalium-Pumpe (Natrium-Kalium-ATPase) (Hill et al., 2002; Li et al., 2001; Murtazina et al., 2006; Shlyonsky et al., 2003; Welker et al., 2007). Des Weiteren akkumulieren einige Proteine in cholesterinreichen Fraktionen und gelten deshalb als *Lipid Raft*-Marker, beispielsweise Flotillin-1 und das Tamm Horsfall Protein (THP) mit seinem GPI-Anker (Bickel et al., 1997; Cavallone et al., 2001; Santamaria et al., 2005). Dabei scheint die Insertion in *Lipid Rafts* nicht nur für die Aktivität und Sortierung von NKCC2 physiologisch bzw. funktionell von Bedeutung zu sein, sondern auch andere Proteine sind in ihrer Funktionalität von der Insertion in Lipidmikrodomänen abhängig (Li et al., 2001; Murtazina et al., 2006; Shlyonsky et al., 2003).

Interessanterweise konnten Welker *et al.* zeigen, dass die Behandlung mit Vasopressin zu einer Anreicherung von NKCC2 in *Lipid Rafts* führt (Welker et al., 2008). Des Weiteren führte eine Cholesterin-Depletion zu einer deutlichen Reduktion der Vasopressin induzierten NKCC2-Aktivität sowie zu einer Verminderung der Translokation des Kotransporters (Welker et al., 2008). Basierend auf diesen Ergebnissen wird angenommen, dass nicht nur die Insertion in *Lipid Rafts* für die Aktivität von NKCC2 notwendig ist, sondern diese Membranmikrodomänen auch verantwortlich für die Rekrutierung von Proteinen sind, die mit Membranen interagieren und dadurch die Translokation und die Fusion von NKCC2-tragenden Vesikeln mit der apikalen Plasmamembran vermitteln.

Dennoch sind die präzisen Signalkaskaden, die interagierenden Proteine sowie die einzelnen Translokationsschritte, die die Aktivität und die intrazelluläre Lokalisation von NKCC2 regulieren, bisher noch nicht identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb potentielle regulatorische Interaktionspartner von NKCC2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen untersucht werden, um letztlich die Mechanismen der Oberflächenexpression von dem Kotransporter weiter zu charakterisieren.

1.3 Annexin A2 und P11

In Vorarbeiten in der Gruppe von Prof. Bachmann wurde mit einem *Yeast-2-Hybrid* Verfahren Annexin A2 (ANXA2) als potentieller Interaktionspartner für den N-Terminus von NKCC2 identifiziert. Die Frage, ob ANXA2 tatsächlich mit NKCC2 interagiert und welche Rolle es während der Regulation des Kotransporters bei der Urinkonzentrierung spielt, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.3.1 Struktur von ANXA2

ANXA2 ist eines von derzeit 12 bekannten Mitgliedern der Annexin-Familie, die alle über die Eigenschaft verfügen, calciumabhängig an negativ geladene Membranphospholipide zu binden und dadurch verschiedene membranabhängige Funktionen ausüben (Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 1997; Rescher et al., 2004). Allen Annexinen ist eine konservierte hydrophile C-terminale Kernregion gemeinsam, die in der Regel 30-35 kDa umfasst und aus vier Domänen besteht (ausgenommen Annexin 6 mit acht Domänen) (Liemann and Huber, 1997; Smith and Moss, 1994). Jede dieser Annexin-Domänen ist wiederum aus fünf α -Helices aufgebaut, die über kurze Schleifen verbunden sind (Abb. 1.4) (Liemann and Huber, 1997; Rosengarth and Luecke, 2004). Der C-Terminus beinhaltet die Bindungsstellen für Calcium, Phospholipide und filamentöses Aktin (F-Aktin) (Filipenko and Waisman, 2001; Hayes et al., 2004; Hayes et al., 2009; Raynal and Pollard, 1994).

Im Gegensatz zum C-Terminus ist die N-terminale Domäne für die einzelnen Annexine spezifisch und somit für die unterschiedlichen Bindungseigenschaften mit Liganden und Proteinen, Calciumaffinitäten, Phosphorylierungen und Funktionen der Familienmitglieder verantwortlich (Liemann and Huber, 1997; Raynal and Pollard, 1994). Posttranslationale Modifikationen der 34 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Domäne von ANXA2 wie Serin- und Tyrosin-Phosphorylierungen und Acetylierungen stellen wichtige Regulationsmechanismen der Funktion von ANXA2 dar (Becker et al., 1990; Gerke et al., 2005; Gould et al., 1986; Jost and Gerke, 1996). Zusätzlich bilden die ersten 12 Aminosäuren des N-Terminus eine amphiphatische α -Helix, die für die Interaktion mit P11 (S100A10) verantwortlich ist (Becker et al., 1990; Johnsson et al., 1988). ANXA2 ist aufgrund seiner Struktur sowie seiner Eigenschaften in verschiedene membranabhängige Prozesse involviert, wie Interaktionen zwischen Membran und Zytoskelett, Regulation des Ionentransports durch Membranen, Exozytose und Endozytose sowie Translokation von Vesikeln (Filipenko and Waisman, 2001; Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 2002; Liu et al., 1997; Rescher and Gerke, 2004). Weiterhin vermittelt es die Fusionen von Membranen, indem sie zueinander in räumliche Nähe gebracht werden (Gerke and Moss, 2002; Rescher and Gerke, 2004).

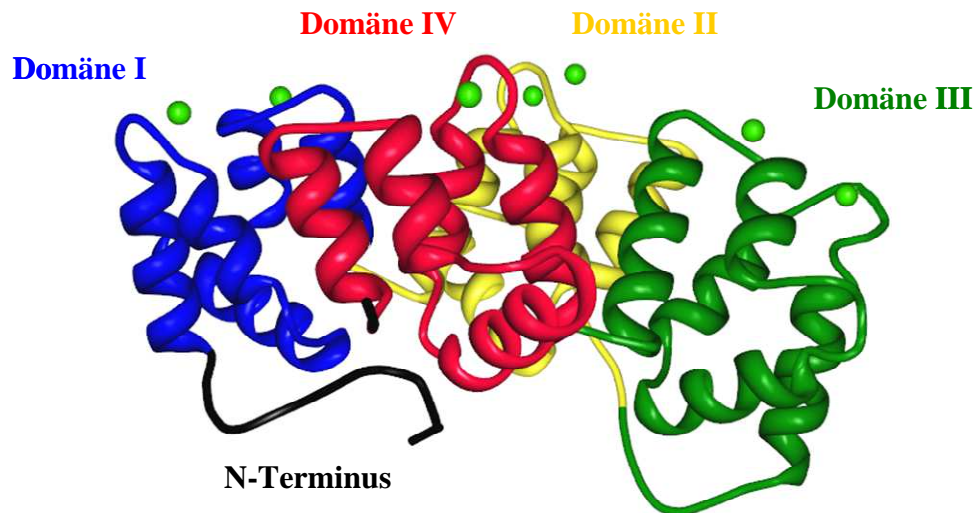


Abbildung 1.4: Kristallstruktur von ANXA2 mit gebundenen Calciumionen.

Strukturmodell des humanen ANXA2, in dem die vier Kerndomänen in unterschiedlichen Farben dargestellt sind. Jede Domäne besteht aus fünf α -Helices, die über kurze Schleifen verbunden sind. Der N- sowie der C-Terminus des Moleküls sind schwarz und die gebundenen Calciumionen als grüne Kreise gekennzeichnet. Darstellung verändert nach Rosengarth und Luecke (Rosengarth and Luecke, 2004).

ANXA2 liegt bei geringem intrazellulärem Calciumgehalt vorwiegend im Zytoplasma gelöst vor. Unter diesen Bedingungen bindet nur eine kleine ANXA2-Fraktion calciumunabhängig über eine spezifische Sequenz im N-Terminus an cholesterinreiche Membranmikrodomänen (Abb. 1.5A) (Gerke and Moss, 2002; Rescher and Gerke, 2004). Bei ansteigender intrazellulärer Calciumkonzentration werden die Calciumbindungsstellen im C-Terminus von ANXA2 besetzt (Gerke and Moss, 2002; Raynal and Pollard, 1994). Aktiviert durch das Calcium transloziert ANXA2 zur Membran (Gerke and Moss, 2002). Dabei vermittelt das gebundene Calcium dann die effiziente Bindung der Kernregion von ANXA2 an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Phospholipide, also an die Plasmamembran, Zellkompartimente oder Vesikel (Swairjo et al., 1995; Swairjo and Seaton, 1994). Die Menge an membrangebundenem ANXA2 steigt signifikant in Anwesenheit von Calcium, was wahrscheinlich zu einer dichten Gruppierung von ANXA2-Molekülen an der Membran führt (Abb. 1.5B) (Taveau et al., 1997). Auf diese Weise können einige Membrandomänen bzw. -ordnungen stabilisiert werden. ANXA2 bindet dabei bevorzugt an mit Cholesterin und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat angereicherte Membranmikrodomänen, sogenannte *Lipid Rafts* (Ayala-Sanmartin et al., 2001; Hayes et al., 2004; Rescher et al., 2004; Valapala and Vishwanatha, 2011). Zudem ist ANXA2 in die Formation von *Lipid Rafts* involviert, beeinflusst deren Dynamik und verbindet sie mit Zytoskelett- und Gerüst-Proteinen

(Babiychuk and Draeger, 2000; Chintagari et al., 2006; Domon et al., 2012; Harder et al., 1997; Oliferenko et al., 1999). Der exponierte N-Terminus von ANXA2 ist in die calciumvermittelte Bindung zwischen der Kerndomäne und der Membran nicht involviert und steht somit für weitere Interaktionen zur Verfügung, unter anderem für die Bindung von frei im Zytoplasma lokalisierten Proteinen wie P11 oder für die Interaktion mit Transmembranproteinen (Huang et al., 2004; Johnsson et al., 1990; Mayer et al., 2008). Zudem kann der N-Terminus von ANXA2 zusätzlich zur Kerndomäne ebenfalls mit einer Membran interagieren, wodurch die beiden gebundenen Membranen aggregiert werden würden und so eine anschließende Fusion eingeleitet werden könnte (Zibouche et al., 2008).

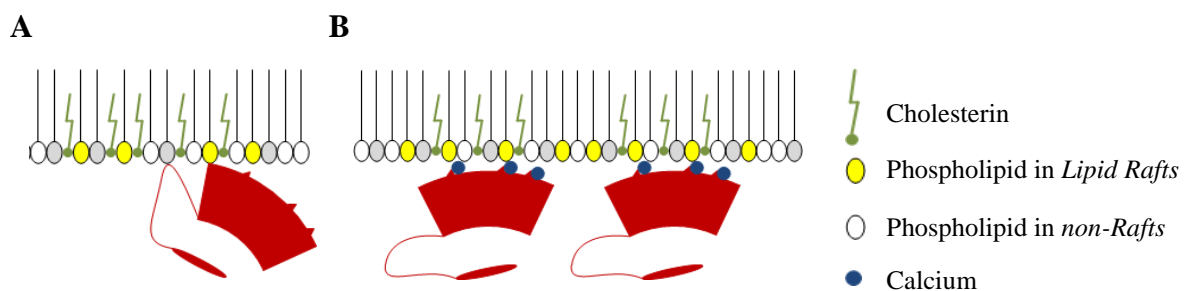


Abbildung 1.5: Modell der calciumunabhängigen und calciumabhängigen Interaktion von ANXA2 mit Membranen.

(A) In Abwesenheit von Calcium wird die Bindung von ANXA2 (rot) an die Membran über eine spezifische Sequenz im N-Terminus des Proteins und einen hohen Gehalt an Membran-Cholesterin (*Lipid Rafts*) vermittelt. (B) Mit Erhöhung des intrazellulären Calciumgehalts, steigt die Menge an membrangebundenem ANXA2 signifikant, wobei die Membranaffinität der Kerndomäne von ANXA2 calciumabhängig zunimmt. Der N-Terminus von ANXA2 ist für Interaktionen mit den entsprechenden Liganden frei. Abbildung modifiziert nach Gerke und Moss (Gerke and Moss, 2002).

1.3.2 Komplex aus ANXA2 und P11

Das Protein P11, auch als Protein S100A10 oder Annexin 2 light chain bezeichnet, ist ein bekannter Bindungspartner von ANXA2 (Rescher and Gerke, 2008; Waisman, 1995). P11 gehört zur S100-Proteinfamilie, die die größte Gruppe innerhalb der EF-Hand Superfamilie von calciumbindenden Proteinen darstellt (Rescher and Gerke, 2008). Die Mitglieder der S100-Familie sind 10-15 kDa kleine Polypeptide, die im N- und C-Terminus jeweils eine EF-Hand-ähnliche Calciumbindungsstelle besitzen, die wiederum durch eine strukturlose Verbindungsregion getrennt sind (Harder et al., 1992). Die Bindung von Calcium führt durch eine Konformationsänderung der meisten S100-Proteine zu deren Aktivierung und ermöglicht gleichzeitig die Interaktion mit Zielproteinen. Demnach werden die S100-Proteine als Signalegeber betrachtet, die als Reaktion auf steigende intrazelluläre Calciumkonzentrationen zelluläre Zielproteine binden und deren Aktivität regulieren. Im Gegensatz dazu befindet sich P11 aufgrund von Mutationen innerhalb der Calcium-Bindedomäne permanent in einem

aktivierten Zustand. Somit ist P11 in der Lage calciumunabhängig und ohne Konformationsänderung an seine Effektorproteine zu binden (Donato, 2001; Kube et al., 1992; Rety et al., 1999).

In der Zelle liegen S100-Proteine typischerweise in dimerisierter Form als Homo- oder Heteromer vor. Ein P11-Homodimer verfügt über zwei identische ANXA2-Bindungsstellen, sodass ein Komplex gebildet werden kann, in dem ein zentrales P11-Dimer mit zwei ANXA2-Molekülen interagiert (Abb. 1.6) (Lewit-Bentley et al., 2000; Sopkova-de Oliveira Santos et al., 2000). Auf diese Weise entsteht ein symmetrisches Heterotetramer, durch das das zytosolische P11, das selbst über keine membranbindenden Eigenschaften verfügt, an Membranen gekoppelt werden kann (Zobiack et al., 2001). Dieser Mechanismus erfolgt annähernd calciumunabhängig, da die Bindung von P11 die Calciumabhängigkeit für eine effiziente ANXA2-Membranbindung auf mikromolare Calciumlevel herabsetzt (Gerke et al., 2005; Waisman, 1995). Somit steigert P11 die Membranaffinität von ANXA2, wobei die eigentliche Bindung an die Phospholipide über ANXA2 vermittelt wird. ANXA2 assoziiert dabei vorwiegend mit dem zytosolischen Blatt der Membranen (Rescher and Gerke, 2004).

Die Membranbindung des Heterotetramers kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen (Abb. 1.6) (Fritz et al., 2010; Rescher and Gerke, 2008). Zum einen können beide ANXA2-Untereinheiten an die kontinuierliche Membran eines Kompartiments binden. Auf diese Weise kann P11 mit weiteren Bindungspartnern interagieren und fungiert als Brücke, indem es Transmembranproteine wie einige Ionenkanäle der Plasmamembran mit dem phospholipidgebundenem ANXA2 koppelt (Abb. 1.6A) (Menke et al., 2004; Rescher and Gerke, 2008). Dabei korreliert die Bindung der P11-Untereinheit mit dem Einbau dieser Proteine in die Plasmamembran. Das P11-Dimer interagiert beispielsweise mit den membrangebundenen epithelialen Calciumkanälen TRPV5 und TRPV6 sowie dem Natriumkanal Nav 1.8 über eine zytoplasmatische Domäne dieser Proteine, wobei die Bindung zwischen ANXA2 und P11 nicht beeinflusst wird (Foulkes et al., 2006; Okuse et al., 2002; Poon et al., 2004; van de Graaf et al., 2003). Auf diese Weise kann ANXA2 innerhalb des ANXA2-P11-Kanalkomplexes mit Phospholipiden interagieren, wodurch der Transport des gebundenen Transmembranproteins zur Plasmamembran vermittelt wird (Rescher and Gerke, 2004). Diese Interaktion kann eine Rolle innerhalb des Biosyntheseweges spielen oder während des Recyclings der Kanalproteine unter Einbindung endosomaler Recyclingorganellen zum tragen kommen. Bei der zweiten Variante bindet jede ANXA2-Untereinheit des Tetramers über seine Kerndomäne an eine andere Membran. Auf diese Weise gelangt P11 in das Zentrum des Komplexes und bringt die Membranen in räumliche

Nähe zueinander (Abb. 1.6B) (Lambert et al., 1997). Dabei interagiert ANXA2 aber nicht als Fusionsprotein. Diese Funktion wird wahrscheinlich von SNARE-Proteinen übernommen (Creutz et al., 1978).

Neben der Bindung an negativ geladene Membranphospholipide bindet ANXA2 als Monomer oder in Form des Heterotetramers calciumabhängig an Zytoskelettelemente, beispielsweise filamentöses Aktin (F-Aktin) (Filipenko and Waisman, 2001; Gerke and Weber, 1984; Ikebuchi and Waisman, 1990). Es kann die Formation sogenannter Aktin *comets* regulieren, die neu gebildete Endozytosevesikel von der Zellmembran ins Zellinnere transportieren. Weiterhin ist es notwendig für die Bildung von aktinreichen Komplexen, die in die Abschnürung von Membranen und den anschließenden Transport involviert sind (Merrifield et al., 2001; Morel et al., 2009). Auf diese Weise ist ANXA2 mit dynamischen Membran-Zytoskelettstrukturen assoziiert und spielt eine Rolle bei Vesikelfusionen sowie deren Abschnürungen (Merrifield et al., 2001). Der aktinabhängige Transport sekretorischer Vesikel zu *Lipid Rafts* in der apikalen Membran wird in epithelialen Zellen ebenfalls über ANXA2 vermittelt (Jacob et al., 2004). Zusammenfassend fungiert ANXA2 als Gerüstprotein, das das Aktinzytoskelett mit verschiedenen Membranmikrodomänen verknüpft und es rekrutiert verschiedene Faktoren für Aktin-Umbauprozesse (Bharadwaj et al., 2013).

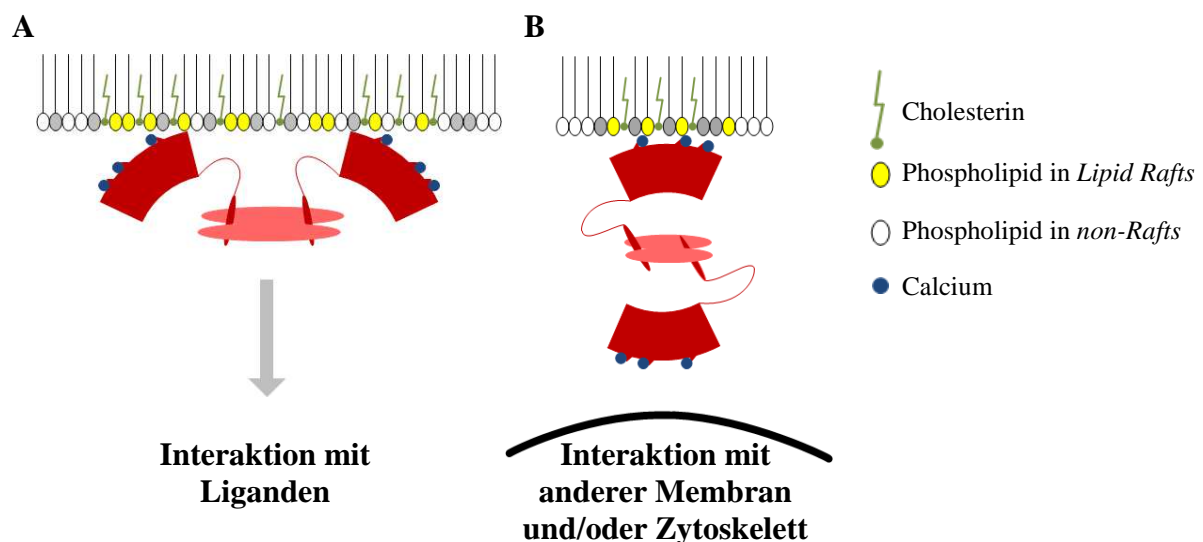


Abbildung 1.6: Modell des ANXA2-P11-Tetramers sowie dessen Bindung an Membranen.

Mögliche Konfigurationen des membrangebundenen ANXA2-P11-Komplexes, wobei (A) zum einen beide ANXA2-Untereinheiten (rot) über ihre Kerndomäne an dieselbe Membran binden. P11 (rosa) ist frei und könnte mit anderen Liganden interagieren. (B) Zum anderen können die beiden ANXA2-Moleküle an verschiedene Membranen binden. Auf diese Weise werden die Membranen in räumliche Nähe gebracht und die Fusion könnte vermittelt werden. Bevorzugterweise bindet ANXA2 an Membranbereiche mit einem hohen Gehalt an Cholesterin und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (*Lipid Rafts*). Abbildung in Anlehnung an Rescher und Gerke (Rescher and Gerke, 2008).

Zusammenfassend ist bekannt, dass ANXA2 an verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist, die verschiedene Membranprozesse regulieren, beispielsweise Membran-Zytoskelett-Interaktionen, Translokationen von Vesikeln sowie den darin befindlichen Proteinen und die Aggregation von Vesikeln an Membrankompartimente, wobei schließlich die Fusion der Membranen vermittelt wird (Gerke and Moss, 2002; Rescher and Gerke, 2004; Tamma et al., 2008). Dabei interagiert ANXA2 entweder in Form eines Monomers und bindet über seinen N-Terminus direkt an Effektorproteine oder es liegt in einem heterotetrameren Komplex mit einem P11-Dimer vor, wobei P11 die Zielproteine bindet und sie dadurch mit der ANXA2-Untereinheit verbindet (Gerke and Weber, 1985; Glenney and Tack, 1985; Rescher and Gerke, 2008). Basierend auf diesen Charakteristika wird angenommen, dass ANXA2 die Translokation seiner interagierenden Proteine zu deren Zielmembranen reguliert. Entsprechend dieser Modelle könnte ANXA2 direkt oder indirekt über P11 mit NKCC2 interagieren und aufgrund dessen an der Translokation von NKCC2 zur Plasmamembran beteiligt sein.

1.3.3 Lokalisation von ANXA2 in der Niere

Die Lokalisation von ANXA2 wurde mittels Immunhistochemie an humanen sowie an Rattennieren durch diverse Arbeiten beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass es in Zellen verschiedener renaler Tubulusabschnitte exprimiert wird (Abb. 1.7). Im Cortex waren vor allem die Glomeruli stark positiv für ANXA2. Daneben zeigten die MD und der distale Tubulus nur eine geringe Immunreaktivität. In der Medulla konnte ANXA2 in der dünnen Henle-Schleife sowie der dicken aufsteigenden Henle-Schleife und in den Hauptzellen des Sammelrohrs detektiert werden (Kaminski, 2012; Tamma et al., 2008; van de Graaf et al., 2003). Zudem konnte ANXA2 in allen Gefäßendothelien der Niere mit Ausnahme der *Venae arcuatae* und *Vena interlobares* nachgewiesen werden (Hajjar et al., 1996; Hullin et al., 1989). In der Niere ist ANXA2 somit weit verbreitet und dient dort unter anderem der Regulation von Translokationsprozessen, Membranorganisation sowie der Epithelpolarität (Markoff and Gerke, 2005).

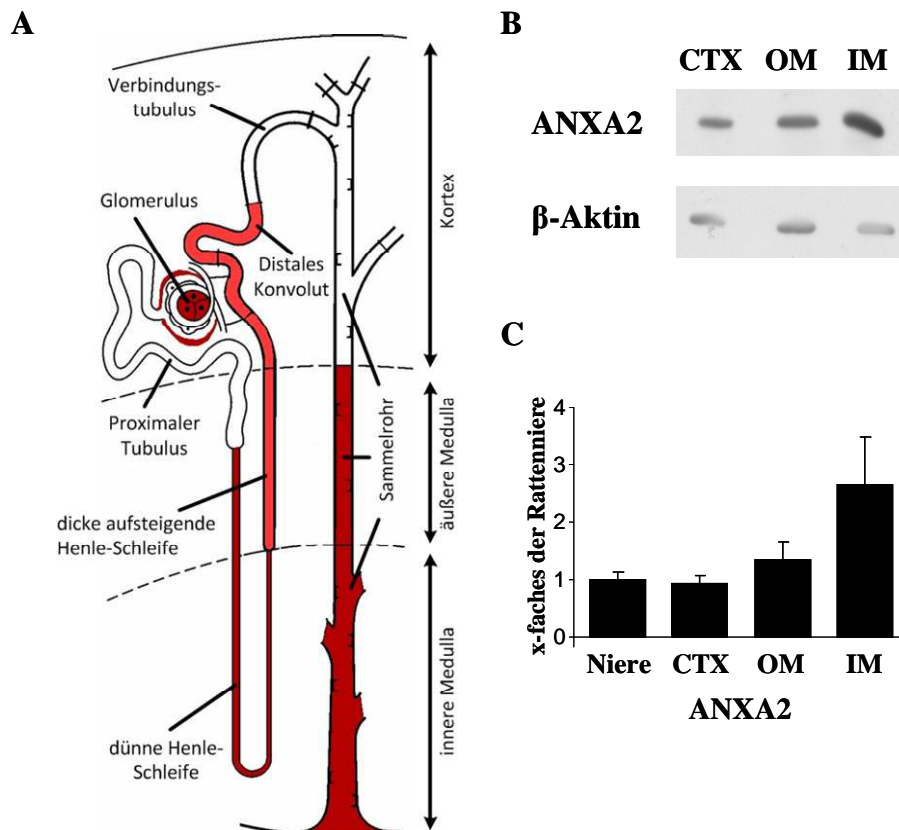


Abbildung 1.7: Expression von ANXA2 in der Niere.

(A) Schema der ANXA2-Lokalisation in den verschiedenen Segmenten des Nephrons, wobei die Farbintensität mit der Proteinexpression von ANXA2 (rot) korreliert. Darstellung modifiziert nach Kriz und Bankir (Kriz and Bankir, 1988). (B) Western Blot Analyse bezüglich des Vorkommens von ANXA2 in den verschiedenen Nierenzonen. CTX -Cortex, OM -äußere Medulla, IM -innere Medulla. (C) Expression von ANXA2 in der Gesamtniere von Ratten sowie in den Nierenzonen.

1.4 Fragestellung und methodischer Ansatz

Die dicke aufsteigende Henle-Schleife (TAL) der Niere spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Natriumchlorid Homöostase. Dieses Nephronsegment reabsorbiert 25-30% des filtrierten Natriumchlorids und erzeugt dadurch den kortikomedullären osmotischen Gradient, der für die Urinkonzentrierung notwendig ist. Da NKCC2 der bedeutendste apikale Natriumtransporter im TAL ist, führen Defekte dieses Transporters zu Störungen des Urinkonzentrierungsmechanismus.

Seit der Erstcharakterisierung von NKCC2 in der apikalen Membran des TAL haben nachfolgende Untersuchungen gezeigt, dass die Aktivität des Kcotransporters unter anderem durch dessen Insertion in cholesterinreiche Membranmikrodomänen (*Lipid Rafts*) moduliert wird. Zudem ist für die Funktion von NKCC2 dessen Translokation zu seinem Wirkungsort, der apikalen Plasmamembran, essentiell. In diesem Kontext ist bekannt, dass endokrine Faktoren wie Vasopressin sowie ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehalts insbesondere die Zelloberflächenexpression des Kcotransporters und, damit verbunden, seine Translokation

beeinflussen. Jedoch sind die molekularen Mechanismen der beteiligten Signalkaskade sowie die Identität der Interaktionspartner und die Bedeutung der Lipidumgebung in der apikalen Membran bisher unzureichend erforscht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Interaktionspartner von NKCC2 in *Lipid Rafts* zu identifizieren und diese funktionell zu charakterisieren. Für die Suche nach Interaktionspartnern war der zytoplasmatische N-Terminus des Proteins von besonderem Interesse, da diese Region hoch konserviert und bei allen Isoformen identisch ist. Zudem ist diese Domäne wahrscheinlich an der Regulation des Kotransporters durch viele zelluläre Faktoren beteiligt. Mit Hilfe von *Floating Assays* und Immunpräzipitationen sollten NKCC2-angereicherte Membranmikrodomänen zunächst biochemisch charakterisiert werden. Anschließende massenspektrometrische Analysen erfassten die mit NKCC2 in *Lipid Rafts* assoziierten Proteine, die immunhistologisch und biochemisch bestätigt werden sollten. Im weiteren Verlauf sollten zellbiologische und tierexperimentelle Analysen verwendet werden, um die physiologische Relevanz der Interaktionspartner für die Funktion des Kotransporters während der Urinkonzentrierung zu untersuchen. Dazu sollte zum einen betrachtet werden, ob diese Proteine am Translokationsprozess von NKCC2 beteiligt sind und zum anderen, ob sie simultan zu NKCC2 in *Lipid Rafts* angereichert werden.

Die Identifizierung neuer Interaktionspartner und das damit einhergehende tiefere Verständnis der Regulation der NKCC2-Aktivität bei der Urinkonzentrierung ist von großer Bedeutung für die Pathophysiologie von NKCC2-assoziierten Krankheitsbildern und kann für die Entwicklung potenzieller Therapieansätze wichtig sein.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

2.1.1 Versuchstiere und Behandlung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche erfolgten gemäß den Richtlinien des *National Institute of Health* sowie unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden von der LAGESO Berlin genehmigt (Tötungsanzeige T0386/10; Organentnahmeantrag O0124/96 und Tierversuchsantrag G0285/10). Die Haltung der Tiere erfolgte in geschlossenen klimatisierten Räumen bei 22 bis 24°C und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Dabei verfügten die Tiere über freien Zugang zu Wasser und Futter (Standarddiät). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche, circa 12 Wochen alte Tiere mit einem Gewicht von 250 bis 300 g verwendet. Für immunhistologische Darstellungen und biochemische Untersuchungen wurden Sprague-Dawley und Brattleboro Ratten eingesetzt.

2.1.2 Brattleboro Ratten

Brattleboro Ratten entstanden durch eine spontane Mutation im Vasopressingen aus einem Long Evans Inzuchtstamm. Aufgrund dessen können sie kein AVP sezernieren und somit ihren Urin nicht konzentrieren, wodurch sie 10-mal mehr Urin produzieren als die Wildtyp-Ratten (Lee and Williams, 1972; Schmale and Richter, 1984). Heute werden Brattleboro Ratten als ein weit verbreitetes Tiermodell zur Untersuchung des zentralen Diabetes insipidus verwendet. Durch die Gabe des Vasopressin-Analogons Desmopressin (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin (dDAVP)) kann der intakte periphere Signaltransduktionsapparat stimuliert werden (Moses and Coulson, 1980). Aufgrund dieser gezielten Aktivierung der renalen V2-Rezeptor-Signalkaskade wird die Aktivität sowie die apikale Translokation von NKCC2 reguliert (Gimenez and Forbush, 2003; Meade et al., 2003; Welker et al., 2008). Somit stellen Brattleboro Ratten ein geeignetes Modell zur Untersuchung der an dieser Translokation beteiligten Proteine dar.

Die Brattleboro Ratten stammten aus der lokalen Zucht von Dr. Kerim Mutig (Institut für vegetative Anatomie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) und wurden in der Versuchstiereinrichtung der Charité (FEM) unter Standardbedingungen gehalten. Zur Induktion des kurzzeitigen Transports von NKCC2 wurde den Tieren der V2-Vasopressin-Rezeptor Agonist dDAVP (1 µg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Die

Kontrollgruppe erhielt stattdessen 0,9%-ige Kochsalzlösung (Vehikel). 30 min nach der Applikation wurden die Tiere beider Gruppen getötet und die Nieren entweder für molekularbiologische sowie biochemische Analysen entnommen, entkapselt und in innere sowie äußere Medulla und Cortex geteilt oder die Tiere wurden narkotisiert und es erfolgte eine *Aorta abdominalis* Perfusion (Schmitt et al., 2003) zur Fixierung der Nieren für immunhistologische Untersuchungen.

2.2 Organentnahme und Gewebepräparation

2.2.1 Perfusionsfixierung und Gewebeaufbereitung für Immunhistochemie

Zur morphologischen Untersuchung der Nieren wurden Tiere jeder Gruppe einer *Aorta abdominalis* Perfusion unterzogen (Schmitt et al., 2003). Dazu wurden die Tiere zunächst mittels einer intraperitonealen Verabreichung von Nembutal (0,06 mg/g Körpergewicht) anästhesiert. Anschließend wurde der Bauchraum eröffnet, die *Aorta abdominalis* freipräpariert, abgeklemmt und distal der Abgänge der *Arteriae renales* eröffnet. Ein ausgezogener Polyethylenschlauch wurde 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; pH 7,35) eingeleitet. Anschließend erfolgte die eigentliche Fixierung mittels 5-minütiger Perfusion mit 3%-igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS (Fixierlösung) bei einem konstanten Druck von 1,5 m Wassersäule. Die Perfusionsfixierung wurde von Dr. Alexander Paliege durchgeführt.

2.2.1.1 Herstellung von Kryostatschnitten

Perfusionsfixierte Nieren wurden zerteilt und über Nacht bei 4°C in Sucrose-Puffer (800 mosmol; pH 7,4) nachfixiert, um Gefrierartefakte zu verhindern. Anschließend wurden die Kryogewebe in stickstoffgekühltem 2-Methyl-Butan schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für immunhistochemische Analysen wurden mit Hilfe des Kryostaten (Gefriermikrotom Leica CM 3050S; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) 5-7 µm dünne Gefrierschnitte des Kryogewebes angefertigt, auf beschichtete Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet und bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Nachfixierung des perfundierten Gewebes für Paraffinschnitte erfolgte über Nacht bei 4°C in der Perfusionslösung. Bis zur Einbettung wurden die Gewebe in 330 mosmol Sucrose/PBS mit 0,02% (v/v) Natriumazid gelagert. Die automatisierte Paraffineinbettung erfolgte am Institut für Pathologie der Charité Berlin (CCM). Die Paraffingewebe wurden bei 4°C oder 20°C gelagert. Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurde das eingebettete Nierengewebe für mindestens zwei Stunden bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden mit einem Mikrotom (Leica RM 2125RT; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) 4 µm starke Schnitte angefertigt, die bei 37°C im Wasserbad gestreckt und letztlich auf Objektträger aufgezogen wurden.

2.2.2 Gewebeaufbereitung für biochemische Analysen

Für die Präparation der Nieren wurden männliche Brattleboro bzw. Sprague-Dawley Ratten mittels Isofluran betäubt, durch Genickbruch getötet, der Bauchraum der Tiere geöffnet und beide Nieren entnommen. Anschließend wurden die Nierenkapseln entfernt und die medullären sowie kortikalen Anteile unter Eiskühlung präpariert.

2.2.2.1 Gewebeaufbereitung zur Genexpressionsanalyse

Anschließend wurden die so erhaltenen Nierensegmente schockgefroren, in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill feingemahlen und für die RNA-Isolation mit Trizol versetzt.

2.2.2.2 Gewebeaufbereitung für Immunpräzipitation und *Lipid Raft*-Präparation

Nach Aufnahme der medullären Nierensegmente im jeweiligen Puffer erfolgte die Homogenisation mit dem Ultra-Turrax und anschließendem Ultraschall (2x 3 Impulse; Cycle: 70). Zur Entfernung der Zellkerne und nicht lysierter Gewebereste wurden diese durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 800x g und 4°C pelletiert. Der zugleich erhaltene Überstand entsprach dem Proteinlysat und wurde anschließend direkt weiterverwendet (siehe 2.3.5 und 2.3.6).

Immunpräzipitations (IP)-Puffer	TBS (0,075 M Tris Base, 0,44 M Tris HCl, 1,5 M NaCl; pH 7,4) 0,5% (v/v) Tween [®] 20 1x Complete Protease Inhibitor Tablette /50 ml
Homogenisierungspuffer (pH 7,4)	250 mM Sucrose 10 mM Triethanolamin (TEA) 1x Complete Protease Inhibitor Tablette /50 ml

2.3 Proteinanalytische Methoden

2.3.1 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Analysen wurden Paraffinschnitte zunächst in Xylol entparaffiniert. Mittels einer absteigenden Ethanolreihe (100%-70%) wurden die Schnitte rehydriert und für 6 min in Zitratpuffer (0,02M Zitronensäure, 0,09 M Natriumcitrat; pH 6) gekocht, um die Verfügbarkeit der Antigene zu erhöhen. Zum Abkühlen wurden die Schnitte in PBS gestellt.

Dagegen wurden Gefrierschnitte für 30 min in 0,5% (v/v) Triton[®] X-100 in PBS inkubiert, um Lipide zu entfernen und die Plasmamembran zu perforieren, wodurch die Antikörperpenetration erleichtert wird.

Alle Präparate wurden in PBS gewaschen und für 30 min mit Blockiermedium (5% (w/v) Milchpulver in PBS) behandelt, um unspezifische Proteinbindungen und somit Hintergrundsignale zu minimieren. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper entsprechend der ausgetesteten Konzentrationen mit Blockiermedium verdünnt, aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die Gewebeschnitte in PBS gewaschen. Die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Cy2- oder Cy3-konjugiert) wurden ebenfalls in Blockiermedium verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur (RT) auf den Schnitten inkubiert. Die Blaufärbung der Zellkerne erfolgte mittels 10-minütiger Inkubation mit 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI). Anschließend wurden die Präparate erneut mit PBS gewaschen und mit 33% (v/v) PBS /67% (v/v) Glycerin (pH 6,8) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exiter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH), wobei die Schnitte hinsichtlich Signallokalisation und Signalintensität beurteilt worden.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

137 mM NaCl

11,4 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

1,8 mM Kaliumhydrogenphosphat

2.3.2 Immunzytochemie

Zur Fixierung wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen mit 3% (w/v) PFA/PBS für 15 min bei 4°C oder mit eisgekühltem 100%-igem Methanol für 5 min bei -20°C behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5% (v/v) Triton[®] X-100 mit 1% (w/v) Bovinem Serum Albumin (BSA) in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungen durch eine Inkubation mit 1% (w/v) BSA in PBS blockiert. Der

jeweilige Primärantikörper wurde mit Blockiermedium verdünnt, aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurden die in Blockiermedium verdünnten, Cy2- bzw. Cy3-konjugierten Sekundärantikörper, sowie DAPI für 1 h bei RT auf den Zellen inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen mit Hilfe von Fluoromount-G auf Objektträger aufgebracht und nach Trocknung mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exiter analysiert.

