

Institut für Biochemie und Biologie

Abteilung Zellbiologie

**Bedeutung der Interaktion von Calcineurin und SORLA für die
Regulation des Na⁺,K⁺,2Cl⁻-Kotransporters (NKCC2) in der Niere**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam von

Aljona Borschewski



Oktober 2015

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-89205
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-89205>

Diese Arbeit wurde von Januar 2011 bis August 2014 unter der Leitung von Prof. Dr. Sebastian Bachmann am Institut für Vegetative Anatomie der Charité Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralph Gräf, Universität Potsdam
2. Gutachter: Prof. Dr. Otto Baumann, Universität Potsdam
3. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Bachmann, Charité Universitätsmedizin Berlin

Disputation am 27.01.2016

Selbständigkeitserklärung

Ich, Aljona Borschewski, versichere hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form an keiner anderen Hochschule eingereicht worden.

Berlin, den 13.10.2015

Publikation

Diese Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Borschewski, A., Himmerkus, N., Boldt, C., Blankenstein, K. I., McCormick, J. A., Lazelle, R., Willnow, T. E., Jankowski, V., Plain, A., Bleich, M., Ellison, D. H., Bachmann, S., Mutig, K. 2015. Calcineurin and Sorting-Related Receptor with A-Type Repeats Interact to Regulate the Renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter. *J Am Soc Nephrol*. pii: ASN.2014070728 [Epub ahead of print].

Die Verwendung von publizierten Bildern in dieser Arbeit wurde durch das *Journal of the American Society of Nephrology* genehmigt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Nephron – Funktionseinheit der Niere	1
1.2 Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2	4
1.2.1 Verteilung und Struktur von NKCC2	4
1.2.2 Funktion von NKCC2	5
1.2.3 Regulation von NKCC2	8
1.3 Die Kinasen SPAK und OSR1	9
1.3.1 Struktur und Verteilung der Kinasen SPAK und OSR1	9
1.4 SORLA	12
1.4.1 Struktur und Funktion von SORLA	13
1.4.2 Regulation von SORLA	14
1.5 Calcineurin	15
1.5.1 Struktur und Funktion der β -Isoform	15
1.5.2 Regulation von Calcineurin	17
1.5.3 Cyclosporin, der spezifische Inhibitor von Calcineurin	18
1.6 Ziel der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Material	20
2.1.1 Tiermodelle	20
2.1.2 Zellmodelle	21
2.1.3 Antikörper	21
2.1.4 Plasmide	23
2.1.5 Chemikalien	24
2.1.6 Geräte und Software	27
2.2 Methoden	29
2.2.1 Proteinbiochemische Methoden	29

Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Immunfluoreszenz und Mikroskopie	32
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.4	MALDI-TOF Massenspektrometrie	39
2.2.5	Versuche mit Cyclosporin A	40
2.2.6	Statistik	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	SORLA	41
3.1.1	Lokalisation und Expression von SORLA in der Niere	41
3.1.2	Auswirkung der SORLA-Defizienz auf die NKCC2-Phosphorylierung und die Gesamtproteinmenge	43
3.1.3	Auswirkung der SORLA-Defizienz auf die Expression und zelluläre Verteilung der Kinasen SPAK und OSR1	46
3.2	Calcineurin Aβ-Isoform	53
3.2.1	Verifikation der Calcineurin A β -Antikörper	53
3.2.2	Lokalisation und Verteilung von CnA β in der WT-Mausniere	54
3.2.3	Interaktion zwischen CnA β und NKCC2	55
3.2.4	Effekte der Calcineurin-Inhibition auf NKCC2	57
3.2.5	Auswirkung der SORLA-Deletion auf die CnA β -Expression und -Verteilung im TAL	59
3.2.6	Auswirkung der SORLA-Überexpression auf die CnA β -Expression und -Verteilung in HEK-Zellen	62
3.2.7	Interaktion zwischen SORLA und CnA β	63
3.2.8	Funktioneller Nachweis der Interaktion zwischen CnA β und SORLA	67
4	DISKUSSION	68
4.1	SORLA im distalen Nephron	68
4.1.1	Lokalisation von SORLA	68
4.1.2	Auswirkungen von SORLA-Defizienz auf NKCC2 und beteiligte Kinasen	69
4.2	Calcineurin Aβ im distalen Nephron	70
4.2.1	Inhibierung von Calcineurin durch Cyclosporin A	70
4.2.2	Lokalisation von CnA β	71
4.2.3	Interaktion zwischen CnA β und NKCC2	72
4.3	Zusammenspiel von SORLA und CnAβ im distalen Nephron	73
4.4	Schlussfolgerung	75

Inhaltsverzeichnis

5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	76
6	LITERATURVERZEICHNIS	79

Zusammenfassung

Der Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Kotransporter (NKCC2) wird im distalen Nephron der Niere exprimiert. Seine Verteilung umfasst die Epithelien der medullären und kortikalen Teile der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (*Thick ascending limb*, TAL) und die Macula densa. Resorptiver NaCl-Transport über den NKCC2 dient dem renalen Konzentrierungsmechanismus und reguliert systemisch auch Volumenstatus und Blutdruck. Die Aktivität des NKCC2 ist mit der Phosphorylierung seiner N-terminalen Aminosäurereste Serin 126 und Threonin 96/101 verbunden. Vermittelt wird diese durch die homologen Kinasen SPAK (*SPS-related proline/alanine-rich kinase*) und OSR1 (*Oxidative stress responsive kinase 1*), die hierzu ihrerseits phosphoryliert werden müssen. Der regulatorische Kontext dieser Kinasen ist mittlerweile gut charakterisiert. Über Mechanismen und Produkte, die den NKCC2 deaktivieren, war hingegen weniger bekannt. Ziel der Arbeit war daher zu untersuchen, welche Wege zur Deaktivierung des Transporters führen. Der intrazelluläre Sortierungsrezeptor SORLA (*Sorting-protein-related receptor with A-type repeats*) war zuvor in seiner Bedeutung für das Nephron charakterisiert worden. Ein SORLA-defizientes Mausmodell weist unter anderem eine stark verringerte NKCC2-Phosphorylierung auf. Unter osmotischem Stress können SORLA-defiziente Mäuse ihren Urin weniger effizient konzentrieren. Meine Resultate zeigen mit hochauflösender Technik, dass SORLA apikal im TAL lokalisiert ist und dass mit NKCC2 eine anteilige Kolo-kalisation besteht. Unter SORLA Defizienz war die für die NKCC2 Aktivität maßgebliche SPAK/OSR1-Phosphorylierung gegenüber dem Wildtyp nicht verändert. Jedoch war die ebenfalls im TAL exprimierte Phosphatase Calcineurin A β (CnA β) per Western blot um das zweifache gesteigert. Parallel hierzu wurde immunhistochemisch die Kolo-kalisation von verstärktem CnA β -Signal und NKCC2 bestätigt. Beide Befunde geben zusammen den Hinweis auf einen Bezug zwischen der reduzierten NKCC2-Phosphorylierung und der gesteigerten Präsenz von CnA β bei SORLA Defizienz. Die parallel induzierte Überexpression von SORLA in HEK-Zellen zeigte entsprechend eine Halbierung der CnA β Proteinmenge. SORLA steuert demzufolge sowohl die Abundanz als auch die zelluläre Verteilung der Phosphatase. Weiterhin ließ sich die Interaktion zwischen CnA β und SORLA (intrazelluläre Domäne) mittels Co-Immunpräzipitation bzw. *GST-pulldown assay* nachweisen. Auch die Interaktion zwischen CnA β und NKCC2 wurde auf diesem Weg belegt. Da allerdings

weder SORLA noch NKCC2 ein spezifisches Bindungsmuster für CnA β aufweisen, sind vermutlich intermediäre Adapterproteine bei ihrer Bindung involviert. Die pharmakologische Inhibition von CnA β mittels Cyclosporin A (CsA; 1 h) führte bei SORLA Defizienz zur Normalisierung der NKCC2-Phosphorylierung. Entsprechend führte *in vitro* die Gabe von CsA bei TAL Zellen zu einer 7-fach gesteigerten NKCC2-Phosphorylierung. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Phosphatase CnA β über ihre Assoziation mit NKCC2 diesen im adluminale Zellkompartiment deaktivieren kann. Gesteuert wird dieser Vorgang durch die Eigenschaft von SORLA, CnA β apikal zu reduzieren und damit die adluminale Phosphorylierung und Aktivität von NKCC2 zu unterstützen. Da Calcineurin-Inhibitoren derzeit die Grundlage der immunsupprimierenden Therapie darstellen, haben die Ergebnisse eine klinische Relevanz. Angesichts der Co-Expression von SORLA und CnA β in verschiedenen anderen Organen können die Ergebnisse auch über die Niere hinaus Bedeutung erlangen.

Summary

The Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter (NKCC2) of the thick ascending limb (TAL) is critical for renal salt handling. Activity of the cotransporter is facilitated by its phosphorylation at conserved N-terminal threonine and serine residues provided by homologous SPAK (SPS-related proline/alanine-rich kinase) and OSR1 (oxidative stress responsive kinase 1) kinases. The identification of factors which modulate the phosphorylation and hence, the activity of NKCC2 has received recent interest. SORLA (sorting-protein-related receptor with A-type repeats) is co-expressed with NKCC2 in TAL epithelium. Genetically engineered mice lacking SORLA show near-complete absence of NKCC2 phosphorylation at the SPAK/OSR1-dependent phosphoacceptors, indicating that SORLA acts as a mediator between these reaction partners, possibly by a cellular trafficking step involving additional molecules. The present study addresses molecular pathways modulating NKCC2 activity by phosphorylation or dephosphorylation reactions with a special focus on SORLA. Comparative evaluation of SORLA-deficient and wild-type mouse kidneys revealed similar levels of phosphorylated, catalytically active SPAK and OSR1 kinases, whereas abundance of the phosphatase calcineurin A β (CnA β) was increased by approximately two-fold in the renal medulla of SORLA-deficient mice likely reflecting changes in TAL. In line with this, confocal microscopy revealed accumulation of CnA β in the apical compartment of TAL in SORLA-deficient kidneys. In contrast, overexpression of SORLA in HEK cells resulted in approximately two-fold decreased CnA β levels suggesting that SORLA modulates both the cellular abundance and distribution of the phosphatase. This data was further corroborated by co-immunoprecipitation and GST pull down assays which showed an interaction between the cytoplasmic tail of SORLA and CnA β . Acute administration of the calcineurin inhibitor, cyclosporin A (CsA), for 1 h rapidly normalized NKCC2 phosphorylation in SORLA-deficient mice which demonstrates that the decrease in phospho-NKCC2 was functionally related with CnA β . In sum, our data elucidate the role of calcineurin in the regulation of NKCC2 and establish SORLA as an endogenous regulator of the phosphatase.