2.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

2.3.3.1 Ultrastrukturelle Analyse der *Lipid Rafts*

Die aus den Nierenhomogenaten mittels Dichtegradientenzentrifugation angereicherte *Lipid Raft*-Fraktion wurde pelletiert und mit 3% (w/v) PFA und 0,5% (v/v) Glutaraldehyd über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurde das Pellet mit 330 mosmol Sucrose/PBS mit 0,02% (v/v) Natriumazid (pH 7,4) gewaschen und in 1% Agarose Typ 7 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) eingebettet. Nach der anschließenden Entwässerung mittels Gefriersubstitution erfolgte die Infiltration mit LR White Medium (Electron Microscopy Sciences). Anschließend wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms Ultradünnschnitte angefertigt, die mit spezifischen Primärantikörpern inkubiert wurden. Zur Detektion dieser wurden Gold-gekoppelte (5 nm/10 nm) Sekundärantikörper eingesetzt. Die ultrastrukturelle Analyse erfolgte mit dem Elektronenmikroskop Zeiss EM 906 (Carl Zeiss Jena GmbH).

2.3.3.2 Präparation von Plasmamembran-*Sheets* und Immunogoldmarkierung

Die Präparation von Plasmamembran-*Sheets* dient der Visualisierung von Mikrodomänen in der nativen Zellmembran (Wilson et al., 2004). Letztendlich wird ein zweidimensionales Bild von der zytoplasmatischen Seite der Zelloberfläche erzeugt, das der Untersuchung der Proteinkomposition und -verteilung innerhalb der Plasmamembran dient.

Zunächst wurden konfluente MMDD1 bzw. raTAL Zellen auf Deckgläschen mit 0,5% PFA/PBS für 10 min bei RT präfixiert. Parallel erfolgte die Aktivierung der glimentladenen, kohlebeschichteten *Agar grids* (Square mesh grids G2300N, Agar-Scientific) mittels 30-minütiger Inkubation in 0,8 mg/ml poly-L-Lysin. Danach wurden die Grids kurz in Aqua dest. gespült und luftgetrocknet. Für die anschließende Präparation der Plasmamembran-*Sheets* wurden die Grids und die präfixierten Zellen in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 25 mM Kaliumchlorid, 2,5 mM Magnesiumacetat; pH 7,2) getaucht und die Coverslips wurden mit der Zellseite auf den Grids plaziert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurden die Coverslips mit Hilfe einer Pinzette auf die Grids gedrückt und

nach 2-3 sec wieder angehoben und entfernt. Dabei blieb ein Teil der apikalen Plasmamembran adhären auf den Grids haften, was zum Aufreißen der Zellen führte. Dadurch wurden die Membraninnenseiten der Zellen zugänglich für weitere Behandlungen. Die erhaltenen Zellmembranfragmente wurden dann für 20 min in 2% (w/v) PFA/HEPES nachfixiert. Für die anschließende Immunogold-Markierung wurden die Grids für 5-10 min in PBS überführt und die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte für 5 min in 0,1% (w/v) BSA/PBS. Danach wurden die Membranfragmente mit den jeweiligen Primäntikörpern sowie den entsprechenden 5 nm oder 10 nm Gold-konjugierten Sekundäntikörpern, die jeweils in einer 1:50 Verdünnung in Blockierungspuffer vorlagen, für 60 min bei RT inkubiert. Nach der 20-minütigen Behandlung mit 2% (v/v) Glutaraldehyd in PBS wurden die Grids für 1 min in 0,3% (w/v) Tanninsäure und für 10 min in Uranylacetat gegeben. Zwischen allen Schritten wurde dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Zum Schluss wurden die Grids/Membranfragmente getrocknet und mittels Elektronenmikroskopie (Zeiss EM 906, Carl Zeiss Jena GmbH) analysiert.

2.3.4 Separation von Zytosol und Plasmamembran

Die in flüssigem Stickstoff gemörserteren Nierensegmente oder konfluente Zellkulturen wurden mit eisgekühltem Homogenisierungspuffer versetzt, mittels Ultraschall aufgeschlossen und für 10 min bei 1000x g und 4°C zentrifugiert (siehe 2.2.2). Für die Trennung von Zytosol und Plasmamembran wurden 2 mg Protein des postnukleären Überstands mit Homogenisierungspuffer auf 500 µl aufgefüllt und bei 4°C mit 19.000x g für 30 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand enthielt die intrazelluläre Fraktion mit Zytosol und kleinen Vesikeln (Zytosolfraktion - Zyt). Das Pellet, das die Plasmamembran sowie adhären vesikuläre Strukturen enthielt, wurde erneut in 500 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert (Plasmamembranfraktion - PM). Für die Separation der Membran in Triton[®] X-100-lösliche und -unlösliche Fraktionen wurde die PM-Fraktion mit 1% (v/v) Triton[®] X-100 versetzt, 1 h bei 4°C schwenkend inkubiert und anschließend für 30 min bei 100.000x g und 4°C zentrifugiert (Optima[™] MAX-XP Ultrazentrifuge, Beckman Coulter[®]). Der Überstand enthielt die Triton[®] X-100-lösliche (*soluble*) Fraktion (TS). Das Pellet wurde im gleichen Volumen Homogenisierungspuffer aufgenommen und entsprach der Triton[®] X-100-unlöslichen (*insoluble*) Membranfraktion (TI). Die Analyse der auf diese Weise generierten Zellfraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 2.3.7.2 und 2.3.7.5), wobei jeweils 20 µl jeder Fraktion aufgetragen wurden.

2.3.5 Lipid Raft-Präparation

Die Präparation der cholesterinreichen Membranmikrodomänen (*Lipid Rafts*) erfolgte nach Welker *et al.* (Welker et al., 2007). Als Ausgangsmaterial diente die äußere Medulla von Rattennieren, die zunächst in eiskaltem Homogenisierungspuffer aufbereitet wurde (siehe 2.2.2.2). Im Anschluss an die Homogenisation wurde das postnukleäre Proteinlysate für 1 h bei 120.000x g und 4°C zentrifugiert (Festrotor: TLA 100.4 und Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter®), um die Membranen zu isolieren. Das dabei generierte Pellet wurde in kaltem Homogenisierungspuffer mit 1% Triton® X-100 resuspendiert und für 1 h bei 4°C drehend inkubiert. Durch diese Behandlung und die anschließende Ultrazentrifugation (120.000x g, 1 h, 4°C) wurden die detergensresistenten Membrandomänen pelletiert und auf diese Weise von den anderen Membranfraktionen separiert (Brown, 2006). Für den folgenden *Floating Assay* wurde das Pellet in Homogenisierungspuffer mit 40% (w/v) Sucrose aufgenommen und mit 30% und 5% (w/v) Sucroselösung überschichtet. Innerhalb dieses diskontinuierlichen Sucrosegradienten sammelten sich die *Lipid Rafts* während der 16-stündigen Dichtegradientenzentrifugation bei 35.000 rpm und 4°C (Ausschwingrotor: SW40Ti und Optima™ L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter®) im Bereich niedrigerer Dichte zwischen 5% und 30% Sucrose in einer weiß-gefärbten, trüben Schicht. Anschließend wurde der Gradient von oben nach unten abgenommen, wobei er in 1 ml-Fractionen geteilt wurde. Zur Kontrolle des *Floating Assays* wurden die in den einzelnen Fractionen enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 2.3.7) analysiert. Die mit NKCC2-tragenden *Lipid Rafts* angereicherten Fractionen des Gradienten wurden vereinigt, mit Homogenisierungspuffer ohne Sucrose auf 12 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (2 h, 35.000 rpm, 4°C; Ausschwingrotor SW40Ti). Dadurch konnten diese Vesikel pelletiert und gleichzeitig von der Sucrose getrennt werden. Das erhaltene Pellet diente zum einen als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation (siehe 2.3.6) und zum anderen für elektronenmikroskopische Untersuchungen der Ultrastruktur der *Lipid Rafts* (siehe 2.3.3.1).

2.3.6 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitationen wurden der polyklonale NKCC2-Antikörper (AB 3562P, Millipore GmbH), der polyklonale ANXA2-Antikörper (sc-1924; Santa Cruz Biotechnology) sowie die als Negativkontrolle fungierenden Immunglobuline gleichen Isotyps (Kaninchen Gammaglobuline 011-000-002, Ziegen Gammaglobuline 005-000-002; beide Dianova GmbH) unter Verwendung des Dynabeads® Antibody Coupling Kits (Invitrogen DYNAL AS)

kovalent an die Dynabeads[®] M-270 Epoxy gebunden. Die Immobilisierung des jeweiligen Antikörpers an der Oberfläche der Dynabeads[®] erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

Als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation wurde entweder frisch entnommene und in Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer) homogenisierte äußere Medulla von Rattennieren (siehe 2.2.2.2) oder die angereicherten NKCC2-tragenden *Lipid Rafts* aus der äußeren Medulla (siehe 2.3.5) verwendet. Jeweils 1 ml des Proteinlysats wurde zu den Antikörperbeladenen Beads gegeben und rotierend bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Beads mit IP-Puffer und aufsteigender Salzkonzentration (150, 300 und 450 mM NaCl) für je 5 min wurden die am Antikörper gebundenen Immunkomplexe in jeweils 30 µl 4x Laemmli-Puffer eluiert. Zur weiteren Analyse wurden diese Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.3.7.2) und anschließend ein Immunblot durchgeführt (siehe 2.3.7.5) oder einzelne Proteinbanden nach Färbung des SDS-PAGE Gels mittels Massenspektrometrie analysiert (siehe 2.3.8).

2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

2.3.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der BCA-Methode

Die Proteinquantifizierung erfolgte mit dem Micro BCA[™] Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerangaben. Dieser kolorimetrische Proteinassay basiert auf der Biuret-Reaktion. Dabei werden zweiwertige Kupferionen durch Peptidbindungen reduziert und bilden mit 2,2'-Bichinoninsäure (BCA) einen violetten Chelatkomplex, dessen Intensität bzw. Absorption bei 560 nm (A_{560}) sich proportional zur Proteinkonzentration verhält (Smith et al., 1985). Die Ermittlung der Gesamtproteinmenge erfolgte durch Messung der Extinktion bei 560 nm am Plattenreader Asys Expert 96 (Beckman Coulter[®]) und mit Hilfe einer Eichkurve, die mit Bovinem Serum Albumin (BSA) generiert wurde.

2.3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) wurden die in den verschiedenen Proben enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und die Proteinzusammensetzung bzw. die Reinheit der Proben analysiert. Zur Vereinheitlichung von Form und Ladung der einzelnen Moleküle wurden die Proteine durch Zugabe von 4x Laemmli-Puffer (252 mM Tris/HCl, 40% (v/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 0,04% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) β -Mercaptoethanol; pH 6,8) reduziert und zur Denaturierung für 15 min auf 65°C oder für 5 min auf 95°C erhitzt. Dadurch wurde neben den Protein-Protein-Interaktionen (Quartärstrukturen) auch die Ausbildung von Tertärstrukturen unterbunden. Somit war die Beweglichkeit der unter diesen Bedingungen vollständig

denaturierten Proteine im Gel proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Masse. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte in 10-12%-igen Polyacrylamidgelen (Tabelle 2.1) in der Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH) unter Verwendung von Elektrophoresepuffer (0,1% (w/v) SDS, 25 mM Tris, 192 mM Glycin; pH 8,3) zunächst bei 100 V. Mit Eintritt der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Precision Plus Protein[™] Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories GmbH) eingesetzt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der SDS-PAGE.

Sammelgel	2 Gele	
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese [®] Gel 30)	835 µl	
0,625 M Tris HCl (pH 6,8)	625 µl	
10% Natriumdodecylsulfat (SDS)	50 µl	
Aqua dest.	3,5 ml	
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	25 µl	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	5 µl	
Trenngel	12%	10%
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese [®] Gel 30)	4,5 ml	3,75 ml
0,75 M Tris HCl (pH 8,8)	5,625 ml	5,625 ml
10% Natriumdodecylsulfat (SDS)	113 µl	113 µl
Aqua dest.	1,0 ml	1,75 ml
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	80 µl	80 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	5,65 µl	5,65 µl

2.3.7.3 Coomassie-Färbung

Bei diesem Färbeverfahren lagert sich der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue an die im Gel enthaltenen Proteine an und bildet einen stabilen Protein-Farbstoff-Komplex. Zur Färbung wurden die Gele nach der SDS-PAGE in einem 40% Ethanol/ 10% Essigsäure/ 50% Wasser-Gemisch und darin gelöstem Färbemittel Coomassie Brilliant Blue (Rotiphorese[®] Blau, Carl Roth GmbH + Co. KG) bis zur vollständigen Blaufärbung des Gels inkubiert. Gleichzeitig wurden die Proteine durch die Behandlung mit Essigsäure und Ethanol im Gel fixiert. Anschließend wurde mit 40% Ethanol/ 10%-iger Essigsäure entfärbt, bis der Hintergrund des Gels klar und nur noch die Proteinbanden gefärbt waren. Mit Hilfe dieser Methode können Proteinmengen ab 0,2 µg/Bande sichtbar gemacht und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden (siehe 2.3.8).

2.3.7.4 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988)

Die Silberfärbung beruht darauf, dass die Silberionen Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten bilden, welche durch alkalisches Formaldehyd zu Silber reduziert werden können und somit im Gel sichtbar ausfallen. Diese Färbemethode eignet sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität (50-100 pg Protein/Bande) zur Sichtbarmachung sehr geringer Proteinmengen, die mittels Coomassie-Färbung nicht detektierbar sind. Aufgrund der zum Teil irreversiblen Fixierung der Proteine während der Silberfärbung und der proteinvernetzenden Wirkung der zur Entwicklung verwendeten Aldehyde ist keine Massenspektrometrie dieser Proteine möglich. Die Färbung der Gele erfolgte im Anschluss an die SDS-PAGE in Anlehnung an das Protokoll von Heukeshoven & Dernick (Tabelle 2.2) (Heukeshoven and Dernick, 1988).

Tabelle 2.2: Protokoll der Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988).

Schritt	Lösung	Menge/Gel	Inkubationsdauer
Fixierung	50% Ethanol 10% Essigsäure	100 ml	2 h
Waschen	30% Ethanol	100 ml	10 min
Wässerung	Aqua dest.	100 ml	1 min
Inkubation	20 mg Natriumthiosulfat	100 ml	1 min
Wässerung	Aqua dest.	2x 100 ml	2x 1 min
Färbung	0,15 g Silbernitrat	100 ml	1 h
Wässerung	Aqua dest.	2x 100 ml	2x 1 min
Spülung	2,5 g Natriumcarbonat	100 ml	1 min
Entwicklung	2,5 g Natriumcarbonat 40 µl von 37% Formaldehyd	100 ml	1-10 min
Abstoppen	0,05 M EDTA	100 ml	5 min
Wässerung	Aqua dest.	2x 100 ml	2x 1 min

2.3.7.5 Immunblotting

Das Immunblotting dient der Identifikation sowie der quantitativen Bestimmung einzelner Proteine innerhalb der Proteingemische. Bei diesem Verfahren wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Trenngel auf eine Nitrocellulosemembran (Porablot NCP, Macherey-Nagel GmbH) transferiert und anschließend mit Hilfe spezifische Antikörper sichtbar gemacht. Der Proteintransfer stellt das eigentliche Blotting dar und erfolgte mittels Elektroblothing nach dem *Semi-Dry*-Prinzip (Kyhse-Andersen, 1984). Dafür wurden zwei Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran und das Gel mit gekühltem *Semi-Dry*-Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) getränkt bzw. äquilibriert und zwischen Kathode und Anode plaziert. Der Blotvorgang

erfolgte bei 90 mA/Gel für 90 min. Zur Kontrolle der Gleichmäßigkeit der geladenen Proteinmenge und des Blotvorgangs wurde die Membran kurzzeitig mit Ponceau-Rot (0,5% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Essigsäure) gefärbt und zur Beurteilung mit Aqua dest. entfärbt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 30 min bei RT mit 5%iger Magermilch/PBS auf dem Schüttler inkubiert.

Die Identifikation einzelner immobilisierter Proteine erfolgte indirekt mit Hilfe von Antikörpern und Chemilumineszenz. Dafür wurde zunächst der jeweilige Primärantikörper entsprechend seiner ausgetesteten Konzentration mit Blockiermedium verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 0,5% (v/v) Tween[®] 20/PBS (pH 7,5) entfernt. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiertem Sekundärantikörper (1:2000; Dako Denmark A/S; Dänemark) für 1 h bei RT inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen. Zur Visualisierung der immunreaktiven Banden wurde die Membran für 1 min mit Luminolreagenz (Amersham[™] ECL[™] Western blotting detection reagents, GE Healthcare) inkubiert. In dieser Zeit wurde das Luminol durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase im alkalischen Milieu oxidiert und dadurch in einen energetisch niedrigeren Zustand versetzt. Gleichzeitig kommt es zur Emittierung von Licht (Chemilumineszenz), welches über Autoradiographiefilme (FUJIFILM Super RX, Fujifilm Europe GmbH) aufgenommen werden kann. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit der Tischentwicklungsmaschine Curix 60 (Agfa-Gevaert N.V.) sowie dem Fixierer G354 und dem Entwickler G150 (Agfa-Gevaert N.V.). Für die densitometrische Auswertung wurden die entwickelten Filme eingescannt und mit der AlphaImager-Software (Alpha Innotech Corporation) analysiert. Zur Ladungskontrolle und Normalisierung wurden β -Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bzw. Tubulin detektiert.

2.3.8 Massenspektrometrische Analyse

NKCC2-Immunpräzipitate (siehe 2.3.6) aus angereicherten *Lipid Rafts* der renalen äußeren Medulla (siehe 2.3.5) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die darin enthaltenen Proteine wurden mit Coomassie angefärbt (siehe 2.3.7) und anschließend wurden einzelne Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden zunächst mechanisch zerkleinert, in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat /100% Acetonitril (1:1) für 10 min bei 30°C gewaschen, in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat equilibriert, mit Acetonitril dehydriert und in einer Vakuum-Konzentrations-Zentrifuge (*Speed Vac System*) getrocknet. Die enthaltenen Proteine wurden mit 0,02 μ g Trypsin (Promega) bei 37°C und 500 rpm für

24 h verdaut, kurz abzentrifugiert und für 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurden die Peptide unter Verwendung der ZipTip_{C18} Technologie (Millipore) sowie 50% Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) entsalzt und aufkonzentriert. Danach wurden die Peptide direkt auf den MALDI-Probenträger (Bruker Daltonik) eluiert, wobei 2,5 mg/ml α -cyano-4-Hydroxycimtsäure (CHCA) als Matrix diente. Die massenspektrometrische Analyse wurde mit einer *Matrix-assisted, laser-desorption/ionization time-of-flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) kombiniert mit einer *MALDI-Lift fragment* Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF MS) (Bruker Daltonik) durchgeführt. Kalibrierte und annotierte Spektren wurden dann einer Datenbank-Suche (Swiss-Prot) unterzogen, wobei das Programm Bruker Bio-Tool 3.2 und die Mascot 2.2 Datenbank verwendet wurden. Dabei wurden die experimentell generierten Daten der MALDI-TOF MS und der MALDI-TOF/TOF MS mit den kalkulierten Peptidmassen aller Einträge in der Sequenzdatenbank verglichen. Letztendlich wurden empirisch determinierte Faktoren verwendet, um jede Peptid-Übereinstimmung statistisch zu bewerten. Die Massenspektrometrie wurde in Kooperation mit Frau Priv.-Doz. Dr. Vera Jankowski aus der Arbeitsgruppe Experimentelle Nephrologie und Hypertensiologie durchgeführt.

2.3.9 Expression und Affinitätschromatographie von GST-Fusionsproteinen

Für die Überexpression von rekombinantem ANXA2, P11 und den N-Terminus-Mutanten von NKCC2 wurden *E.coli* Rosetta Zellen (Merck Millipore) mit den verschiedenen pGEX-6P-1-Expressionsplasmiden (siehe 2.4.2) transformiert und in 500 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin gegeben. Als die OD₆₀₀ der Bakteriensuspension einen Wert von 0,5 erreicht hatte, wurde die Proteinexpression mit 0,2 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid (IPTG) induziert. Nach einer 15-stündigen Inkubation bei RT und 225 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation (4500x g, 10 min) sedimentiert. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte in Lysepuffer mit 1 mg/ml Lysozym, 1% (v/v) Triton[®] X-100 und 2 Units DNaseI für 1 h bei RT und anschließendem Ultraschall (2x 3 Impulse; Cycle: 70). Zellreste und unlösliche Bestandteile wurden mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000x g und 4°C entfernt.

Lysepuffer	50 mM HEPES (pH 7,5)
	200 mM NaCl
	10 mM CaCl ₂
	1x Complete Protease Inhibitor Tablette /50 ml

Für die affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinant hergestellten Proteine wurde das Bakterienlysat mit 250 μ l Pierce Glutathion Magnet Beads (Thermo Fisher

Scientific Inc.) versetzt. Während der 12-stündigen Inkubationszeit bei 4°C band die Glutathion-S-Transferase (GST) der Fusionsproteine an das Glutathion auf den Beads. Anschließend wurden die Beads mit den gebundenen rekombinanten Proteinen dreimal mit Lysepuffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen.

2.3.10 Peptid Spot Array

2.3.10.1 Proteolytische Spaltung und Säulen-Chromatographie von Fusionsproteinen

Um unnatürlichen Dimerisierungen der rekombinanten Proteine vorzubeugen, musste GST proteolytisch entfernt werden. Dafür wurden die an GST-Beads gebundenen Fusionsproteine (siehe 2.3.9) über Nacht mit der ortsspezifisch wirkenden PreScission Protease (GE Healthcare GmbH) gespalten. Der Überstand mit dem geschnittenen Strukturprotein wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 70 µl Talon Beads (Clontech laboratories Inc.) für 15 min bei 4°C inkubiert, um die in der Lösung befindliche His-getaggte PreScission Protease zu entfernen. Zur weiteren Aufreinigung des synthetisierten Proteins wurde die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt. Dafür mussten die in der Affinitätschromatographie gewonnenen Proben unter Einsatz von Amicon Ultra-Zentrifugenfiltern auf ein Volumen von 2 ml aufkonzentriert werden. Anschließend wurden die Konzentrate auf eine Säule aufgebracht und die Chromatographie mit Hilfe der Software UNICORN 5.2 reguliert. Die Probe durchlief dabei, angetrieben vom Laufpuffer (20 mM HEPES, 300 mM NaCl; pH 7,0), die Säulenmatrix (Superdex 75 highload 16/60) und die enthaltenen Proteine wurden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Beim Verlassen der Säule wurden die Laufpufferfraktionen mit UV-Detektoren analysiert, um die Fraktionen zu identifizieren, die ausschließlich das gewünschte Protein enthielten. Die Konzentration wurde mit Hilfe des Molekulargewichts und dem Extinktionskoeffizienten photometrisch (NanoDrop ND-2000) bestimmt.

2.3.10.2 Herstellung und Durchführung der Peptid Spots

Die Fusionsproteine bestehend aus GST und dem N-Terminus sowie den phospho- und nicht-phosphomimetischen Mutanten von NKCC2 wurden durch den Einsatz von 10 mM Glutathion von den Glutathion Magnet Beads (siehe 2.3.9) eluiert. Jeweils 1 µl des Eluats wurde punktuell auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen und luftgetrocknet. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 5% (w/v) Magermilch und 1% (v/v) Tween[®]20 in TBS blockiert. Um potentielle Interaktionen zwischen den gespotteten N-terminalen NKCC2 Mutanten mit Wildtyp ANXA2, P11 oder

dem ANXA2-P11-Tetramer zu identifizieren, wurden die vorbereiteten Membranen mit je 0,1 μM des jeweils synthetisch hergestellten und aufgereinigten Proteins in Blockierungspuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proteine, die sekundär an die *Spot Arrays* gebunden hatten, wurden mit den entsprechenden in Blockierungspuffer gelösten Primär- und HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern sowie der Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen (siehe 2.3.7.5). Zwischen allen Inkubationsschritten wurde dreimal mit TBST (50 M Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween[®]20; pH 7,6) gewaschen, um ungebundene Proteine oder Antikörper zu entfernen. Als Positivkontrollen wurden synthetisch hergestelltes ANXA2 und P11 auf die Membran gespottet. GST, Glutathion und BSA dienten als Negativkontrollen.

2.3.11 GST-Pulldown

Für den *GST-Pulldown* wurden die verschiedenen, rekombinant hergestellten Mutanten des NKCC2 N-Terminus über GST an die Glutathion Magnet Beads gebunden (siehe 2.3.9). Parallel wurden HEK239 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und mit 10 μg DNA der Expressionsplasmide kodierend für ANXA2-GFP und P11-GFP unter Einsatz von 20 μl JetPEI transfiziert (siehe 2.5.2). Nach 48 h wurden die Zellen in eisgekühltem Lysepuffer versetzt mit 1% (v/v) Triton[®] X-100 und Ultraschall aufgeschlossen (siehe 2.5.5). Das nach der Zentrifugation (1000x g, 15 min, 4°C) erhaltene postnukleäre Proteinlysate wurde auf die Beads mit daran gebundenen Fusionsproteinen (GST-gekoppelte N-Termini von NKCC2) 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 der SDS-PAGE und Immunblotting analysiert (siehe 2.3.7.2 und 2.3.7.5).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Genexpressionsanalyse

2.4.1.1 RNA-Isolation mittels Trizol

Für die Isolation der Gesamt-RNA nach der Trizol/Isopropanol-Methode wurden gemörsertes Nierengewebe oder Zellen mit 0,5 ml Trizol versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurde das Homogenat mit 100 μl Chloroform überschichtet und die Phasen durch Schütteln vermischt. Im Anschluss wurden die Proben 10 min bei 16.000x g und 4°C zentrifugiert. Die in der oberen Phase enthaltene Gesamt-RNA wurde in einem neuen Reaktionsgefäß unter Zugabe von 250 μl Isopropanol für 10 min bei RT inkubiert und durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 16.000x g und 4°C gefällt. Das erhaltene RNA-Pellet

wurde zunächst mit 500 µl 70%-igem Ethanol und danach mit 250 µl 100%-igem Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 7500x g und 4°C und der jeweilige Überstand wurde dekantiert. Das erhaltene Pellet wurde im Thermoblock bei 65°C für 10 min getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser bei 65°C für 10 min resuspendiert. Bis zur weiteren Analyse wurde die RNA bei -80°C gelagert.

Zur Qualitätskontrolle wurde ein Teil der isolierten RNA auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf das Vorhandensein klar abgegrenzter 28S und 18S rRNA Banden untersucht, um Degradationen und Verunreinigungen ausschließen zu können. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm mit Hilfe eines Nanophotometers (Implen) gemessen und das Lambert Beer'sche Gesetz verwendet.

$$E = \varepsilon \times d \times c$$

E = Extinktion
 ε = Extinktionskoeffizient (für einzelsträngige DNA 33 µg/ml)
 d = Schichtdicke der Küvette
 c = Konzentration der Lösung in der Küvette

2.4.1.2 cDNA Synthese mittels Reverser Transkription

Bei der Reversen Transkription wird RNA in stabilere cDNA mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, umgeschrieben. Dafür wurde 1 µg isolierter Gesamt-RNA zunächst mit 0,5 µg Oligo(dT)₁₈ Primer (Bioline GmbH, Luckenwalde) versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung der RNA und gleichzeitigen Hybridisierung der Oligo(dT)₁₈ Primer am polyadenylierten 3'-Ende der mRNA erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 70°C. Anschließend wurden die Ansätze auf ein Gesamtvolumen von 20 µl durch Zugabe von 10 mM dNTPs (Bioline GmbH, Luckenwalde), 10 U Ribolock Rnase Inhibitor, 50 U BioScript Polymerase und dazugehörige Pufferlösung (1x) aufgefüllt. Zur cDNA Synthese wurden die Proben für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert und somit die Reaktion abgestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.4.1.3 Quantitative *Real-Time* PCR mit EvaGreen®

Bei der quantitativen *Real-Time* PCR (qPCR) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Amplifikation der Zielsequenz in Echtzeit erfasst wird. Dabei interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® (Solis BioDyne) während der Elongation der PCR in doppelsträngige DNA. Aufgrund der Proportionalität steigt mit zunehmender Zyklenzahl nicht nur die Anzahl synthetisierter Amplifikate sondern ebenso die Fluoreszenz exponentiell.

Der 20 µl Ansatz für die qPCR beinhaltete 10 µl 1:10 verdünnter cDNA, 2 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), 2 µl jedes Primers (100 nM) und 6 µl nukleasefreies Wasser. Pro verwendetem Primerpaar (Tabelle 2.3) wurde eine Negativkontrolle, die anstelle des Templates nukleasefreies Wasser enthielt, mitgeführt und alle Proben wurden 3-fach bestimmt. Die während der qPCR freiwerdende Emission wurde mit dem Fast Real-Time PCR 7500 System (Applied Biosystems) gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit der SDS2.1 Software (Applied Biosystems). Zur Ermittlung der Schmelztemperatur erfolgte anschließend eine Dissoziation der während der qPCR gebildeten Amplifikate. Dabei durfte pro Gen und Probe nur ein Peak entsprechend der Produktlänge zu sehen sein, um unspezifische Amplifikationen ausschließen zu können.

qPCR-Profil

1. Initiation	50°C	2 min
2. Denaturierung	95°C	10 min
3. Denaturierung	95°C	15 sec
4. Elongation	60°C	1 min
	40 Zyklen von 3-4	

Tabelle 2.3: Liste der bei der qPCR verwendeten Primer.

Bezeichnung	Spezies	Gen (Basen)	Nummer	Sequenz 5' - 3'	Amplifikat
ANXA2_fwd	Ratte	ANXA2 (506-624)	NM_019905.1	TGGAGAAGGACATCATCTCTGA	119 bp
ANXA2_rev	Maus	ANXA2 (538-656)	NM_007585.3	ATCCTGGTCAATCAGCTCGT	
GAPDH_fwd	Ratte	GAPDH (523-609)	NM_017008.4	TGCACCACCAACTGCTTAGC	87 bp
GAPDH_rev	Maus	GAPDH (498-584)	NM_008084.2	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
NKCC2_fwd	Ratte	NKCC2 (725-825)	NM_001270618.1	TGTGAAGTTTGGATGGGTGA	101 bp
NKCC2_rev	Maus	NKCC2 (742-842)	NM_001079690.1	CCGCTTCTCCTACAATCCAG	

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der komparativen $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Zunächst wurde der Zyklus quantifiziert, an dem die exponentielle Phase beginnt, also die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (Ct-Wert). Dieser Ct-Wert wurde auf das endogene Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert (ΔCt) und danach der Kalibrator subtrahiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Zur Bestimmung der relativen Quantifizierung (RQ) wurde die Potenz aus dem Exponent $-\Delta\Delta\text{Ct}$ zur Basis 2 berechnet.

2.4.2 Klonierung

2.4.2.1 Klonierungs-PCR

Die Endpunkt Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der exponentiellen *in vitro* Amplifikation eines definierten DNA-Fragments, das von zwei spezifischen Primern begrenzt wird. Da die PCR in dieser Arbeit für die Erzeugung der zu klonierenden DNA-Fragmente

eingesetzt wurde, musste zusätzlich zu der konventionellen Polymerase eine weitere mit *Proofreading*-Funktion verwendet werden. Somit beinhaltete der 50 µl PCR-Ansatz folgende Komponenten: 1 µl cDNA-Template, 2,5 µl jedes Primers (10 pmol/µl), 1,5 µl Dimethylsulfoxid (DMSO), 2 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl; Stratec Molecular GmbH) mit 2,5 µl des 10x NH₄-Reaktionspuffers, sowie 0,5 µl Phusion[®] Polymerase (2 U/ml; New England Biolabs) mit 5 µl 5x Phusion[®] HF-Puffer und 28,5 µl nukleasefreies Wasser. Die PCR wurde mit dem PTC-220 DNA Engine Dyad[™] Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc.) durchgeführt.

PCR-Profil

1. Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 sec
3. Annealing	61-55°C	45 sec
4. Elongation	72°C	1-2 min
5. Elongation	72°C	10 min
6. Kühlen	4°C	
	40 Zyklen von 2.-4.	

Für die Erzeugung zielgerichteter Punktmutationen in der DNA, die letztlich zum Austausch bestimmter Aminosäuren im Protein führen, wurden zueinander komplementäre Primer (mutagene Primer) bei der *Overlap-Extension-PCR* eingesetzt. In dieser Arbeit wurden Threonin (T) oder Serin (S) zum einen gegen die Aminosäure Alanin (A) ausgetauscht, um phosphomimetische Mutanten von NKCC2 zu erzeugen. Zum anderen erfolgte ein Austausch dieser Aminosäuren zu Asparaginsäure (D), wodurch nicht-phosphomimetische Mutanten generiert worden. Alle verwendeten Primer wurden in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt und von der Firma metabion International AG bezogen (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Übersicht über verwendete Klonierungs- und mutagene Primer.

Die Restriktionsschnittstellen sind in rot und das jeweils mutierte Codon in blau dargestellt.

Bezeichnung	Gen-Nummer	Sequenz 5' - 3'
ANXA2_pEGFP_fwd_PstI	NM_007585.3	TTTTTTTTTTC CCTGCAG ATGTCTACTGTCCACGAAATCC
ANXA2_pEGFP_rev_BamHI		ACTGTGCTGAG GGATCC CAGTCATCCCCACCACACAGGT
P11_pEGFP_fwd_PstI	NM_009112.2	TCGACAGACTC CCTGCAG ATGCCATCCCAAATGGAGCA
P11_pEGFP_rev_BamHI		GCTCCAG GGATCC TCTTCCCTTCTGCTTCATGT
ANXA2_pGEX_fwd_BamHI	NM_007585.3	TTTTTTTTTTC CGGATCC ATGTCTACTGTCCACGAAATCC
ANXA2_pGEX_rev_NotI		ATCCACTGT GCGGCCGC CTTCAGTCATCCCCACCACACA
NKCC2_N-Terminus	NM_	
NKCC2_pGEX_fwd_BamHI	001270618.1	CTCCAAAAT CGGATCC AGATTTTGGAAGATGTCAGTCA
NKCC2_pGEX_rev_EcoRI		TCAGTCACGAT GAATTC TATCCAAACTTCACAACTCCA
P11_pGEX_fwd_EcoRI	NM_009112.2	CGACAGACTC GAATTC ATGCCATCCCAAATGGAGCA
P11_pGEX_rev_NotI		TACCAGTGC GCGGCCGC GCCTACTTCTTCCCTTCTGCT
NKCC2-T96A-fwd	NM_	TATTACCTACAAG CC TTTGCCACAAC
NKCC2-T96A-rev	001270618.1	GTTGTGGCCAAAG GC TTGTAGGTAATA
NKCC2-T101A-fwd	NM_	TTTGGCCACAAC GCC ATGGACGCCGTC
NKCC2-T101A-rev	001270618.1	GACGGCGTCCAT GCC GTTGTGGCCAAA
NKCC2-T114A-fwd	NM_	TACTACCGCAAC GCC GCCAGTGTGAGC
NKCC2-T114A-rev	001270618.1	GCTCACACTGCC GCC GTTGCGGTAGTA
NKCC2-S126A-fwd	NM_	AAGGTCAACCGGCC GCC CTGCAGGAGATC
NKCC2-S126A-rev	001270618.1	GATCTCCTGCAG GCC CGGCCGTTGACCTT
NKCC2-T96D-fwd	NM_	TATTACCTACAAG AT TTTGCCACAAC
NKCC2-T96D-rev	001270618.1	GTTGTGGCCAAA ATC TTGTAGGTAATA
NKCC2-T101D-fwd	NM_	TTTGGCCACAAC GAT ATGGACGCCGTC
NKCC2-T101D-rev	001270618.1	GACGGCGTCCAT ATC GTTGTGGCCAAA
NKCC2-T114D-fwd	NM_	TACTACCGCAAC GAT GCCAGTGTGAGC
NKCC2-T114D-rev	001270618.1	GCTCACACTGCC ATC GTTGCGGTAGTA
NKCC2-S126D-fwd	NM_	AAGGTCAACCGGCC GAT CTGCAGGAGATC
NKCC2-S126D-rev	001270618.1	GATCTCCTGCAG ATC CGGCCGTTGACCTT

2.4.2.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente zum Nachweis einer erfolgreichen Ligation (Gussow and Clackson, 1989) und wurde verwendet, um die nach der Klonierung und Transformation gewachsenen Klone auf das Vorhandensein des jeweiligen Inserts zu überprüfen. Dafür wurde je ein Klon mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und in 10 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. 5 µl dieser Lösung dienten als Template in der PCR und wurden mit folgenden Komponenten versetzt (25 µl Reaktionsansatz): 0,75 µl jedes Primers (10 pmol/µl), 0,75 µl DMSO, 1 µl MgCl₂ (50 mM), 0,15 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,15 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl; Stratec Molecular GmbH) und 1,5 µl des zugehörigen 10x NH₄-Reaktionspuffers sowie 15 µl nukleasefreies Wasser. Das verwendete PCR-Programm entsprach dem der Klonierungs-PCR (siehe 2.4.2.1).

Tabelle 2.5: Liste eingesetzter Primer.

Bezeichnung	Vektor	Sequenz 5' - 3'
pGEX 5'	pGEX-6P-1	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX 3'		CCGGGAGCTGCATGTGTTCAGAGG
CMV-F	pEGFP-N1	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
EGFP-N		CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG

2.4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA- oder RNA-Fragmente durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (~10V pro cm Elektrodenabstand) in der Gelmatrix der Größe nach aufgetrennt. Diese Methode wurde zur analytischen Beurteilung von PCR-Amplifikaten oder Vektoren bzw. zur präparativen Reinigung von PCR-Produkten oder Spaltprodukten eingesetzt. Zunächst wurde die DNA mit 6x Ladepuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 33% (v/v) 150 mM Tris, 60% (v/v) Glycerol; pH 7,6) versetzt, in die Geltaschen des 1,5%-igen Agarosegels gegeben und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer (0,1 M Tris-Base, 0,28% (v/v) Eisessig, 0,5% (v/v) 0,5 M EDTA; pH 8,0). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel vor der Polymerisation mit dem Nukleinsäure-färbenden Stoff GelRedTM (VWR International GmbH) versetzt. Die Detektion erfolgte mit dem AlphaImager[®] EC (Biozym) unter UV-Licht. Zur Ermittlung der exakten Fragmentgröße wurde ein DNA-Standard (Gene RulerTM DNA Ladder Mix, Fermentas) mitgeführt.

Die Aufreinigung bzw. Extraktion von Spaltprodukten und Amplifikaten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Invisorb[®] Spin DNA Extraction Kit (Stratec Molecular GmbH) nach Anleitung des Herstellers. Die Elution der DNA wurde stets mit 25-50 µl nukleasefreiem Wasser durchgeführt.

2.4.2.4 Restriktionsverdau

Zur Herstellung eines Plasmids mit integrierter Zielsequenz mussten das Insertionsfragment sowie der Vektor zunächst mit zwei Restriktionsendonukleasen behandelt werden (Tabelle 2.6). Dafür wurden 5 µl 10x Tango Puffer mit je 0,5 µl jedes Restriktionsenzym und 44 µl Insert oder 3 µl Vektor-DNA und 41 µl nukleasefreiem Wasser versetzt. Die Restriktionsansätze wurden dann für mindestens 6 h bei 37°C inkubiert. Um eine Religation des entsprechenden Plasmid-Rückgrates zu verhindern bzw. zu minimieren, wurde dieses dephosphoryliert, indem direkt zu dem Restriktionsansatz des jeweiligen Vektors 0,5 µl Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase) gegeben wurden und eine 30-minütige Inkubation bei 37°C erfolgte (Ullrich et al., 1977). Anschließend wurden die

Restriktionsansätze im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die gewünschten Spaltprodukte aus dem Gel extrahiert und für die Ligation verwendet.

Tabelle 2.6: Genetische Konstrukte mit verwendeten Plasmiden.

Expressionskonstrukte	Ausgangsplasmid	Schnittstellen
ANXA2_pEGFP-N1	pEGFP-N1	<i>PstI/BamHI</i>
P11_pEGFP-N1	pEGFP-N1	<i>PstI/BamHI</i>
ANXA2_pGEX-6P-1	pGEX-6P-1	<i>BamHI/NotI</i>
NKCC2-N-Terminus_pGEX-6P-1 (1-525 bp)	pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_T96A_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_T101A_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_T114A_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_T96A/T101A/T114A_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_T96A_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_S126A_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_T96D_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_T101D_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_T114D_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_T96D/T101D/T114D_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_T96A_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
NKCC2-N-Terminus_S126D_pGEX-6P-1	NKCC2-N-Terminus_pGEX-6P-1	<i>BamHI/EcoRI</i>
P11_pGEX-6P-1	pGEX-6P-1	<i>EcoRI/NotI</i>

2.4.2.5 Ligation

Von den geschnittenen und aufgereinigten DNA-Fragmenten wurden je 2 µl Vektorrückgrat und 13,5 µl Insert (siehe 2.4.2.4) mit 0,5 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl) und 4 µl 5x T4 DNA Ligase Puffer versetzt. Dieser Ansatz wurde für 10 min auf Eis und anschließend für 20 min bei RT inkubiert.

2.4.2.6 Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock

Der gesamte Ligationsansatz wurde zu 100 µl chemisch kompetenten (Calciumchlorid-Methode) *E.coli* Top10 Zellen (Invitrogen Life Technologies GmbH) gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 45 sec ein Hitzeschock bei 42°C, um die Plasmidaufnahme zu verstärken. Anschließend wurden die Bakterien kurz auf Eis abgekühlt, bevor 300 µl selektionsfreies LB-Medium zu dem Ansatz gegeben wurden. Im Anschluss wurde die Suspension für 30-60 min bei 37°C und 350 rpm inkubiert, in Abhängigkeit vom verwendeten Vektor auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Gewachsene Klone wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR (siehe 2.4.2.2) auf das Vorhandensein von Vektoren mit korrekt integriertem Insert untersucht.

LB-Medium	1% (w/v) Trypton 1% (w/v) NaCl 0,5% (w/v) Hefeextrakt
LB-Festmedium	enthält zusätzlich 1,5% (w/v) Agar

2.4.2.7 Präparation der Plasmid-DNA und Sequenzierung

Jeweils ein, mittels Kolonie-PCR bestätigter, positiver Klon wurden von der LB-Agarplatte gepickt, in 2 ml 100 µg/ml Ampicillin- bzw. 50 µg/ml Kanamycin-haltiges LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Aus der Übernacht-Kultur wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kits (Stratec Molecular GmbH) nach Angaben des Herstellers isoliert und in 50-100 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Anschließend wurde die Sequenzierung der Plasmid-DNA vom Sequenzierservice *SMB Service in Molecular Biology GmbH* durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der Software Chromas Lite Version 2.01 und dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) der Website NCBI.

2.5 Zellkultur und Transfektion

2.5.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37°C und 5% CO₂ kultiviert (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Übersicht eingesetzter Zelllinien.

Name	Herkunft	Kulturmedium
MMDD1 - <i>mouse macula densa-derived 1 cells</i>	J. Schnermann (Yang et al., 2000)	DMEM mit L-Glutamin (PAN-Biotech) 10% fötales Kälberserum (FKS) 1% Penicillin-Streptomycin
raTAL - <i>rat medullary thick ascending limb cells</i>	N.R. Ferreri (Eng et al., 2007)	renal epithelial growth medium (Promo Cell) 1% Penicillin-Streptomycin
Hek293 - <i>Human embryonic kidney cells</i>	ATCC®, CRL-1573™	alpha-MEM (Lonza) 2 mM L-Glutamin 5% FKS

2.5.2 Transfektion von Expressionsplasmiden

Zur Erzeugung einer transienten Überexpression der Fusionsproteine ANXA2-GFP bzw. P11-GFP wurden MMDD1 Zellen in 3 cm Zellkulturschalen und auf Deckgläschen bis zu 50% Konfluenz kultiviert. Die Transfektion der Plasmid-DNA erfolgte mittels JetPEI (Polyplus

transfection) nach Herstelleranleitung. Für die Transfektion von beispielsweise 3 cm Zellkulturschalen wurde ein Transfektionsmix hergestellt, der je 2 µg der zuvor klonierten Plasmid-DNA (ANXA2_pEGFP-N1, P11_pEGFP-N1 oder pEGFP-N1; siehe 2.4.2), 4 µl JetPEI und 200 µl 0,9%-ige NaCl-Lösung beinhaltet. Während der 15-minütigen Inkubation des Ansatzes bei RT wurden die Zellen mit 1 ml DMEM mit 5% FKS überschichtet. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 24 h wurde 1 ml des jeweiligen Zellkulturmediums zugefügt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert, bevor zusätzliche Stimulationen und Analysen folgten.

2.5.3 RNA-Interferenz

Small interfering RNA (siRNA) für ANXA2 (sc-29683, Santa Cruz Biotechnology) sowie eine Negativkontrolle (*scramble*) (1027280, Qiagen) wiesen eine Ausgangskonzentration von 25 µM auf und wurden bei -20°C gelagert. Für die Erzeugung eines transienten *Knockdowns* von ANXA2 wurden raTAL Zellen in 3 cm Zellkulturschalen und auf Deckgläschen bis zu 40-50% Konfluenz kultiviert und mit einem Gemisch bestehend aus 2,5 µl der jeweiligen siRNA und 200 µl OptiMEM unter Verwendung von 3 µl HiPerFect (Qiagen) transfiziert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wurde das Transfektionsgemisch direkt auf die vom Medium befreiten raTAL Zellen gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml DMEM mit 5% FKS gehalten. 8 h später wurde die Transfektion wiederholt und nach weiteren 12 h wurden 2 ml raTAL-Kulturmedium hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von zusätzlichen 50 h wurden die Zellen mit unterschiedlich konzentrierten Chlorid-Lösungen behandelt und analysiert.

2.5.4 Stimulation der Zellen

2.5.4.1 Hypotonischer Chloridmangel-Stress

Um die Auswirkung von unterschiedlichen Chloridgehalten auf die Translokation von ANXA2, P11 und NKCC2 zu untersuchen, wurden MMDD1 Zellen zunächst mit den jeweiligen DNA-Plasmiden transfiziert (siehe 2.5.2) bzw. raTAL Zellen mit ANXA2 siRNA behandelt (siehe 2.5.3). Die Zellen wurden entweder mit der hypotonischen Chloridmangellösung (25 mM NaHCO₃, 0,96 mM NaH₂PO₄, 0,24 mM Na₂HPO₄, 5 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 5,5 mM Glucose) oder mit der Lösung mit normalem Chloridgehalt (zusätzliche 100 mM NaCl) für 1 h stimuliert (Cheng et al., 2000).

2.5.4.2 Behandlung mit PMA und Dynasore

Bevor transfizierte MMDD1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Dynasore[®] oder DMSO behandelt werden konnten, wurden die Zellen für 30 min in serumfreiem DMEM kultiviert. Anschließend wurden 500 nM PMA und/oder 80 µM Dynasore[®] in serumfreiem DMEM für 30 min auf die Zellen gegeben. Zur Untersuchung der Auswirkung dieser Stimulationen auf die Translokation von endogenem NKCC2 bzw. überexprimiertem ANXA2 und P11 wurde danach eine immunzytochemische Färbung durchgeführt (siehe 2.3.2).

2.5.5 Biochemische Aufbereitung der Zellkultur

In 3 cm Zellkulturschalen kultivierte Zellen wurden in 100 µl RIPA-Puffer abgekratzt und durch Ultraschall (3 x 3 Impulse; Cycle: 70) sowie die Wirkung des Detergens Triton[®] X-100 aufgeschlossen. Die Proben wurden für 15 min bei 1000x g und 4°C zentrifugiert und das erhaltene postnukleäre Proteinlysate mittels SDS-PAGE analysiert.

RIPA-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	150 mM NaCl
	1 mM Na ₂ EDTA
	1% Triton [®] X-100
	1% Natriumdeoxycholat
	2,5 mM Natriumpyrophosphat
	1x Complete Protease Inhibitor Tablette / 50 ml

2.6 Statistik

Die Quantifizierung der Ergebnisse wurde mit Excel (Microsoft Office) durchgeführt. Alle Versuchsergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die Ergebnisse der verschiedenen Kohorten wurden mit Hilfe des zweiseitigen ungepaarten Student'schen t-Test auf Signifikanz überprüft. Dabei wurde von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen und alle Versuche wurden mit einer Mindestanzahl von n=4 durchgeführt. Werte von p<0,05 wurden als statistisch signifikant (*) und p<0,01 als hoch signifikant definiert (**).

2.7 Material

2.7.1 Antikörper

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primärantikörper (Tabelle 2.8) für Western Blot und immunhistochemische Analysen waren gut charakterisiert und hinsichtlich ihrer Spezifität

validiert. Die eingesetzte Konzentration von jedem Antikörper musste spezifisch für jeden Versuch ermittelt werden.

Tabelle 2.8: Auflistung verwendeter Primärantikörper für Immunblotting und Immunhistochemie.

Antigen	Isotyp (IgG)	Hersteller Bezugsquelle	Katalognummer	Verdünnungen		
				WB	IF	EIMi
Actin (β)	mouse	Sigma-Aldrich	A5441	1:5.000		
Annexin A2	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-9061	1:500	1:100	1:50
Annexin A2	goat	Santa Cruz Biotechnology	sc-1924	1:500		
Clathrin heavy-chain	mouse	BD Transduction Laboratories	610499	1:10.000		
Flotillin-1	goat	Everest Biotech Ltd.	EB05449		1:200	
Flotillin-1	mouse	BD Transduction Laboratories	610821	1:2.000		1:50
GAPDH	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-25778	1:2.000		
GFP	chicken	Aves Biolabs	GFP-1020		1:5.000	
GFP	mouse	Roche	11814460001	1:10.000		
GST	rabbit	Sigma-Aldrich	078K4876	1:2.000		
Na+K+ATPase (α)	rabbit	Merck Millipore	05-369	1:300		
NHE3	rabbit	Biotrend	NHE3 1-A	1:300		
NKCC2 (2.1 & 2.2)	guinea pig	laboreigene Herstellung		1:500		1:50
NKCC2 -T4	mouse	C. Lytle -nicht kommerziell		1:500		
Phospho-NKCC2 (T96/T101)	rabbit	laboreigene Herstellung		1:1.000	1:500	
P11	rabbit	Acris	ABIN954651	1:400	1:100	
ROMK (Kir1.1)	rabbit	alomone labs	APC-001	1:300		
THP	rabbit	J.R. Hoyer -nicht kommerziell		1:300		1:50
Tubulin (α)	mouse	Sigma-Aldrich	T5168	1:1000		
Transferrin- rezeptor 2	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-32271	1:200		1:50

WB: Western Blot (Immunblot), IF: Immunfluoreszenz, EIMi: Elektronenmikroskopie

Tabelle 2.9: Übersicht eingesetzter Sekundärantikörper.

Isotyp	Hersteller	Katalognummer	Verdünnungen	
			WB	IF
Cy TM 2 donkey anti chicken IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	730-225-155		1:300
Cy TM 2 donkey anti guinea pig IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	706-225-148		1:300
Cy TM 3 donkey anti goat IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	705-154-147		1:300
Cy TM 3 donkey anti guinea pig IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	706-165-148		1:300
Cy TM 3 donkey anti rabbit IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	711-165-152		1:300
polyclonal swine anti rabbit HRP	Dako	P0399	1:2000	
polyclonal rabbit anti goat HRP	Dako	P0449	1:2000	
polyclonal rabbit anti guinea pig HRP	Dako	P0141	1:2000	
polyclonal goat anti mouse HRP	Dako	P0447	1:2000	

WB: Western Blot (Immunblot), IF: Immunfluoreszenz, EIMi: Elektronenmikroskopie

2.7.2 Enzyme und zugehörige Agenzien

Tabelle 2.10: Liste eingesetzter Enzyme sowie zugehöriger Puffer und Agenzien.

Enzyme/Puffer	Verwendung	Firma	Ort
<i>BamHI</i>	Restriktionsverdau	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
BioScript	cDNA-Synthese	Bioline GmbH	Luckenwalde
Calf Intestine Phosphatase (CIAP)	Dephosphorylierung Vektorrückgrat	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen
<i>EcoRI</i>	Restriktionsverdau	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)	qPCR	Solis BioDyne	Tartu, Estland
NH ₄ -Reaction Puffer (10x)	PCR -3'-A-Überhang	Stratec Molecular GmbH	Berlin
<i>NotI</i>	Restriktionsverdau	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Phusion® Polymerase (2 U/ml)	PCR - <i>Proofreading</i> Funktion	New England Biolabs	Frankfurt a.M.
Phusion® HF-Puffer (5x)	PCR - <i>Proofreading</i> Funktion	New England Biolabs	Frankfurt a.M.
PreScission Protease	proteolytischer Verdau	GE Healthcare GmbH	München
<i>PstI</i>	Restriktionsverdau	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Reaction Buffer BioScript (5x)	cDNA-Synthese	Bioline GmbH	Luckenwalde
RiboLock Rnase Inhibitor	Schutz der RNA vor Abbau	Thermo Scientific	Schwerte
T4 DNA Ligase	Ligation	New England Biolabs	Frankfurt a.M.
T4 DNA Ligase Puffer	Ligation	New England Biolabs	Frankfurt a.M.
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	PCR -3'-A-Überhang	Stratec Molecular GmbH	Berlin

2.7.3 Kits

Tabelle 2.11: Auflistung der eingesetzten Kits.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Firma	Ort
Dynabeads® Antibody Coupling Kit DynaL AS	Immobilisierung von Antikörpern an Beads	Invitrogen Life Technologies GmbH	Darmstadt
Invisorb® Spin DNA Extraction Kit	DNA-Isolation aus Agarosegel	Stratec Molecular GmbH	Berlin
Invisorb® spin Plasmid Mini Two	Plasmidpräparation -Mini	Stratec Molecular GmbH	Berlin
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	Thermo Fisher Scientific Inc.	Henningsdorf
Nucleobond® AX 100	Plasmidpräparation -Maxi	Machery Nagel	Düren

2.7.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.12: Übersicht verwendeter Feinchemikalien und Reagenzien.

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsquelle	Ort
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Agar (Bacto™)	Becton Dickson	NJ, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf
Bovines Serum Albumin (BSA)	ICN Biomedicals, Inc	Ohio, USA
Bromphenol Blue Na-salt	SERVA GmbH	Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue (Rotiphorese® Blau)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe

1-Desamino-8D-Arginin-Vasopressin (dDAVP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Difco™ Skim Milk	Becton Dickinson & Company	MD, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
dNTPs	Bioline GmbH	Luckenwalde
ECL-Lösung (Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents)	GE Healthcare GmbH	München
EDTA	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Entwickler G150	Agfa-Gevaert N.V.	Belgien
Essigsäure (Eisessig 100%)	Merck KGaA	Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KGaA	Darmstadt
Fixierer G354	Agfa-Gevaert N.V.	Belgien
Fluoromount-G	SouthernBiotech	AL, USA
Formaldehyd (37%)	J.T. Baker	Griesheim
GelRed™ Nucleic Acid Stain	VWR International GmbH	Darmstadt
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (0,5 µg/µl)	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Glutathion	Calbiochem; Merck Millipore	Darmstadt
Glutaraldehyd (25%)	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Glycerin Rotipuran®	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton Dickson	New Jersey, USA
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Isofluran (Forene 100%)	Abbott GmbH & Co. KG	Wiesbaden
Isopropanol	Merck KGaA	Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Magnesiumchlorid	Stratec Molecular GmbH	Berlin
Methanol	Merck KGaA	Darmstadt
2-Methyl-Butan	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Natriumazid	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumthiosulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Natriumcitrat (tri-Natriumcitrat-Dihydrat)	Merck KGaA	Darmstadt
Nembutal	Fagron	Barsbüttel
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA	Darmstadt
poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Proteinaseinhibitor cocktail tablets, complete	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Proteinmarker Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
SDS/ Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Silbernitrat	Merck KGaA	Darmstadt
Sucrose	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Tanninsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Temed N'N'N'N' tetramethylethylenediamin	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Triethanolamin	Merck KGaA	Darmstadt
Tris Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Merck KGaA	Darmstadt
Tris HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid)	Merck KGaA	Darmstadt
Triton® X-100	Merck KGaA	Darmstadt
Trizol peqGOLD TriFast™	peQlab Biotechnologie GmbH	Erlangen

Trypton (Bacto™)	Becton Dickson	NJ, USA
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Uranylacetat	Merck KGaA	Darmstadt
Xylol	J.T. Baker	Griesheim
Zitronensäure	Merck KGaA	Darmstadt

2.7.5 Materialien und Chemikalien der Zellkultur

Tabelle 2.13: Liste verwendeter Medien und Reagenzien in der Zellkultur.

Reagenzien	Bezeichnung/Firma	Ort
α-MEM	Lonza Group Ltd	Köln
DMEM	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH	Cölbe
Dynasore (Dynamain Inhibitor I)	Calbiochem; Merck Millipore	Darmstadt
EDTA	SERVA GmbH	Heidelberg
Fetal Bovine Serum (FKS)	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach
HiPerFect	Qiagen GmbH	Hilden
JetPEI	Polyplus transfection	NY, USA
L-Glutamine (200mM)	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach
Opti-MEM®	Invitrogen Life Technologies GmbH	Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Calbiochem; Merck Millipore	Darmstadt
renal epithelial growth medium	PromoCell GmbH	Heidelberg
Trypsin 2,5% 10x	Gibco, Invitrogen, Life Technologies	Darmstadt

2.7.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.14: Liste aller Verbrauchsmaterialien.

Material/Bezeichnung	Hersteller	Ort
Autoradiographiefilm FUJIFILM Super RX	Fujifilm Europe GmbH	Düsseldorf
Deckgläser Zellkultur (12 mm)	Marienfeld GmbH & Co KG	Lauda Königshofen
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml/1,5 ml/2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht
Falcon Gefäße (15 ml/50 ml)	Falcon Becton Dickson Labware	NJ, USA
Agar grids (square mesh grids 300mesh; G2300N)	Agar Scientific; Elektron Technology UK	Essex, England
Glutathion Magnet Beads (Pierce)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Henningsdorf
MicroAmp® optical adhesive film	Applied Biosystems	Darmstadt
Kryogefäße (2ml)	Simport	Beloeil, Kanada
Nitrocellulosemembran Porablot NCP (0,45 µm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG,	Düren
Objekträger Super Frost® Plus	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik	Emmendingen
PCR Tubes	Kisker Biotech	Steinfurt
Pipettenspitzen (10 µl/200 µl/1000 µl)	Sarstedt	Nümbrecht
MicroAmp® Fast optical 96Well Plate	Applied Biosystems	Darmstadt
Sterilfilter Minisart® (0,2 µm)	Sartorius	Göttingen
Talon His-Tag Resin Beads	Clontech laboratories Inc.	CA, USA
Ultra Zentrifugenfilter Amicon	Thermo Fisher Scientific Inc.	Henningsdorf
Ultra Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter® GmbH	Krefeld

Whatman-Papier (Gel Blotting Paper GB005)	Whatman GmbH	Dassel
Zellkultur 6 Well, 12 Well, 22mm Petrischale	Falcon Becton Dickson Labware	NJ, USA
Zellkultur Flasche 75 cm ²	Falcon Becton Dickson Labware	NJ, USA
ZipTip _{C18}	Millipore	MA, USA

2.7.7 Geräte

Tabelle 2.15: Liste verwendeter Geräte.

Gerät/Bezeichnung	Hersteller	Ort
Brutschrank Zellkultur (Binder Inkubator Serie CB150)	Binder GmbH	Tuttlingen
Chromatographiesäule Superdex 75 highload 16/60	GE Healthcare GmbH	München
Elektronenmikroskop Zeiss EM 906	Carl Zeiss Jena GmbH	Jena
Elektrophoresegerät Bio-Rad Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Elektrophoresegerät Pharmacia EPS 600 (SDS-Gel)	Pharmacia Biotech GmbH	Freiburg
Elektrophoresegerät Pharmacia LKB GPS 200/400	Pharmacia Biotech GmbH	Freiburg
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Filmentwickler Curix 60	Agfa-Gevaert N.V.	Belgien
Geldokumentationseinheit AlphaImager [®] EC	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Odendorf
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf AG	Hamburg
Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exiter	Carl Zeiss MicroImaging GmbH	Jena
Kryostat Leica CM 3050S (Kryomikrotom)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar
MALDI Probenträger	Bruker Daltonik	Bremen
MALDI Massenspektrometer: Bruker Ultraflex TOF	TOF Bruker Daltonik	Bremen
NanoPhotometer	Implen GmbH	München
Paraffinmikrotom Leica RM 2125RT	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar
PCR-Cycler PTC-220 DNA Engine Dyad [™] Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc.	USA
pH-Meter Knick 766 Calimatic	Knick	Berlin
Plattenreader Asys Expert 96	Beckman Coulter [®] GmbH	Krefeld
Real-time Cycler 7500 Fast	Applied Biosystems	Darmstadt
Rotor SW40Ti	Beckman Coulter [®] GmbH	Krefeld
Rotor TLA 100.4	Beckman Coulter [®] GmbH	Krefeld
SDS-Gelgießvorrichtung	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Semi-dry Blotter Transblot [®] SD	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
steriler Arbeitsplatz Zellkultur Hera Safe HS 12/2	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich Laborapparate AG	Bäch, Schweiz
Ultraschall (SONOPULS GM70; MS72)	Bandelin electronic	Berlin
Ultra-Turrax / Rotor-Stator-Homogenisator DiAx 600	Heidolph Instruments	Schwabach
Ultrazentrifuge Optima [™] MAX-XP	Beckman Coulter [®] GmbH	Krefeld
Ultrazentrifuge Optima [™] L-90K	Beckman Coulter [®] GmbH	Krefeld
Waage BP210S	Sartorius	Göttingen
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus Holding GmbH	Hanau

2.7.8 Software

Tabelle 2.16: Übersicht benutzter Software.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller/Bezugsquelle
AlphaImager	Densitometrie von Western Blots Geldokumentation	Alpha Innotech Corporation; CA, USA
Bruker Bio-Tool 3.2	Massenspektrometrie	http://bruker-daltonics-biotools.software.informer.com/
Chromas 2.01	Auswertung von Sequenzierungen	Technelysium Pty Ltd
NCBI, BLAST	Auswertung von Sequenzierungen	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Mascot 2.2 Suchmaschine	Massenspektrometrie	http://www.matrixscience.com/
Sequence Detection Systems SDS 2.1	Auswertung von qPCR	Applied Biosystems
UNICORN 5.2	Steuerung Gelchromatographie	GE Healthcare, Freiburg
UniProtKB/Swiss-Prot	Proteindatenbank	http://www.uniprot.org/
Zen Version 8	Konfokalmikroskopie	Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena

3 Ergebnisse

3.1 NKCC2 als *Lipid Raft*-Protein –Assoziation mit Flotillin-1 und THP

Zur Bestätigung einer vorausgegangenen Studie bezüglich der Lokalisation von NKCC2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen (*Lipid Rafts*) (Welker et al., 2008) wurden zunächst immunhistochemische Doppelfärbungen auf Paraffinschnitten von Rattennieren mit dem *Lipid Raft*-Markerprotein Flotillin-1 (Bickel et al., 1997; Santamaria et al., 2005) sowie dem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertem *Raft*-Protein THP (Cavallone et al., 2001) durchgeführt. Dabei konnten alle drei untersuchten Proteine in Vesikeln vor allem in der apikalen Region der dicken aufsteigenden Henle Schleife (TAL) nachgewiesen werden und in diesem Bereich zeigte sich eine partielle Kollokalisierung von NKCC2 mit THP und Flotillin-1 (Abb. 3.1).

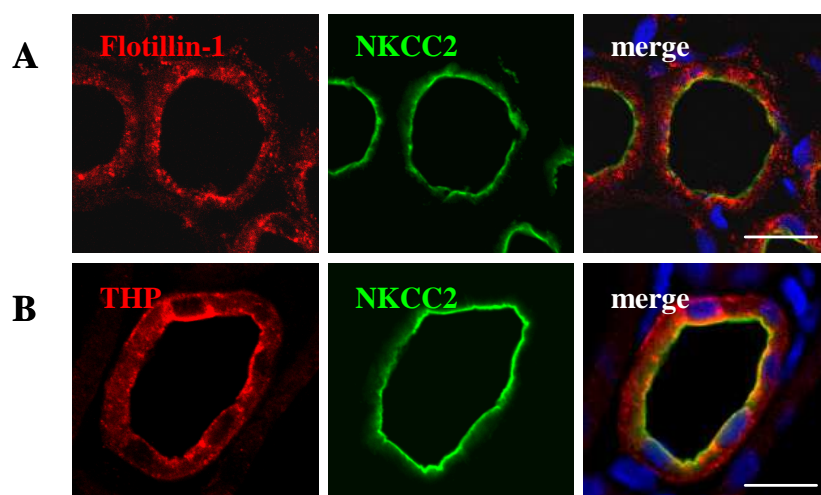


Abbildung 3.1: Immunhistochemische Lokalisation von NKCC2 im TAL der Rattenniere.

Doppelmarkierungen von NKCC2 (2.1 Antikörper; grün) und den *Lipid Raft*-Markern Flotillin-1 (A) bzw. THP (B) (beide rot) auf Paraffinschnitten aus Nieren von Sprague-Dawley Ratten zeigten eine apikale bzw. subapikale vesikuläre Verteilung aller drei Proteine im TAL sowie partielle Kollokalisierungen zwischen NKCC2 und den *Lipid Raft*-Proteinen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Für weiterführende Untersuchungen wurden Plasmamembran-Sheets von TAL-Zellen präpariert, immunmarkiert und elektronenmikroskopisch analysiert. Dabei wurden innerhalb der Plasmamembran NKCC2-positive Mikrodomänen identifiziert, in denen auch Flotillin-1 bzw. THP lokalisiert waren. Somit konnte die Koexpression der betrachteten *Lipid Raft*-Markerproteine mit NKCC2 in der apikalen Membran bestätigt werden. Des Weiteren

befanden sich die detektierten Proteine ausschließlich in den dunkler gefärbten Bereichen der *Sheets*. Diese lipidreichen Domänen variierten stark in ihrer Größe und bildeten Inseln innerhalb der Plasmamembran, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um sogenannte *Lipid Rafts* handelt (Abb. 3.2). Dafür spricht auch, dass der *non-Raft*-Marker Transferrin-Rezeptor (TFR) nicht innerhalb dieser dunkel gefärbten Bereiche lokalisiert werden konnte und demzufolge nicht mit NKCC2 kolokalisierte.

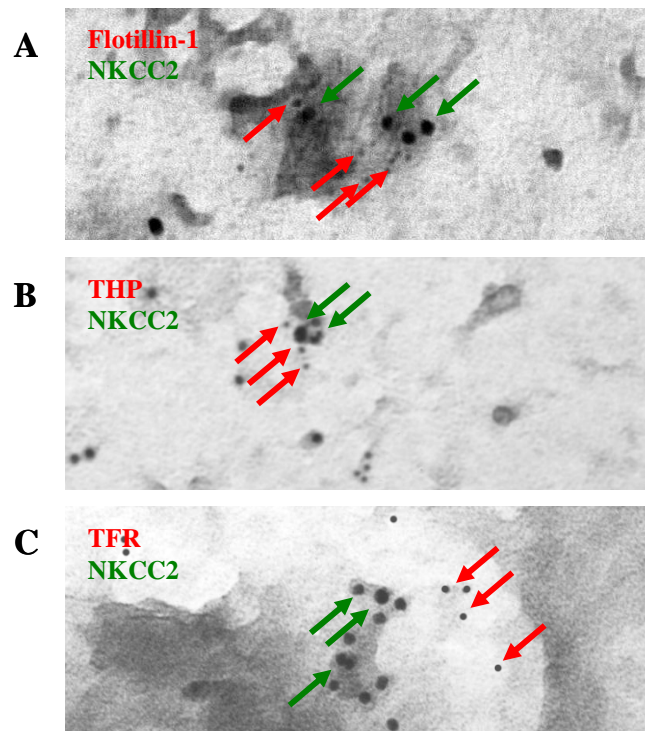


Abbildung 3.2: Lokalisation von NKCC2 in Flotillin-1- und THP-positiven Membranmikrodomänen.

Präparation von Plasmamembran-*Sheets* von kultivierten TAL-Zellen und anschließende Immunogold-Doppelmarkierung von NKCC2 (10 nm; grüne Pfeile) und Flotillin-1 (A, 5 nm; rote Pfeile) oder THP (B, 5 nm; rote Pfeile). Die elektronenmikroskopische Auswertung zeigte eine Kolokalisation dieser Proteine innerhalb derselben Membranmikrodomänen. Dagegen wurde keine Kolokalisation zwischen TFR (C, 5 nm; rote Pfeile) und NKCC2 gefunden.

Des Weiteren ist bekannt, dass Flotillin-1 und THP bei einer Dichtegradientenzentrifugation in den flottierenden, mit Cholesterin angereicherten Fraktionen niedrigerer Dichte akkumuliert werden (Bickel et al., 1997; Cavallone et al., 2001; Santamaria et al., 2005). Um zu überprüfen, ob die Kolokalisation von NKCC2 mit diesen Proteinen weiter eingegrenzt werden kann, wurde die detergensresistente Membranfraktion aus der äußeren Medulla von Sprague-Dawley Ratten mittels diskontinuierlichem *Floating Assay* isoliert. Die Western Blot Analyse der erhaltenen Fraktionen des Sucrosegradienten ergab eine spezifische Anreicherung von NKCC2 innerhalb der Flotillin-1- und THP-positiven Fraktionen (Abb. 3.3). Somit konnten frühere Ergebnisse bestätigt werden (Welker et al., 2008). Triton[®] X-100-lösliche

Proteine akkumulierten im unteren Abschnitt des Gradients und wurden durch den Nachweis von Clathrin als *non-Raft*-Fraktion bestätigt (Mazzone et al., 2006).

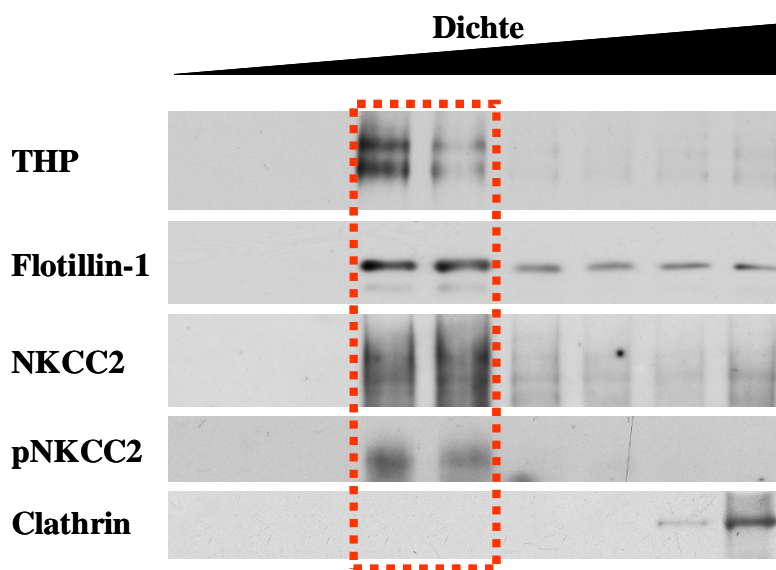


Abbildung 3.3: Diskontinuierlicher *Floating Assay* zur Anreicherung von *Lipid Rafts*.

Triton[®] X-100-unlösliche Homogenate der äußeren Rattenmedulla wurden einer Dichtegradientenzentrifugation mit einem diskontinuierlichen Sucrosegradient (5-40%) unterzogen. Die Western Blot Analyse zeigte die Verteilung der betrachteten Proteine in den einzelnen Fraktionen und eine spezifische Anreicherung von NKCC2, Flotillin-1 und THP in detergensresistenten Fraktionen bei niedrigerer Dichte (ca. 20% Sucrose; gerahmt). Der Nachweis von Clathrin diente der Identifikation der schwereren *non-Raft*-Fraktionen innerhalb des Gradients.

3.2 Identifikation von ANXA2 als möglichen Interaktionspartner von NKCC2 in *Lipid Rafts*

Basierend auf vorausgegangen Studien wird angenommen, dass *Lipid Rafts* nicht nur für die Funktion von NKCC2 verantwortlich sind, sondern möglicherweise auch für die Rekrutierung von Proteinen, die mit Membranen interagieren und dadurch in die Translokation von NKCC2-Vesikeln sowie die Fusion mit der apikalen Membran involviert sind (Welker et al., 2008). Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit potentielle regulatorische Interaktionspartner von NKCC2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen identifiziert und charakterisiert werden. Dafür wurde aus den angereicherten *Lipid Raft*-Fraktionen des *Floating Assays* eine NKCC2-Immunpräzipitation durchgeführt und die kopräzipitierten Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert.

3.2.1 Etablierung und Validierung der NKCC2-Immunpräzipitation

Um die Charakterisierung der NKCC2-positiven Membranmikrodomänen hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung voranzubringen, musste zunächst eine *in vivo* NKCC2-Immunpräzipitation aus homogenisiertem Nierengewebe etabliert werden. Dabei wurde ausschließlich die äußere Medulla der Rattennieren verwendet, da die Abundanz von NKCC2 in diesem Nierensegment am höchsten ist (Abb. 3.4). Auf diese Weise sollte der Anteil an anderen, NKCC2-negativen, cholesterinreichen Membranmikrodomänen im Ausgangsmaterial so gering wie möglich gehalten werden.

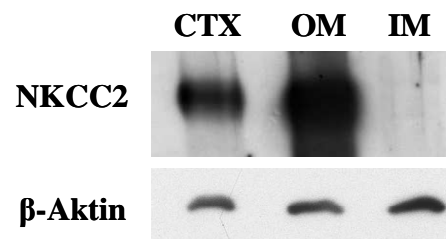


Abbildung 3.4: Präparation der einzelnen Nierensegmente.

Zur Überprüfung der Präparation der einzelnen Nierensegmente wurden Nieren von Sprague-Dawley Ratten in CTX, OM und IM geteilt und homogenisiert. Die Western Blot Analyse zeigte die Verteilung von NKCC2 in den einzelnen Fraktionen, wobei eine spezifische Anreicherung in der OM zu sehen war.

Die Western Blot Analyse der Immunpräzipitate ergab, dass durch den Einsatz des Kaninchen NKCC2-Antikörpers (AB 3562P) der Kotransporter präzipitiert werden konnte (Abb. 3.5, IP-Spur). Dagegen war im Eluat der Kontroll-Immunpräzipitation, bei der unspezifische Kaninchen IgG-Antikörper an die Beads gekoppelt waren, keines der untersuchten Proteine nachweisbar (Abb. 3.5, IgG-Spur). Zur weiteren Überprüfung der Methode wurden verschiedene *Raft*- und *non-Raft*-Proteine bezüglich ihrer Koimmunpräzipitation mit NKCC2 getestet. Dabei konnten das GPI-verankerte Protein THP und Flotillin-1 erneut als interagierende Proteine nachgewiesen werden, was eine enge physikalische Assoziation dieser *Lipid Raft*-Proteine mit NKCC2 erhärtet. Im Gegensatz dazu wurden weder das ebenfalls in *Lipid Rafts* vorkommende Protein NHE3 (Li et al., 2001; Murtazina et al., 2006) noch der *non-Raft*-Marker TFR (Harder et al., 1998; Magee and Parmryd, 2003), die beide in der apikalen Membran des TAL lokalisiert sind, mit NKCC2 koimmunpräzipitiert. Die in *Lipid Rafts* innerhalb der basolateralen Membran lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase (Welker et al., 2007) war im Eluat ebenfalls nicht detektierbar.

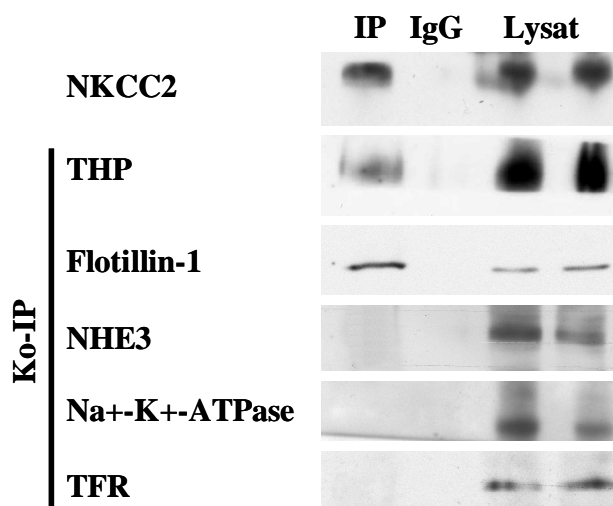


Abbildung 3.5: Immunpräzipitation von NKCC2 aus medullären Nierenhomogenaten.

Die Immunpräzipitation aus medullären Nierenhomogenaten von Sprague-Dawley Ratten wurde unter Verwendung des Kaninchen NKCC2-Antikörpers (AB 3562) etabliert. Die erhaltenen Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Dabei wurde NKCC2 nachgewiesen (2.1 Antikörper) und Flotillin-1 und THP wurden als koimmunpräzipitierende Proteine von NKCC2 detektiert. Im Gegensatz dazu waren die negativen Referenzproteine NHE3, Natrium-Kalium-ATPase und TFR in den Immunpräzipitaten nicht nachweisbar. Alle untersuchten Proteine fehlten in der Kontroll-Immunpräzipitation, konnten aber in den Medulla-Lysaten detektiert werden. IP, Immunpräzipitation mit NKCC2-tragenden Beads; IgG, Kaninchen-IgG tragende Beads als Kontrolle; Lysat, medulläre Nierenlysate als Ausgangsmaterial.