1 Einleitung

1.1 Das Nephron – Funktionseinheit der Niere

Das Nephron ist die strukturelle und funktionelle Einheit der Niere. Jede menschliche Niere enthält ca. eine Million Nephrone, Rattennieren enthalten bis 35.000. Ein Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen und dem anschließenden Tubulusapparat, welcher im Sammelrohr mündet (Abb. 1). Das Nierenkörperchen ist ein kugeliges Gebilde, das 200-300 µm im Durchmesser beträgt. In jedes Nierenkörperchen tritt ein zuführendes arterielles Gefäß, die afferente Arteriole, ein. Dieses spaltet sich am Gefäßpol in ein Knäuel aus Kapillarschlingen auf und vereinigt sich wieder zu einem abführenden Gefäß, die efferente Arteriole. Kapillaren werden von einem glattmuskulären Zellverband, den Mesangiumzellen, gestützt. Nach außen sind sie vom viszeralen Epithel der Bowman-Kapsel überzogen. Die Zellen dieses Epithels werden als Podozyten bezeichnet. Zwischen den Podozyten und den Kapillaren befindet sich die glomeruläre Basalmembran. Das Kapillarknäuel mit der Podozytenbedeckung wird als Glomerulus bezeichnet. Am Gefäßpol geht das viszerale Epithel in das parietale Epithel über, welches am Harnpol wieder in das Tubulusepithel übergeht. Zwischen beiden Epithelien befindet sich der Kapselraum, in den der Primärharn filtriert wird. Pro Tag werden ca. 180 Liter Primärharn gebildet, die aus dem Kapselraum in das Tubulussystem gelangen. Der Nierentubulus ist ein dünnes Kanälchen, dessen Wand von einem einschichtigen Epithel ausgekleidet wird. Der Tubulus ist aus den nacheinander folgenden Segmenten aufgebaut: Proximaler Tubulus mit gewundenem und geradem Teil, Intermediärtubulus, bestehend aus dünner ab- und gegebenenfalls aufsteigender Henle'scher Schleife, dicke aufsteigende Henle'sche Schleife mit Macula densa, distaler gewundener Tubulus und Verbindungstubulus. Für alle Tubulusabschnitte sind standardisierte Abkürzungen eingeführt (Abb. 1). Der Verbindungstubulus stellt die Kommunikation des Nephrons mit dem Sammelrohrsystem her. In jedes Sammelrohr münden bis zu 11 Nephrone. Die Sammelrohre vereinigen sich in der Innenzone des Marks und münden im Nierenbecken (Übersicht in Benninghoff und Drenckhahn, 2003).

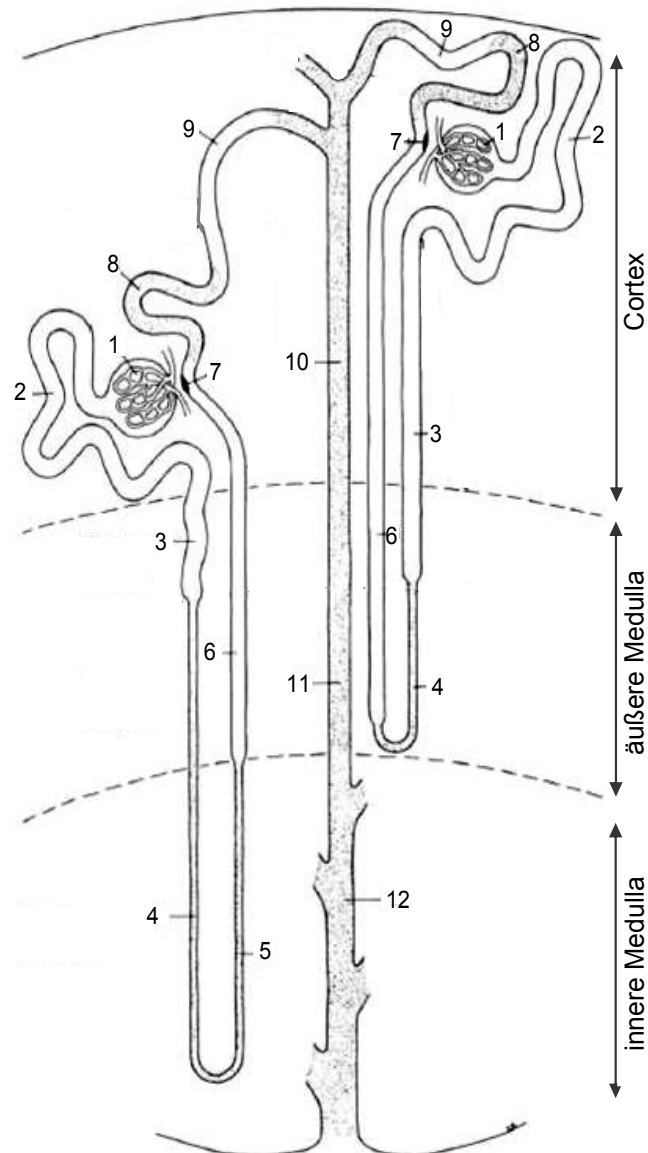


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Nephrone und des Sammelrohrsystems. Aufgrund der unterschiedlichen Längen der Henle'schen Schleifen werden zwei Typen von Nephronen unterschieden: Nephrone mit langen und mit kurzen Schleifen. Kurze Schleifen ragen nur bis in die äußere Medulla, lange Schleifen ziehen sich bis in die innere Medulla. 1: Nierenkörperchen; 2 gewundener proximaler Tubulus (PCT); 3: gerader proximaler Tubulus (PST); 4 und 5: Intermediärtubulus mit dünner absteigender Henle'scher Schleife (DTL) (4) und dünner aufsteigender Henle'scher Schleife (ATL) (5); 6: dicke aufsteigende Henle'sche Schleife (TAL); 7: Macula densa (MD); 8: distaler gewundener Tubulus (DCT); 9: Verbindungstubulus (CNT); 10: Kortikales Sammelrohr (CCD); 11: äußermedulläres Sammelrohr (OMCD); 12: innermedulläres Sammelrohr (IMCD). Quelle: *Kriz and Bankir, (1988)*.

Die Aufgabe des Tubulussystems besteht in der Umwandlung des Primärharns in den Endharn. Die Urinbildung ist ein zusammengesetzter Prozess aus glomerulärer Filtration, Reabsorption und Sekretion. Entlang der Tubulussegmente werden dem Primärharn die für den Organismus wertvollen Bestandteile wie Zucker, Elektrolyte und Aminosäuren durch Resorption entzogen und dem Blutkreislauf zurückgeführt. Genauso wird der Großteil des filtrierten Wassers (99%) resorbiert. Es können aber auch toxische Substanzen wie Harnstoff oder Xenobiotika aus dem Blut in die Tubulusflüssigkeit sezerniert werden. Die Tubulussegmente unterscheiden sich in den Transporteigenschaften. Besondere Bedeutung kommt dem Natriumionen-Transport zu: 80% der filtrierten gelösten Substanzen sind Natrium- und Chloridionen. Im Proximalen Tubulus wird der Großteil (65-70%) des filtrierten Natriums aufgenommen. Bewerkstelligt wird das durch eine Reihe Natrium-gekoppelter Transportprozesse an der luminalen Zellmembran der proximalen Tubuluszellen. Möglich werden die Transportprozesse durch die basolateral liegende $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, die einen elektrochemischen Gradienten für Natriumionen aus dem Tubuluslumen in die Zelle erzeugt. Sie pumpt Natriumionen im Austausch gegen Kaliumionen aus der Zelle und hält damit den Gradienten aufrecht. Die so akkumulierten Kaliumionen in der Zelle verlassen die Zelle über Kaliumkanäle und erzeugen damit das intrazellulär negative Zellmembranpotenzial. Ein weiterer wichtiger Tubulusabschnitt für die Natrium-Rückresorption ist der TAL. Dort werden 20% des filtrierten NaCl resorbiert. Entscheidend dabei ist der Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2 (NKCC2), detailliert beschrieben im Abschnitt 1.2. Im spät distalen Nephron (DCT und CNT) sowie im Sammelrohr erfolgt schließlich die Feineinstellung der Urinzusammensetzung. Das restliche Natrium wird im DCT durch den Natrium-Chlorid-Kotransporter, im CNT und CD durch den ENaC (*Epithelial Natrium channel*) aufgenommen. Der Mensch scheidet ein bis zwei Liter Endharn pro Tag über die ableitenden Harnwege aus (Übersicht in Schmidt et al., 2010).