3.2.2 Massenspektrometrie der NKCC2-Immunpräzipitate

Da das Ziel dieser Arbeit darin bestand, weitere Proteine zu identifizieren, die mit NKCC2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen interagieren, wurden als Ausgangsmaterial für die NKCC2-Immunpräzipitation die Fraktionen des Sucrosegradienten verwendet, die sich im Bereich niedrigerer Dichte sammelten und in denen der Kotransporter akkumuliert vorlag. Zur weiteren Analyse wurden die gebundenen Immunkomplexe von den Beads eluiert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Coomassie- bzw. Silber-Färbung des NKCC2-Immunpräzipitats wies dabei eine Vielzahl distinkter Proteinbanden auf, die hinsichtlich ihrer Intensität und Größe stark variierten. Im Gegensatz dazu waren in der parallel durchgeführten Kontroll-Immunpräzipitation kaum Proteine im Eluat detektierbar (Abb. 3.6).

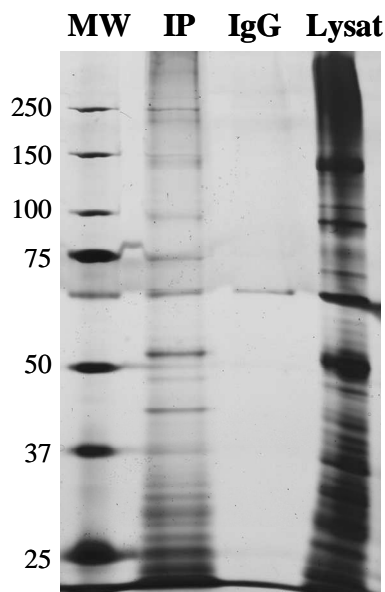


Abbildung 3.6: SDS-PAGE und Silberfärbung nach NKCC2-Immunpräzipitation.

Für die NKCC2-Immunpräzipitation wurden NKCC2-enhaltende cholesterinreiche Fraktionen des diskontinuierlichen Sucrosegradienten verwendet, die aus der Triton[®] X-100-unlöslichen Membranfraktionen aus der äußeren Medulla von Sprague-Dawley Ratten stammten. Das repräsentative Silber-gefärbte SDS-Gel enthielt in der Spur, in der die mit dem NKCC2-Antikörper präzipitierten Proteine aufgetrennt waren, viele unterschiedliche Banden (IP). In der Kontroll-Immunpräzipitation waren dagegen keine Banden erkennbar (IgG). Die als Ausgangsmaterial fungierende *Lipid Raft*-Fraktion wies das am stärksten ausgeprägte Banden-Muster auf (Lysat, 10%).

Anschließend wurden aus vergleichbaren, Coomassie-gefärbten SDS-Gelen einzelne Proteinbanden der NKCC2-Immunpräzipitate ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine massenspektrometrisch analysiert (MALDI-TOF/TOF MS). Parallel dazu wurden ebenfalls die Kontroll-Immunpräzipitate untersucht, um Hintergrundsignale ausschließen zu können. Dabei wurde jeweils das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgenommen. Mit Hilfe dieser *Peptide-Mass-Fingerprints* konnten dann einzelne Peptide bzw. Proteine eindeutig identifiziert werden.

Auf diese Weise ließ sich eine Reihe an möglichen NKCC2-Interaktionspartnern identifizieren, von denen einige bereits als *Lipid Raft*-Proteine bekannt sind, zum Beispiel Moesin (Itoh et al., 2002) und Ezrin (Ruppelt et al., 2007) als Mitglieder der Ezrin-Radixin-Moesin Familie. Des Weiteren wurden einige Proteine gefunden, die über einen Lipid-Anker verfügen und in verschiedene Membran- bzw. Proteintransportvorgänge sowie Endo- und Exozytose involviert sind. Dabei handelt es sich um das *Ras-related protein Rab-35* (Kouranti et al., 2006), das *Ras-related protein Ral-A* (Balasubramanian et al., 2010) und das *GTP-binding protein Rab-3D* (Oberhauser et al., 1994). Andere Kandidaten waren beispielsweise das Calcineurin-inhibierende *Calcium-binding protein CHP*, das unter anderem eine Rolle beim Vesikeltransport und bei der Regulation des Natrium-Wasserstoff-Austauschers NHE1

spielt (Lin et al., 1999; Matsushita et al., 2011) und Plasminogen in Kombination mit dem *Low-density lipoprotein receptor-related protein 2* (LRP-2), das bei der Endozytose beteiligt ist und Plasminogen bindet (Andersen et al., 2001; Czekay et al., 2001). Zudem wurden ebenfalls THP und Flotillin-1 eindeutig identifiziert, was die bisherigen Ergebnisse bestärkt und somit die Methode unterstützt. Die Treffer mit den höchsten Werten (73-103; 3 unabhängige Experimente) erreichten NKCC2 als direkt immunpräzipitiertes Protein und ANXA2 als Kopräzipitat (Abb. 3.7).

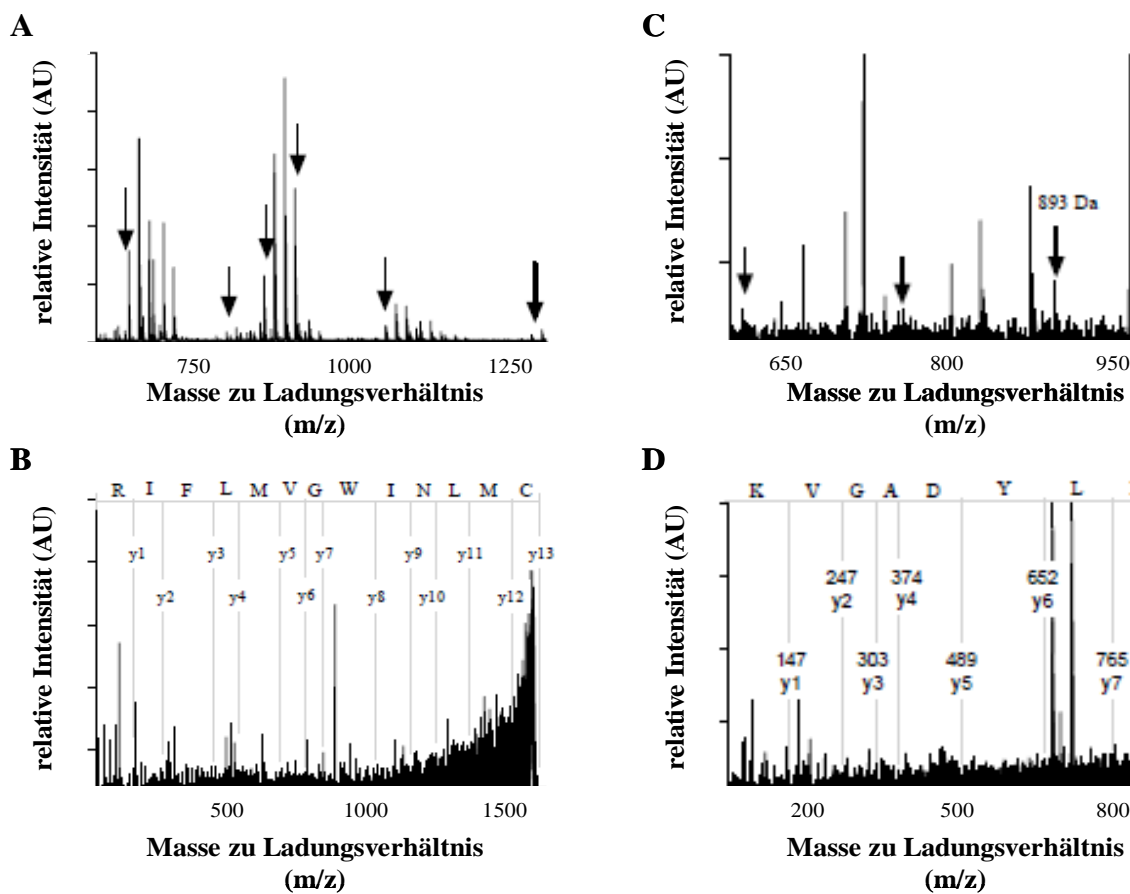


Abbildung 3.7: Massenspektrometrische Analyse einzelner Proteinbanden des NKCC2-Immunpräzipitats aus *Lipid Raft*-Fraktionen der äußeren Medulla von Rattennieren.

Unter Verwendung des NKCC2 Antikörpers wurden Proteine aus der mit NKCC2-angereicherten *Lipid Raft*-Fraktion der OM von Rattennieren immunpräzipitiert. Coomassie-gefärbte Banden wurden aus der SDS-PAGE von den NKCC2-Immunpräzipitaten ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. MALDI-TOF Massenspektrum von jeweils einer Coomassie-gefärbten Bande des NKCC2-Immunpräzipitats (A)(C). Die markierten Peaks entsprechen der Peptidsequenz R-I-F-L-M-V-G-W-I-N-L-M-C von NKCC2 (A) bzw. K-V-G-A-D-Y-L-E von ANXA2 (C). MALDI-TOF/TOF Massenspektren der markierten Peaks aus A (B) und C (D). Relevante Ionen wurden gekennzeichnet und bestätigten die jeweils dargestellte Aminosäuresequenz.

3.3 Verifikation der Interaktion zwischen ANXA2 und NKCC2

3.3.1 Lokalisation von ANXA2 und NKCC2 im TAL und der MD

Die bisherigen Daten weisen darauf hin, dass ANXA2 mit NKCC2 innerhalb von cholesterinreichen Membranmikrodomänen assoziiert ist. Um dieses Resultat zu verifizieren, wurde zunächst untersucht, ob ANXA2 und NKCC2 in der Niere kolokalisiert sind. Dafür wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen auf Kryoschnitten von Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Dabei wurde eine deutliche Kolokalisation von ANXA2 und NKCC2 im apikalen endozytotischen Kompartiment der dicken aufsteigenden Henle Schleife (TAL) und in den Zellen der MD detektiert (Abb. 3.8).

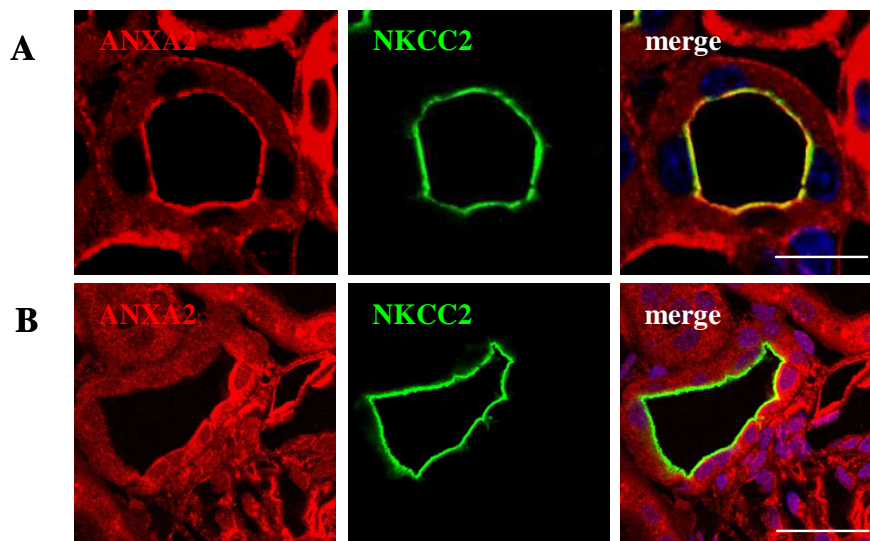


Abbildung 3.8: Kolokalisation von ANXA2 und NKCC2 im TAL und der MD.

Immunhistochemische Doppelfärbung von ANXA2 (rot) und NKCC2 (grün) auf Kryoschnitten aus Nieren von Sprague-Dawley Ratten. Die Konfokalmikroskopie zeigte eine apikale bzw. subapikale vesikuläre Verteilung der untersuchten Proteine im TAL (A) und in den Zellen der MD (B). Dabei konnten deutliche Kolokalisationen zwischen NKCC2 und ANXA2 detektiert werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

In früheren Studien wurde gezeigt, dass ANXA2 mit P11 interagiert, wobei ein funktioneller heterotetramischer Komplex bestehend aus zwei ANXA2-Monomeren und zwei P11-Molekülen gebildet wird (Gerke and Weber, 1985; Glenney and Tack, 1985). Zudem wirkt P11 als Verbindungsglied, indem es das jeweilige Zielprotein auf diese Weise an ANXA2 bindet. Des Weiteren wird angenommen, dass der ANXA2-P11-Komplex interagierende Proteine zur Plasmamembran oder anderen Zielmembranen leitet und somit deren Translokation reguliert (Rescher and Gerke, 2008). Aufgrund dieser Daten wurde die Lokalisation von P11 durch immunhistochemische Doppelfärbungen mit NKCC2 an Nierengewebe durchgeführt. In den Zellen des TAL und der MD lag P11 gleichmäßig verteilt

im Zytoplasma vor. Eine Kolokalisation zwischen P11 und NKCC2 konnte in den betrachteten Zellen nur partiell im apikalen Bereich nachgewiesen werden (Abb. 3.9).

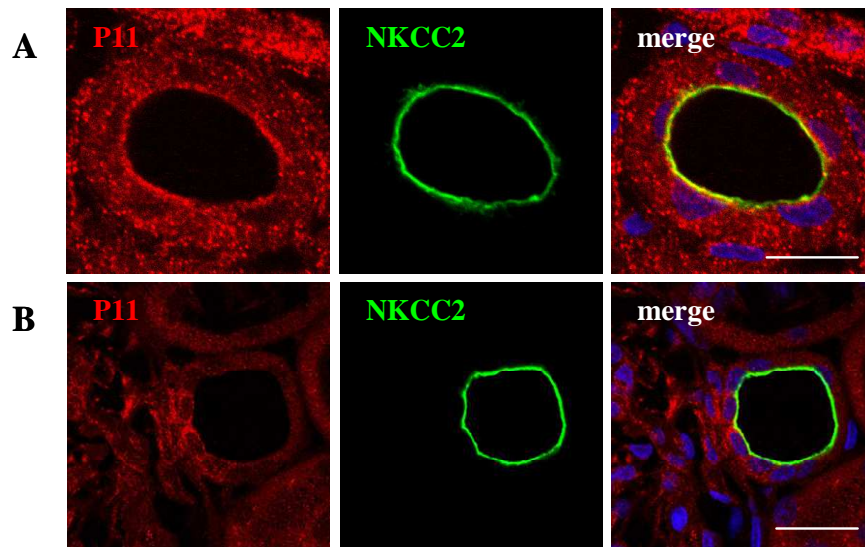


Abbildung 3.9: Kolokalisation von P11 und NKCC2 im TAL und der MD.

Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von P11 (rot) und NKCC2 (grün) an Kryoschnitten aus Nieren von Sprague-Dawley Ratten zeigten eine ausschließlich apikale Lokalisation von NKCC2 im TAL (A) und in den Zellen der MD (B). Im Gegensatz dazu war P11 diffus im Cytosol beider Zelltypen verteilt. Es ist nur eine schwache apikale Kolokalisation zwischen NKCC2 und P11 sichtbar. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Um die Resultate der Massenspektrometrie und der Immunhistochemie zu erhärten, wurde die physische Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2 und/oder P11 innerhalb der äußeren Medulla von Rattennieren mittels Koimmunpräzitationen untersucht. Bei der Immunpräzitation von endogenem NKCC2 wurden endogenes ANXA2 und P11 kopräzipitiert (Abb. 3.10A) und umgekehrt wurde gezeigt, dass mit endogenem ANXA2 NKCC2 und P11 koimmunpräzitierten (Abb. 3.10B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese drei Proteine in denselben *Lipid Rafts* vorliegen und möglicherweise in einem funktionellen Komplex interagieren.

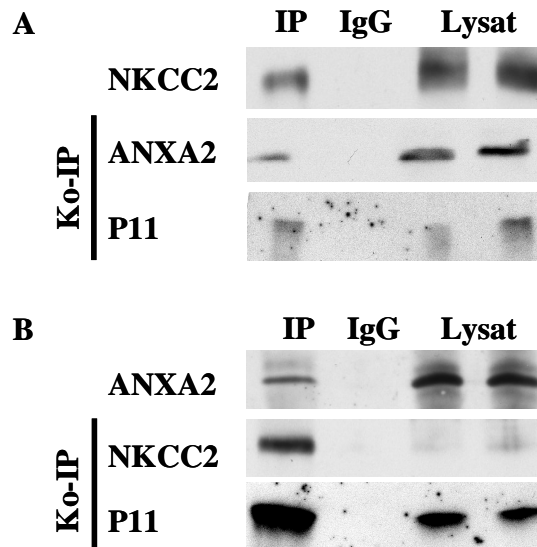


Abbildung 3.10: Immunpräzipitationen von endogenem ANXA2 und NKCC2.

Koimmunpräzipitationen wurden unter Verwendung des NKCC2- und des ANXA2-Antikörpers aus Proteinlysaten von der OM der Rattenniere durchgeführt. Die Analyse der Immunpräzipitate und der eingesetzten Proteinlysate erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot für NKCC2, ANXA2 und P11. Dabei wurde gezeigt, dass die drei Proteine sowohl unter Einsatz des NKCC2 (**A**)- als auch des ANXA2 (**B**)- Antikörpers gemeinsam präzipitierten, was auf eine mögliche Interaktion schließen lässt. Als Negativkontrolle der Immunpräzipitation diente jeweils ein vom Isotyp passendes IgG.

Zur Untersuchung des Vorkommens von NKCC2, ANXA2 und P11 in identischen Membranmikrodomänen innerhalb der apikalen Plasmamembran wurden Immunogold-Markierungen an Plasmamembran-Sheets von kultivierten raTAL-Zellen elektronenmikroskopisch betrachtet. Dabei waren ANXA2 und P11 in den NKCC2-positiven Membranstrukturen sichtbar (Abb. 3.11).

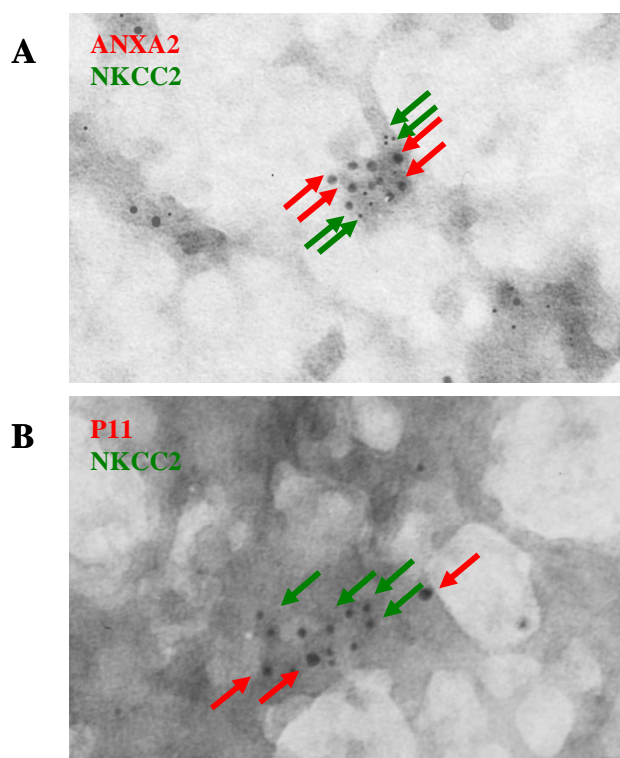


Abbildung 3.11: Lokalisation von ANXA2 und P11 in NKCC2-positiven Membranmikrodomänen.

An Plasmamembran-*Sheets* von kultivierten TAL-Zellen wurde eine Immunogold-Doppelmarkierung von NKCC2 (5 nm; grüne Pfeile) und ANXA2 (A; 10 nm; rote Pfeile) oder P11 (B; 10 nm; rote Pfeile) durchgeführt. Mittels Elektronenmikroskopie konnte eine Kolokalisation dieser Proteine in denselben Membranmikrodomänen nachgewiesen werden.

3.3.2 Lokalisation von ANXA2 und P11 in NKCC2-positiven *Lipid Rafts*

Um die bisherigen Ergebnisse und damit die detektierte Kolokalisation dieser drei Proteine zu verifizieren, wurde eine weitere unabhängige Methode angewandt. Dafür wurden detergensresistente Membranen aus der OM der Rattennieren präpariert, mittels diskontinuierlicher Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert und danach hinsichtlich der Verteilung von ANXA2 und P11 im Western Blot untersucht. Vergleichbar mit NKCC2 lagen auch ANXA2 und P11 im Sucrosegradient im Bereich geringerer Dichte angereichert vor (Abb. 3.12, gerahmt). Diese Daten indizieren ebenfalls, dass beide Proteine in denselben cholesterinreichen Membranstrukturen wie NKCC2 vorkommen.

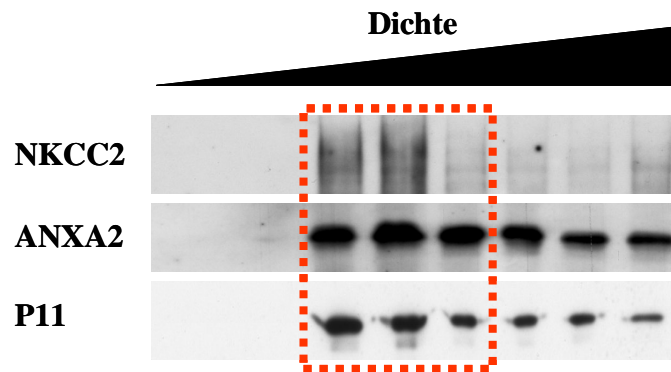


Abbildung 3.12: Akkumulation von ANXA2 und P11 im *Floating Assay* in den NKCC2-positiven Fraktionen geringer Dichte.

Membranfraktionen der OM von Sprague-Dawley Rattennieren wurden mit 1% Triton[®] X-100 behandelt. Die detergensresistenten Anteile wurden einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Der Western Blot der einzelnen Fraktionen zeigte eine Anreicherung von ANXA2 und P11 in den NKCC2-positiven Bereichen geringer Dichte innerhalb des Sucrosegradienten (gerahmt).

Die ultrastrukturelle Analyse der pelletierten Triton[®] X-100-unlöslichen, cholesterinreichen Membranen (*Lipid Rafts*) aus den entsprechenden Fraktionen des *Floating Assays* (Abb. 3.12, gerahmt) zeigte Micellen mit einem Durchmesser von 100-200 nm. Durch die Immunogold-Markierung für ANXA2 und NKCC2 konnte gezeigt werden, dass einige Micellen positiv für beide Proteine, ANXA2 und NKCC2, waren (Abb. 3.13).

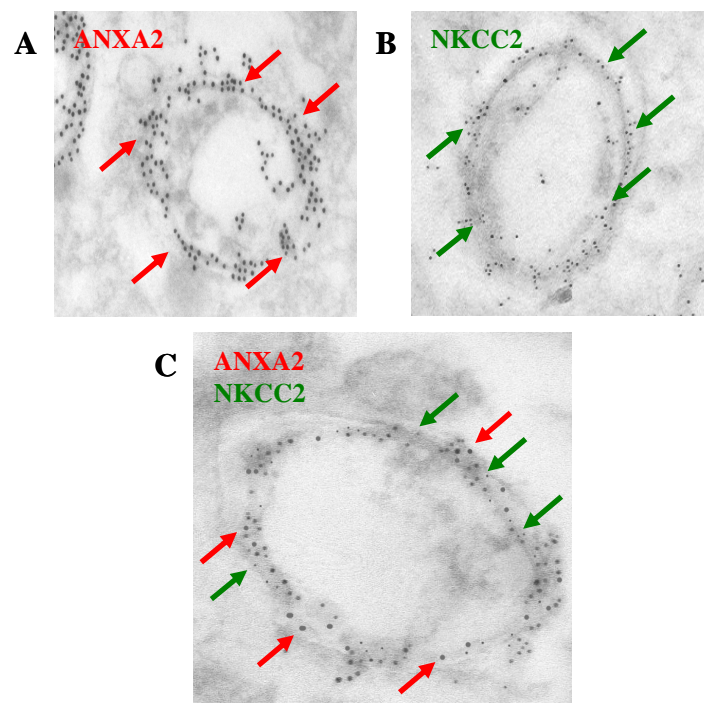


Abbildung 3.13: Ultrastruktur und Immunogold-Markierung der *Lipid Raft* -Anreicherung.

Zur Analyse der Ultrastruktur der detergensunlöslichen, cholesterinreichen Membranen, die sich während der Dichtegradientenzentrifugation im Bereich geringer Dichte akkumulierten, wurden diese anschließend pelletiert und für spezifische Proteine Immunogold-markiert. Die Elektronenmikroskopie zeigte Triton[®] X-100-unlösliche Micellen (~200 nm im Durchmesser), die positiv für ANXA2 (A; 10 nm) bzw. NKCC2 (B; 5 nm) waren bzw. mit Hilfe einer Doppelmarkierung konnten Micellen detektiert werden in denen beide Proteine kolokalisierten (C).

Die mit NKCC2 angereicherten Sucrosegradient-Fractionen, die sich im Bereich geringerer Dichte sammelten, wurden pelletiert und letztlich für die NKCC2-Immunpräzipitationen verwendet, um die Assoziation zwischen dem Kotreporter, ANXA2 und P11 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen zu verifizieren. Dabei wurden ANXA2 und P11 als Proteine bestätigt, die mit NKCC2 koimmunpräzipitieren (Abb. 3.14). Des Weiteren konnte auch das als Positivkontrolle fungierende *Lipid Raft*-Protein Flotillin-1 im NKCC2-Präzipitat nachgewiesen werden, was wiederum die Ergebnisse der Massenspektrometrie verifiziert.

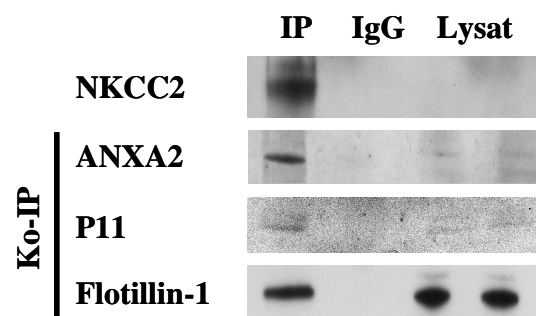


Abbildung 3.14: NKCC2-Immunpräzipitation aus der isolierten *Lipid Raft*-Fraktion.

Cholesterinreiche Fraktionen des diskontinuierlichen Sucrosegradienten dienen als Ausgangsmaterial für Immunpräzipitationen mit dem NKCC2 Antikörper sowie einem IgG passenden Isotypen. Mittels SDS-PAGE der Immunpräzipitate und anschließendem Western Blot erfolgte die Detektion von NKCC2 im Eluat. Die Proteine ANXA2 und P11 konnten als koimmunpräzipitierte Proteine nachgewiesen werden. Auch das positive Referenzprotein Flotillin-1 wurde mit NKCC2 kopräzipitiert.

Zusammenfassend weisen die bisherigen Ergebnisse darauf hin, dass NKCC2 zusammen mit dem Membranmikrodomänen-Organisator ANXA2 und seinem Komplexpartner P11 in denselben cholesterinreichen Membranmikrodomänen im apikalen Bereich des TAL und der MD lokalisiert ist und dass zwischen diesen Proteinen *in vivo* Interaktionen stattfinden, was durch die Koimmunpräzipitationsexperimente nachgewiesen werden konnte.

3.3.3 Protein-Protein-Interaktion zwischen ANXA2 und NKCC2

Es wurde gezeigt, dass endogenes NKCC2, ANXA2 und P11 nicht nur gemeinsam in *Lipid Rafts* vorkommen (Abb. 3.11-3.13) sondern ebenfalls eine Interaktion zwischen diesen Proteinen stattfindet (Abb. 3.10, 3.14). Ob diese Interaktion abhängig vom Phosphorylierungsstatus von NKCC2 ist und ob es sich dabei um eine direkte Protein-Protein-Bindung handelt, sollte mit Hilfe von *GST-Pulldown* Experimenten und *Peptid Spot Arrays* untersucht werden.

3.3.3.1 *Pulldown Assay*

Die *Pulldown Assays* wurden zum einen dazu verwendet, um die mittels Immunpräzipitation prognostizierte Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2 bzw. P11 näher zu charakterisieren und zum anderen sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung von spezifischen Serin (S126)- oder Threonin (T96, T101, T114)-Resten im zytoplasmatischen N-Terminus von NKCC2 einen Einfluss auf die Interaktion mit diesen beiden Proteinen hat. Für diese *in vitro* Methode wurden zunächst verschiedene Mutanten des N-Terminus von NKCC2 als rekombinante GST-Fusionsproteine hergestellt und an Glutathion-Beads gebunden (Abb. 3.15A). Diese Beads wurden anschließend mit Lysaten von ANXA2-GFP, P11-GFP oder GFP überexprimierenden Hek293-Zellen inkubiert (Abb. 3.15B). In dieser Zeit banden die im Lysat enthaltenen Interaktionspartner an die Matrix-gekoppelten GST-Fusionsproteine und konnten dann zusammen eluiert werden. Die Analyse der Präzipitate mittels Western Blot und einem GFP-Antikörper ergab, dass ANXA2-GFP mit hoher Quantität an den Wildtyp und die nicht-phosphomimetischen Mutanten des NKCC2 N-Terminus gebunden hatte. Dagegen war die Interaktionen zwischen ANXA2-GFP und den phosphomimetischen NKCC2-Mutanten kaum nachweisbar, da ausschließlich geringe Signalintensitäten detektiert werden konnten (Abb. 3.15C). Eine Interaktion zwischen dem N-Terminus von NKCC2 und P11-GFP konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.15D).

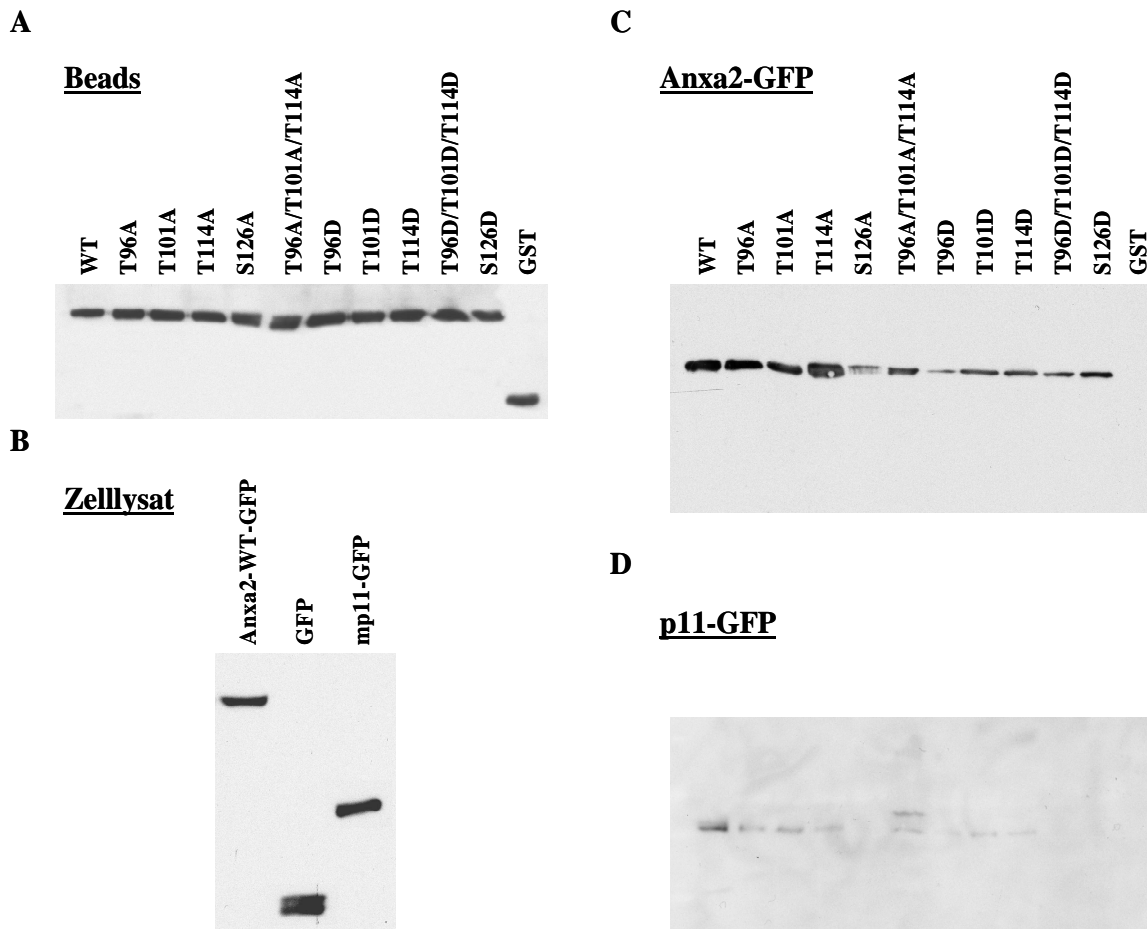


Abbildung 3.15: Pull-down Assay von rekombinanten, phosphomimetischen bzw. nicht-phosphomimetischen Mutanten des N-Terminus von NKCC2.

Der gesamte zytoplasmatische N-Terminus von NKCC2 sowie dessen phosphomimetische und nicht-phosphomimetische Mutanten wurden als rekombinante GST-Proteine exprimiert und an Glutathion-Beads gebunden. Parallel wurden ANXA2-GFP, P11-GFP und GFP in Hek293-Zellen überexprimiert. Zur Kontrolle wurden die jeweiligen Fusionsproteine im Western Blot mit einem GST (A)- oder GFP (B)-Antikörper nachgewiesen, wobei sie annähernd gleich starke Expressionsniveaus zeigten. Die mit dem N-Terminus von NKCC2 beladenen Beads wurden mit den Zelllysaten inkubiert und danach erfolgte die Elution der Proteinkomplexe, die an den Beads gebundenen hatten. Die Western Blot Analyse zeigte, dass ANXA2 vor allem mit dem Wildtyp sowie mit den unphosphorylierten N-Termini von NKCC2 interagiert, da dort die stärksten Signalintensitäten für ANXA2-GFP detektiert wurden (C). Dagegen war zwischen ANXA2 und den phosphomimetischen NKCC2-Mutanten nur eine schwache Interaktion nachweisbar (C) und zwischen P11-GFP und NKCC2 konnte keine Interaktion gezeigt werden (D). Als Negativkontrolle wurde pures GST an die Beads gekoppelt und mit den Zelllysaten inkubiert. In diesen Präzipitaten konnten weder ANXA2- noch P11-GFP detektiert werden, wodurch falsch positive Signale aufgrund von unspezifischen Interaktionen mit dem Tag-Protein ausgeschlossen werden konnten. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt.

3.3.3.2 Peptid Spot Array

Zur Verifikation der im *Pull-down Assay* gezeigten Interaktion zwischen ANXA2 und dem dephosphorylierten N-Terminus von NKCC2 wurden *Peptid Spot Arrays* verwendet. Des Weiteren sollte mit Hilfe dieser Bindungsstudie erstmals untersucht werden, ob es sich bei der

Interaktion zwischen dem N-Terminus von NKCC2 und ANXA2 um eine direkte Protein-Protein-Interaktion handelt.

Dafür wurden rekombinant hergestellte Peptide, die unterschiedliche phosphomimetische und nicht-phosphomimetische Mutanten des gesamten zytoplasmatischen N-Terminus von NKCC2 umfassten (Triplets 1-175), punktuell auf eine Zellulosemembran aufgebracht (*Spot*). Diese Membranen wurden dann mit den rekombinant hergestellten Proteinen ANXA2 oder P11 bzw. mit einer Kombination beider (ANXA2-P11-Tetramer) inkubiert. Dabei wurde mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen, dass ANXA2 direkt an die nicht-phosphorylierten NKCC2 N-Termini gebunden hatte. Im Gegensatz dazu konnte keine Bindung von P11 oder dem ANXA2-P11-Tetramer detektiert werden (Abb. 3.16).

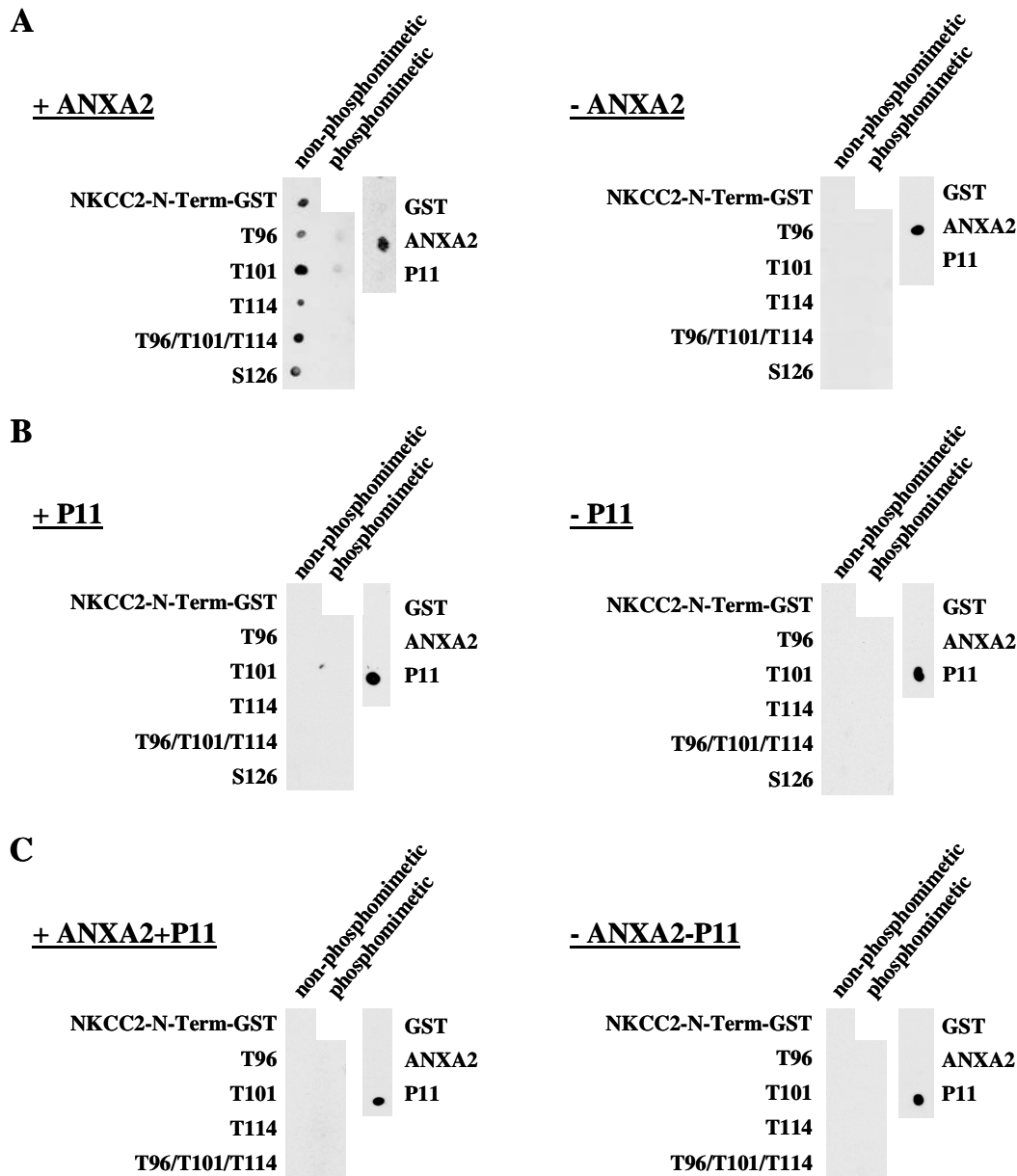


Abbildung 3.16: Peptid Spot Arrays mit gespotteten N-Termini von NKCC2 und ANXA2-/P11-Protein.

Die gesamte zytoplasmatische Domäne des N-Terminus von NKCC2 sowie dessen phosphomimetische und nicht-phosphomimetische Mutanten wurden in *E.coli* Rosetta als rekombinante GST-Proteine exprimiert, affinitätsgereinigt und auf eine Nitrozellulosemembran gespottet. Diese Membran wurde mit einer 0,1 μ M Lösung von rekombinant hergestelltem, ungetagtem ANXA2 (A), P11 (B) oder dem Tetramer aus ANXA2 und P11 (C) inkubiert. Unter Einsatz des entsprechenden ANXA2 oder P11 Antikörpers, sowie des korrespondierenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers mit anschließender Entwicklung konnten Interaktionen zwischen den auf der Membran befindlichen NKCC2 N-Termini und den überschichteten Proteinen detektiert werden. Hierbei zeigte ANXA2 eine direkte Bindung an die nicht-phosphomimetischen NKCC2 N-Termini (A). Für P11 sowie das ANXA2-P11-Tetramer konnte dagegen keine Bindung an den N-Terminus von NKCC2 nachgewiesen werden (B, C). Auf jeder Membran waren als Positivkontrollen ANXA2- und P11-Proteinspots aufgetragen. Als Negativkontrolle diente GST, welches nicht detektiert wurde. Zudem wurden Membranen ohne ANXA2 oder P11 inkubiert, um falsch positive Signale ausschließen zu können (rechtes Panel). Das Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

Zusammenfassend konnte zum einen gezeigt werden, dass ANXA2 direkt an den N-Terminus von NKCC2 bindet, wobei dieser dephosphoryliert vorliegen muss. Zum anderen wurde nachgewiesen, dass P11 weder in einem gemeinsamen Komplex mit dem N-Terminus von NKCC2 vorkommt, noch existiert eine direkte Bindung zwischen beiden. Somit bindet ANXA2 allein in Form des Monomers an NKCC2 und die direkte Interaktion ist unabhängig vom ANXA2-Komplexparker P11 bzw. ANXA2-P11-Komplex.

3.4 Brattleboro Ratten

Brattleboro Ratten können aufgrund einer Mutation im Vasopressin-Gen kein AVP sezernieren und somit ihren Urin nicht konzentrieren (Lee and Williams, 1972; Schmale and Richter, 1984). Durch die Gabe des Vasopressin-Analogons dDAVP wird die renale V₂-Rezeptor-Signalkaskade und somit der Urinkonzentrierungsmechanismus stimuliert (Bia et al., 1979; Moses and Coulson, 1980). Aufgrund dessen stellen Brattleboro Ratten ein Modell zur gezielten Aktivierung sowie der damit verbundenen apikalen Translokation von NKCC2 dar (Ares et al., 2011; Gimenez and Forbush, 2003; Welker et al., 2007) und eignen sich hervorragend zur Untersuchung der an diesem Prozess beteiligten Proteine.

3.4.1 Translokation von ANXA2, P11 und NKCC2 zur apikalen Plasmamembran unter Behandlung mit dDAVP

Kurzzeitige dDAVP-Applikationen führen neben der Phosphorylierung von regulatorischen Threoninen am N-Terminus von NKCC2 auch zum Transport des Kotransporters zur apikalen Membran und letztlich zu dessen Aktivierung (Ares et al., 2011; Gimenez and Forbush, 2003; Welker et al., 2007). Falls ANXA2 und P11 an dieser Translokation beteiligt sind, sollten sie parallel zu NKCC2 translozieren. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden die zellulären Lokalisationen von ANXA2 und P11 im TAL von 30 min dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten mittels Immunhistochemie und Western Blot untersucht.

Für immunhistochemische Analysen wurden Doppelmarkierungen auf Nieren-Paraffinschnitten von Kontroll- und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten angefertigt. In den Kontrolltieren konnte NKCC2 vor allem in Vesikeln im subapikalen Bereich des TAL lokalisiert werden (Abb. 3.17A, 3.18A grün). Auch ANXA2 (Abb. 3.17A rot) und P11 (Abb. 3.18A rot) konnten kaum in der apikalen Membran detektiert werden, sondern lagen eher diffus verteilt im Zytoplasma vor. Durch die Behandlung mit dDAVP reichte sich das apikal lokalisierte NKCC2 signifikant an, wie bereits durch Welker *et al.* gezeigt werden konnte (Welker et al., 2008). Gleichzeitig konnte eine Translokation von ANXA2 aus dem

Zytosol zur Zellmembran beobachtet werden, was zu einer verstärkten Kolo­kalisierung der beiden Proteine in der apikalen TAL-Membran führte (Abb. 3.17B). Vergleichbare Ergebnisse konnten für P11 beobachtet werden (Abb. 3.18B).

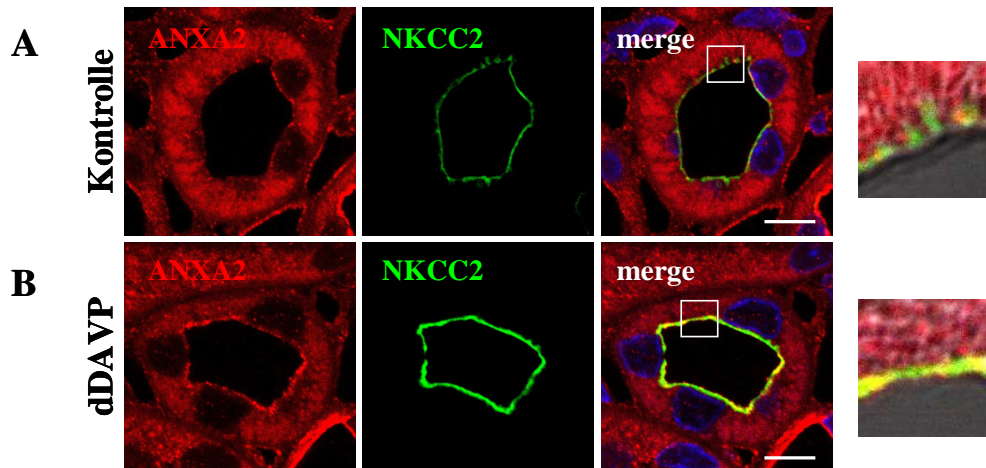


Abbildung 3.17: Translokation von ANXA2 im TAL von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten.

Immunhistochemische Doppelm­arkierung von ANXA2 (rot) und NKCC2 (grün) auf Paraffinschnitten von Nieren NaCl (Kontrolle) (A)- und 30 min dDAVP-behandelter (B) Brattleboro Ratten. Die Konfokalmikroskopie zeigte eine gesteigerte Oberflächenexpression und eine daraus folgende verstärkte Kolo­kalisierung der untersuchten Proteine in der apikalen Plasmamembran des TAL unter dDAVP-Stimulation (B), aufgrund der Translokation aus dem Zytosol zu Zelloberfläche. Die Zellkerne wurden mit DAPI ange­färbt (blau). Die rechte Bildreihe ist aus den Überlagerungsbildern (*merge*) heraus vergrößert und lässt die subapikale bzw. apikale Lokalisation erkennen. Abbildung exemplarischer konfokalmikroskopischer Aufnahmen; pro Gruppe wurden 5 Tiere untersucht. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

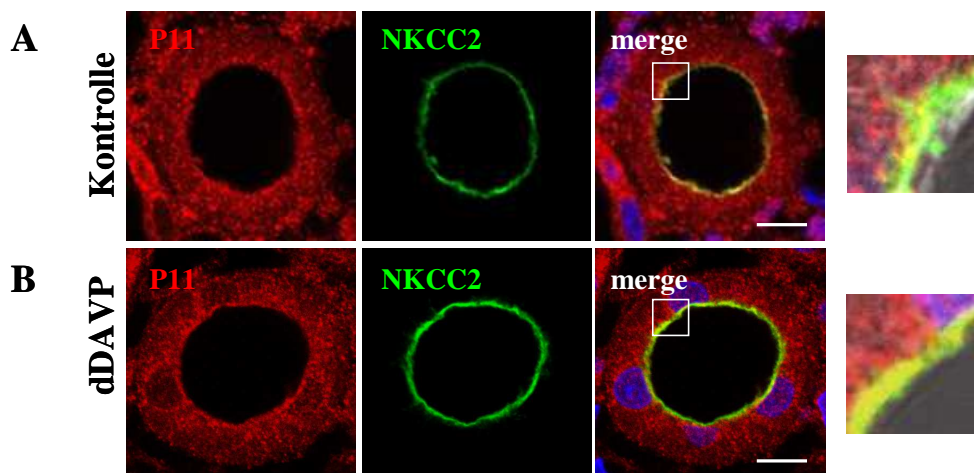


Abbildung 3.18: Translokation von P11 im TAL von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten.

Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von P11 (rot) und NKCC2 (grün) auf Paraffinschnitten von Nieren NaCl (Kontrolle) (A)- und 30 min dDAVP-behandelter (B) Brattleboro Ratten. Die Konfokalmikroskopie zeigte eine Translokation beider Proteine aus dem Zytosol in Richtung apikaler Zellmembran sowie eine damit einhergehende verstärkte Kolo­kalisierung in der apikalen Plasmamembran des TAL unter dDAVP-Stimulation (B). Die Zellkerne wurden mit DAPI ange­färbt (blau). Die rechte Bildreihe ist aus den Überlagerungsbildern (*merge*) heraus vergrößert und lässt die subapikale bzw. apikale Lokalisation erkennen. Dargestellt sind exemplarische konfokalmikroskopische Aufnahmen; pro Gruppe wurden 5 Tiere untersucht. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Zur Verifikation der in der Immunhistochemie gezeigten Kotranslokationen von ANXA2 bzw. P11 und NKCC2 zur apikalen Membran wurde das Lysat der OM von Kontroll- und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten mittels Zentrifugation jeweils in eine Zytosol (Zyt)- und eine Plasmamembran (PM)-angereicherte Fraktion getrennt. Die Auswertung der Western Blots erfolgte durch Densitometrie. Der Anteil des jeweiligen Proteins in der Zyt- oder PM-Fraktion wurde für jedes Tier ermittelt und relativ zum Gesamtproteingehalt angegeben [%]. Somit konnte gezeigt werden, dass der Anteil von NKCC2 nach der dDAVP-Behandlung in der PM-Fraktion signifikant um ~28% gestiegen war. Gleichzeitig verminderte sich der in der Zyt-Fraktion vorkommende NKCC2-Anteil äquivalent (Abb. 3.19A). Eine ähnliche Verschiebung lies sich auch bei ANXA2 beobachten, hier stieg der Anteil in der PM-Fraktion signifikant ebenfalls um ~28% im Vergleich zur ANXA2-Abundanz in der PM-Fraktion der Kontrolltiere (Abb. 3.19B). Im Gegensatz dazu änderte sich die Verteilung von P11 nicht (Abb. 3.19C). Das lässt vermuten, dass die Aktivierung des Urinkonzentrierungsmechanismus eine Kotranslokation von ANXA2 und NKCC2 aus dem Zytosol in die Plasmamembran nach sich zieht, aber P11 davon unbeeinflusst ist.

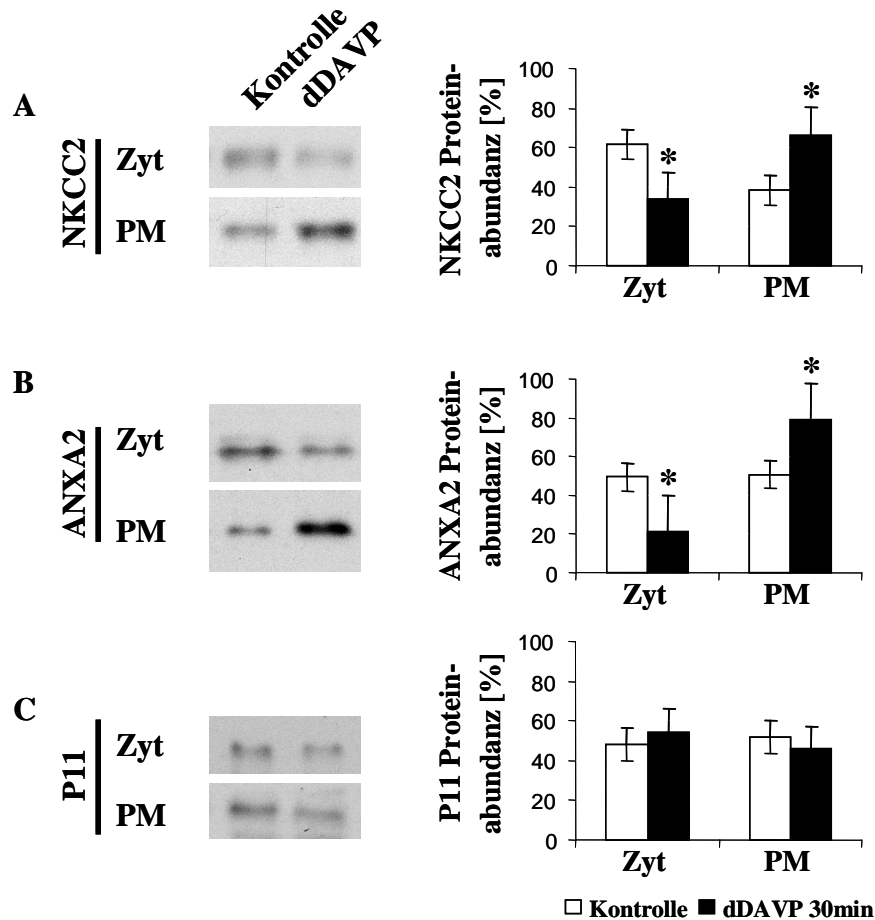


Abbildung 3.19: Verteilung von ANXA2, P11 und NKCC2 in den Zellfraktionen der äußeren Medulla von Brattleboro Ratten nach Behandlung mit dDAVP.

Nierenhomogenate der OM von 30 min dDAVP-behandelten und NaCl-behandelten (Kontrolle) Brattleboro Ratten wurden in je eine Zytosol (Zyt)- und eine Plasmamembran (PM)-angereicherte Fraktion separiert. Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der Abundanz von NKCC2 (A), ANXA2 (B) und P11 (C) analysiert. Durch die Stimulation mit dDAVP wurden die Abundanzen von NKCC2 (Kontrolle: 38,2%±7,6; dDAVP: 66,4%±13,9) und ANXA2 (Kontrolle: 50,7%±7,2; dDAVP: 79,1%±18,7) in der PM-Fraktion gesteigert, gleichzeitig war in der Zyt-Fraktion eine Verminderung dieser beiden Proteine zu beobachten (NKCC2: Kontrolle 61,8%±7,6, dDAVP 33,7%±13,9; ANXA2: Kontrolle 49,3%±7,1, dDAVP 20,9%±18,7). Im Gegensatz dazu blieb die Verteilung von P11 annähernd unverändert (PM: Kontrolle 51,7%±8,4, dDAVP 45,6%±11,5; Zyt: Kontrolle 48,3%±8,4, dDAVP 54,4%±11,5). Die Auswertung der Western Blots erfolgte, indem der Anteil eines Proteins in der Zyt- oder PM-Fraktion bei jedem Tier berechnet wurde; abgebildet ist beispielhaft der Blot für jeweils ein Tier. Gezeigt ist der MW ± SD; n=5, *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Diese beiden experimentellen Ansätze zeigten eine Translokation von ANXA2 zusammen mit NKCC2 durch dDAVP-vermittelte Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade in Brattleboro Ratten. Dabei wanderte ANXA2 mit NKCC2 aus dem Zytosol bzw subapikalen Bereichen zur apikalen Plasmamembran. Für P11 konnte dieser Effekt nur teilweise beobachtet werden.

3.4.2 Interaktion zwischen ANXA2 und pNKCC2 unter Behandlung mit dDAVP

Es ist bekannt, dass kurzzeitige Applikationen von dDAVP zur Phosphorylierung von regulatorischen Threoninen am N-Terminus von NKCC2 führen und somit letztlich die Aktivierung des Kotransporters bewirken (Ares et al., 2011; Gimenez and Forbush, 2003). Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese aktivierte NKCC2-Form zwar hauptsächlich in cholesterinreichen Membranmikrodomänen lokalisiert ist (siehe Abb. 3.3), aber nur eine sehr geringe Interaktion mit ANXA2 aufweist (siehe Abb. 3.15 und 3.16). Zur Verifikation dieser Ergebnisse wurde zunächst die zelluläre Lokalisation von pNKCC2 und ANXA2 in kurzzeit-behandelten Brattleboro Ratten mittels Immunhistochemie betrachtet und anschließend die Interaktion zwischen beiden Proteinen mittels Immunpräzipitation untersucht.

Für immunhistochemische Analysen wurden Doppelmarkierungen auf Nieren-Paraffinschnitten von Kontroll- und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten angefertigt. In den Kontrolltieren konnten nur minimale Intensitäten für pNKCC2 detektiert werden, wobei diese Form des Kotransporters bereits in der apikalen Membran des TAL lokalisiert war. ANXA2 lag dagegen hauptsächlich zytoplasmatisch vor (Abb. 3.20A). Durch die Behandlung mit dDAVP kam es zu einer verstärkten Phosphorylierung des Kotransporters, der sich, wie zuvor gezeigt, signifikant im apikalen Bereich des TAL angereichert hatte (siehe Abb. 3.17 und 3.18). Gleichzeitig konnte eine Translokation von ANXA2 aus dem Zytosol zur Zellmembran beobachtet werden, was zu einer Kolo-kalisation der beiden Proteine in der apikalen TAL-Membran führte (Abb. 3.20B).

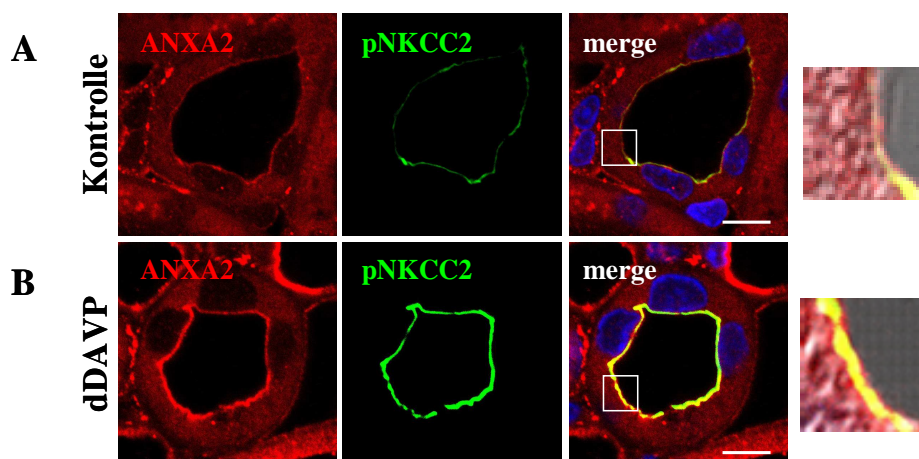


Abbildung 3.20: Lokalisation von ANXA2 und pNKCC2 im TAL von Brattleboro Ratten nach dDAVP-Behandlung.

Immunhistochemische Doppelmarkierung von ANXA2 (rot) und pNKCC2 (grün) auf Paraffinschnitten der Niere von NaCl (Kontrolle) (A)- und 30 min dDAVP-behandelten (B) Brattleboro Ratten. Die Konfokalmikroskopie zeigte eine verstärkte Phosphorylierung von NKCC2 im Bereich der apikalen Membran und eine gesteigerte Oberflächenexpression von ANXA2 sowie eine daraus folgende Kolokalisation der untersuchten Proteine in der apikalen Plasmamembran des TAL unter dDAVP-Stimulation (B). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die rechte Bildreihe ist aus den Überlagerungsbildern (*merge*) heraus vergrößert und lässt die subapikale bzw. apikale Lokalisation erkennen. Abbildung exemplarischer konfokalmikroskopischer Aufnahmen; pro Gruppe wurden 5 Tiere untersucht. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Um die Resultate der *Peptid Spot Arrays* sowie des *Pulldown Assays* zu verifizieren bzw. um zu untersuchen, ob die dDAVP-Behandlung im Gegensatz dazu zu einer Interaktion zwischen ANXA2 und pNKCC2 führt, wurden Koimmunpräzipitationen aus der äußeren Medulla von Nieren kurzzeit-behandelter Brattleboro Ratten durchgeführt. Bei der Immunpräzipitation von endogenem pNKCC2 konnte endogenes ANXA2 nicht kopräzipitiert werden (Abb. 3.21A) und umgekehrt wurde gezeigt, dass mit endogenem ANXA2 kein pNKCC2 koimmunpräzipitierte (Abb. 3.21B). Diese Ergebnisse belegen, dass ANXA2 nicht mit der phosphorylierten Form von NKCC2 interagiert.

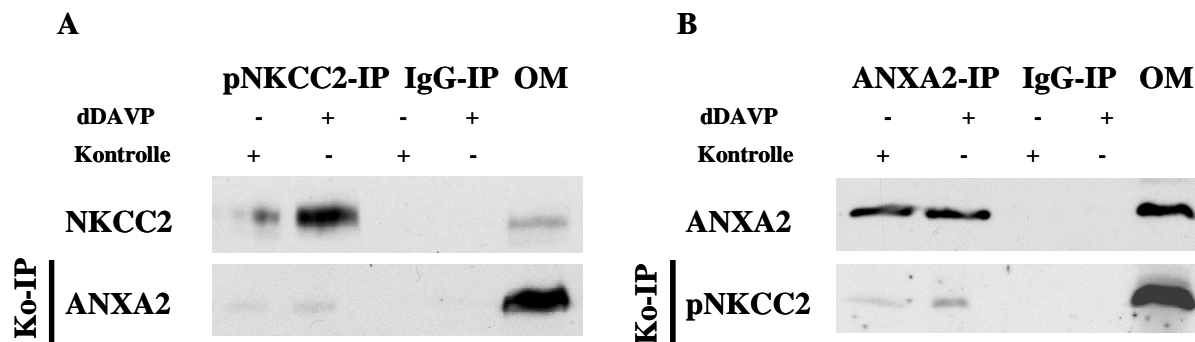


Abbildung 3.21: Immunpräzipitationen von endogenem ANXA2 und NKCC2 aus der äußeren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten.

Koimmunpräzipitationen wurden unter Verwendung des pNKCC2- und ANXA2-Antikörpers aus Proteinlysaten von der OM aus Nieren NaCl (Kontrolle)- und dDAVP-behandelter (30 min) Brattleboro Ratten durchgeführt. Die Analyse der Immunpräzipitate und der eingesetzten Proteinlysate erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot für NKCC2 bzw. pNKCC2 und ANXA2. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Proteine weder unter Einsatz des pNKCC2 (A)- noch unter Verwendung des ANXA2 (B)- Antikörpers gemeinsam präzipitierten, was eine mögliche Interaktion ausschließt. Als Negativkontrolle der Immunpräzipitation diente jeweils ein vom Isotyp her passendes IgG.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass endogenes pNKCC2 zwar mit ANXA2 unter dDAVP-Behandlung in der apikalen TAL-Membran kolokalisiert, aber sie können nicht miteinander koimmunpräzipitiert werden. Das spricht dafür, dass der phosphorylierte Kotransporter nicht mit ANXA2 in einem funktionellen Komplex interagiert.

3.4.3 Assoziation von ANXA2 und NKCC2 mit cholesterinreichen Membranmikrodomänen unter Behandlung mit dDAVP

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass ANXA2 in denselben cholesterinreichen Membranmikrodomänen vorkommt wie NKCC2 und zum anderen kotranslozieren beide Proteine während der Aktivierung des Urinkonzentrationsmechanismus nach apikal, wodurch es zu einer Anreicherung dieser Proteine in der Plasmamembran kommt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit dDAVP und somit die Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade zu einer vermehrten Insertion von ANXA2 und NKCC2 in cholesterinreiche Membranmikrodomänen innerhalb der Plasmamembran führt, was die Bedeutung dieser Membrandomänen für die Funktion von NKCC2 bekräftigen würde. Des Weiteren sollte der Einfluss von dDAVP auf die Interaktion zwischen dem Kotransporter und ANXA2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen näher betrachtet werden.

Dafür wurden zunächst detergensresistente Membranen aus der OM der Nieren von Kontroll- und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten präpariert und mittels diskontinuierlicher Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Der Western Blot der einzelnen

Fraktionen ergab einen dDAVP-bedingten, signifikanten, 13%-igen Anstieg der NKCC2-Abundanz (Kontrolle: $33,8\% \pm 4,5$; dDAVP: $46,7\% \pm 1,9$) in den detergensresistenten, cholesterinreichen Regionen, die innerhalb des Sucrosegradienten bei geringer Dichte akkumulierten (Abb. 3.22 gerahmt). Parallel konnte eine solche Anreicherung auch für ANXA2 beobachtet werden. Der Anteil dieses Proteins in den *Lipid Rafts* stieg unter Behandlung mit dDAVP um 19% im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: $46,3\% \pm 6,8$; dDAVP: $65,2\% \pm 4,1$). Das AVP-Analogon dDAVP stimuliert somit die Insertion von NKCC2 und ANXA2 in cholesterinreiche Membranmikrodomänen.

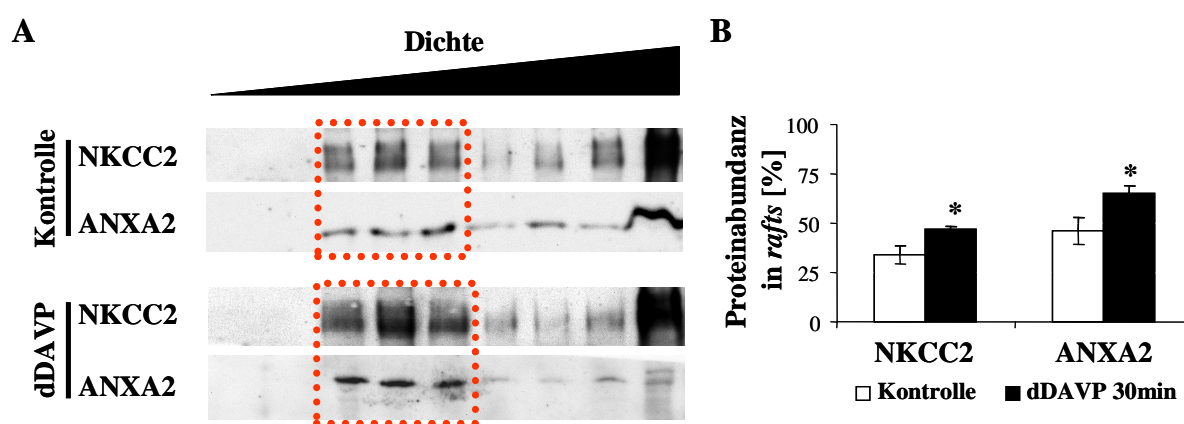


Abbildung 3.22: Abundanz von ANXA2 und NKCC2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen unter dDAVP-Behandlung.

Triton[®] X-100-unlösliche Membranen der OM von 30 min dDAVP-behandelten und Kontroll-Brattleboro Ratten wurden einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Der Western Blot zeigte dDAVP-bedingte signifikant gesteigerte Abundanzen von NKCC2 (Kontrolle: $33,8\% \pm 4,5$; dDAVP: $46,7\% \pm 1,9$) und ANXA2 (Kontrolle: $46,3\% \pm 6,8$; dDAVP: $65,2\% \pm 4,1$) in den cholesterinreichen Sucrosegradient-Fractionen (A; gerahmt). Die statistische Auswertung (B) der Western Blots erfolgte, indem der in den cholesterinreichen Fractionen (gerahmt) lokalisierte Anteil des entsprechenden Proteins relativ zum Gesamtprotein berechnet wurde. Dargestellt sind die MW \pm SD aus 4 unabhängigen Experimenten (n=4), *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Zur Untersuchung der Wirkung von dDAVP auf die Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen wurde eine NKCC2-Immunpräzipitation aus den Triton[®] X-100-unlöslichen, cholesterinreichen Fractionen des Sucrosegradienten von dDAVP-behandelten und Kontroll-Brattleboro Ratten durchgeführt. Dabei konnte mit derselben Menge an immunpräzipitiertem NKCC2 fast die doppelte ANXA2-Menge bei den Proben der dDAVP-behandelten Tiere koimmunpräzipitiert werden (Kontrolle: $1 \pm 0,18$; dDAVP: $1,84 \pm 0,36$) (Abb. 3.23). Somit konnte gezeigt werden, dass dDAVP und damit die Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade die Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2 signifikant steigert.

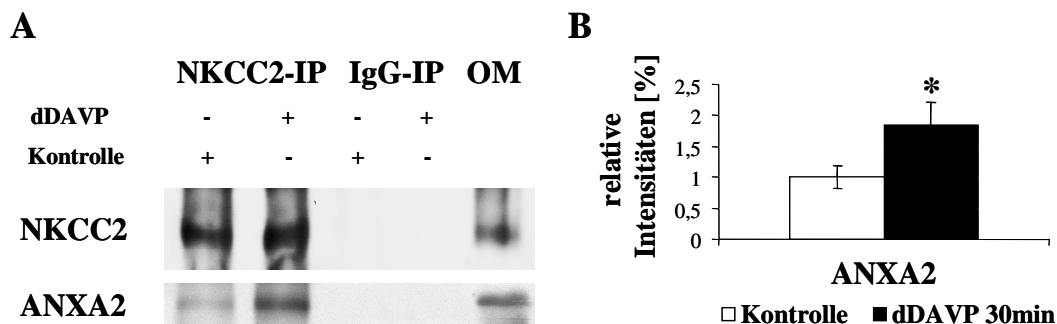


Abbildung 3.23: Interaktion von ANXA2 und NKCC2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen unter Behandlung mit dDAVP.

Detergensresistente, cholesterinreiche Sucrosegradient-Fractionen aus der OM von 30 min dDAVP-behandelten und Kontroll-Brattleboro Ratten dienten als Ausgangsmaterial für Immunpräzipitationen mit dem NKCC2-Antikörper sowie IgGs passenden Isotyps (Kontrolle). Die Immunpräzipitate wurden mittels Western Blot für NKCC2 und ANXA2 ausgewertet (A), wobei eine gesteigerte Koimmunpräzipitation von ANXA2 unter dDAVP-Stimulation beobachtet wurde (Kontrolle: $1 \pm 0,18$; dDAVP: $1,84 \pm 0,36$). Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifikation von ANXA2 wurden auf das jeweilige NKCC2-Signal normalisiert (B). Dargestellt ist der MW \pm SD aus 4 unabhängigen Experimenten (n=4), *p<0,05 verglichen mit der Kontrolle.

3.4.4 ANXA2 Expression in der äußeren Medulla von Brattleboro Ratten

Aufgrund der bisher gezeigten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass ANXA2 eine Rolle bei der Translokation von NKCC2 spielt. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Expression von ANXA2 ähnlich wie die von NKCC2 reguliert wird. Dessen Expression wird in Brattleboro Ratten durch die Gabe des AVP-Analogons dDAVP auf Normalwerte angehoben (Ecelbarger et al., 2001; Gimenez and Forbush, 2003; Mutig et al., 2007; Ortiz, 2006). In diesem Kontext wurde untersucht, ob die mRNA-Expression von ANXA2 durch die Behandlung mit dDAVP ebenfalls stimuliert wird. Da die Dauer der 30-minütigen Behandlung nicht ausreicht, um den Effekt der Expressionssteigerung sicher auswerten zu können, wurden zur Untersuchung dieses Kontexts zusätzlich langzeit (3 d) Kontroll- und dDAVP-behandelte Tiere betrachtet.

Zur Ermittlung der Transkriptionsniveaus von ANXA2 und NKCC2 wurde eine quantitative *Realtime* PCR (qPCR) durchgeführt. Dafür wurde zunächst RNA aus der äußeren Medulla der jeweiligen Kontroll- und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten isoliert, in cDNA transkribiert und mittels qPCR analysiert. Während die 30-minütige dDAVP-Behandlung der Brattleboro Ratten nur zu einem leichten Anstieg der NKCC2-Expression führte (Kontrolle: $1 \pm 0,24$; dDAVP: $1,19 \pm 0,12$) (Mutig et al., 2007), war ein signifikanter 1,37-facher Anstieg der mRNA-Menge des Kotransporters in den langzeit-behandelten Tieren zu verzeichnen (Kontrolle: $1 \pm 0,14$; dDAVP: $1,37 \pm 0,09$) (Abb. 3.24A). Die Expression von ANXA2 war nach der Stimulation mit dDAVP im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren ebenfalls signifikant gesteigert, wobei kein Unterschied zwischen den kurzzeit-

(Kontrolle: $1 \pm 0,14$; dDAVP: $1,43 \pm 0,21$) und langzeit- (Kontrolle: $1 \pm 0,17$; dDAVP: $1,5 \pm 0,38$) behandelten Tieren festgestellt werden konnte (Abb. 3.24B).

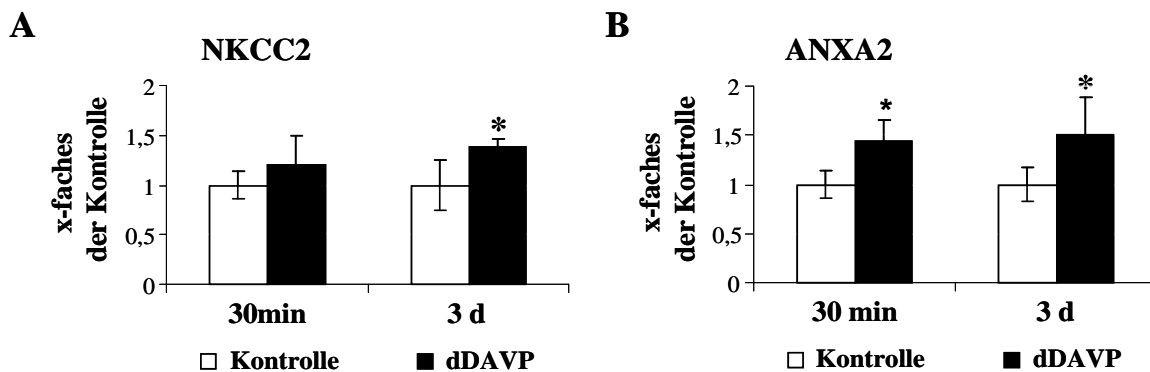


Abbildung 3.24: mRNA-Expression von NKCC2 und ANXA2 in der äußeren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten.

qPCR zur Bestimmung des mRNA-Transkriptionsniveaus von ANXA2 und NKCC2 in der OM von 30 min und 3 d Kontroll- und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten. Die kurzzeitige dDAVP-Behandlung führte nur zu einer minimalen Erhöhung der NKCC2 mRNA-Expression (A), die ANXA2 Expression stieg dagegen signifikant an (B). Die Analyse der 3 d-Tiere zeigte in den behandelten Tieren eine signifikant erhöhte Expression von ANXA2 und NKCC2. Die ermittelten Ct-Werte wurden auf GAPDH normalisiert (ΔCT), auf die Kontrollen kalibriert ($\Delta\Delta\text{CT}$) und die ermittelten mRNA-Expressionsniveaus ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) berechnet. Gezeigt ist der MW \pm SD; n=5 pro Gruppe, *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Zusammenfassend, konnte auch an Brattleboro Ratten gezeigt werden, dass durch die Gabe des AVP-Analogons dDAVP die Translokation des Kotransporters einhergehend mit ANXA2 zur apikalen Membran stimuliert wird und deren Insertion in Flotillin-1- und THP-positive Membranmikrodomänen signifikant gesteigert wird. Des Weiteren wurde neben der Expression von NKCC2 simultan die ANXA2-Expression unter Behandlung mit dDAVP angeregt.

3.5 Funktionelle Analyse der Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2

3.5.1 Stimulation von NKCC2 unter Chloridmangel

3.5.1.1 Überexpression von ANXA2 und P11

Modifikationen im Zellvolumen und der Chloridkonzentration regulieren aufgrund der dadurch ausgelösten Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsereignisse elektroneutrale Kation-Chlorid-Kotransporter der *SLC12*-Genfamilie (Gamba, 2005). Dabei führt hypotonischer Chloridmangel-Stress letztlich zu einer gesteigerten Phosphorylierung von konservierten Threonin- und Serin-Resten im N-Terminus von NKCC2, was mit einer verstärkten Transportaktivität und somit mit der Aktivierung des Kotransporters korreliert ist (Ares et al., 2011; Gimenez and Forbush, 2003; Gimenez and Forbush, 2005; Ponce-Coria et

al., 2008; Richardson et al., 2011). Um den Einfluss von hypotonischem Chloridmangel-Stress auf die Translokation und die Oberflächenexpression von NKCC2 sowie dessen zuvor identifizierten Interaktionspartner ANXA2 zu untersuchen, wurden MMDD1-Zellen auf Deckgläschen kultiviert, jeweils mit Expressionsvektoren, die für ANXA2, P11 und GFP kodieren, für 48 h transfiziert und mit hypotonischer Chloridmangellösung oder einer Lösung mit normalem Chloridgehalt (Kontrolle) stimuliert. Für immunzytologische Analysen wurden Fluoreszenzfärbungen an den fixierten Zellen durchgeführt. In den Kontrollzellen (normal Chlorid) waren das endogene NKCC2 (Abb. 3.25A-C; rot) und die überexprimierten, GFP-markierten Proteine (grün) gleichmäßig im Zytosol verteilt. Im Gegensatz dazu wiesen die mit Chloridmangellösung behandelten Zellen eine starke Anreicherung von nativem NKCC2 in der Plasmamembran auf, die mit einer verminderten NKCC2-Abundanz im Zytoplasma einherging (Abb. 3.25D-F; rot). Gleichzeitig konnte eine Translokation von ANXA2-GFP vom Zytoplasma zur Zellmembran beobachtet werden, was zu einer verstärkten Kollokalisierung der beiden Proteine an der Zelloberfläche führte (Abb. 3.25D; grün). Vergleichbare Ergebnisse, nur weniger stark ausgeprägt, konnten für P11-GFP unter Chloridmangel beobachtet werden (Abb. 3.25E; grün). Überexprimiertes GFP, das als Negativkontrolle diente, war unabhängig von der Stimulation diffus im Zytoplasma verbreitet (Abb. 3.25C, F).