1.2 Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2

Der Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2 (NKCC2) im TAL ist essentiell für die Salz- und Wasserregulation der Niere (Ares et al., 2011). Der NKCC2 vermittelt hier vorrangig die transepitheliale Reabsorption von Kochsalz. Auch der parazelluläre Transport von Natrium-, Magnesium- und Kalziumionen ist an die NKCC2-Aktivität gekoppelt (Hebert and Andreoli, 1986). Die Natriumchloridresorption über den NKCC2 bewirkt mit dem sog. Einzeleffekt (engl. *Single effect*) die Schaffung eines hyperosmolaren Interstitiums im Nierenmark. Durch fehlende Wasserdurchlässigkeit des TAL wird gleichzeitig eine Harnverdünnung erreicht, die Grundlage für die interstitielle Wasseraufnahme durch das Sammelrohrepithel ist (Übersicht in Klinke et al., 2010; Briggs et al. 2001). Durch die Eigenschaft Salz zu resorbieren, ist der NKCC2 weiterhin an der Volumen- und Blutdruckregulation beteiligt (Jung et al., 2011). Außerdem ist der Kotransporter pharmakologisch ein wichtiger Angriffspunkt für Schleifendiuretika (z.B. Furosemid und Bumetanid), die durch seine Hemmung effizient den Körper entwässern (Gamba, 2005).

1.2.1 Verteilung und Struktur von NKCC2

Der NKCC2 gehört zur Superfamilie der elektroneutralen, Kationen-gekoppelten Chlorid-Kotransporter und wird vom Gen *Slc12a1* kodiert (Russell, 2000). Das humane Protein besteht aus 1099 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 160 kDa (Gamba, 1994). Der NKCC2 kommt nur in der Niere vor. Dort befindet er sich ausschließlich im Epithel des medullären TAL (mTAL) und kortikalen TAL (cTAL) sowie in der Macula densa (Gamba, 1994) (Abb. 2A). Zellulär ist er sowohl in der apikalen Plasmamembran als auch in subapikalen Vesikeln lokalisiert (Nielsen et al., 1998; Gimenez and Forbush, 2003). Innerhalb der Plasmamembran ist der Kotransporter in cholesterinreichen Membranmikrodomänen (*Lipid rafts*) lokalisiert (Welker et al., 2008). Die Grundstruktur des Kotransporters umfasst eine zytoplasmatische N-terminale Domäne, 12 Transmembrandomänen und eine zytoplasmatische C-terminale Domäne (Abb. 2B). Auf der N-terminalen Domäne befinden sich die meisten der bisher bekannten Phosphorylierungsstellen, die zwischen den Spezies Mensch, Ratte und Maus konserviert und für die Regulation von NKCC2 von Bedeutung sind (Abschnitt 1.2.3) (Ares et al., 2011). Zwischen den Transmembrandomänen 7 und 8 befinden sich zwei N-Glykosylierungsstellen, die in das *Processing* (Proteinreifung) und in das

Trafficking zur Plasmamembran involviert sind (Muth and Caplan, 2003; Ares et al., 2011). Die C-terminale Domäne ist ebenfalls in die Proteinreifung 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).

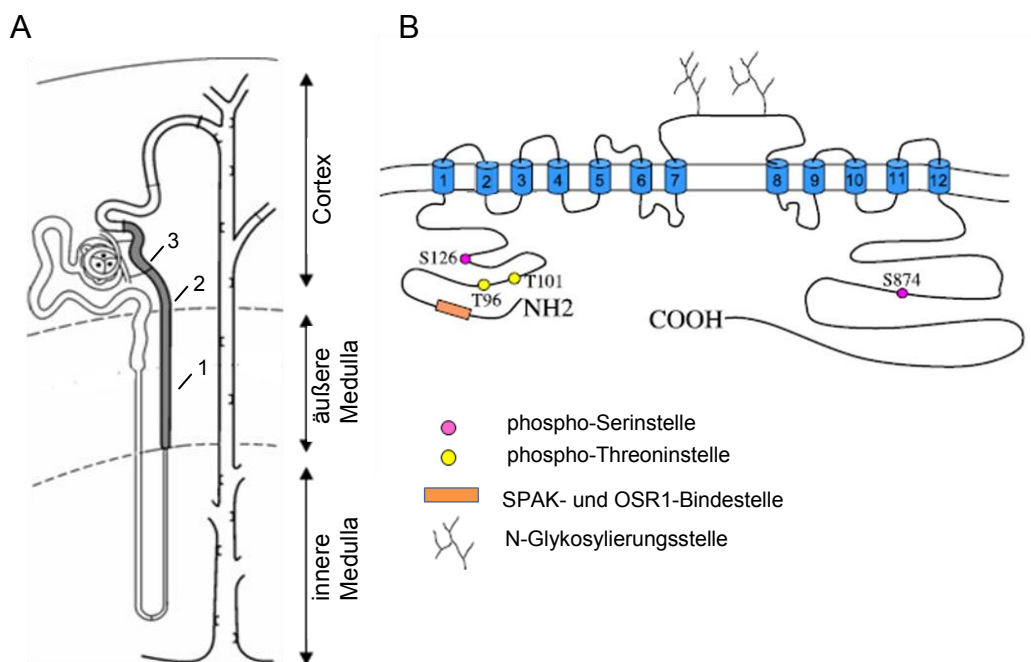


Abbildung 2: Lokalisation und Struktur des NKCC2-Kotransporters. A: Der NKCC2 ist im Nephron im medullären TAL (mTAL) (1), im kortikalen TAL (cTAL) (2) und in der Macula densa (3) lokalisiert. B: Der NKCC2 besteht aus einer zytoplasmatischen N-terminalen Domäne, die Phospho-Serin- und Phospho-Threoninstellen trägt, aus 12 Transmembrandomänen, die zwischen den Domänen 7 und 8 zwei N-Glykosylierungsstellen aufweisen, und einer zytoplasmatischen C-terminalen Domäne mit einer Phospho-Serin-Stelle. Eine Bindungsstellen für die Serin-Threoninkinasen SPAK- und OSR1 befindet sich am N-Terminus (verändert nach Ares et al., (2011)).

1.2.2 Funktion von NKCC2

Der NKCC2 ist als elektroneutraler Ionen-Kotransporter an der Rückresorption von 15-20% des frei filtrierten Natriumchlorids beteiligt (Übersicht in Gamba, 2005). Natrium-, Kalium- und Chloridionen werden über den NKCC2 im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:2 aus dem Tubuluslumen in die TAL-Zelle transportiert (Ares et al., 2011). Der

Transport der Ionen erfolgt entlang eines elektrochemischen Natrium-Konzentrationsgradienten, der durch die in der basolateralen Membran lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase erzeugt wird. Dabei kommt es zu einem Ausstrom der Natriumionen über die basolaterale Membran ins Interstitium (Greger, 1983). Chloridionen verlassen die Zelle basolateral über den Chloridkanal Cl^- -Kb oder über den Kotransport mit Kalium (KCC4) (Kieferle et al., 1994; Mount and Gamba, 2001). Dadurch wird eine lumenpositive transepitheliale Potentialdifferenz erzeugt, durch die der passive parazelluläre Transport von Kalzium- und Magnesiumionen angetrieben wird (Hebert and Andreoli, 1986). Für die parazelluläre Magnesiumresorption ist Claudin 16 als integrales *Tight junction*-Protein verantwortlich. Das über den NKCC2 aufgenommene Kalium wird durch den apikal lokalisierten Kaliumkanal ROMK (*Renal outer medullary potassium channel*) ins Tubuluslumen zurückgeführt. Dieser Schritt ist essentiell für die Funktionalität des NKCC2 (Gamba, 2005). Für die Salz-Resorption ist demnach ein Zusammenspiel von mehreren luminalen und basolateralen Transportern und Kanälen in der TAL-Zelle notwendig (Abb. 3).

Durch das Fehlen luminaler Wasserkanäle (Aquaporine) resorbiert der NKCC2 im TAL Natriumchlorid, ohne dass Wasser folgen kann. Das führt zu einer progressiv verminderten Osmolarität im Tubuluslumen, die wiederum Voraussetzung für den durch das antidiuretische Hormon (ADH, Vasopressin) gesteuerten resorptiven Transport von Wasser in den später folgenden, Aquaporine tragenden Segmenten Verbindungstubulus und Sammelrohr ist. Der Effekt des „Verdünnungssegments“ ist hier also die Erzeugung eines hypoosmolaren Tubulusharns im Nierenkortex. Dadurch, dass im TAL generell eine Trennung von Salz und Wasser erfolgt, erfolgt neben der Harnverdünnung gleichzeitig ein Transport von Salz ins Interstitium des Nierenmarks. Im Verein mit dem inneren Nierenmark erfolgt über das Prinzip der Gegenstrommultiplikation eine weitere „Verschleppung“ interstitiellen Salzes in die Innenzone der Niere. Durch Wasserentzug über die dünnen Schleifenschenkel von Nephronen speziell mit langen Schleifen sowie durch Harnstoffrezirkulation kommt es hierbei letztlich zur Generierung eines stärker hyperosmolaren Nierenmarks in diesem Bereich, der human eine Aufkonzentrierung des Urins bis zu 1500 mOsmol/l ermöglicht (Übersicht in Klinka et al., 2010).

Die Funktion des NKCC2 kann durch Schleifendiuretika wie Bumetanid oder Furosemid, effektiv, regulierbar und reversibel inhibiert werden (Forbush, 1983; Hannaert, 2002). Im Fall der Inhibition kommt es zur Auswaschung des medullären Gradienten. Abgesehen von der Funktion der Salzresorption im TAL kann NKCC2-abhängiger Transport eine

weitere lokal wie auch systemisch bedeutsame Leistung erbringen. Wie im TAL ist der NKCC2 auch in der Macula densa exprimiert. Hier leistet der Kotransporter den initialen Schritt in der „tubulovaskulären Signalgebung“, die Signale der Macula densa an die Funktion der afferenten Arteriole koppelt (Castrop and Schnermann, 2008). Hierdurch wird ein „Tubuloglomerulärer Feedback“ generiert, der bei ansteigender tubulärer Salzkonzentration eine Konstriktion der afferenten Arteriole und nachfolgendes Absinken der Einzelnephron-GFR bewirkt (negative Feedback-Schleife). Schleifendiuretika hemmen diesen Vorgang. Über die Macula densa-Zellen wird NKCC2-abhängig ein weiterer Signalweg ausgelöst, der über die Steuerung der Reninsynthese und Reninfreisetzung die Funktion des Renin-Angiotensin-Systems kochsalzabhängig reguliert. Die luminal Chloridkonzentration spielt hier eine zentrale Rolle (Skott and Briggs, 1987). Das Nukleosid Adenosin und Autakoide wie Prostaglandine und Stickstoffmonoxid sind in die Signalgebung involviert (Bachmann et al., 1995; Schnermann, 1998).

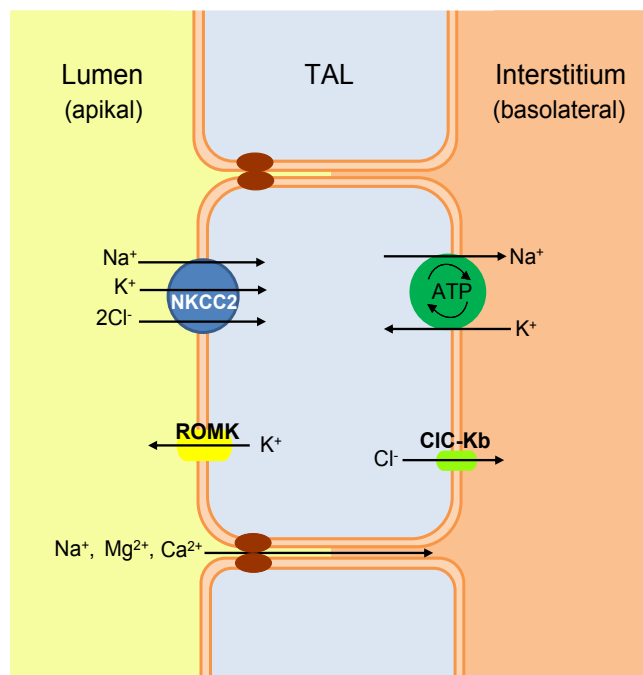


Abbildung 3: Schema für den Ionentransport im TAL. Apikal sind der NKCC2 für Natrium-, Kalium- und Chlorid-Einwärtstransport und der ROMK für Kalium-Auswärtstransport exprimiert. Basolateral lokalisiert sind die Natrium-Kalium-ATPase für den Natrium-/Kalium-Austausch sowie Chloridkanäle für den Kalium/Chlorid-Auswärtstrom. Der Transport von Kalzium- und Magnesiumionen erfolgt parazellulär über *Tight junctions* (braun). Quelle: *Katzung et al.*, (2012).

1.2.3 Regulation von NKCC2

Die NKCC2-Transportaktivität kann durch unterschiedliche Faktoren reguliert werden. Die Hormone Vasopressin, Parathormon, Kalzitinin, Glukagon und β -adrenerge Agonisten sind dafür bekannt, dass sie die Natriumchloridreabsorption im TAL durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels stimulieren (Molony, 1987; Dublineau, 1992). Das am besten untersuchte stimulatorische Hormon ist Vasopressin (ADH, Antidiuretisches Hormon). Dieses gelangt aus der Neurohypophyse über den Blutkreislauf in die Niere und bindet im TAL basolateral an V2-Rezeptoren (Mutig et al., 2007). Die Rezeptorbindung vermittelt eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade, die zur Freisetzung von cAMP und zur Aktivierung von Proteinkinase A sowie SPAK- und OSR1-Kinasen führt, die wiederum den NKCC2 durch Phosphorylierung der regulatorischen Stellen aktivieren (Gimenez and Forbush, 2003; Mutig et al., 2007; Ares et al., 2011). Zu diesen gehören auf der zytoplasmatischen N-terminalen Domäne die Threonine 96, 101, 114 und Serin 126 (Ares et al., 2011). Außerdem führt eine kurzzeitige Stimulation mit Vasopressin durch *Trafficking* zu einer gesteigerten apikalen Oberflächenexpression des NKCC2 in der luminalen Membran. Subapikal gelagerte, NKCC2-tragende Vesikel werden dabei zur apikalen Plasmamembran transportiert, in welcher sich der NKCC2 anteilig in *Lipid rafts* anreichert (Gimenez and Forbush, 2003; Welker et al., 2008). Ein ebenfalls in *Lipid rafts* inserierendes Glykoprotein, Tamm-Horsfall Protein (THP, auch Uromodulin), kann die Aktivität von NKCC2 modulieren (Mutig et al., 2011). In THP-deletierten Mäusen war die Phosphorylierung und damit die Aktivität des NKCC2 signifikant reduziert. Eine kurzzeitige Behandlung der Mäuse mit ADH steigerte die Phosphorylierung des NKCC2 in Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in den THP-deletierten Mäusen (Mutig et al., 2011). Wie THP an der Regulation von NKCC2 beteiligt ist, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Die Mechanismen, die für das *Trafficking* von NKCC2 verantwortlich sind, sind zur Zeit noch wenig erforscht (Ares et al., 2011). Ein zytosolisches Protein, Annexin A2 (AnxA2), kann offenbar direkt und selektiv mit der nicht-phosphorylierten zytoplasmatischen N-terminalen Domäne des NKCC2 interagieren. AnxA2 ist an der Translokation des NKCC2 zur apikalen Plasmamembran insofern beteiligt, als es eine Mittlerfunktion bei dessen Übergang aus Speichervesikeln in die apikale Membran und parallel dessen Organisation in *Lipid raft*-Domänen einnimmt. Dieser Vorgang ist wiederum durch ADH und außerdem auch durch hypotonischen Chloridmangel-Stress stimulierbar (Dathe et al., 2014). Anschließend wird ein WNK-SPAK-OSR1-Signalweg aktiviert, durch welchen letztlich NKCC2 an den N-terminalen regulatorischen Stellen phosphoryliert und damit

an der Zelloberfläche aktiviert wird (Gimenez and Forbush, 2003; Richardson et al., 2011).

1.3 Die Kinasen SPAK und OSR1

SPAK (*Ste20- and SPS1-related proline and alanine rich kinase*) und OSR1 (*oxidative stress-responsive kinase*) sind Serin-/Threoninkinasen, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von NKCC2 durch dessen Phosphorylierung spielen. Sie gehören zur großen Genfamilie der Sterile 20 (Ste20)-verwandten Kinasen und zur Unterfamilie der Germinal Center Kinasen (GCK), die bei Pilzen, Pflanzen und Tieren konserviert sind (Boyce and Andrianopoulos, 2011). In Säugetieren sind die beiden Kinasen zu 67% homolog (Piechotta et al., 2002) (Abb. 4). SPAK und OSR1 sind im Organismus ubiquitär exprimiert. In der Niere wurden sie im distalen Nephron nachgewiesen (McCormick et al., 2011; Lin et al., 2011).

Erstmals beschrieben wurde die Interaktion zwischen SPAK und OSR1 mit NKCC2 von Piechotta *et al.* (2002). Die Kinasen interagieren direkt mit dem RFX[V/I]-Bindemotiv des N-Terminus von NKCC2. Die Rolle der Kinasen bei der NKCC2-Regulation wurde mittels Knock in- und Knock out-Mäusen untersucht (Übersicht in Gagnon and Delpire, 2012).

Die Kinasen SPAK und OSR1 bedürfen auch ihrerseits der Aktivierung. Hier sind die WNK-Kinasen (*With-no-lysine kinases*) WNK1, WNK3 und WNK4, die auch im TAL vorkommen, untersucht worden (Übersicht in McCormick and Ellison, 2011). WNK1 und WNK4 phosphorylieren die SPAK direkt an Threonin 243 ihrer katalytischen Domäne (Rafiqi et al., 2010). OSR1 wird von den WNK hingegen an der Position 185 direkt phosphoryliert (Vitari et al., 2005).

1.3.1 Struktur und Verteilung der Kinasen SPAK und OSR1

SPAK kommt in der Niere in drei und OSR1 in zwei Isoformen vor (Abb. 4) (McCormick et al., 2011; Piechotta et al., 2003). Die lange Isoform von SPAK (FL [*full length*]-SPAK) ist 60 kDa groß. FL-SPAK weist am N-Terminus eine Region auf, die Prolin- und Alaninreiche Wiederholungen trägt (PAPA-Box) und sich direkt vor der katalytischen Domäne befindet (Piechotta et al., 2002). Die katalytische Domäne beherbergt eine T-Schleife, in welcher die Threonin 243-Phosphorylierungsstelle für die WNK-Kinasen liegt (Rafiqi et

al., 2010). Auch das im Serin-Motiv liegende Serin 383 wird von WNK-Kinasen phosphoryliert, die Bedeutung dieser Stelle bei der Aktivierung der SPAK ist jedoch unklar, da ihre Mutation die Aktivierung der Kinase nicht beeinträchtigt (Vitari et al., 2005). Am C-Terminus befindet sich eine konservierte C-terminale (CCT)-Domäne. Mit dieser bindet die Kinase an das RFx[V/I]-Motiv ihrer Substrate (Übersicht in Delpire and Gagnon, 2008). SPAK2 (58 kDa) und KS (*Kidney specific*)-SPAK (53 kDa) sind N-terminal trunke Isoformen der FL-SPAK mit sonst übereinstimmender Aminosäure-Sequenz. Ihnen fehlt zudem ein Teil der katalytischen Domäne (McCormick et al., 2011; Piechotta et al., 2003). Damit sind SPAK2 und KS-SPAK als Kinasen inaktiv (Saritas et al., 2013). KS-SPAK kann jedoch aufgrund ihrer vorhandenen CCT-Domäne an die N-terminale Domäne von NKCC2 binden. Damit wird offenbar die Phosphorylierung des NKCC2 durch FL-SPAK verhindert. Dies wurde durch ein kompetitives Bindungsverhalten beider SPAK-Isoformen an NKCC2 erklärt. Lediglich bei verstärkter Phosphorylierung von FL-SPAK, bedingt z.B. durch die Stimulation mit ADH, wird KS-SPAK von NKCC2 verdrängt und dadurch der Kotransporter aktiviert (Saritas et al., 2013). Die funktionelle Rolle von SPAK2 ist noch unbekannt.