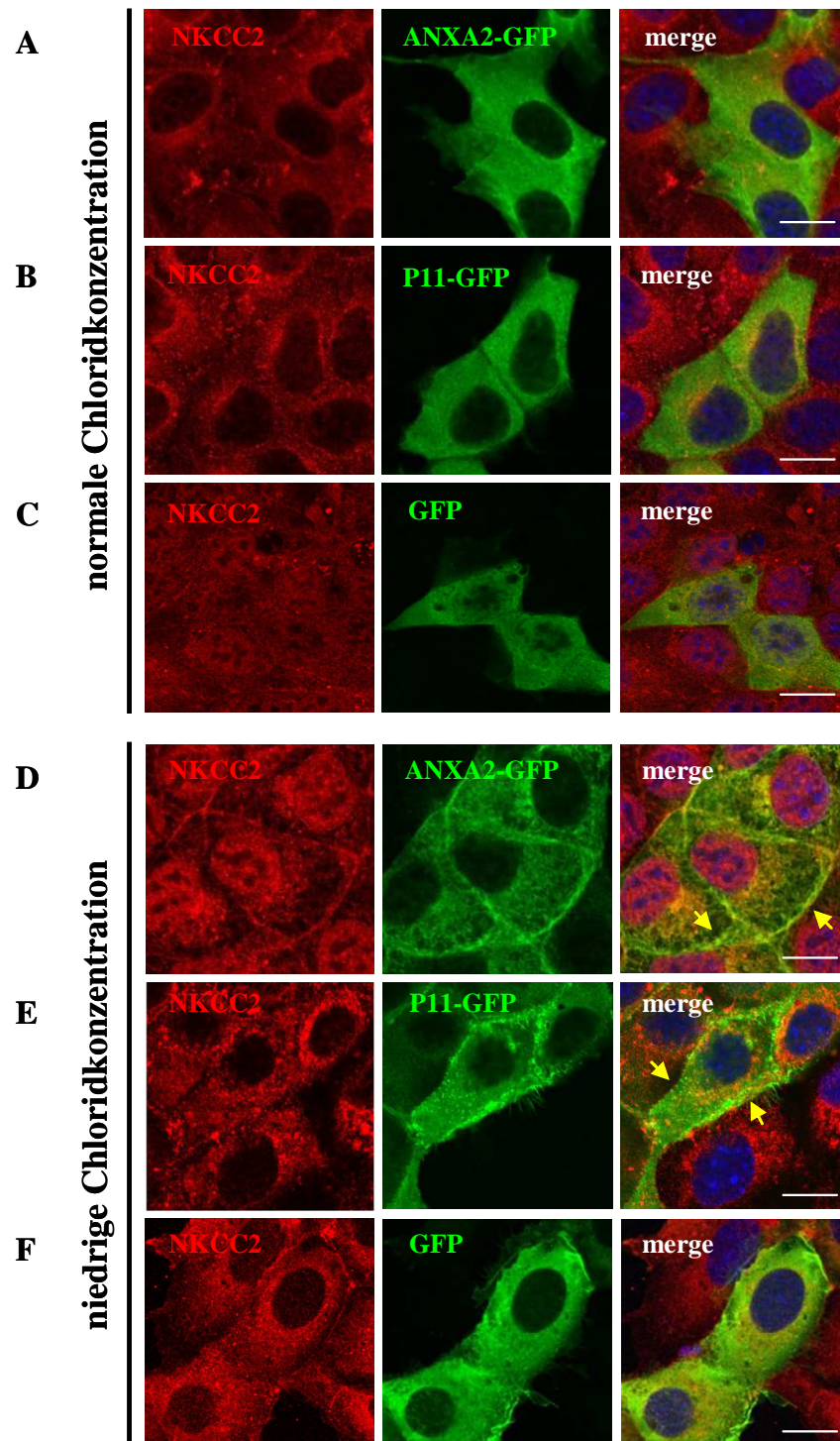


Abbildung 3.25: Translokation von ANXA2, P11 und NKCC2 unter Chloridmangel.

MMDD1-Zellen wurden mit ANXA2-GFP, P11-GFP oder GFP transfiziert und entweder mit Chloridmangellösung oder mit einer Lösung mit normalem Chloridgehalt (Kontrolle) behandelt. Die Immunzytochemischen Doppelmarkierungen wurden mit anti-NKCC2 (rot) und anti-GFP (grün) Antikörpern durchgeführt; die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). In den Kontrollzellen (A-C; normal Chlorid) waren die untersuchten Proteine diffus im Zytoplasma verteilt. Dagegen zeigte die Konfokalmikroskopie eine gesteigerte Oberflächenexpression und eine daraus folgende verstärkte Kolokalisation von NKCC2 und ANXA2-GFP in der Plasmamembran unter Chloridmangel (D), aufgrund der Translokation aus dem Zytoplasma zur Zelloberfläche. Derselbe Effekt war bei P11-GFP sichtbar (E), jedoch mit geringerer Quantität. Dagegen lag GFP diffus in der gesamten Zelle verbreitet vor (F). Der gelbe Pfeil markiert die Plasmamembrankolokalisation. Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Zur Verifikation der in der Immunzytochemie gezeigten Kotranslokationen und um zu untersuchen, ob die rekombinanten Proteine ANXA2-GFP und P11-GFP nach der Chloridmangel-Stimulation mit cholesterinreichen Membranmikrodomänen assoziiert sind, wurden transfizierte MMDD1-Zellen nach der Chlorid-Behandlung lysiert. Anschließend wurden diese Zellysate mittels Zentrifugation in je eine Zytosol (Zyt)- und eine Plasmamembran (PM)-Fraktion getrennt. Die PM-Fraktion wurde danach einer Triton[®] X-100 Extraktion unterzogen, wodurch je eine Triton[®] X-100-lösliche (TS) und eine Triton[®] X-100-unlösliche (TI) Fraktion entstanden. Die Proteinabundanz in den einzelnen Fraktionen wurde mittels Western Blot bestimmt und die Auswertung erfolgte, indem die jeweilige Proteinabundanz relativ zum entsprechenden Gesamtproteingehalt berechnet wurde. Anhand der Statistik wurde gezeigt, dass unter Chloridmangel der Anteil von NKCC2 (Abb. 3.26A) und ANXA2-GFP (Abb. 3.26B) signifikant um ca. 50% in der Triton[®] X-100-unlöslichen Membranfraktion (TI) anstieg. Gleichzeitig verminderte sich der im Zytoplasma vorkommende Anteil dieser beiden Proteine. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass NKCC2 und ANXA2-GFP aus dem Zytosol in die detergensresistenten Membranfraktionen translozieren. Im Gegensatz dazu konnten bei P11-GFP (Abb. 3.26C) und GFP (Abb. 3.26D) keine Veränderungen bezüglich der Lokalisation innerhalb der Zellfraktionen aufgrund der Chlorid-Stimulation beobachtet werden. GAPDH (Zyt), Clathrin (TS) und Flotillin-1 (TI) wurden als Referenzproteine verwendet, um die Reinheit der einzelnen Fraktionen zu überprüfen (Abb. 3.26E).

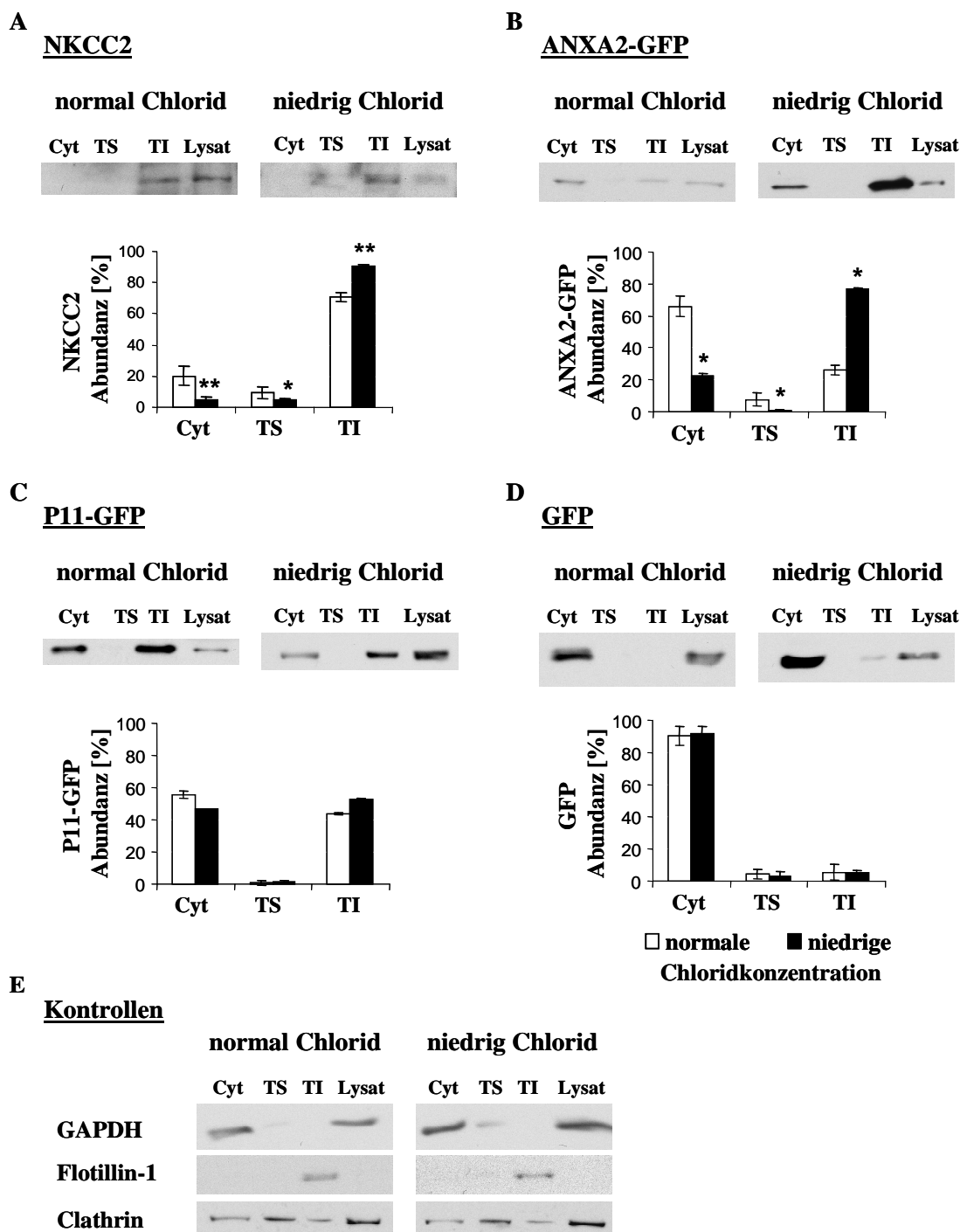


Abbildung 3.26: Abundanz von NKCC2, ANXA2 und P11 unter Chloridmangel.

Transfizierte MMDD1-Zellen wurden nach der Stimulation mit Mangel- oder normal Chloridlösung lysiert und letztlich in 3 Fraktionen separiert: Zytoplast (Zyt), Triton[®] X-100-lösliche (TS) und Triton[®] X-100-unlösliche (TI) Fraktion. Die Verteilung der Proteine innerhalb der Fraktionen wurde mittels Western Blot und unter Verwendung des NKCC2 Antikörpers (2.1) und des anti-GFP Antikörpers zur Detektion der Fusionsproteine untersucht. Endogenes NKCC2 (A; Kontrolle: 70,7%±2,7; Chlorid: 90,2%±1,2) und ANXA2-GFP (B; Kontrolle: 26,2%±3; Chlorid: 76,6%±1,3) reichern sich in der detergensunlöslichen Membranfraktion (TI) unter Chloridmangel an, wohingegen P11-GFP (C; Kontrolle: 49,9%±0,3; Chlorid: 51,4%±4,5) und GFP (D; Kontrolle: 5,3%±4,9; Chlorid: 5%±2,1) keine Veränderungen zeigen. GAPDH, Clathrin und Flotillin-1 wurden als Referenzproteine zur Charakterisierung der Zellfraktionen verwendet (E). Die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die MW ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten, *p<0,05 und **p<0,01 verglichen mit normal Chlorid-Behandlung.

Diese beiden experimentellen Ansätze zeigten eine Translokation von ANXA2 zusammen mit NKCC2 aufgrund einer Chloridmangel-bedingten Aktivierung des Kotransporters. Dabei wanderte ANXA2 mit NKCC2 aus dem Zytosol in die in der Plasmamembran lokalisierten *Lipid Rafts*. Diese Translokation konnte für P11 nicht beobachtet werden. Zusammenfassend verursacht Chloridmangel-Stress die Translokation von NKCC2 und ANXA2 zur Zelloberfläche und führt dort zur Assoziation dieser Proteine mit cholesterinreichen Membrandomänen.

3.5.1.2 ANXA2-Knockdown mittels RNA-Interferenz

Die bisherigen Resultate deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen ANXA2 und NKCC2 eine wichtige funktionelle Bedeutung hat. Folglich wurde die Hypothese, dass ANXA2 eine wesentliche Rolle bei der Translokation von NKCC2 zur apikalen Plasmamembran einnimmt, aufgestellt und überprüft. Dafür wurden raTAL-Zellen, die nativ über hohe ANXA2- und NKCC2-Abundanzen verfügen, mit ANXA2-*small interfering* RNA (siRNA) für insgesamt 72 h transfiziert, um die ANXA2-Expression zu hemmen. Zur Verifikation des *knockdowns* wurden die Zelllysate mittels qPCR und Western Blot analysiert. Dabei zeigten die mit ANXA2-siRNA behandelten Zellen eine hoch signifikante Verminderung der ANXA2-mRNA-Expression um ~50% (Kontrolle: 100%±22,9; ANXA2-siRNA: 53%±9,2) (Abb. 3.27) und eine signifikante ~40%-ige Reduzierung auf Proteinebene (Kontrolle: 100%±9,8; ANXA2-siRNA: 65%±11,7) (Abb. 3.28). Gleichzeitig konnte keine Veränderung der Abundanz von NKCC2 in diesen Zellen beobachtet werden (Kontrolle: 100%±38,9; ANXA2-siRNA: 97,5%±47,1) (Abb. 3.28).

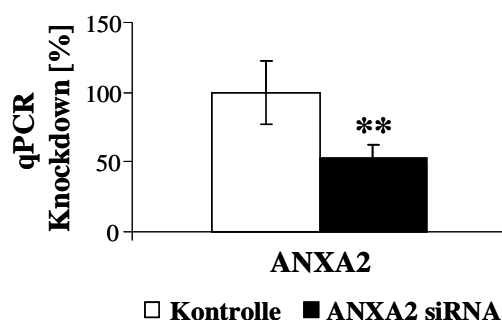


Abbildung 3.27: mRNA-Expression von ANXA2 in raTAL-Zellen nach ANXA2-knockdown.

Die ANXA2-qPCR von Kontroll- und ANXA2-siRNA behandelten raTAL-Zellen ergab eine um 47% verminderte ANXA2-Expression im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Δ Ct-Werte wurden auf GAPDH normalisiert. Gezeigt ist der MW \pm SD; n=7, **p<0,01 im Vergleich zur Kontroll-siRNA-Transfektion.

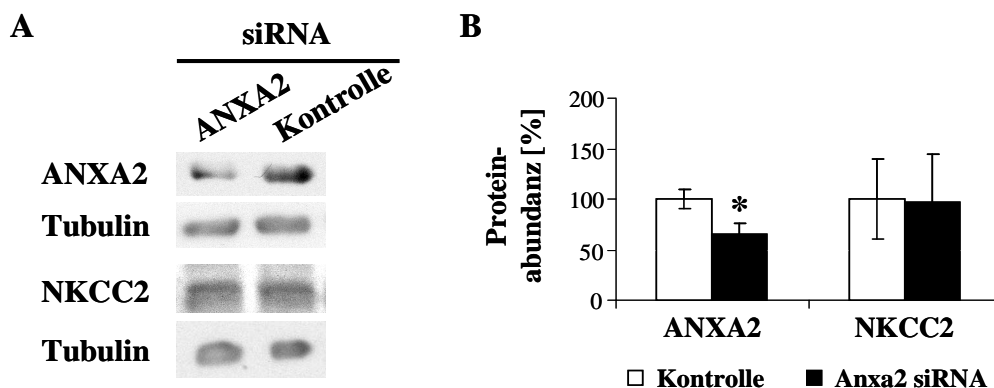


Abbildung 3.28: Proteinexpression von ANXA2 und NKCC2 in raTAL-Zellen nach ANXA2-knockdown.

Zellysate der Kontroll- und ANXA2-siRNA behandelten raTAL-Zellen wurden mittels Western Blot hinsichtlich der Abundanz von ANXA2 (A) und NKCC2 (B) analysiert. Dabei konnte ein signifikanter Proteinverlust von ANXA2 durch die siRNA-Transfektion demonstriert werden (Kontrolle: $100\% \pm 9,8$; ANXA2-siRNA: $65\% \pm 11,7$). Zusätzlich wurde die Expression von NKCC2 untersucht, wobei keine Veränderungen nachgewiesen werden konnten (Kontrolle: $100\% \pm 38,9$; ANXA2-siRNA: $97,5\% \pm 47,1$). Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifikation von ANXA2 und NKCC2 wurden auf das Referenzprotein Tubulin normalisiert. Dargestellt ist der MW \pm SD; n=7, *p<0,05 verglichen mit der Kontroll-siRNA-Transfektion.

Um die Auswirkungen von stark verminderter ANXA2-Abundanz auf die Translokation von NKCC2 zu untersuchen, wurden die siRNA-transfizierten raTAL-Zellen mit normaler Chloridlösung (Kontrolle) oder mit Chloridmangellösung behandelt, fixiert und immunfluoreszenzmarkiert. In den Zellen, die mit einer normalen Chloridkonzentration behandelt wurden, war NKCC2 diffus, vor allem in Zellkernnähe und zu einem sehr geringen Anteil in der Zellmembran, lokalisiert, wobei diese Verteilung unabhängig von der ANXA2-Präsenz war (Abb. 3.29 A, B). Die Stimulation mit einer niedrigen Chloridkonzentration führte in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zu einer erwarteten, deutlich ausgeprägten Anreicherung von NKCC2 in der Plasmamembran (Abb. 3.29 C). Im Gegensatz dazu konnte in den Zellen mit verminderter ANXA2-Abundanz keine Anreicherung des Kotransporters in der Zellmembran trotz Stimulation mit Chloridmangellösung und unveränderter NKCC2-Abundanz (siehe Abb. 3.28) beobachtet werden (Abb. 3.29D). Folglich weisen diese Daten darauf hin, dass die Präsenz von ANXA2 und die direkte Interaktion zwischen ANXA2 und NKCC2 notwendig für die Translokation von NKCC2 zur Plasmamembran sind. ANXA2 vermittelt somit die Rekrutierung von NKCC2 in die apikale Membran.

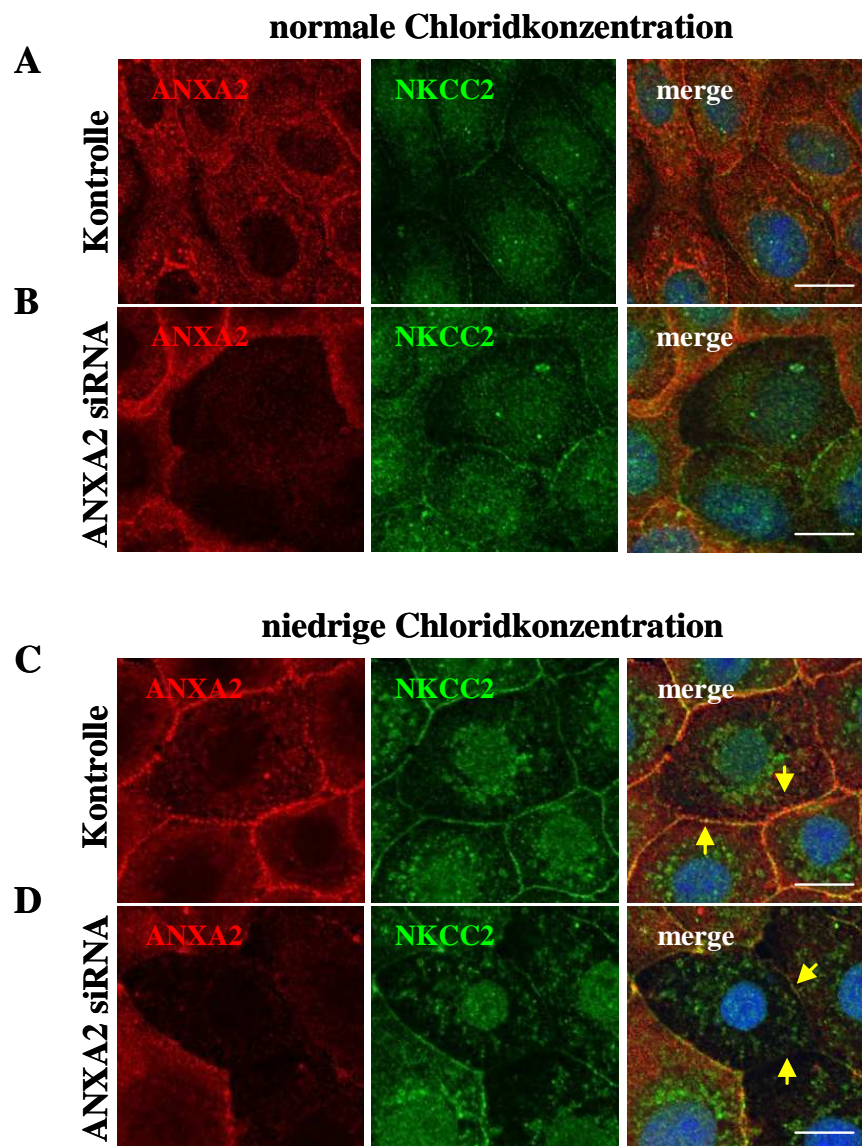


Abbildung 3.29: Translokation von NKCC2 in raTAL-Zellen nach *knockdown* von ANXA2 und Chloridmangel.

raTAL-Zellen wurden mit Kontroll- oder ANXA2-siRNA transfiziert und nach 72 h entweder mit Chloridmangellösung oder mit einer Lösung mit normalem Chloridgehalt (Kontrolle) behandelt. Die immunzytochemischen Doppelmarkierungen wurden mit ANXA2 (rot) und NKCC2 (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Mittels Konfokalmikroskopie konnte in den mit normaler Chloridlösung behandelten Zellen eine diffuse Verteilung von NKCC2, die unabhängig von der ANXA2-Präsenz war, beobachtet werden (**A**, **B**). Unter Chloridmangel kam es in den Kontroll-Zellen zur Anreicherung von ANXA2 und NKCC2 in der Zellmembran (**C**). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit Chloridmangellösung in Zellen mit verminderter ANXA2-Abundanz zu einer stark verminderten Lokalisation des Kotransporters in der Plasmamembran (**D**). Gelbe Pfeile markieren die Plasmamembrangrenzen. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

3.5.2 Stimulation von ANXA2 mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und Hemmung der Endozytose

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ist ein etablierter Aktivator der Proteinkinase C-Signalkaskade und führt zu einer gesteigerten Membranassoziation von Annexinen (Gerelsaikhan et al., 2011; Singh et al., 2004; Vaaraniemi et al., 1994). Unter Verwendung dieser Substanz sollte deshalb untersucht werden, wie sich die Stimulation und damit einhergehend die Translokation und gesteigerte Oberflächenexpression von ANXA2 auf seinen Interaktionspartner NKCC2 auswirkt (Abb. 3.30). Ausgehend von der Hypothese, dass NKCC2 zwischen den subapikalen Speicher-Vesikeln und der Plasmamembran verkehrt, sollte die Inhibition der Endozytose die laterale Expression von NKCC2 zusätzlich steigern. Dafür wurden die Zellen ergänzend mit einem Dynamin-Inhibitor (Dyasore) behandelt, um die konstitutive Endozytose von NKCC2 (Caceres et al., 2009) zu hemmen und somit die Menge an ANXA2 und möglicherweise kolokalisiertem NKCC2 in der Plasmamembran zu steigern (Abb. 3.31)

Dafür wurden ANXA2-GFP, P11-GFP und GFP überexprimierende MMDD1-Zellen mit PMA, Dyasore, PMA in Kombination mit Dyasore oder DMSO (Kontrolle) stimuliert. Für immunzytologische Analysen wurden Fluoreszenzfärbungen mit einem NKCC2- und einem GFP-Antikörper an den fixierten Zellen durchgeführt. In den Kontrollzellen (DMSO) waren das endogene NKCC2 (rot) und die überexprimierten, GFP-markierten Proteine (grün) gleichmäßig im Zytosol verteilt (Abb. 3.30A-C). Im Gegensatz dazu führte die PMA-Stimulation zur Translokation und damit verbunden zur partiellen Membranlokalisierung von ANXA2-GFP. Gleichzeitig konnte in diesen Membranbereichen eine Anreicherung von NKCC2 und somit Kolokalisation dieser beiden Proteine beobachtet werden (Abb. 3.30D). Zellen, die mit P11-GFP oder GFP transfiziert waren, zeigten unter Behandlung mit PMA weder eine Anreicherung dieser Proteine in der Plasmamembran, noch wurde NKCC2 an der Zelloberfläche akkumuliert (Abb. 3.30E-F).

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Kontrollzellen (DMSO) konnte auch in den mit Dyasore behandelten Zellen keine Anreicherung der untersuchten Proteine im Bereich der Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 3.31A-C). Dagegen führte die kombinierte Behandlung von PMA und Dyasore zu einer starken Plasmamembran-Anreicherung von ANXA2-GFP zusammen mit NKCC2 (Abb. 3.31D). In den P11-GFP- sowie den GFP-exprimierenden Zellen zeigte sich unter diesen Bedingungen keine verstärkte Membranlokalisierung der untersuchten Proteine (Abb. 3.31E-F).

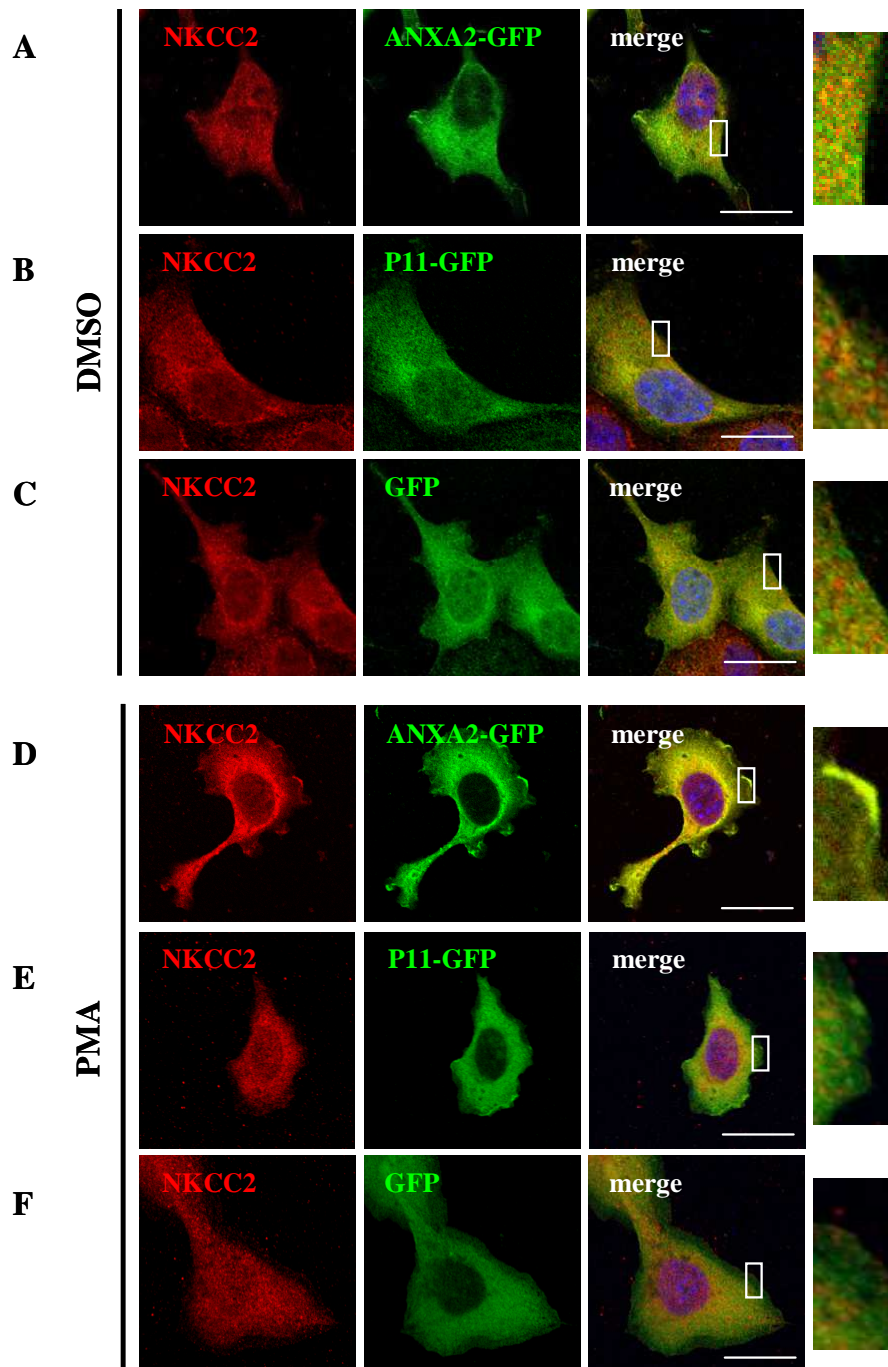


Abbildung 3.30: Translokation von ANXA2 und NKCC2 in MMDD1-Zellen nach Stimulation mit PMA.

MMDD1-Zellen wurden mit ANXA2-GFP, P11-GFP und GFP transfiziert und mit 500 nM PMA oder DMSO (Kontrolle) stimuliert. Die immunzytochemischen Doppelmarkierungen erfolgten mit NKCC2 (rot) und GFP (grün) Antikörpern und die Färbung der Zellkerne wurde mit DAPI durchgeführt (blau). In den Kontrollzellen (A-C; DMSO) waren die untersuchten Proteine diffus im Zytoplasma verteilt. Dagegen zeigte die Konfokalmikroskopie eine gesteigerte Lokalisation in der Plasmamembran nicht nur von ANXA2-GFP sondern auch von NKCC2 und eine daraus folgende verstärkte Kolokalisation von beiden Proteinen in der Membran unter PMA-Stimulation (D). Im Gegensatz dazu translozierten P11-GFP (E) und GFP (F) unter PMA-Behandlung nicht, sondern verblieben im Zytoplasma. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

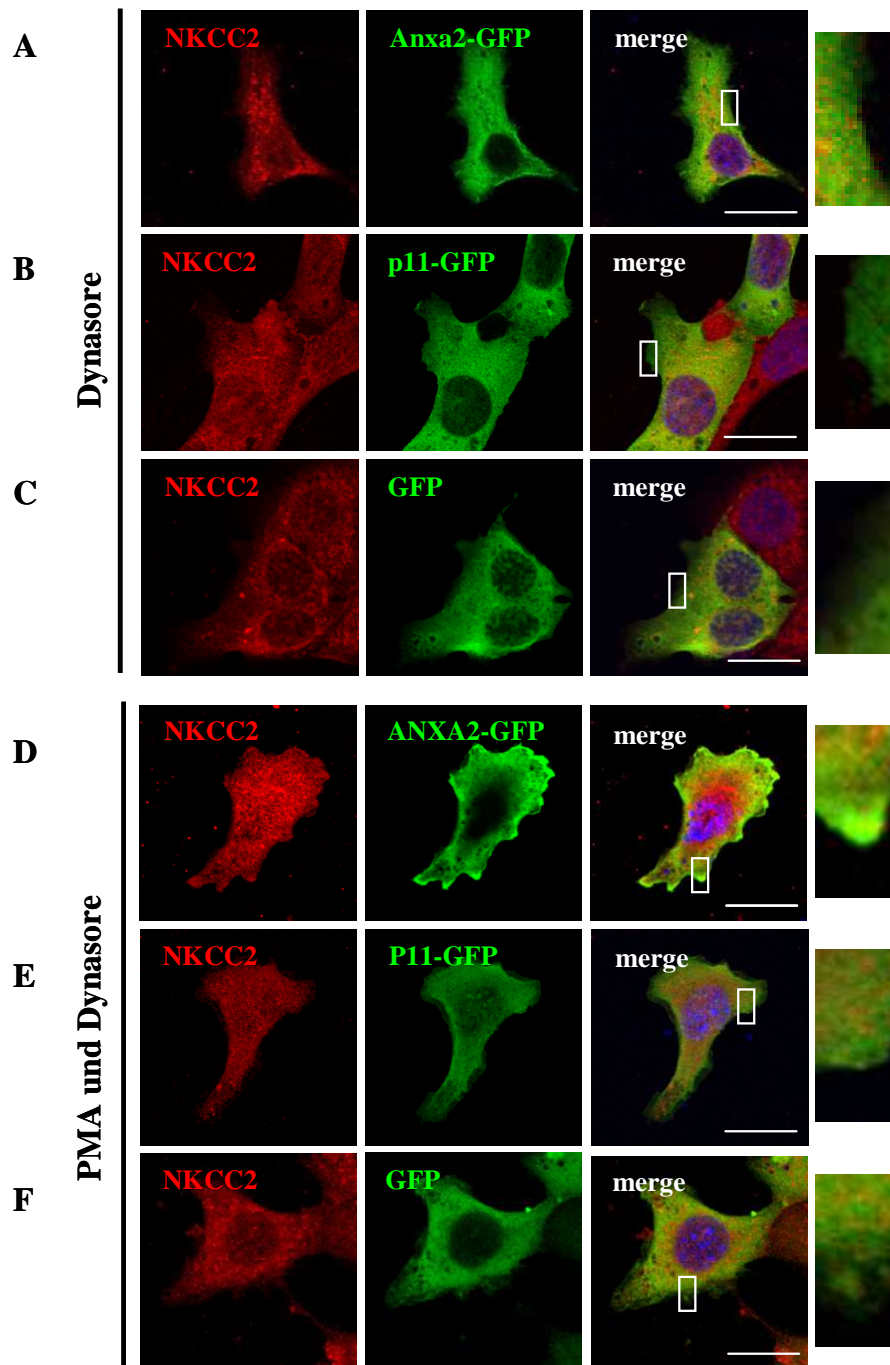


Abbildung 3.31: Lokalisation von ANXA2 und NKCC2 in MMDD1-Zellen nach PMA-Stimulation und Hemmung der Endozytose.

MMDD1-Zellen wurden mit ANXA2-GFP, P11-GFP und GFP transfiziert und mit 80 μM Dynasore (Kontrolle) oder einer Kombination aus 500 nM PMA und 80 μM Dynasore stimuliert. Die immunzytochemischen Doppelmarkierungen erfolgten mit NKCC2 (rot) und GFP (grün) Antikörpern und die Färbung der Zellkerne wurde mit DAPI durchgeführt (blau). In den Kontrollzellen (A-C; Dynasore) waren die untersuchten Proteine diffus im Zytoplasma verteilt. Dagegen zeigte die Konfokalmikroskopie eine gesteigerte Anreicherung von ANXA2-GFP und NKCC2 in der Plasmamembran sowie eine daraus folgende verstärkte Kolokalisation von beiden Proteinen unter Stimulation mit PMA in Kombination mit Dynasore (D). Im Gegensatz dazu translozierten P11-GFP (E) und GFP (F) unter PMA/Dynasore-Behandlung nicht, sondern verblieben im Zytoplasma. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Somit zeigte dieses Experiment zum einen, dass die Aktivierung der Translokation von ANXA2 gleichzeitig zu einem parallelen Transport von NKCC2 führt und letztlich in einer Kollokalisierung beider Proteine in der Plasmamembran resultiert. Dabei konnte dieser Effekt in P11-überexprimierenden Zellen, die nur eine sehr geringe ANXA2-Abundanz haben, weder für P11 selbst noch für NKCC2 beobachtet werden. ANXA2 ist somit für die Rekrutierung von NKCC2 in die Zellmembran erforderlich. Zum anderen führte die Steigerung der Translokationsaktivität von ANXA2 durch PMA in Kombination mit der Inhibition der Endozytose zu einer wesentlich stärkeren Anreicherung von ANXA2 zusammen mit NKCC2 in der Plasmamembran als durch die alleinige PMA-Stimulation.

4 Diskussion

Die dicke aufsteigende Henle Schleife (TAL) wirkt als Schlüsselement der Osmo- und Volumenhomöostase des Körpers. Hierfür werden verschiedene systemische und lokal generierte Signale durch die Zellen des TAL integriert. NKCC2 stellt dabei den quantitativ wichtigsten apikalen Salztransporter in diesem Nephronsegment dar (Ares et al., 2011; Greger, 1985; Hebert and Andreoli, 1986). Beim Menschen bewirken Aktivitätsdefekte von NKCC2 eine Störung des Urinkonzentrationsmechanismus und manifestieren sich im Bartter-Syndrom (Scheinman et al., 1999). Um die Pathophysiologie von NKCC2-assoziierten Krankheitsbildern besser zu verstehen und um potenzielle Therapieansätze entwickeln zu können, ist es wichtig, die präzisen Mechanismen der NKCC2-Regulation aufzuklären. Die Aktivierung von NKCC2 wird über intrazelluläre Signaltransduktionswege wie den Vasopressin-V2-Rezeptor-Weg reguliert, welcher zur vermehrten Translokation von NKCC2 in *Lipid Rafts* der Plasmamembran führt und zudem die Phosphorylierung des N-Terminus von NKCC2 bewirkt (Gimenez and Forbush, 2003; Mutig et al., 2007; Welker et al., 2008). In diesem Kontext wird vermutet, dass *Lipid Rafts* als Organisationsstrukturen für beide Prozesse von Bedeutung sind und ebenfalls für die Rekrutierung von spezifischen regulatorischen Interaktionspartnern von NKCC2 verantwortlich sind (Welker et al., 2008).