Die lange Isoform von OSR1 (FL [*full length*]-OSR1) ist 58 kDa groß (Piechotta et al., 2003) (Abb. 4). Eine 54 kDa große N-terminal trunke OSR1-Isoform (t-OSR1) zeigt eine Verkürzung der katalytischen Domäne. Die Funktion dieser Isoform ist bisher noch unbekannt (Piechotta et al., 2003).

Die Kinasen SPAK und OSR1 sind entlang des distalen Tubulus unterschiedlich verteilt. Bei den SPAK-Isoformen dominiert FL-SPAK im DCT und SPAK2 und KS-SPAK im TAL (McCormick et al., 2011). Aus dieser Lokalisation ergeben sich offenbar unterschiedliche Funktionen. Im DCT wird der NCC aktiviert, weil FL-SPAK dominiert und im TAL wird der NKCC2 inhibiert, weil KS-SPAK dominiert (McCormick et al., 2011; Park et al., 2013). Mit OSR1 ist es umgekehrt. Im TAL dominiert diese Kinase und ist für die Aktivierung von NKCC2 hauptverantwortlich. Im DCT ist OSR1 schwach exprimiert und ist für die Aktivierung von NCC nicht relevant (McCormick et al., 2011). Die Phosphorylierung des NKCC2 erfolgt durch die Kinasen nur an den Threoninen 96 und 101 (Richardson et al., 2011).

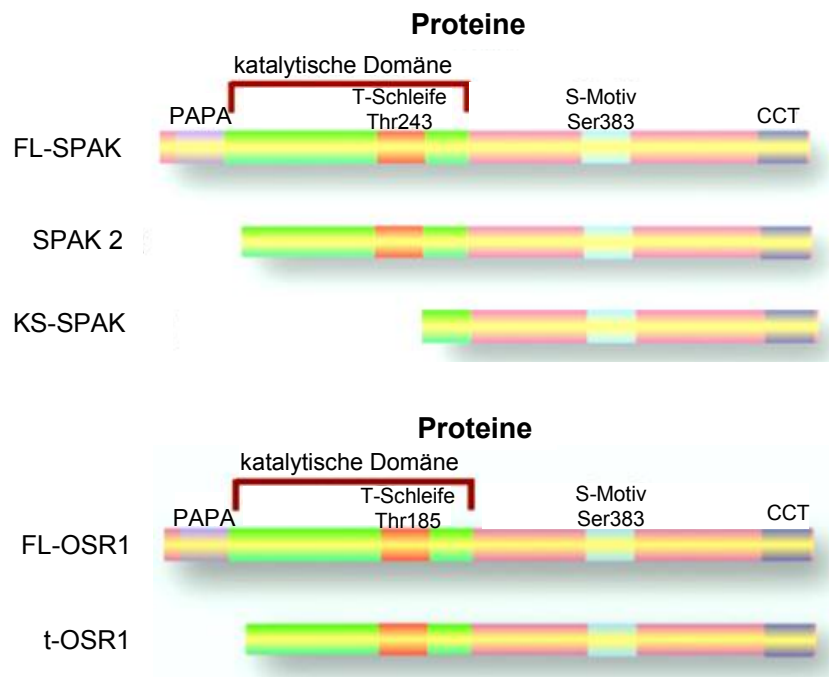


Abbildung 4: Struktur der Kinasen SPAK und OSR1 und ihrer Isoformen. Die beiden langen Varianten FL-SPAK und FL-OSR1 weisen am N-Terminus jeweils eine PAPA-Box (Prolin-/Alanin-reiche Region) auf. Es folgt die katalytische Domäne mit einer T-Schleife. Die dort liegenden Threonine (Thr243 bei SPAK und Thr185 bei OSR1) werden von WNK-Kinasen phosphoryliert. Das S-Motiv beinhaltet jeweils ein Serin 383, welches ebenfalls von WNK-Kinasen phosphoryliert wird. Am C-Terminus befindet sich eine CCT-Domäne. Diese ist in allen Isoformen konserviert. FL = *full length*; KS = *kidney specific*; t = *trunkiert*; Thr = Threonin; Ser = Serin; CCT = *conserved C-terminal*.

Quelle: McCormick *et al.*, (2011).

1.4 SORLA

Ein seit kurzem bekannter Interaktionspartner von NKCC2, der in die Regulation des Kotransporters involviert ist, ist SORLA (*Sorting protein-related receptor with type A repeats*) (Reiche et al, 2002). SORLA ist auch unter der Bezeichnung LR11 bekannt und gehört zur Genfamilie der VPS10P-(*Vacuolar protein sorting 10 protein*) Rezeptoren, die aus 6 Mitgliedern besteht (Abb. 5) (Willnow et al., 2011). Zudem ist SORLA mit der LDL-Rezeptor-Genfamilie verwandt (Riedel et al, 2002).

Der Rezeptor wird in verschiedenen Organen und Geweben exprimiert, beispielsweise im Gehirn und hier speziell im Hippocampus, weiterhin in der Leber, im Hoden, in der Gebärmutter, im Rückenmark, in der Schilddrüse, in der Lunge, in den Lymphknoten und in der Niere (Kanaki et al., 1998; Jacobsen et al., 1996; Yamazaki et al., 1996; Morwald et al., 1997).

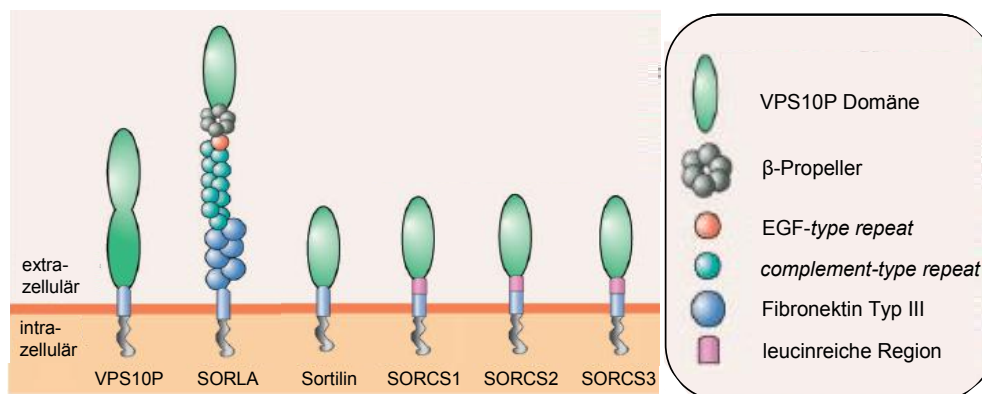


Abbildung 5: Die Genfamilie der VPS10P Rezeptoren. Diese Rezeptoren verfügen über eine extrazelluläre VPS10P Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre C-terminale Domäne. Das VPS10P Protein hat zwei VPS10P Domänen, Sortilin hingegen nur eine. SORCS1, SORCS2 und SORCS3 tragen zusätzlich noch zwischen der VPS10P-Domäne und der Transmembrandomäne eine leucinreiche Region. SORLA beinhaltet zwischen der VPS10P Domäne und der Transmembrandomäne einen β -Propeller, einen EGF-type repeat, 11 complement-type repeats und 6 Fibronectin-Typ III. Quelle: Willnow et al., (2011).

1.4.1 Struktur und Funktion von SORLA

SORLA ist ein 250 kDa umfassender Multi-Ligand-Rezeptor, der neben der extrazellulären VPS10P Domäne zusätzlich mit LDL-Rezeptoren verwandte LDLRA und LDLRB *repeats*, einen EGF-*type repeat* und eine Fibronectin-*type III* Region besitzt (Abb. 5, 6) (Jacobsen et al., 1996; Riedel et al., 2002; Lintzel et al., 2002). Anschließend folgt eine Transmembrandomäne und ein intrazellulärer Teil, der sowohl Eigenschaften von Endozytose- als auch von *Sorting*-Rezeptoren besitzt (Riedel et al., 2002).



Abbildung 6: Struktur von SORLA. Schematisch dargestellt ist die Struktur von SORLA, die neben den Elementen der VPS10P Rezeptor-Genfamilie (VPS10P Domäne) zusätzlich Elemente der LDL Rezeptor-Genfamilie (*LDLR-like*) enthält. Dabei handelt es sich um den β -Propeller (*LDLRB repeats*), den EGF-*type repeat*, die *complement-type repeats* (*LDLRA repeats*) und die Fibronectin Typ III *repeats* (F3). Zusätzlich trägt der Rezeptor eine Transmembrandomäne (TM) und eine intrazelluläre Domäne (IC). Der Pfeil symbolisiert das Furin-Schneide-Motiv. Quelle: Lintzel et al., (2002).

In der Plasmamembran bindet SORLA mit seinem extrazellulären Teil an verschiedene Liganden: Apolipoprotein E, Rezeptor-assoziiertes Protein (RAP), Lipoproteinlipase und Urokinase-Plasminogen-Aktivator (Taira et al., 2001; Jacobsen et al., 2001; Gliemann et al., 2004; Nilsson et al., 2007). Neben der Funktion, Liganden in die Zelle zu transferieren, agiert SORLA im Gehirn als *Sorting*-Rezeptor für das *Amyloid Precursor* Protein, welches an der Entstehung der Alzheimer Erkrankung maßgeblich beteiligt ist (Andersen et al., 2005; Offe et al., 2006).

Die Gruppe von T. Willnow generierte erstmals SORLA-defiziente Mäuse (*Sorla*^{-/-}) (Andersen et al., 2005). Diese wiesen neben neurologischen Auffälligkeiten auch Veränderungen in der Niere auf (Reiche et al., 2010). Erste Untersuchungen zur Funktion von SORLA in der Mausniere zeigten eine hohe Expression des Rezeptors während der embryonalen Entwicklung der Niere (Riedel et al., 2002). Darüber hinaus exprimieren adulte Tiere SORLA im Sammelrohr, speziell in Aquaporin-positiven Vesikeln. Die Funktion des Rezeptors ist hier noch nicht bekannt (Riedel et al., 2002).

Reiche *et al.* untersuchten die Verteilung von SORLA in der Mausniere. Hier wurde vor allem der Schwerpunkt auf die Rolle des Rezeptors bei der Aktivierung des NKCC2 gelegt. SORLA wurde im apikalen Bereich des TAL und des DCT, sowie im CNT und im Sammelrohr lokalisiert. In SORLA-defizienten Mäusen wurden funktionelle Abweichungen der (NaCl) transportierenden Kotransporter und Kanäle dieser Abschnitte beobachtet. Die Aktivität von NKCC2 war stark reduziert, NCC und ENaC waren dagegen in ihrer Aktivität gesteigert. Hier wurde eine Kompensation der verminderten Funktion des TAL durch nachfolgende Segmente angenommen. Die NKCC2-aktivierende Kinase SPAK lag bei SORLA-Defizienz im TAL zwar hyperphosphoryliert vor, kann jedoch offenbar NKCC2 aufgrund von *Missortings* jedoch nicht erreichen, was als Ursache für seine fast vollständig fehlende Phosphorylierung und damit Aktivität angenommen wurde. In Wildtyp Tieren kolokalisierte phosphoryliertes SPAK in subapikalen Vesikeln im TAL mit SORLA. Somit wird angenommen, dass SORLA beim intrazellulären *Trafficking* von SPAK und bei der Aktivierung von NKCC2 eine wichtige Funktion ausübt (Reiche et al., 2010).

1.4.2 Regulation von SORLA

SORLA wird als Prorezeptor synthetisiert (Hampe et al., 1999; Jacobsen et al., 1996). Im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Abtrennung des Signalpeptids und im Golgi-Apparat wird der N-Terminus des SORLA-Propeptids durch Furin, eine Kalzium abhängige Serin-Endoprotease, gespalten (Jacobsen et al., 2001; Hampe et al., 2000). Weniger als 10% des reifen Rezeptors sind in der Plasmamembran lokalisiert, der Großteil des Proteins ist in Vesikeln unterhalb der Plasmamembran gespeichert (Übersicht in Willnow et al., 2011). In der Plasmamembran wird der SORLA-Rezeptor durch *Clathrin-coated pits* und der Interaktion mit dem Adapter-Protein-2-Komplex endozytiert und zu den frühen Endosomen transportiert (Übersicht in Willnow et al., 2011).

1.5 Calcineurin

Calcineurin ist eine Kalzium- und Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase (Rusnak and Mertz, 2000). Sie gehört zur Familie der Serin-/Threoninphosphatasen, zu deren Mitgliedern Proteinphosphatase 1, 2A und 2C gehören. Im Vergleich zu anderen Familienmitgliedern unterscheidet sich Calcineurin durch die Bildung eines Heterodimers, bestehend aus einer 60 kDa großen katalytischen Domäne (Calcineurin A, CnA) und einer 19 kDa großen regulatorischen Domäne (Calcineurin B, CnB) (Abb. 7). Beide Untereinheiten sind zwischen Hefe und Mensch konserviert. Calcineurin A wird von drei verschiedenen Genen kodiert, so dass drei Isoformen hervorgehen: CnA α (PPP3CA), CnA β (PPP3CB) und CnA γ (PPP3CC). Von Calcineurin B gibt es zwei Isoformen, CNB1 (PPP3R1) und CNB2 (PPP3R2) (Rusnak and Mertz., 2000). Im Gewebe der Säugetiere ist Calcineurin ubiquitär exprimiert. Die höchste Expression wurde im Gehirn beschrieben (Stewart et al., 1983). Calcineurin kann durch spezifische Inhibitoren, Cyclosporin A und Tacrolimus, in seiner Aktivität gehemmt werden (Liu et al., 1991). Die Untersuchungen in dieser Arbeit richten sich auf die CnA β -Isoform, weil diese in der Niere im TAL kolokalisierend mit NKCC2 gefunden wurde.

1.5.1 Struktur und Funktion der β -Isoform

CnA β ist aus 521 AS aufgebaut (Ke et al., 2003). CnA β unterscheidet sich zu anderen CnA-Isoformen in einem Prolin-reichen N-Terminus (Klee et al., 1998). Nach dem N-Terminus folgt die katalytische Domäne (346 AS), die im aktiven Zentrum zwei Metallionen, Zn²⁺ und Fe³⁺, enthält (Abb. 7). An diese schließt eine CnB-bindende Domäne (26 AS), eine Calmodulin-bindende Domäne (24 AS) und eine autoinhibitorische Domäne (17 AS) an (Ke et al., 2003). CnB enthält zwei Ca²⁺-bindende Domänen. Jede ist 83 AS groß und weist zwei EF-Hand-Motive auf, an die Kalziumionen binden (Ke et al., 2003; Aitken et al., 1984). Die Größe des CnA β -Proteins beträgt 60 kDa (NCBI Datenbank-Nr. NP_032940).

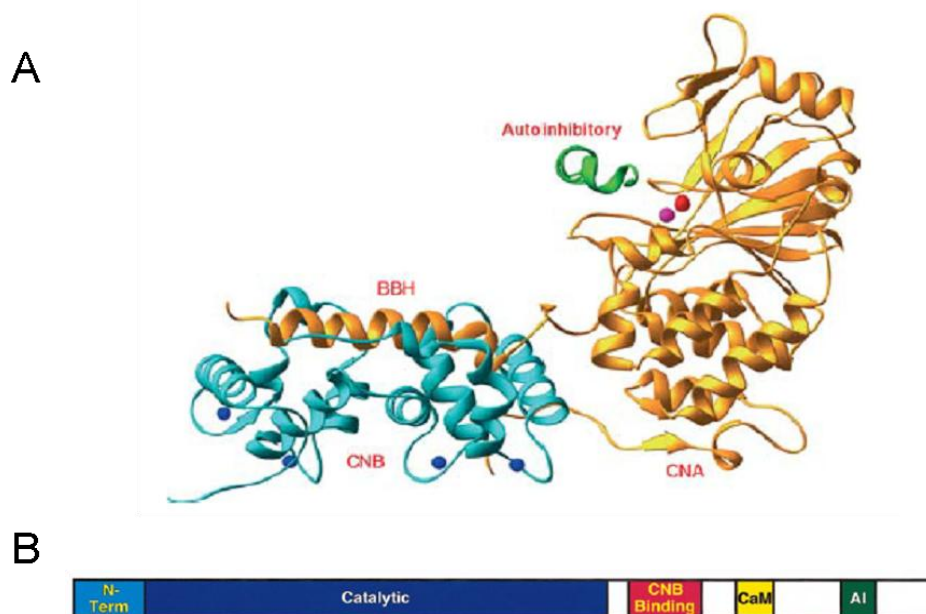


Abbildung 7: Struktur von CnAβ. A: Ein *Ribbon*-Diagramm bestehend aus α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen zeigt den räumlichen Aufbau von CnAβ. CnA (gelb) beinhaltet im aktiven Zentrum ein Zn^{2+} (rote Kugel) und ein Fe^{3+} (violette Kugel). Es folgen eine CnB-bindende Domäne (BBH), eine Calmodulin-bindende Domäne (zwischen BBH und autoinhibitorischer Domäne, nicht markiert) und eine autoinhibitorische Domäne (grün). CnB (hellblau) bindet insgesamt vier Ca^{2+} (blaue Kugeln). B: Schematische Darstellung der katalytischen Untereinheit CnA. Nach dem N-Terminus (hellblau) folgt die katalytische Domäne (dunkelblau), die CnB-bindende Domäne (rot), die Calmodulin-bindende Domäne (CaM; gelb) und die autoinhibitorische Domäne (AI; grün). Quellen: A: *Ke et al.*, (2003), B: *Rusnak and Mertz*, (2000).

Allgemein betrachtet besteht die Funktion einer Phosphatase darin, phosphorylierte Substrate zu dephosphorylieren. Dabei wird enzymatisch der an Serin oder Threonin gebundene Phosphatrest abgespalten. Calcineurin reguliert auf diese Weise unterschiedliche zelluläre Prozesse. Es ist an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt, am Zellwachstum sowie an der Organisation von Mikrotubuli. Es reguliert Ionenkanal-Aktivitäten sowie auch die Hypertrophie in Skelettmuskeln und im Herzen (Perrino et al., 1998).

Einer der wichtigen Substrate für Calcineurin ist NF-AT (*Nuclear factor of activated T cells*), ein Transkriptionsfaktor von T-Lymphozyten (Hogan et al., 2003). Am N-Terminus der regulatorischen Domäne von NF-AT befindet sich die Bindestelle für Calcineurin (Hogan et al., 2003). Die Bindung von Calcineurin an diese dephosphoryliert und aktiviert NF-AT. Dies ist mit seiner Translokation zum Zellkern

verbunden, wo er die Transkription verschiedener Gene, wie z.B. von Interleukinen, einleitet. Das führt zur Immunantwort der aktivierten T-Lymphozyten (Übersicht in Williams and Gooch, 2012). Gooch et al. zeigten 2007, dass die β -Isoform wichtig ist für die NF-AT-Regulation, während es die α -Isoform nicht ist. Doetschman et. al zeigten 2011, dass CnA β multiple anti-inflammatorische Effekte im Immunsystem ausübt.

Wenig ist über die Funktion der β -Isoform in der Niere bekannt. Tumlin et al. zeigten 1995 die Lokalisation von CnA β im TAL der Ratte. 2004 fanden Gooch et al. die meiste Expression von CnA β in der inneren Medulla der diabetischer Rattenniere. Reddy et al. wiesen 2011 CnA β in der Regulation glomerulärer Hypertrophie nach. Calcineurin soll weiterhin in Verbindung mit der Regulation von Aquaporin 2 im Sammelrohr stehen. Zwischen den drei Calcineurin-Isoformen wurde hierbei nicht unterschieden (Jo et al. 2001; Li et al., 2007).