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Proteinzusammensetzung NKCC2-tragender *Lipid Rafts* zu charakterisieren. Dazu sollten zunächst Methoden entwickelt werden, um diese NKCC2-tragenden *Lipid Rafts* zu isolieren und deren Proteinzusammensetzung mittels Massenspektrometrie zu analysieren. Der wahrscheinlichste Kandidat wurde anschließend funktionell charakterisiert, wobei die physiologische Rolle dieses Kandidaten bei der Regulation von NKCC2 während der Urinkonzentrierung untersucht werden sollte.

4.1 NKCC2 ist ein in spezifischen *Lipid Rafts* angereichertes Protein

Als *Lipid Rafts* werden dynamische Membranmikrodomänen bezeichnet, die sich in ihrer Zusammensetzung und physikalischen Eigenschaften von den umliegenden Membrananteilen unterscheiden (Simons and Ikonen, 1997). Sie wirken als Verankerungsplattformen für GPI-verankerte Membranproteine und dienen als Organisationszentren für die Signaltransduktion sowie für Prozesse der Endo- und Exozytose (Brown, 2006; Helms and Zurzolo, 2004; Lippincott-Schwartz, 2004; Schuck and Simons, 2006; Simons and Toomre, 2000). *Lipid*

Rafts können mit Hilfe einer Detergensbehandlung (Triton[®] X-100, 4°C) und anschließender Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden (Brown, 2006; Simons and Vaz, 2004; Welker et al., 2008). Mittels biochemischer Charakterisierung der aus diesem Verfahren, auch *Floating Assay* genannt, erhaltenen Fraktionen niedrigerer Dichte konnte eine Anreicherung von NKCC2 in diesen speziellen Membranmikrodomänen, in denen auch Cholesterin und Sphingolipide akkumulierten, gezeigt werden (Welker et al., 2008). Gleichzeitig akkumulierten in diesen Fraktionen die *Lipid Raft*-Proteine Flotillin-1 und GPI-verankertes THP (Bickel et al., 1997; Cavallone et al., 2001; Santamaria et al., 2005; Welker et al., 2008). Diese Daten wurden durch Immunmarkierungen an Plasmamembran-*Sheets* von TAL-Zellen näher charakterisiert. Hierbei sind *Lipid Rafts* als elektronendichtere Bereiche erkennbar, die mittels Transmissionselektronenmikroskopie als dunklere Regionen detektiert werden können. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Lokalisation der *Lipid Raft*-Markerproteine in NKCC2-enthaltenden Membranmikrodomänen innerhalb der apikalen Membran bestätigt werden. Dagegen konnte eine Kolokalisation von NKCC2 mit *non-Raft*-Proteinen anhand des Markers Transferrin-Rezeptor (TFR) (Harder et al., 1998; Magee and Parmryd, 2003) ausgeschlossen werden. Diese Resultate liefern einen weiteren Beleg für die Assoziation von NKCC2 mit *Lipid Rafts* und bestätigen vorausgegangene Studien (Carmosino et al., 2010; Welker et al., 2008; Yu et al., 2008). Anhand dieser Daten wurde hypothetisiert, dass eine signifikante Abhängigkeit der NKCC2-Aktivität von dessen Präsenz in cholesterinreichen Membranmikrodomänen besteht (Mutig et al., 2011; Welker et al., 2008). Erste Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit Vasopressin zur Anreicherung von NKCC2 in *Lipid Rafts* führt und dass eine Zerstörung der *Lipid Rafts* durch Cholesterin-Depletion eine deutliche Reduktion der Vasopressin-induzierten Aktivität von NKCC2 bei gleichzeitiger Verminderung der Translokation des Kotransporters zur Folge hat (Welker et al., 2008). Überdies wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass das Fehlen von THP zu einer Verminderung der Aktivität von NKCC2 führt (Mutig et al., 2011). Es ist bekannt, dass THP und andere GPI-verankerte Proteine eine Rolle bei der Formation von *Lipid Rafts* zu *Scaffolding platforms* spielen, die wiederum für regulatorische Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sein können (Delpire and Gagnon, 2008; Paladino et al., 2008; Rinehart et al., 2005). Folglich kann für NKCC2 die Hypothese aufgestellt werden, dass die Proteinzusammensetzung der spezifischen Membranmikrodomänen eine direkte Wirkung auf seine Funktion und Regulation hat (Li et al., 2001; Murtazina et al., 2006; Shlyonsky et al., 2003).

4.2 NKCC2 interagiert direkt mit dem *Scaffold*-Protein ANXA2 in *Lipid Rafts*

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde nach regulatorischen Interaktionspartnern von NKCC2 in *Lipid Rafts* gesucht, um letztendlich die zellbiologischen Mechanismen der Oberflächenlokalisierung von NKCC2 sowie die molekularen Mechanismen der Regulation des Kotransporters charakterisieren zu können. Für die biochemische Charakterisierung der NKCC2-angereicherten, detergensresistenten Membranmikrodomänen wurde die Methode der Immunpräzipitation etabliert. Dafür wurden aus dem homogenisierten Gewebe der äußeren Medulla von Rattennieren sowie aus den daraus mittels *Floating Assay* angereicherten *Lipid Raft*-Fraktionen eine NKCC2-Immunpräzipitation durchgeführt. Hier konnte jeweils gezeigt werden, dass THP und Flotillin-1 mit NKCC2 koimmunpräzipitieren und somit in *Lipid Rafts* mit dem Kotransporter assoziiert vorliegen. Diese Resultate dienen zum einen der Validierung der methodischen Vorgehensweise und zum anderen wurde dadurch die enge physische Assoziation der *Lipid Raft*-Markerproteine mit NKCC2 bestärkt. Gleichzeitig konnte die Spezifität der Isolation durch die Untersuchung der Verteilung von *non-Raft*-Markern, wie TfR und Clathrin (Harder et al., 1998; Magee and Parmryd, 2003; Mazzone et al., 2006), bestätigt werden, da diese nicht im Eluat der NKCC2-Immunpräzipitation aus der äußeren Medulla von Rattennieren nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise konnte NHE3, welches ebenfalls als *Lipid Raft*-Protein in der apikalen Membran des TAL beschrieben ist (Li et al., 2001; Murtazina et al., 2006), nicht mit NKCC2 koimmunpräzipitiert werden. Dieses Resultat gibt erste Hinweise darauf, dass die *Lipid Rafts* in der apikalen Plasmamembran keine homogene Population bilden und hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung differenziert werden können. Darüberhinaus kann anhand dieser Beobachtung vermutet werden, dass zwischen den einzelnen *Lipid Rafts* funktionell relevante Unterschiede existieren und sie somit in verschiedene steuerbare Transportwege involviert sind.

Nach erfolgreicher Etablierung der NKCC2-Immunpräzipitation wurde diese aus den *Lipid Raft*-Fraktionen der äußeren Medulla durchgeführt. Die erhaltenen Eluate wurden mittels Massenspektrometrie analysiert, um Proteine, die in NKCC2-tragenden, cholesterinreichen Membranmikrodomänen lokalisiert sind und damit potentielle Interaktionspartner von NKCC2 darstellen, zu identifizieren. Auf diese Weise konnte erfolgreich eine Reihe an Proteinen erfasst werden, die mit NKCC2 in *Lipid Rafts* assoziieren. Neben den bereits identifizierten Proteinen, THP und Flotillin-1, gehören hierzu zum Beispiel Mitglieder der Ezrin-Radixin-Moesin Familie, Moesin und Ezrin, die bereits als *Lipid Raft*-Proteine bekannt

sind (Itoh et al., 2002; Ruppelt et al., 2007). Des Weiteren wurden *Ras-related protein Rab-35*, *Ras-related protein Ral-A* und *GTP-binding protein Rab-3D* gefunden, welche jeweils über einen Lipid-Anker verfügen und in verschiedene Membran- bzw. Proteintransportvorgänge sowie Endo- und Exozytose involviert sind (Balasubramanian et al., 2010; Kouranti et al., 2006; Oberhauser et al., 1994).

Unter den mittels Massenspektrometrie identifizierten, kopräzipitierten Proteinen entsprach ANXA2 dem Treffer mit der höchsten Probabilität. Des Weiteren konnte die Präsenz von ANXA2 in NKCC2-positiven *Lipid Rafts* mittels biochemischer Methoden, immunhistochemischer Doppelmarkierung im apikalen Bereich des medullären TAL sowie in den Zellen der MD als auch mittels Immuno-Goldmarkierung an Plasmamembran-*Sheets* bestätigt werden. In der Literatur wurde gezeigt, dass ANXA2 nicht nur mit *Lipid Rafts* assoziiert, sondern ebenfalls in die Formation dieser Membranmikrodomänen involviert ist, deren Dynamik beeinflusst und sie mit den entsprechenden Zytoskelett- und Gerüstproteinen verbindet sowie den Transport und Einbau weiterer interagierender Proteine vermittelt (Babiychuk and Draeger, 2000; Chasserot-Golaz et al., 2005; Chintagari et al., 2006; Domon et al., 2012; Gerke and Moss, 2002; Harder et al., 1997; Jacob et al., 2004; Oliferenko et al., 1999; Rescher and Gerke, 2004).

Aufgrund der hier generierten Ergebnisse sowie der Literaturdaten stellte ANXA2 einen aussichtsreichen und interessanten regulatorischen Interaktionskandidaten für die Translokation von NKCC2 in *Lipid Rafts* dar. Ein unterstützender Hinweis für die Bedeutung von ANXA2 für die Funktion des TAL ist, dass es im medullären Abschnitt dieses Nephronsegments hochgradig exprimiert ist (Yu et al., 2009). Zudem wurde ANXA2 unter Einsatz eines *Microarrays* als Vasopressin-reguliertes Gen beschrieben (Dietrich et al., 2013; Paliege et al., 2012). Dies ist insofern relevant, da auch NKCC2 durch Vasopressin reguliert wird, wobei nachgewiesen werden konnte, dass der Kotransporter Vasopressin-abhängig zur Plasmamembran transportiert wird (Gimenez and Forbush, 2003; Meade et al., 2003; Welker et al., 2008). Zusammenfassend zeigen die hier generierten Ergebnisse, dass endogenes ANXA2 und NKCC2 in denselben *Lipid Rafts* im apikalen Bereich des TAL vorkommen und sich daher eine bedeutende Rolle von ANXA2 für die Translokation von NKCC2 in *Lipid Rafts* vermuten lässt.

Um die regulatorische Relevanz von ANXA2 für NKCC2 zu untersuchen, wurden die physikalischen Bindungseigenschaften von NKCC2 an ANXA2 näher betrachtet. In

vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass ANXA2 eine spezifische N-terminale Domäne besitzt, die für die unterschiedlichen Bindungseigenschaften mit Liganden und Proteinen sowie die spezifischen ANXA2-Funktionen verantwortlich ist (Liemann and Huber, 1997; Raynal and Pollard, 1994). Weiterhin ist bekannt, dass ANXA2 über diesen exponierten N-Terminus einen heterotetrameren Komplex mit P11 bildet, wobei P11 lediglich als Verbindungsglied fungiert, das das jeweilige Zielprotein an ANXA2 bindet (Gerke and Weber, 1985; Glenney and Tack, 1985; Rescher and Gerke, 2008; Waisman, 1995). Somit interagiert ANXA2 entweder indirekt, vermittelt über P11 in Form des heterotetrameren Komplexes mit seinen Zielproteinen, oder es findet eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen dem ANXA2-Monomer und dem entsprechenden Zielprotein statt (Huang et al., 2004; Johnsson et al., 1990; Mayer et al., 2008). Daher sollte zunächst mittels *Pulldown Assays* und *Peptid Spot Arrays* untersucht werden, ob ANXA2 direkt oder unter Vermittlung von P11 an NKCC2 bindet. Mittels dieser detaillierten *in vitro* Analysen konnte eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen dem ANXA2-Monomer und dem N-terminalen Bereich von NKCC2 gezeigt werden. Die Komplexbildung von NKCC2 mit ANXA2 wird zusätzlich durch Ergebnisse eines *Yeast-2-Hybrid Screens* bestätigt (eigene, bisher unveröffentlichte Ergebnisse).

Die hier gefundene Interaktion ist dabei unabhängig von P11, da weder eine direkte noch eine indirekte, ANXA2-vermittelte Bindung von P11 an den N-Terminus von NKCC2 nachgewiesen wurde. Frühere Studien zeigten auch für andere Proteine eine P11-unabhängige, direkte Interaktion mit dem ANXA2-Monomer, die für die Translokation und somit Regulation dieser Proteine erforderlich ist. Das betrifft neben der Rekrutierung und Lokalisation der homologen Rab5 Effektorproteine APPL1 und APPL2 in der endosomalen Membran (Urbanska et al., 2011) ebenfalls die Translokation der Bürstensaum-Proteine Keratin 19 und Ezrin zur apikalen Plasmamembran (Hein et al., 2011). Des Weiteren zeigten Mayer *et al.*, dass ANXA2 die Bindung von PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9*) an seinen korrespondierenden LDL-Rezeptor (*low-density lipoprotein receptor*) in der apikalen Membran reguliert (Mayer et al., 2008).

Im Gegensatz zum Tetramer (Rescher and Gerke, 2008; Waisman, 1995) ist die Bindungseigenschaft des ANXA2-Monomers an seine direkten Interaktionspartner bislang nicht näher untersucht, wobei bisher auch kein potentiell Bindemotiv identifiziert wurde. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass ANXA2 direkt in Form des Monomers an den N-Terminus von NKCC2 bindet und dadurch vermutlich die intrazelluläre Translokation des Kotransporters zur Plasmamembran reguliert.

Für den N-Terminus von NKCC2 sind verschiedene Phosphorylierungsstellen bekannt, welche höchstwahrscheinlich die Zielregion von regulatorischen Proteinen darstellen. Frühere Studien zeigten, dass die Phosphorylierung der N-terminalen Threonine sowie des Serins für die Aktivität von NKCC2 essentiell sind (Ponce-Coria et al., 2008; Richardson et al., 2011), wobei eine gleichzeitige Phosphorylierung dieser regulatorischen Stellen zu einer Steigerung bzw. eine Dephosphorylierung zu einer starken Verminderung der Transportaktivität von NKCC2 führt (Gimenez and Forbush, 2005; Ponce-Coria et al., 2008). Ein weiteres Indiz für die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstellen und somit des N-Terminus von NKCC2 ist die hohe Konservierung zwischen den verschiedenen Spezies (Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen) (Ares et al., 2011; Gimenez and Forbush, 2003; Gimenez and Forbush, 2005; Richardson et al., 2011).

Wie die Phosphorylierung die NKCC2-Aktivität im Detail beeinflusst, ist derzeit nicht bekannt. In diesem Kontext wird aber postuliert, dass der Phosphorylierungsstatus des NKCC2 N-Terminus die Interaktionen mit regulierenden Proteinen beeinflusst und dass die Translokation des Kotransporters ebenfalls phosphorylierungsabhängig ist. Aufgrund dessen wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss der Phosphorylierungsstatus von NKCC2 auf die Wechselwirkung mit dem ANXA2-Monomer hat. Mittels *Pulldown Assays* und *Peptid Spot Arrays* konnte gezeigt werden, dass ANXA2 neben der unmutierten N-terminalen Region (kodierende Triplets 1-175) ausschließlich eine direkte Bindung mit den dephosphomimetischen Mutanten des N-Terminus von NKCC2 eingeht. Die mittels dieser *in vitro* Methoden gezeigte Abhängigkeit der betrachteten, direkten Interaktion vom Phosphorylierungsstatus von NKCC2, konnte *in vivo* mittels Koimmunpräzipitationen aus medullärem Nierengewebe von Brattleboro bzw. Sprague Dawley Ratten bestätigt werden, da ANXA2 nicht mit endogenem pNKCC2 kopräzipitiert werden konnte. Im Gegensatz dazu koimmunpräzipitierten endogenes NKCC2 und ANXA2 miteinander. Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass lediglich unphosphoryliertes nicht aber phosphoryliertes NKCC2 direkt mit dem ANXA2-Monomer in einem funktionellen Komplex interagiert. Somit wurde hier erstmalig eine phosphorylierungsabhängige Bindung von uns an NKCC2 nachgewiesen.

4.3 Funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2

Zur Ausübung seiner Funktion muss NKCC2 an der Zelloberfläche exprimiert werden. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass NKCC2 nicht nur in der apikalen Membran vorkommt, sondern auch abundant in intrazellulären Vesikeln gespeichert wird, die sich im subapikalen Bereich der TAL-Zelle befinden und bei Bedarf zur Plasmamembran transportiert werden (Gimenez and Forbush, 2003; Meade et al., 2003; Nielsen et al., 1998; Welker et al., 2008). Somit stellt die Translokation neben der Phosphorylierung einen wichtigen Teil des Aktivierungsprozesses dar (Gimenez and Forbush, 2003). Mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen konnte hier beobachtet werden, dass das Vasopressin-Analogon dDAVP die Translokation der NKCC2-positiven Vesikel zur luminalen Membran sowie deren exozytotische Insertion in die Plasmamembran bewirkt. Dies resultiert in einer Zunahme der apikalen Membranlokalisation sowie in einer Steigerung der Transportaktivität von NKCC2 (Caceres et al., 2009; Gimenez and Forbush, 2003; Ortiz, 2006; Welker et al., 2008).

Die gezeigte direkte Interaktion zwischen NKCC2 und dem ANXA2-Monomer lässt eine regulatorische Rolle von ANXA2 für den Transport von NKCC2 zur apikalen Plasmamembran im medullären TAL vermuten. Für ANXA2 ist bereits beschrieben, dass es eine regulatorische Funktion bei der Translokation verschiedener Plasmamembranproteine hat (Hein et al., 2011; Mayer et al., 2008). Darüber hinaus ist bekannt, dass beide Proteine durch Vasopressin stimuliert werden können (Dietrich et al., 2013; Gimenez and Forbush, 2003; Paliege et al., 2012; Welker et al., 2008). Um die Interaktion von NKCC2 mit ANXA2 funktionell zu charakterisieren, wurden Vasopressin-defiziente Brattleboro Ratten untersucht. Dabei wurde die Translokation beider Proteine unter kurzzeitiger Applikation von dDAVP analysiert. Neben dem Transport von NKCC2 zur apikalen Membran (Mutig et al., 2007; Welker et al., 2008) konnte gleichzeitig eine signifikante Anreicherung von ANXA2 sowie eine verstärkte Kolokalisation beider Proteine in den *Lipid Rafts* der apikalen TAL-Membran gefunden werden. Der parallele Transport von ANXA2 und NKCC2 wurde in Zellkulturexperimenten unter hypotonischem Chloridmangel-Stress bestätigt. Hypotonischer Chloridmangel-Stress ist ein etablierter Stimulus, der mittels einer Abnahme der intrazellulären Chloridkonzentration (Darman et al., 2001; Flemmer et al., 2002) letztlich eine gesteigerte Phosphorylierung des N-Terminus von NKCC2 bewirkt und dadurch eine gesteigerte Transportaktivität des Kotransporters hervorruft (Ares et al., 2011; Gimenez and

Forbush, 2003; Gimenez and Forbush, 2005; Ponce-Coria et al., 2008; Richardson et al., 2011). Unter hypochlorischem Stress und anschließender Membranpräparation zeigte sich eine apikale Translokation und damit Akkumulation von nativem NKCC2 zusammen mit überexprimiertem ANXA2 in den Plasmamembran-*Rafts* bei gleichzeitiger Verminderung der intrazellulären Lokalisation dieser Proteine. Unterstützend zeigte die Proteinkinase C-abhängige Stimulation der Translokation von ANXA2 mittels PMA (Gerelsaikhan et al., 2011; Singh et al., 2004; Vaaraniemi et al., 1994, 1994 #712) eine gleichzeitig verstärkte Akkumulation von NKCC2 in der Plasmamembran durch eine gesteigerte Exozytose. Zudem wurde in Übereinstimmung mit der Arbeitshypothese nach siRNA-vermittelter ANXA2-Repression eine verminderte Translokation von NKCC2 in die Zellmembran nach hypochlorischem Stressreiz beobachtet. Frühere Studien zeigten in diesem Kontext, dass eine verminderte Abundanz von ANXA2 ebenfalls zu einer Inhibition der Translokation von anderen Proteinen führte. Das betrifft neben den homologen Rab5 Effektorproteinen APPL1 und APPL2 die epithelialen Kanäle TRPV5 und TRPV6 (Urbanska et al., 2011; van de Graaf et al., 2003).

Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Resultate wird folglich die Hypothese gestützt, dass ANXA2 für die Translokation von NKCC2 essentiell ist, wobei der genaue Mechanismus, wie ANXA2 den Transport von NKCC2 zur apikalen Membran beeinflusst, jedoch nicht endgültig geklärt ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass ANXA2 die Interaktion von Aktinfilamenten an Vesikeln moduliert und somit für die Membranamordnung während der Transportprozesse verantwortlich ist (Merrifield et al., 2001; Morel and Gruenberg, 2009; Morel et al., 2009). Außerdem stellt ANXA2 eine wichtige Komponente von Protein-Transport-Maschinerien dar, bei denen ebenfalls *Lipid Rafts* und das Aktin-Zytoskelett involviert sind (Hein et al., 2011; Valapala and Vishwanatha, 2011). In diesem Kontext wird vermutet, dass ANXA2 spezifische Vesikel mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet und dadurch den Transport dieser Organellen zu ihren Zielorten vermittelt (Urbanska et al., 2011). Dies hebt die Bedeutung von ANXA2 als Regulator von Transportprozessen hervor. Bisher liegen aber keine Daten zur Interaktion von ANXA2 im TAL vor.

Dagegen haben Resultate zur Rolle von ANXA2 in Sammelrohrzellen gezeigt, dass die Stimulation mit dem cAMP-erhöhenden Reagens Forskolin zu einer Anreicherung von ANXA2 in Plasmamembran-*Rafts* führte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass ANXA2 nicht nur für die Fusion der AQP2-Vesikel verantwortlich ist, sondern ebenfalls bei der Membraninsertion des Wasserkanals im Sammelrohr beteiligt ist (Tamma et al., 2008).

Außerdem konnte vor geraumer Zeit der Nachweis erbracht werden, dass die Stimulation von cAMP/Proteinkinase A einen potentiellen Regulator des ANXA2-P11-Komplexes darstellt. Unter diesen Bedingungen wurde in den Epithelien der Atemwege und des Darms beobachtet, dass der Transport der Bürstensaumproteine zur apikalen Membran via ANXA2-positiver *Lipid Rafts* stattfindet (Borthwick et al., 2008a; Borthwick et al., 2008b).

Zusammenfassend hat die Arbeit gezeigt, dass ANXA2 als regulatorisches Protein für den intrazellulären Transport von NKCC2 aus subapikalen Vesikeln in Plasmamembran-*Rafts* im TAL fungieren kann. Das mechanistische Detail, wie die Interaktion beider Proteine letztlich den Transport des Kotransporters zur Zelloberfläche beeinflusst, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen noch nicht völlig geklärt werden. Folgerichtig bleibt dieser Aspekt ein interessanter Gegenstand für weiterführende Studien.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit die spezifische Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2 in *Lipid rafts* erstmalig identifiziert und im Verlauf näher charakterisiert. Dabei basiert die Assoziation von ANXA2 und dem N-Terminus von NKCC2 auf einer direkten Protein-Protein-Bindung und ist zudem abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Kotransporters. Die funktionelle Relevanz dieser Interaktion wird durch folgende Beobachtungen dargelegt: 1) beide Proteine wurden infolge der Stimulation mit dDAVP simultan in *Lipid Rafts* innerhalb der Zellmembran angereichert und parallel dazu verstärkte sich die Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2; 2) die Aktivierung von NKCC2 via hypotonischem Chloridmangel-Stress bewirkte eine gesteigerte Translokation, die wiederum zu einer Kollokalisierung von beiden Proteinen, endogenem NKCC2 und überexprimiertem ANXA2, in der Plasmamembran führte; und 3) die Verminderung der ANXA2-Abundanz mittels siRNA limitierte die durch Chlorid-Depletion hervorgerufene apikale Translokation von NKCC2, was die Notwendigkeit der ANXA2-NKCC2-Interaktion für die Akkumulation des Kotransporters in der apikalen Membran induziert. Somit ist ANXA2 ein unerlässliches Element der Translokation von NKCC2-enthaltenden Vesikeln zur apikalen Membran sowie der dort stattfindenden Insertion des Kotransporters in spezifische *Lipid Rafts*.

Anhand der hier generierten Daten in Kombination mit Literaturangaben kann ein Modell der ANXA2-Regulation für die Funktion von NKCC2 aufgestellt werden (Abb. 4.1). Dabei bindet monomeres ANXA2 Vasopressin-induziert an die in subapikalen Vesikeln lokalisierte, N-terminal unphosphorylierte Population von NKCC2. Darauf folgend vermittelt das

gebundene ANXA2 den apikalen Transport von NKCC2 zur Plasmamembran sowie die Insertion in die dort vorkommenden *Lipid Rafts*, indem es die Assoziation der Vesikel mit der Plasmamembran begünstigt (Gerke and Moss, 2002; Rescher and Gerke, 2004; Tamma et al., 2008). Anschließend erfolgt die Phosphorylierung von NKCC2 und somit letztlich die Aktivierung des Kotransporters (Gimenez and Forbush, 2005; Ponce-Coria et al., 2008; Richardson et al., 2011). Aufgrund der Phosphorylierung löst sich parallel die Bindung zwischen ANXA2 und NKCC2. Somit stellt die Phosphorylierung in diesem Modell das Ende des exozytischen Transportmechanismus dar. Darüber hinaus wird spekuliert, dass neben der Aktivität auch die Verweildauer von NKCC2 in den Plasmamembran-*Rafts* vom Phosphorylierungsstatus abhängig ist, indem die ansonsten konstitutiv stattfindende Endozytose von NKCC2 dadurch verringert wird (Dimke et al., 2007; Gimenez and Forbush, 2003; Rafiqi et al., 2010; Richardson et al., 2011).

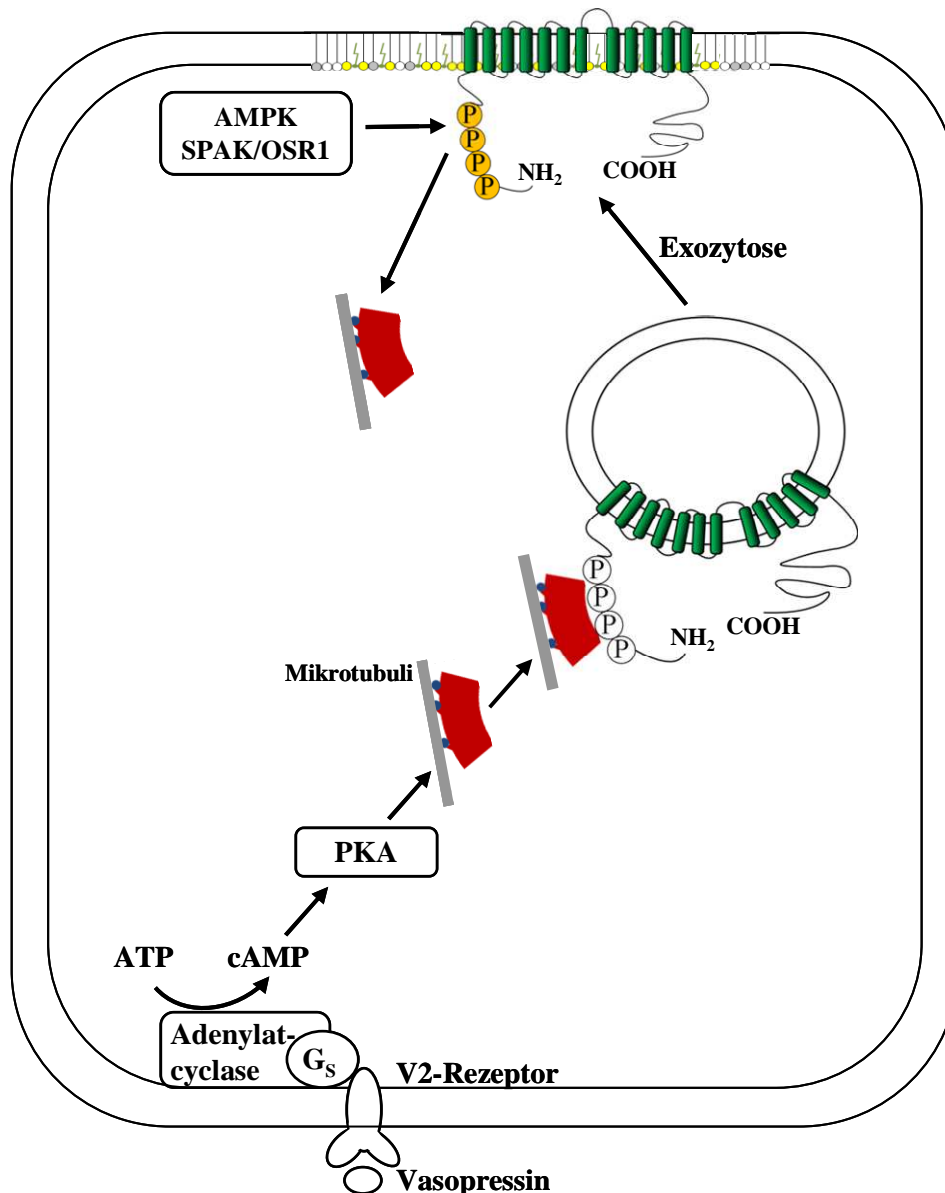


Abbildung 4.1: Modell der funktionellen Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2.

Die Vasopressin-induzierte Aktivierung von ANXA2 über den V2-Rezeptor-Signalweg führt zu seiner Bindung an N-terminal dephosphoryliertes, subapikal lokalisiertes NKCC2. Nach der ANXA2-vermittelten Translokation des Kotransporters in die *Lipid Rafts* der Plasmamembran erfolgt mit Hilfe der Kinase-vermittelten Phosphorylierung die Aktivierung von NKCC2. Gleichzeitig löst sich die Bindung zwischen ANXA2 und NKCC2. Darstellung von NKCC2 (grün) mit etablierten Phosphorylierungsstellen im N-Terminus (inaktiv: weiß; aktiv: gelb) und ANXA2 (rot). AMPK: 5'-AMP-activated protein kinase; SPAK: *STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase*; OSRI: *Oxidative stress-responsive 1 protein*; PKA: Proteinkinase A.

Die vorliegende Arbeit bietet somit einen mechanistischen Ansatz dafür, wie die Translokation von NKCC2 in die apikale Membran nach aktivierendem Stimulus reguliert wird. Angesichts der Bedeutung von NKCC2 für die Funktion des TAL leisten diese Ergebnisse damit einen Beitrag zum Verständnis der Regulation des Urinkonzentrationsmechanismus. Weiterführend kann sich hieraus ein besseres Verständnis

für die Pathophysiologie von NKCC2-assoziierten Erkrankungen ableiten lassen, was die Grundlage für die Entwicklung neuer gezielter pharmakologischer Wirkstoffe bildet.

5 Zusammenfassungen

5.1 Zusammenfassung

Der nierenspezifische, furosemidsensitive Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2 (NKCC2) ist für die transepitheliale Natriumchlorid Reabsorption in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL) verantwortlich und somit für die Salz- und Volumenhomöostase des Körpers essentiell. Die Transportaktivität von NKCC2 ist unter anderem von seiner N-terminalen Phosphorylierung, seiner apikalen Translokation sowie seiner Assoziation mit *Lipid Raft* Membranmikrodomänen abhängig. Vasopressin (AVP) stimuliert diese Parameter im Kontext einer gesteigerten Urinkonzentrierung effektiv. Experimentell induzierter hypotonischer Chloridmangel-Stress erzeugt die gleichen Effekte. Dabei wurden zugrundeliegende Mechanismen und interagierende Proteine, die in die Regulation der NKCC2-Aktivität involviert sind, bislang nur wenig untersucht.

Um einen besseren Einblick in diese Mechanismen zu erhalten, wurden mittels massenspektrometrischer Analysen potentielle Interaktionspartner von NKCC2 identifiziert. Dazu wurden detergensresistente Membranfraktionen aus einer Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation als Ausgangsmaterial für eine NKCC2-Immunpräzipitation eingesetzt. Auf diese Weise wurde, neben anderen Proteinen, das *Scaffolding* Protein Annexin A2 (ANXA2) als ein neuer Interaktionspartner von NKCC2 in *Lipid Rafts* identifiziert. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass ANXA2 nicht nur in die Formation von *Lipid Rafts* involviert ist, sondern auch die *Lipid Raft*-abhängige Translokation verschiedener Membranproteine, wie Aquaporin 2, vermittelt. Folglich wurde hier die Hypothese, dass ANXA2 eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung von NKCC2 in *Lipid Rafts* sowie seiner apikalen Translokation einnimmt, aufgestellt. Mit Hilfe morphologischer Methoden wurde eine Kolo-kalisation von ANXA2 sowie seinem etablierten Komplexpartner P11 (S100A10) mit NKCC2 in den als *Rafts* identifizierten, apikalen Membrandomänen des TAL gezeigt. Bindungsstudien belegten, dass ANXA2, jedoch nicht P11, direkt mit dem unphosphorylierten N-Terminus von NKCC2 interagiert. Zudem stimulierte allein ANXA2, und nicht P11, die AVP- oder Chloridmangel-Stress-induzierte, apikale Translokation von NKCC2 in einem Tiermodell mit zentralem Diabetes insipidus und in Zellkultur. Die Verminderung der Abundanz von ANXA2 mittels siRNA limitierte die durch Chlorid-

Depletion hervorgerufene Akkumulation von NKCC2 in der Plasmamembran, was die Rolle von ANXA2 bei der apikalen Translokation von NKCC2 unterstützt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ANXA2 ein essentieller, *Lipid Raft*-gekoppelter Translokationsfaktor ist, der unter Einsatz etablierter Stimuli direkt die apikale Translokation des Kotransporters NKCC2 vermittelt. Diese Studie liefert somit neue mechanistische Informationen über die Regulation von NKCC2.

5.2 Summary

The renal furosemide-sensitive Na-K-Cl-cotransporter type 2 (NKCC2) is responsible for transepithelial sodium-chloride reabsorption in the thick ascending limb (TAL) and thus critical to body salt handling and urinary concentration. Transport activity of NKCC2 depends, among other variables, on its N-terminal phosphorylation, its rate of apical trafficking, and on its association with lipid raft membrane microdomains. Vasopressin (AVP) effectively stimulate these parameters in the context of an enhanced urine concentration. Experimentally induced low chloride hypotonic stress has similar effects. Underlying mechanisms and interacting proteins involved in the activation of NKCC2 have so far received only limited attention.

To gain better insight into these mechanisms, a mass spectrometric screen was performed to identify potential binding partners of NKCC2 using detergent-resistant membrane fractions from sucrose density gradient centrifugation. Fractions were used for immunoprecipitations with antibody to NKCC2. Among other proteins, the scaffolding protein annexin A2 (ANXA2) was hereby identified as a novel protein interacting with NKCC2 in lipid rafts. ANXA2 is known to stabilize lipid rafts and to mediate lipid raft-dependent trafficking of several membrane proteins such as aquaporin 2. We hypothesized that ANXA2 serves as an essential mediator in the recruitment of NKCC2 into lipid rafts and apical trafficking. With morphological methods we could demonstrate that ANXA2 and its complex-forming partner, P11 (S100A10), are co-distributed with NKCC2 in TAL apical membrane domains identified as rafts. Binding assays revealed direct interaction between ANXA2, but not P11, and the N-terminus of NKCC2 in its dephosphorylated state. ANXA2, but not P11, further served to promote apical trafficking of NKCC2 in response to AVP or low chloride hypotonic stress in a rat model for central diabetes insipidus and in cultured cells. RNAi-induced knockdown of ANXA2 revealed that the plasma membrane localization of NKCC2 was limited in absence of ANXA2 during low chloride stimulation, supporting its role in apical trafficking of the cotransporter.

In summary, our data have identified ANXA2 as an essential, lipid raft-related trafficking factor which directly promotes the apical trafficking of the cotransporter, NKCC2, in response to established stimuli. This study hereby provides new mechanistic information on the regulation of NKCC2.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Amlal, H., Legoff, C., Vernimmen, C., Paillard, M. and Bichara, M. (1996). Na(+)-K+(NH4+)-2Cl- cotransport in medullary thick ascending limb: control by PKA, PKC, and 20-HETE. *Am J Physiol* **271**, C455-63.

Andersen, O. M., Petersen, H. H., Jacobsen, C., Moestrup, S. K., Etzerodt, M., Andreasen, P. A. and Thogersen, H. C. (2001). Analysis of a two-domain binding site for the urokinase-type plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor-1 complex in low-density-lipoprotein-receptor-related protein. *Biochem J* **357**, 289-96.

Ares, G. R., Caceres, P. S. and Ortiz, P. A. (2011). Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* **301**, F1143-59.

Attmane-Elakeb, A., Sibella, V., Vernimmen, C., Belenfant, X., Hebert, S. C. and Bichara, M. (2000). Regulation by glucocorticoids of expression and activity of rBSC1, the Na+-K+(NH4+)-2Cl- cotransporter of medullary thick ascending limb. *J Biol Chem* **275**, 33548-53.

Ayala-Sanmartin, J., Henry, J. P. and Pradel, L. A. (2001). Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca(2+) concentration. *Biochim Biophys Acta* **1510**, 18-28.

Babiychuk, E. B. and Draeger, A. (2000). Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* **150**, 1113-24.

Bacic, D., Wagner, C. A., Hernando, N., Kaissling, B., Biber, J. and Murer, H. (2004). Novel aspects in regulated expression of the renal type IIa Na/Pi-cotransporter. *Kidney Int Suppl*, S5-S12.

Balasubramanian, N., Meier, J. A., Scott, D. W., Norambuena, A., White, M. A. and Schwartz, M. A. (2010). RalA-exocyst complex regulates integrin-dependent membrane raft exocytosis and growth signaling. *Curr Biol* **20**, 75-9.

Becker, T., Weber, K. and Johnsson, N. (1990). Protein-protein recognition via short amphiphilic helices; a mutational analysis of the binding site of annexin II for p11. *EMBO J* **9**, 4207-13.

Bennett, C. M., Brenner, B. M. and Berliner, R. W. (1968). Micropuncture study of nephron function in the rhesus monkey. *J Clin Invest* **47**, 203-16.

Bettinelli, A., Bianchetti, M. G., Girardin, E., Caringella, A., Cecconi, M., Appiani, A. C., Pavanello, L., Gastaldi, R., Isimbaldi, C., Lama, G. et al. (1992). Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes. *J Pediatr* **120**, 38-43.

Bharadwaj, A., Bydoun, M., Holloway, R. and Waisman, D. (2013). Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* **14**, 6259-305.