1.5.2 Regulation von Calcineurin

Für die biologische Funktion von Calcineurin bedarf es seiner Aktivierung. Das geschieht durch Kalzium und Calmodulin. Im inaktiven Zustand blockiert die autoinhibitorische Domäne sterisch das aktive Zentrum von CnA (Abb. 8). Sobald die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle steigt, wird Calmodulin durch Bindung von Ca^{2+} aktiviert. Das aktivierte Calmodulin bindet an die katalytische Untereinheit von Calcineurin. Zusätzlich binden Kalziumionen an die regulatorische Untereinheit. Das führt zu einer Veränderung der Tertiärstruktur, wodurch sich die autoinhibitorische Domäne vom aktiven Zentrum entfernt und dieses frei legt (Tumlin et al., 1997). Erst dann kann Calcineurin an sein Substrat binden und dieses dephosphorylieren. Dafür ist das Bindemotiv PxlxIT und/oder ein LxVP Motiv erforderlich (Roy and Cyert, 2009).

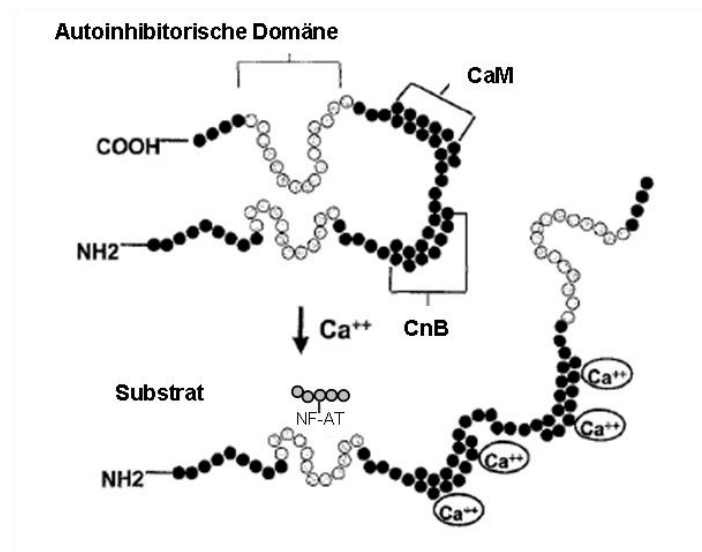


Abbildung 8: Aktivierung von Calcineurin durch Kalzium und Calmodulin. Im inaktiven Zustand verdeckt die autoinhibitorische Domäne das aktive Zentrum von Calcineurin. Durch die Bindung von Ca^{2+} und Calmodulin ändert sich die Tertiärstruktur von Calcineurin und das aktive Zentrum der Phosphatase wird frei gelegt. Substrate wie das dargestellte NF-AT können gebunden und dephosphoryliert werden. Quelle: *Tumlin et al.*, (1997).

1.5.3 Cyclosporin, der spezifische Inhibitor von Calcineurin

Cyclosporin A (CsA) ist ein zyklisches Peptid, welches aus 11 AS besteht (Faulds et al., 1993). Es wird aus dem Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum* gewonnen und wirkt immunsuppressiv (Laupacis et al., 1982). Seit 1980 wird CsA erfolgreich nach Transplantationen zur Unterdrückung der Immunabwehr eingesetzt, um Abstoßungsreaktionen zu verringern (Starzl et al., 1980). Zudem wird CsA bei autoimmunen chronischen Entzündungskrankheiten wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatische Arthritis oder Psoriasis verabreicht (Faulds et al., 1993). Längere Gabe in höheren Dosen führt jedoch zu Bluthochdruck und Schädigungen der Leber, des Magen-Darm-Trakts und der Nieren (Faulds et al., 1993; Busauschina et al., 2004; Williams et al., 2012).

CsA ist ein spezifischer Inhibitor von Calcineurin (Liu et al., 1991). Die inhibitorische Wirkung wird erst entfaltet, wenn CsA an Cyclophilin A (CyPA) bindet (Liu et al., 1991; Ke et al., 2003). CyPA ist eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase, ein Immunophilin, das zytosolisch an CsA bindet (Fischer et al., 1989). Der CsA-CyPA-Komplex bindet an Calcineurin und verhindert, dass das Substrat mit Calcineurin interagieren kann (Ke et

al., 2003). Die immunsuppressive Wirkung von CsA beruht darauf, dass das inhibierte Calcineurin NF-AT nicht durch Dephosphorylierung aktivieren kann. Dadurch gelangt der Transkriptionsfaktor nicht in den Zellkern, wodurch wiederum die für die Aktivierung und Vermehrung von Lymphozyten benötigten Interleukine und Interferone nicht exprimiert werden.

1.6 Ziel der Arbeit

NKCC2 spielt eine wichtige Rolle bei der Harnkonzentrierung und Volumenregulation. Inaktivierende Mutationen im NKCC2-Gen führen zum renalen Salzverlust und zu Hypotonie und Hypokaliämie. Pharmakologische Hemmer des Transporters, wie Bumetanid oder Furosemid, finden eine breite klinische Anwendung bei der Therapie von Bluthochdruck und Ödemen. Die Kenntnis über die Regulationsmechanismen von NKCC2 hat eine hohe klinische Relevanz und ist Gegenstand aktueller Forschung.

Studien der letzten Jahre fokussierten sich auf der Aktivierung von NKCC2 durch N-terminale Phosphorylierung in der apikalen Plasmamembran. Hierbei wurden beteiligte Kinasen identifiziert und ihre Interaktion mit NKCC2 charakterisiert. Im Gegensatz dazu sind Phosphatasen, die an der Dephosphorylierung und somit Deaktivierung von NKCC2 beteiligt sind, noch nicht charakterisiert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit, zellbiologische Mechanismen zu untersuchen, die zur Deaktivierung des Transporters führen.

Hierzu wurde ein Schwerpunkt auf die Phosphatase Calcineurin A β (CnA β) gesetzt. Die Deaktivierung des Kcotransporters über diese Phosphatase sollte im TAL durch das Erstellen von Expressions- und Lokalisationsprofilen mittels immunhistologischer und biochemischer Methoden erfasst werden. Eine Interaktion zwischen CnA β und NKCC2 sollte sichergestellt werden. SORLA, ein intrazelluläres Rezeptorprotein des distalen Nierentubulus, sollte auf seine Interaktion mit CnA β überprüft werden, um Einblick in das *Trafficking* der Phosphatase zu gewinnen. Hierzu wurde das *Sorla*^{-/-}-Mausmodell verwendet. Der funktionelle Nachweis dieser Interaktionen bezüglich der Deaktivierung von NKCC2 sollte durch Einsatz des Calcineurininhibitors Cyclosporin A *in vivo* im Mausmodell und *in vitro* an kultivierten TAL-Zellen erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiermodelle

2.1.1.1 SORLA-defiziente Mäuse

Das SORLA-defiziente Mausmodell stammt aus der Zucht von T. Willnow am MDC in Berlin Buch. Im Rahmen einer Kooperation wurde uns diese Mauslinie für experimentelle Zwecke zur Verfügung gestellt. Sie basiert auf dem hybriden genetischen Hintergrund von 129SvEmcTer × Balb/c. Das SORLA-Gen wurde durch homologe Rekombination deletiert. Im Stoffwechsellkäfig wiesen die Mäuse einen Verlust von Kalium, Kalzium, Natrium und Chlorid auf. Sie waren schlechter in der Lage Urin zu konzentrieren als Wildtyp-Mäuse (Reiche et al., 2010).

Die Aufrechterhaltung der Zucht erfolgte in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité. Für die Experimente wurden ausschließlich erwachsene Männchen verwendet. 12 Mäuse wurden für *Steady state* Evaluierungen verwendet (n=4 für Immunhistochemie und n=8 für Western blot). Für die kurzzeitige (1 h) Vehikel- bzw. Cyclosporin A-Behandlung wurden 8 Mäuse verwendet (n= 4 in pro Gruppe). Die Versuche erfolgten unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden von der LAGESO Berlin genehmigt (Tierversuchsantrag G0220/12).

2.1.1.2 Wildtyp Mäuse

Zur Kontrolle wurden als Wildtypstamm Balb/c-Mäuse verwendet (FEM). Für die Versuche wurden ausschließlich erwachsene Männchen verwendet. 12 Mäuse wurden für *Steady state* Evaluierungen verwendet (n=4 für Immunhistochemie und n=8 für Western blot). Außerdem wurden 8 Mäuse für kurzzeitige (1 h) Vehikel- bzw. Cyclosporin A-Behandlung (n= 4 in jeder Gruppe) eingesetzt.

2.1.1.3 Calcineurin A β -defiziente Mäuse

Calcineurin A β -defiziente Mäuse wurden von J. D. Molkenin am Institut für Pädiatrie in Cincinnati, USA generiert. Das PPP3CB-Gen war bei diesen Mäusen durch Deletion des 2. Exons ausgeschaltet (Bueno et al, 2002). Von zwei männlichen Mäusen wurden uns Nieren und Gehirne zur Verfügung gestellt.

2.1.1.4 Wildtyp Ratten

Für die Co-Immünpräzipitation (2.2.1.4) und GST-*pull-down* (2.2.1.6) wurden 6 männliche Wildtyp-Ratten (Sprague-Dawley) verwendet, die aus der FEM stammten.

2.1.2 Zellmodelle

Die verwendeten Zelllinien sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Spezies	Zelltyp	Medium	Zusätze
raTAL	Ratte	medullärer TAL	RECGM	1% Pen/Strep
MDCK	Hund	Epithelzellen	DMEM	10% FKS, 1% Pen/Strep
MCD4	Maus	kortikales Sammelrohr	DMEM	5% FKS, 1% Pen/Strep
MMDD1	Maus	Macula densa	DMEM	10% FKS, 1% Pen/Strep
HEK-293	Human	Epithelzellen	DMEM	10% FKS, 1% Pen/Strep

RECGM = Renal Epithelial Cell Growth Medium von Promo Cell

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

Die Kultivierung aller Linien erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit dem jeweiligen Medium im Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt.