Bia, M. J., Dewitt, S. and Forrest, J. N., Jr. (1979). Dissociation between plasma, urine, and renal papillary cyclic AMP content following vasopressin and DDAVP. *Am J Physiol* **237**, F218-25.

Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P. and Lodish, H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* **272**, 13793-802.

Borthwick, L. A., Neal, A., Hobson, L., Gerke, V., Robson, L. and Muimo, R. (2008a). The annexin 2-S100A10 complex and its association with TRPV6 is regulated by cAMP/PKA/CnA in airway and gut epithelia. *Cell Calcium* **44**, 147-57.

- Borthwick, L. A., Riemen, C., Goddard, C., Colledge, W. H., Mehta, A., Gerke, V. and Muimo, R.** (2008b). Defective formation of PKA/CnA-dependent annexin 2-S100A10/CFTR complex in DeltaF508 cystic fibrosis cells. *Cell Signal* **20**, 1073-83.
- Briggs, J. P., Kriz, W. and Schnermann, J. B.** (2001). Overview of Renal Function and Structure. In *Primer on Kidney Disease*, (ed. A. Greenberg), pp. 3-20: National Kidney Foundation, Elsevier Saunders.
- Briggs, J. P. and Schnermann, J.** (1987). The tubuloglomerular feedback mechanism: functional and biochemical aspects. *Annu Rev Physiol* **49**, 251-73.
- Brown, D. A.** (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)* **21**, 430-9.
- Burg, M. B.** (1976). Tubular chloride transport and the mode of action of some diuretics. *Kidney Int* **9**, 189-97.
- Caceres, P. S., Ares, G. R. and Ortiz, P. A.** (2009). cAMP stimulates apical exocytosis of the renal Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in the thick ascending limb: role of protein kinase A. *J Biol Chem* **284**, 24965-71.
- Carmosino, M., Gimenez, I., Caplan, M. and Forbush, B.** (2008). Exon loss accounts for differential sorting of Na-K-Cl cotransporters in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* **19**, 4341-51.
- Carmosino, M., Rizzo, F., Procino, G., Basco, D., Valenti, G., Forbush, B., Schaeren-Wiemers, N., Caplan, M. J. and Svelto, M.** (2010). MAL/VIP17, a new player in the regulation of NKCC2 in the kidney. *Mol Biol Cell* **21**, 3985-97.
- Castrop, H. and Schnermann, J.** (2008). Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2: expression and functional significance. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F859-66.
- Cavallone, D., Malagolini, N. and Serafini-Cessi, F.** (2001). Mechanism of release of urinary Tamm-Horsfall glycoprotein from the kidney GPI-anchored counterpart. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 110-4.
- Chang, R. L., Deen, W. M., Robertson, C. R. and Brenner, B. M.** (1975a). Permeability of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. *Kidney Int* **8**, 212-8.
- Chang, R. L., Ueki, I. F., Troy, J. L., Deen, W. M., Robertson, C. R. and Brenner, B. M.** (1975b). Permeability of the glomerular capillary wall to macromolecules. II. Experimental studies in rats using neutral dextran. *Biophys J* **15**, 887-906.
- Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Umbrecht-Jenck, E., Knight, D., Gerke, V. and Bader, M. F.** (2005). Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* **16**, 1108-19.
- Cheng, H. F., Wang, J. L., Zhang, M. Z., McKanna, J. A. and Harris, R. C.** (2000). Role of p38 in the regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. *J Clin Invest* **106**, 681-8.
- Chintagari, N. R., Jin, N., Wang, P., Narasaraaju, T. A., Chen, J. and Liu, L.** (2006). Effect of cholesterol depletion on exocytosis of alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 677-87.
- Creutz, C. E., Pazoles, C. J. and Pollard, H. B.** (1978). Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J Biol Chem* **253**, 2858-66.
- Czekay, R. P., Kuemmel, T. A., Orlando, R. A. and Farquhar, M. G.** (2001). Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell* **12**, 1467-79.
- Darman, R. B., Flemmer, A. and Forbush, B.** (2001). Modulation of ion transport by direct targeting of protein phosphatase type 1 to the Na-K-Cl cotransporter. *J Biol Chem* **276**, 34359-62.
- Delpire, E. and Gagnon, K. B.** (2008). SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells. *Biochem J* **409**, 321-31.

- Dietrich, A., Mathia, S., Kaminski, H., Mutig, K., Rosenberger, C., Mrowka, R., Bachmann, S. and Paliege, A.** (2013). Chronic activation of vasopressin V2 receptor signalling lowers renal medullary oxygen levels in rats. *Acta Physiol (Oxf)* **207**, 721-31.
- Dimke, H., Flyvbjerg, A., Bourgeois, S., Thomsen, K., Frokiaer, J., Houillier, P., Nielsen, S. and Frische, S.** (2007). Acute growth hormone administration induces antidiuretic and antinatriuretic effects and increases phosphorylation of NKCC2. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F723-35.
- Domon, M., Nasir, M. N., Matar, G., Pikula, S., Besson, F. and Bandorowicz-Pikula, J.** (2012). Annexins as organizers of cholesterol- and sphingomyelin-enriched membrane microdomains in Niemann-Pick type C disease. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1773-85.
- Donato, R.** (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 637-68.
- Dublineau, I., Pradelles, P., de Rouffignac, C. and Elalouf, J. M.** (1992). Differential short-term desensitization to vasopressin, isoproterenol, glucagon, parathyroid hormone and calcitonin in the thick ascending limb of rat kidney. *Pflugers Arch* **420**, 16-22.
- Ecelbarger, C. A., Kim, G. H., Wade, J. B. and Knepper, M. A.** (2001). Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol* **171**, 227-34.
- Eng, B., Mukhopadhyay, S., Vio, C. P., Pedraza, P. L., Hao, S., Battula, S., Sehgal, P. B., McGiff, J. C. and Ferreri, N. R.** (2007). Characterization of a long-term rat mTAL cell line. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, F1413-22.
- Filipenko, N. R. and Waisman, D. M.** (2001). The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem* **276**, 5310-5.
- Flemmer, A. W., Gimenez, I., Dowd, B. F., Darman, R. B. and Forbush, B.** (2002). Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. *J Biol Chem* **277**, 37551-8.
- Foulkes, T., Nassar, M. A., Lane, T., Matthews, E. A., Baker, M. D., Gerke, V., Okuse, K., Dickenson, A. H. and Wood, J. N.** (2006). Deletion of annexin 2 light chain p11 in nociceptors causes deficits in somatosensory coding and pain behavior. *J Neurosci* **26**, 10499-507.
- Fritz, K., Fritz, G., Windschiegl, B., Steinem, C. and Nickel, B.** (2010). Arrangement of Annexin A2 tetramer and its impact on the structure and diffusivity of supported lipid bilayers. *Soft Matter* **6**, 4084-4094.
- Gamba, G.** (2005). Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* **85**, 423-93.
- Gerelsaikhan, T., Chen, X. L. and Chander, A.** (2011). Secretagogues of lung surfactant increase annexin A7 localization with ABCA3 in alveolar type II cells. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 2017-25.
- Gerke, V., Creutz, C. E. and Moss, S. E.** (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 449-61.
- Gerke, V. and Moss, S. E.** (1997). Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1357**, 129-54.
- Gerke, V. and Moss, S. E.** (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82**, 331-71.
- Gerke, V. and Weber, K.** (1984). Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J* **3**, 227-33.
- Gerke, V. and Weber, K.** (1985). The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells. *EMBO J* **4**, 2917-20.

- Giebisch, G.** (1993). Diuretic action of potassium channel blockers. *Eur J Clin Pharmacol* **44** Suppl 1, S3-5.
- Gimenez, I. and Forbush, B.** (2003). Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein. *J Biol Chem* **278**, 26946-51.
- Gimenez, I. and Forbush, B.** (2005). Regulatory phosphorylation sites in the NH₂ terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F1341-5.
- Gimenez, I., Isenring, P. and Forbush, B.** (2002). Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na-K-Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions. *J Biol Chem* **277**, 8767-70.
- Glenney, J. R., Jr. and Tack, B. F.** (1985). Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7884-8.
- Gould, K. L., Woodgett, J. R., Isacke, C. M. and Hunter, T.** (1986). The protein-tyrosine kinase substrate p36 is also a substrate for protein kinase C in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* **6**, 2738-44.
- Greger, R.** (1985). Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* **65**, 760-97.
- Gussow, D. and Clackson, T.** (1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **17**, 4000.
- Hajjar, K. A., Guevara, C. A., Lev, E., Dowling, K. and Chacko, J.** (1996). Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2. *J Biol Chem* **271**, 21652-9.
- Hannaert, P., Alvarez-Guerra, M., Pirot, D., Nazaret, C. and Garay, R. P.** (2002). Rat NKCC2/NKCC1 cotransporter selectivity for loop diuretic drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**, 193-9.
- Harder, T., Kellner, R., Parton, R. G. and Gruenberg, J.** (1997). Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* **8**, 533-45.
- Harder, T., Kube, E. and Gerke, V.** (1992). Cloning and characterization of the human gene encoding p11: structural similarity to other members of the S-100 gene family. *Gene* **113**, 269-74.
- Harder, T., Scheiffle, P., Verkade, P. and Simons, K.** (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**, 929-42.
- Hayes, M. J., Merrifield, C. J., Shao, D., Ayala-Sanmartin, J., Schorey, C. D., Levine, T. P., Proust, J., Curran, J., Bailly, M. and Moss, S. E.** (2004). Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem* **279**, 14157-64.
- Hayes, M. J., Shao, D. M., Grieve, A., Levine, T., Bailly, M. and Moss, S. E.** (2009). Annexin A2 at the interface between F-actin and membranes enriched in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1086-95.
- Hebert, S. C. and Andreoli, T. E.** (1984). Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol* **246**, F745-56.
- Hebert, S. C. and Andreoli, T. E.** (1986). Ionic conductance pathways in the mouse medullary thick ascending limb of Henle. The paracellular pathway and electrogenic Cl⁻ absorption. *J Gen Physiol* **87**, 567-90.
- Hebert, S. C., Culpepper, R. M. and Andreoli, T. E.** (1981a). NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport; origin of transepithelial voltage. *Am J Physiol* **241**, F432-42.

Hebert, S. C., Culpepper, R. M. and Andreoli, T. E. (1981b). NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. III. Modulation of the ADH effect by peritubular osmolality. *Am J Physiol* **241**, F443-51.

Hebert, S. C., Friedman, P. A. and Andreoli, T. E. (1984). 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* **80**, 201-19.

Hebert, S. C., Schafer, J. A. and Andreoli, T. E. (1981c). The effects of antidiuretic hormone (ADH) on solute and water transport in the mammalian nephron. *J Membr Biol* **58**, 1-19.

Hein, Z., Schmidt, S., Zimmer, K. P. and Naim, H. Y. (2011). The dual role of annexin II in targeting of brush border proteins and in intestinal cell polarity. *Differentiation* **81**, 243-52.

Helms, J. B. and Zurzolo, C. (2004). Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* **5**, 247-54.

Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.

Hill, W. G., An, B. and Johnson, J. P. (2002). Endogenously expressed epithelial sodium channel is present in lipid rafts in A6 cells. *J Biol Chem* **277**, 33541-4.

Huang, J., Hsia, S. H., Imamura, T., Usui, I. and Olefsky, J. M. (2004). Annexin II is a thiazolidinedione-responsive gene involved in insulin-induced glucose transporter isoform 4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* **145**, 1579-86.

Hullin, F., Raynal, P., Ragab-Thomas, J. M., Fauvel, J. and Chap, H. (1989). Effect of dexamethasone on prostaglandin synthesis and on lipocortin status in human endothelial cells. Inhibition of prostaglandin I₂ synthesis occurring without alteration of arachidonic acid liberation and of lipocortin synthesis. *J Biol Chem* **264**, 3506-13.

Igarashi, P., Vanden Heuvel, G. B., Payne, J. A. and Forbush, B., 3rd. (1995). Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am J Physiol* **269**, F405-18.

Ikebuchi, N. W. and Waisman, D. M. (1990). Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J Biol Chem* **265**, 3392-400.

Inoue, M., Digman, M. A., Cheng, M., Breusegem, S. Y., Halaihel, N., Sorribas, V., Mantulin, W. W., Gratton, E., Barry, N. P. and Levi, M. (2004). Partitioning of NaPi cotransporter in cholesterol-, sphingomyelin-, and glycosphingolipid-enriched membrane domains modulates NaPi protein diffusion, clustering, and activity. *J Biol Chem* **279**, 49160-71.

Itoh, K., Sakakibara, M., Yamasaki, S., Takeuchi, A., Arase, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Okada, M. and Saito, T. (2002). Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly. *J Immunol* **168**, 541-4.

Jacob, R., Heine, M., Eikemeyer, J., Frerker, N., Zimmer, K. P., Rescher, U., Gerke, V. and Naim, H. Y. (2004). Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* **279**, 3680-4.

Johnsson, N., Gerke, V. and Weber, K. (1990). P36, member of the CA²⁺/lipid binding proteins (annexins, calpactins, lipocortins) and its complex with P11; molecular aspects. *Prog Clin Biol Res* **349**, 123-33.

Johnsson, N., Marriott, G. and Weber, K. (1988). p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. *EMBO J* **7**, 2435-42.

Jost, M. and Gerke, V. (1996). Mapping of a regulatory important site for protein kinase C phosphorylation in the N-terminal domain of annexin II. *Biochim Biophys Acta* **1313**, 283-9.

- Jung, J., Basile, D. P. and Pratt, J. H.** (2011). Sodium reabsorption in the thick ascending limb in relation to blood pressure: a clinical perspective. *Hypertension* **57**, 873-9.
- Kaminski, H.** (2012). Die Bedeutung von Annexin A2 bei der Translokation des Wasserkanals Aquaporin 2 im Sammelrohr der Niere. *Institut für Biologie, Chemie, Pharmazie: Freie Universität Berlin*.
- Kaplan, M. R., Plotkin, M. D., Lee, W. S., Xu, Z. C., Lytton, J. and Hebert, S. C.** (1996). Apical localization of the Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int* **49**, 40-7.
- Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A. and Jentsch, T. J.** (1994). Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6943-7.
- Kim, G. H., Ecelbarger, C. A., Mitchell, C., Packer, R. K., Wade, J. B. and Knepper, M. A.** (1999). Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* **276**, F96-F103.
- Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A. and Silbernagel, S.** (2010). Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Knepper, M. A., Kim, G. H., Fernandez-Llama, P. and Ecelbarger, C. A.** (1999). Regulation of thick ascending limb transport by vasopressin. *J Am Soc Nephrol* **10**, 628-34.
- Kobayashi, K., Uchida, S., Mizutani, S., Sasaki, S. and Marumo, F.** (2001). Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* **12**, 1327-34.
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B. and Echard, A.** (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol* **16**, 1719-25.
- Kriz, W. and Bankir, L.** (1988). A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney Int* **33**, 1-7.
- Kube, E., Becker, T., Weber, K. and Gerke, V.** (1992). Protein-protein interaction studied by site-directed mutagenesis. Characterization of the annexin II-binding site on p11, a member of the S100 protein family. *J Biol Chem* **267**, 14175-82.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-9.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lambert, O., Gerke, V., Bader, M. F., Porte, F. and Brisson, A.** (1997). Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* **272**, 42-55.
- Lee, J. and Williams, P. G.** (1972). The effect of vasopressin (Pitressin) administration and dehydration on the concentration of solutes in renal fluids of rats with and without hereditary hypothalamic diabetes insipidus. *J Physiol* **220**, 729-43.
- Lewit-Bentley, A., Rety, S., Sompkova-de Oliveira Santos, J. and Gerke, V.** (2000). S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol Int* **24**, 799-802.
- Li, X., Galli, T., Leu, S., Wade, J. B., Weinman, E. J., Leung, G., Cheong, A., Louvard, D. and Donowitz, M.** (2001). Na⁺-H⁺ exchanger 3 (NHE3) is present in lipid rafts in the rabbit ileal brush border: a role for rafts in trafficking and rapid stimulation of NHE3. *J Physiol* **537**, 537-52.
- Liemann, S. and Huber, R.** (1997). Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci* **53**, 516-21.
- Lin, X., Sikkink, R. A., Rusnak, F. and Barber, D. L.** (1999). Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *J Biol Chem* **274**, 36125-31.

- Lippincott-Schwartz, J.** (2004). Dynamics of secretory membrane trafficking. *Ann N Y Acad Sci* **1038**, 115-24.
- Liu, L., Tao, J. Q. and Zimmerman, U. J.** (1997). Annexin II binds to the membrane of A549 cells in a calcium-dependent and calcium-independent manner. *Cell Signal* **9**, 299-304.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Lolait, S. J., O'Carroll, A. M., McBride, O. W., Konig, M., Morel, A. and Brownstein, M. J.** (1992). Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* **357**, 336-9.
- Luft, F. C.** (1999). [Water-electrolyte balance in clinical routine practice]. *Urologe A* **38**, W493-501.
- Lüllmann-Rauch, R.** (2009). Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Magee, A. I. and Parmryd, I.** (2003). Detergent-resistant membranes and the protein composition of lipid rafts. *Genome Biol* **4**, 234.
- Markoff, A. and Gerke, V.** (2005). Expression and functions of annexins in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F949-56.
- Matsushita, M., Tanaka, H., Mitsui, K. and Kanazawa, H.** (2011). Dual functional significance of calcineurin homologous protein 1 binding to Na(+)/H(+) exchanger isoform 1. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**, C280-8.
- Mayer, G., Poirier, S. and Seidah, N. G.** (2008). Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J Biol Chem* **283**, 31791-801.
- Mazzone, A., Tietz, P., Jefferson, J., Pagano, R. and LaRusso, N. F.** (2006). Isolation and characterization of lipid microdomains from apical and basolateral plasma membranes of rat hepatocytes. *Hepatology* **43**, 287-96.
- Meade, P., Hoover, R. S., Plata, C., Vazquez, N., Bobadilla, N. A., Gamba, G. and Hebert, S. C.** (2003). cAMP-dependent activation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F1145-54.
- Menke, M., Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C.** (2004). The molecular arrangement of membrane-bound annexin A2-S100A10 tetramer as revealed by scanning force microscopy. *Chembiochem* **5**, 1003-6.
- Merrifield, C. J., Rescher, U., Almers, W., Proust, J., Gerke, V., Sechi, A. S. and Moss, S. E.** (2001). Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Curr Biol* **11**, 1136-41.
- Morel, E. and Gruenberg, J.** (2009). Annexin A2 binding to endosomes and functions in endosomal transport are regulated by tyrosine 23 phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 1604-11.
- Morel, E., Parton, R. G. and Gruenberg, J.** (2009). Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell* **16**, 445-57.
- Moses, A. M. and Coulson, R.** (1980). Augmentation by chlorpropamide of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin-induced antidiuresis and stimulation of renal medullary adenylate cyclase and accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* **106**, 967-72.
- Mount, D. B., Baekgaard, A., Hall, A. E., Plata, C., Xu, J., Beier, D. R., Gamba, G. and Hebert, S. C.** (1999). Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization. *Am J Physiol* **276**, F347-58.
- Mount, D. B. and Gamba, G.** (2001). Renal potassium-chloride cotransporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**, 685-91.

- Murtazina, R., Kovbasnjuk, O., Donowitz, M. and Li, X.** (2006). Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity and trafficking are lipid Raft-dependent. *J Biol Chem* **281**, 17845-55.
- Mutig, K., Kahl, T., Saritas, T., Godes, M., Persson, P., Bates, J., Raffi, H., Rampoldi, L., Uchida, S., Hille, C. et al.** (2011). Activation of the bumetanide-sensitive Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner. *J Biol Chem* **286**, 30200-10.
- Mutig, K., Paliege, A., Kahl, T., Jons, T., Muller-Esterl, W. and Bachmann, S.** (2007). Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, F1166-77.
- Nielsen, S., Maunsbach, A. B., Ecelbarger, C. A. and Knepper, M. A.** (1998). Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am J Physiol* **275**, F885-93.
- Oberhauser, A. F., Balan, V., Fernandez-Badilla, C. L. and Fernandez, J. M.** (1994). RT-PCR cloning of Rab3 isoforms expressed in peritoneal mast cells. *FEBS Lett* **339**, 171-4.
- Obermuller, N., Kunchaparty, S., Ellison, D. H. and Bachmann, S.** (1996). Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J Clin Invest* **98**, 635-40.
- Okuse, K., Malik-Hall, M., Baker, M. D., Poon, W. Y., Kong, H., Chao, M. V. and Wood, J. N.** (2002). Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* **417**, 653-6.
- Oliferenko, S., Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwarzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Gunthert, U. and Huber, L. A.** (1999). Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **146**, 843-54.
- Ortiz, P. A.** (2006). cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F608-16.
- Ozgo, M., Skrzypczak, W., Drzewdzon, D., Lepczynski, A., Dratwa-Chalupnik, A., Michalek, K. and Herosimczyk, A.** (2009). Urinary excretion of low molecular weight proteins in goats during the neonatal period. *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 3**, 119-25.
- Paladino, S., Lebreton, S., Tivodar, S., Campana, V., Tempre, R. and Zurzolo, C.** (2008). Different GPI-attachment signals affect the oligomerisation of GPI-anchored proteins and their apical sorting. *J Cell Sci* **121**, 4001-7.
- Paliege, A., Roeschel, T., Neymeyer, H., Seidel, S., Kahl, T., Daigeler, A. L., Mutig, K., Mrowka, R., Ferreri, N. R., Wilson, B. S. et al.** (2012). Group VIA phospholipase A2 is a target for vasopressin signaling in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* **302**, F865-74.
- Payne, J. A. and Forbush, B., 3rd.** (1994). 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* **91**, 4544-8.
- Peterson, L. N., McKay, A. J. and Borzecki, J. S.** (1993). Endogenous prostaglandin E2 mediates inhibition of rat thick ascending limb Cl reabsorption in chronic hypercalcemia. *J Clin Invest* **91**, 2399-407.
- Plata, C., Meade, P., Hall, A., Welch, R. C., Vazquez, N., Hebert, S. C. and Gamba, G.** (2001). Alternatively spliced isoform of apical Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter gene encodes a furosemide-sensitive Na⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F574-82.
- Plata, C., Mount, D. B., Rubio, V., Hebert, S. C. and Gamba, G.** (1999). Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL II. Functional characterization and activation by cAMP. *Am J Physiol* **276**, F359-66.
- Ponce-Coria, J., San-Cristobal, P., Kahle, K. T., Vazquez, N., Pacheco-Alvarez, D., de Los Heros, P., Juarez, P., Munoz, E., Michel, G., Bobadilla, N. A. et al.** (2008). Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8458-63.

- Poon, W. Y., Malik-Hall, M., Wood, J. N. and Okuse, K.** (2004). Identification of binding domains in the sodium channel Na(V)1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11. *FEBS Lett* **558**, 114-8.
- Pressler, C. A., Heinzinger, J., Jeck, N., Waldegger, P., Pechmann, U., Reinalter, S., Konrad, M., Beetz, R., Seyberth, H. W. and Waldegger, S.** (2006). Late-onset manifestation of antenatal Bartter syndrome as a result of residual function of the mutated renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *J Am Soc Nephrol* **17**, 2136-42.
- Rafiqi, F. H., Zuber, A. M., Glover, M., Richardson, C., Fleming, S., Jovanovic, S., Jovanovic, A., O'Shaughnessy, K. M. and Alessi, D. R.** (2010). Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO Mol Med* **2**, 63-75.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. and Deutzmann, R.** (2012). Biochemie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Raynal, P. and Pollard, H. B.** (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1197**, 63-93.
- Rescher, U. and Gerke, V.** (2004). Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* **117**, 2631-9.
- Rescher, U. and Gerke, V.** (2008). S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Arch* **455**, 575-82.
- Rescher, U., Ruhe, D., Ludwig, C., Zobiack, N. and Gerke, V.** (2004). Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* **117**, 3473-80.
- Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F. and Lewit-Bentley, A.** (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol* **6**, 89-95.
- Richardson, C., Sakamoto, K., de los Heros, P., Deak, M., Campbell, D. G., Prescott, A. R. and Alessi, D. R.** (2011). Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* **124**, 789-800.
- Rinehart, J., Kahle, K. T., de Los Heros, P., Vazquez, N., Meade, P., Wilson, F. H., Hebert, S. C., Gimenez, I., Gamba, G. and Lifton, R. P.** (2005). WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16777-82.
- Rose, B. D.** (1994). Regulation of the effective circulating volume. In *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*, (ed. M.-H. (ed.)), pp. 247:471. New York.
- Rosengarth, A. and Luecke, H.** (2004). Annexin A2: Does it induce membrane aggregation by a new multimeric state of the protein? *Annexins* **1**, 129-136.
- Ruppelt, A., Mosenden, R., Gronholm, M., Aandahl, E. M., Tobin, D., Carlson, C. R., Abrahamsen, H., Herberg, F. W., Carpen, O. and Tasken, K.** (2007). Inhibition of T cell activation by cyclic adenosine 5'-monophosphate requires lipid raft targeting of protein kinase A type I by the A-kinase anchoring protein ezrin. *J Immunol* **179**, 5159-68.
- Russell, J. M.** (2000). Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* **80**, 211-76.
- Santamaria, A., Castellanos, E., Gomez, V., Bedit, P., Renau-Piqueras, J., Morote, J., Reventos, J., Thomson, T. M. and Paciucci, R.** (2005). PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts. *Mol Cell Biol* **25**, 1900-11.
- Scheinman, S. J., Guay-Woodford, L. M., Thakker, R. V. and Warnock, D. G.** (1999). Genetic disorders of renal electrolyte transport. *N Engl J Med* **340**, 1177-87.
- Schiebler, T. H.** (2005). Anatomie. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Schmale, H. and Richter, D.** (1984). Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. *Nature* **308**, 705-9.

- Schmitt, R., Klussmann, E., Kahl, T., Ellison, D. H. and Bachmann, S.** (2003). Renal expression of sodium transporters and aquaporin-2 in hypothyroid rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F1097-104.
- Schnermann, J. and Levine, D. Z.** (2003). Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol* **65**, 501-29.
- Schnermann, J., Ploth, D. W. and Hermle, M.** (1976). Activation of tubulo-glomerular feedback by chloride transport. *Pflugers Arch* **362**, 229-40.
- Schuck, S. and Simons, K.** (2006). Controversy fuels trafficking of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* **172**, 963-5.
- Shlyonsky, V. G., Mies, F. and Sariban-Sohraby, S.** (2003). Epithelial sodium channel activity in detergent-resistant membrane microdomains. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F182-8.
- Simon, D. B. and Lifton, R. P.** (1996). The molecular basis of inherited hypokalemic alkalosis: Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am J Physiol* **271**, F961-6.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-72.
- Simons, K. and Toomre, D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-9.
- Simons, K. and Vaz, W. L.** (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 269-95.
- Singh, T. K., Abonyo, B., Narasaraju, T. A. and Liu, L.** (2004). Reorganization of cytoskeleton during surfactant secretion in lung type II cells: a role of annexin II. *Cell Signal* **16**, 63-70.
- Skou, J. C.** (2004). The identification of the sodium pump. *Biosci Rep* **24**, 436-51.
- Smith, P. D. and Moss, S. E.** (1994). Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Genet* **10**, 241-6.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Sobotta, J., Welsch, U. and Sobotta, W.** (2009). Lehrbuch Histologie. München [u.a.]: Elsevier.
- Sopkova-de Oliveira Santos, J., Oling, F. K., Rety, S., Brisson, A., Smith, J. C. and Lewit-Bentley, A.** (2000). S100 protein-annexin interactions: a model of the (Anx2-p11)(2) heterotetramer complex. *Biochim Biophys Acta* **1498**, 181-91.
- Starremans, P. G., Kersten, F. F., Knoers, N. V., van den Heuvel, L. P. and Bindels, R. J.** (2003). Mutations in the human Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) identified in Bartter syndrome type I consistently result in nonfunctional transporters. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1419-26.
- Swairjo, M. A., Concha, N. O., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. and Seaton, B. A.** (1995). Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat Struct Biol* **2**, 968-74.
- Swairjo, M. A. and Seaton, B. A.** (1994). Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**, 193-213.
- Tamma, G., Procino, G., Mola, M. G., Svelto, M. and Valenti, G.** (2008). Functional involvement of Annexin-2 in cAMP induced AQP2 trafficking. *Pflugers Arch* **456**, 729-36.
- Taveau, J. C., Boisset, N., Lamy, J., Lambert, O. and Lamy, J. N.** (1997). Three-dimensional reconstruction of *Limulus polyphemus* hemocyanin from cryoelectron microscopy. *J Mol Biol* **266**, 1002-15.
- Thurau, K. and Schnermann, J.** (1965). [the Sodium Concentration in the Macula Densa Cells as a Regulating Factor for Glomerular Filtration (Micropuncture Experiments)]. *Klin Wochenschr* **43**, 410-3.

- Traebert, M., Kohler, K., Lambert, G., Biber, J., Forster, I. and Murer, H.** (2001). Investigating the surface expression of the renal type IIa Na⁺/Pi-cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol* **180**, 83-90.
- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W. J. and Goodman, H. M.** (1977). Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* **196**, 1313-9.
- Urbanska, A., Sadowski, L., Kalaidzidis, Y. and Miaczynska, M.** (2011). Biochemical characterization of APPL endosomes: the role of annexin A2 in APPL membrane recruitment. *Traffic* **12**, 1227-41.
- Vaaraniemi, J., Huotari, V., Lehto, V. P. and Eskelinen, S.** (1994). The effects of PMA and TFP and alterations in intracellular pH and calcium concentration on the membrane associations of phospholipid-binding proteins fodrin, protein kinase C and annexin II in cultured MDCK cells. *Biochim Biophys Acta* **1189**, 21-30.
- Valapala, M. and Vishwanatha, J. K.** (2011). Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2. *J Biol Chem* **286**, 30911-25.
- Valentijn, J. A., Fyfe, G. K. and Canessa, C. M.** (1998). Biosynthesis and processing of epithelial sodium channels in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **273**, 30344-51.
- van de Graaf, S. F., Hoenderop, J. G., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B. and Bindels, R. J.** (2003). Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J* **22**, 1478-87.
- Waisman, D. M.** (1995). Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* **149-150**, 301-22.
- Wang, D., An, S. J., Wang, W. H., McGiff, J. C. and Ferreri, N. R.** (2001). CaR-mediated COX-2 expression in primary cultured mTAL cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F658-64.
- Wang, W. H., White, S., Geibel, J. and Giebisch, G.** (1990). A potassium channel in the apical membrane of rabbit thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* **258**, F244-53.
- Welker, P., Bohlick, A., Mutig, K., Salanova, M., Kahl, T., Schluter, H., Blottner, D., Ponce-Coria, J., Gamba, G. and Bachmann, S.** (2008). Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F789-802.
- Welker, P., Geist, B., Fruhauf, J. H., Salanova, M., Groneberg, D. A., Krause, E. and Bachmann, S.** (2007). Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na⁺-K⁺-ATPase, thick ascending limb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R1328-37.
- Wilson, B. S., Steinberg, S. L., Liederman, K., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., Zhang, J., Samelson, L. E., Yang, L. H., Kotula, P. G. and Oliver, J. M.** (2004). Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol Biol Cell* **15**, 2580-92.
- Yang, T., Park, J. M., Arend, L., Huang, Y., Topaloglu, R., Pasumarthy, A., Praetorius, H., Spring, K., Briggs, J. P. and Schnermann, J.** (2000). Low chloride stimulation of prostaglandin E2 release and cyclooxygenase-2 expression in a mouse macula densa cell line. *J Biol Chem* **275**, 37922-9.
- Yu, M. J., Miller, R. L., Uawithya, P., Rinschen, M. M., Khositseth, S., Braucht, D. W., Chou, C. L., Pisitkun, T., Nelson, R. D. and Knepper, M. A.** (2009). Systems-level analysis of cell-specific AQP2 gene expression in renal collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2441-6.
- Yu, M. J., Pisitkun, T., Wang, G., Aranda, J. F., Gonzales, P. A., Tchapyjnikov, D., Shen, R. F., Alonso, M. A. and Knepper, M. A.** (2008). Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C661-78.

Zaarour, N., Demaretz, S., Defontaine, N., Mordasini, D. and Laghmani, K. (2009). A highly conserved motif at the COOH terminus dictates endoplasmic reticulum exit and cell surface expression of NKCC2. *J Biol Chem* **284**, 21752-64.

Zibouche, M., Vincent, M., Illien, F., Gallay, J. and Ayala-Sanmartin, J. (2008). The N-terminal domain of annexin 2 serves as a secondary binding site during membrane bridging. *J Biol Chem* **283**, 22121-7.

Zobiack, N., Gerke, V. and Rescher, U. (2001). Complex formation and submembranous localization of annexin 2 and S100A10 in live HepG2 cells. *FEBS Lett* **500**, 137-40.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Säugernephrons.	2
Abbildung 1.2: Schematische Struktur von NKCC2.	6
Abbildung 1.3: Darstellung der Phosphorylierungsstellen im N-Terminus von NKCC2.....	7
Abbildung 1.4: Kristallstruktur von ANXA2 mit gebundenen Calciumionen.....	12
Abbildung 1.5: Modell der calciumunabhängigen und calciumabhängigen Interaktion von ANXA2 mit Membranen.	13
Abbildung 1.6: Modell des ANXA2-P11-Tetramers sowie dessen Bindung an Membranen.	15
Abbildung 1.7: Expression von ANXA2 in der Niere.	17
Abbildung 3.1: Immunhistochemische Lokalisation von NKCC2 im TAL der Rattenniere... ..	48
Abbildung 3.2: Lokalisation von NKCC2 in Flotillin-1- und THP-positiven Membranmikrodomänen.	49
Abbildung 3.3: Diskontinuierlicher <i>Floating Assay</i> zur Anreicherung von <i>Lipid Rafts</i>	50
Abbildung 3.4: Präparation der einzelnen Nierensegmente.....	51
Abbildung 3.5: Immunpräzipitation von NKCC2 aus medullären Nierenhomogenaten.	52
Abbildung 3.6: SDS-PAGE und Silberfärbung nach NKCC2-Immunpräzipitation.....	53
Abbildung 3.7: Massenspektrometrische Analyse einzelner Proteinbanden des NKCC2- Immunpräzipitats aus <i>Lipid Raft</i> -Fraktionen der äußeren Medulla von Rattennieren.	54
Abbildung 3.8: Kolokalisation von ANXA2 und NKCC2 im TAL und der MD.....	55
Abbildung 3.9: Kolokalisation von P11 und NKCC2 im TAL und der MD.	56
Abbildung 3.10: Immunpräzipitationen von endogenem ANXA2 und NKCC2.....	57
Abbildung 3.11: Lokalisation von ANXA2 und P11 in NKCC2-positiven Membranmikrodomänen.	58
Abbildung 3.12: Akkumulation von ANXA2 und P11 im <i>Floating Assay</i> in den NKCC2- positiven Fraktionen geringer Dichte.	59
Abbildung 3.13: Ultrastruktur und Immunogold-Markierung der <i>Lipid Raft</i> -Anreicherung..	59
Abbildung 3.14: NKCC2-Immunpräzipitation aus der isolierten <i>Lipid Raft</i> -Fraktion.	60
Abbildung 3.15: <i>Pulldown Assay</i> von rekombinanten, phosphomimetischen bzw. nicht- phosphomimetischen Mutanten des N-Terminus von NKCC2.....	62
Abbildung 3.16: <i>Peptid Spot Arrays</i> mit gespotteten N-Termini von NKCC2 und ANXA2- /P11-Protein.	64

Abbildung 3.17: Translokation von ANXA2 im TAL von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten.....	66
Abbildung 3.18: Translokation von P11 im TAL von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten.	66
Abbildung 3.19: Verteilung von ANXA2, P11 und NKCC2 in den Zellfraktionen der äußeren Medulla von Brattleboro Ratten nach Behandlung mit dDAVP.....	68
Abbildung 3.20: Lokalisation von ANXA2 und pNKCC2 im TAL von Brattleboro Ratten nach dDAVP-Behandlung.....	70
Abbildung 3.21: Immunpräzipitationen von endogenem ANXA2 und NKCC2 aus der äußeren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten.....	71
Abbildung 3.22: Abundanz von ANXA2 und NKCC2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen unter dDAVP-Behandlung.....	72
Abbildung 3.23: Interaktion von ANXA2 und NKCC2 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen unter Behandlung mit dDAVP.....	73
Abbildung 3.24: mRNA-Expression von NKCC2 und ANXA2 in der äußeren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten.....	74
Abbildung 3.25: Translokation von ANXA2, P11 und NKCC2 unter Chloridmangel.....	76
Abbildung 3.26: Abundanz von NKCC2, ANXA2 und P11 unter Chloridmangel.....	78
Abbildung 3.27: mRNA-Expression von ANXA2 in raTAL-Zellen nach <i>ANXA2-knockdown</i>	79
Abbildung 3.28: Proteinexpression von ANXA2 und NKCC2 in raTAL-Zellen nach <i>ANXA2-knockdown</i>	80
Abbildung 3.29: Translokation von NKCC2 in raTAL-Zellen nach <i>knockdown</i> von ANXA2 und Chloridmangel.....	81
Abbildung 3.30: Translokation von ANXA2 und NKCC2 in MMDD1-Zellen nach Stimulation mit PMA.....	83
Abbildung 3.31: Lokalisation von ANXA2 und NKCC2 in MMDD1-Zellen nach PMA-Stimulation und Hemmung der Endozytose.....	84
Abbildung 4.1: Modell der funktionellen Interaktion zwischen NKCC2 und ANXA2.....	96

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der SDS-PAGE.....	27
Tabelle 2.2: Protokoll der Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988).....	28
Tabelle 2.3: Liste der bei der qPCR verwendeten Primer.....	34
Tabelle 2.4: Übersicht über verwendete Klonierungs- und mutagene Primer.	36
Tabelle 2.5: Liste eingesetzter Primer.....	37
Tabelle 2.6: Genetische Konstrukte mit verwendeten Plasmiden.....	38
Tabelle 2.7: Übersicht eingesetzter Zelllinien.....	39
Tabelle 2.8: Auflistung verwendeter Primärantikörper für Immunblotting und Immunhistochemie.	42
Tabelle 2.9: Übersicht eingesetzter Sekundärantikörper.....	42
Tabelle 2.10: Liste eingesetzter Enzyme sowie zugehöriger Puffer und Agenzien.....	43
Tabelle 2.11: Auflistung der eingesetzten Kits.	43
Tabelle 2.12: Übersicht verwendeter Feinchemikalien und Reagenzien.	43
Tabelle 2.13: Liste verwendeter Medien und Reagenzien in der Zellkultur.....	45
Tabelle 2.14: Liste aller Verbrauchsmaterialien.	45
Tabelle 2.15: Liste verwendeter Geräte.	46
Tabelle 2.16: Übersicht benutzter Software.	47

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen benutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Zeichnungen oder Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt worden oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen.

Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

Berlin, den 19.09.2013