2.1.3 Antikörper

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt. Antikörper gegen NKCC2, pT96/pT101-NKCC2 und pT58-NCC (alle: Pineda Antikörper Service, Berlin) wurden in vorangegangenen Studien charakterisiert (Tabelle 3). Die Spezifität aller in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurde in Vorarbeiten mit Hilfe von Präabsorptionstests bzw. durch den Einsatz entsprechender Knockout-Kontrollproben überprüft. Beim Nachweis von phosphorylierten Epitopen wurde eine Präabsorption der entsprechenden Antikörper mit den jeweiligen dephosphorylierten Peptiden durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion gegenüber der phosphorylierten Epitope zu erhöhen.

Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Herkunft	Katalog-Nr.	Konz. im WB	Konz. in IHC
NKCC2 (Mutig et al., 2007)	Meerschweinchen	hiesiges Labor	---	1:500	1:500
pT96/pT101-NKCC2 (Mutig et al., 2007)	Kaninchen	hiesiges Labor	---	1:1000	1:5000
pS126NKCC2	Schaf	Universität Dundee	---	1:300	---
NCC (McCormick et al., 2011)	Kaninchen	Oregon Health & Science University	---	---	1:500
pT58-NCC (Saritas et al., 2013)	Kaninchen	hiesiges Labor	---	1:200	---
SPAK	Kaninchen	Cell Signaling	2281	1:200	---
N-SPAK	Ziege	Santa Cruz	---	---	1:300
OSR1	Schaf	Universität Dundee	---	1:300	1:300
CnA β	Kaninchen	Millipore	07-068	1:200	1:50
CnA β	Ziege	Santa Cruz	sc-6124	---	1:50
SORLA (Gliemann et al., 2004)	Ziege	Aarhus University	---	1:1000	1:300
Clathrin	Maus	BD Transduction Laboratories	610499	1:10000	---
β -Aktin	Maus	Sigma Aldrich	A5441	1:5000	---
DAPI	---	Sigma Aldrich	D9542	---	1:1000
Mouse Gamma Globulin	Maus	Dianova	015-000-002	5 μ g an Beads	
Goat Gamma Globulin	Ziege	Dianova	005-000-002	5 μ g an Beads	
Guinea Pig Gamma Globulin	Meerschweinchen	Dianova	006-000-002	5 μ g an Beads	

Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten Sekundärantikörper

Bezeichnung	Herkunft	Katalog-Nr.	Konz. im WB	Konz. in IHC
DyLight™488 donkey anti rabbit IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	711-485-152	---	1:400
Cy™2 donkey anti guinea pig IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	706-225-148	---	1:300
Cy™3 donkey anti rabbit IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	711-165-152	---	1:300
Cy™3 donkey anti goat IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	705-154-147	---	1:300
Cy™3 donkey anti sheep IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	713-165-003	---	1:300
Cy™3 donkey anti guinea pig IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	706-166-148	---	1:300
Cy™5 donkey anti guinea pig IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	706-175-148	---	1:300
polyclonal swine anti rabbit IgG/HRP	Dako	P0399	1:2000	---
Goat anti mouse IgG/HRP	Dako	P0447	1:2000	---
polyclonal swine anti guinea pig IgG/HRP	Dako	P0141	1:2000	---
Rabbit anti sheep IgG/HRP	Dako	P0163	1:2000	---
polyclonal rabbit anti goat IgG/HRP	Dako	P0449	1:2000	---

2.1.4 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Hersteller, Ort
pcDNA3_SORLA_WT	Kooperation mit Prof. Willnow, MDC, Berlin
pEYFP_SORLA_tail	Kooperation mit Prof. Willnow, MDC, Berlin
pGEX-6P1	GE Healthcare GmbH, Solingen, DE

2.1.5 Chemikalien

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
5% Milchblockierlösung	5 g Difco TM Skim Milk auf 100 ml 1x PBS-Puffer
5% BSA-Blockierlösung	5 g BSA auf 100 ml 1x PBS-Puffer
Cacodylat-Sucrose-Puffer 0,1M	21,4 g Cacodylat ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 34,2 g Sucrose auf 1 L, pH 7,4
Elektrophoresepuffer	10fach: 0,25 M Tris(-Base), 1,92 M Glycin, 1% SDS, A.dest auf 1 L, pH 8,3
GST-Puffer	50 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 1x Protease Inhibitor
Gelpuffer	3 M Tris-Base, 0,3% SDS, A.dest, pH 8,45
Homogenisierungspuffer	250 mM Sucrose, 10 mM TEA, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette, A.dest, pH 7,5
Igepal Puffer	1% Igepal, 1x Protease Inhibitor in A.dest (aus 25x), mit PBS auffüllen
IP-Puffer	50 ml: 5 ml 10xTBS, 250 μl Tween, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabl., 45 ml A.dest
Laemmli 4x	252 mM Tris/HCL, 40% Glycerin, 8% SDS, 0,04% Bromphenolblau, 20% 2-Mercapto, pH 6,8
PBS-Puffer	400 g NaCl, 12 g KH_2PO_4 , 89 g Na_2HPO_4 , 10 g KCl auf 5 L H_2O
Ponceau S	0,5% Ponceau, 1% Essigsäure, A.dest
SPAK Blockierlösung	1x TBS, 0,1% Tween-20, 5% Difco TM Skim Milk
SPAK dilution buffer	1x TBS, 0,1% Tween-20, 5% BSA
Sammelgel 4%	1 ml Acrylamid, 2 ml Gelpuffer, 5 ml A.dest, 100 μl APS (100 mg/ml mit A.dest), 10 μl Bromphenolblau, 10 μl Temed
Trenngel 10%	7 ml Acrylamid, 7 ml Gelpuffer, 2,5 ml Glycerol, 4 ml A.dest, 200 μl APS (100 mg/ml mit A.dest), 10 μl Temed
TBS-Puffer	10fach: 24,2 g Tris(-Base), 80 g NaCl, A.dest auf 1 L, pH 7,6
Transferpuffer	10fach: 0,25 M Tris(-Base), 1,92 M Glycin, A.dest auf 1 L
LB-Agar	10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl, 5 g Bacto Hefe, 15 g Agar, mit A.dest auf 1 L

Tabelle 7: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller, Ort
2-Merkapto	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
5x Phusion HF Buffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
5x Reaction Buffer BioScript	Bioline GmbH, Luckenwalde, DE
6x Ladepuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE
10x Ligasepuffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
10x NH_4 Reaction Buffer (Phusion)	Finnzymes; Vantaa, Finnland

10x Tangopuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE
Amersham™ ECL™ Western Blotting	GE Healthcare GmbH, Solingen, DE
BioScript	Bioline GmbH, Luckenwalde, DE
Bromphenol Blue Na-salt 15375	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Chloroform reinst	Merck KGaA, Darmstadt, DE
CIAP (calf intestine alkaline phosphatase)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE
complete, proteinase inhibitor cocktail	Roche GmbH, Mannheim, DE
Cyclosporin A	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
DMSO Dimethylsulphoxide	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
dNTP	Bioline GmbH, Luckenwalde, DE
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, DE
FKS fetal bovine serum	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
GelRed™ Nucleic Acid Stain	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix 0,5 µg/µl	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE
Glycerin	Roth, Karlsruhe, DE
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix	Solis BioDyne, Tartu, EST
HEPES	Roth, Karlsruhe, DE
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Mango Taq DNA Pol	Bioline GmbH, Luckenwalde, DE
Methanol	Merck, Darmstadt, DE
MgCl ₂ (50 mM)	Bioline GmbH, Luckenwalde, DE
Nembutal	Fagron GmbH & CO., Barsbüttel, DE
Paraformaldehyd PFA	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Phusion® F530S DNA Pol	Finnzymes, Vantaa, FIN
Proteinmarker Dual Color	Bio-Rad, München, DE
Random Hexamer Primer	Bioline GmbH, Luckenwalde, DE
RiboLock Rnase Inhibitor	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe, DE
T4 Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
Temed	Bio-Rad, München, DE
Triton X 100	Merck, Darmstadt, DE
Trizol peqGOLD TriFast™ 30-2010	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Tween	SERVA GmbH, Heidelberg, DE

Tabelle 8: Enzyme, Bakterien

Bezeichnung	Hersteller, Ort
EcoRI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE
XhoI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE
E.coli TOP10	Invitrogen Life Technologies GmbH
E.coli Rosetta	Merck Millipore

Tabelle 9: Feste Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessischen Oldendorf, DE
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bacto Agar	Becton Dickson, New Jersey, USA
Bacto Hefe	Becton Dickson, New Jersey, USA
Bacto-Trypton	Becton Dickson, New Jersey, USA
BSA	ICN Biomedicals, Ohio, USA
complete protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, DE
Dynabeads® Protein G	Invitrogen, Darmstadt, DE
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Milch (Difco™ Skim Milk)	Becton Dickson, New Jersey, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Ponceau S	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Sucrose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
TEA	Merck, Darmstadt, DE
Tris/Base	Merck, Darmstadt, DE
Tris/HCL	Merck, Darmstadt, DE

Tabelle 10: Kits

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Agarosegeleextraktion	Invisorb® Spin Plasmid Mini Two, Stratec Molecular
Dynabeads Antibody Coupling Kit	Invitrogen, Darmstadt, DE
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Plasmidpräparation -Mini	Invisorb® Spin Plasmid Mini Two, Stratec Molecular

Tabelle 11: Materialien

Bezeichnung	Bezeichnung/Größe, Hersteller, Ort
Deckgläser Zellkultur	12 mm, Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda Königshofen, DE
Eppendorf Reaktionsgefäße	0,5 ml/1,5 ml/2 ml, Sarstedt, Nümbrecht, DE
Falcon Gefäße	15 ml/50 ml, Falcon Becton Dickson Labware, New Jersey, USA
Folie für qPCR Platten	MicroAmp® optical adhesive film, Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Glasplatten für SDS-Page	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Nitrocellulosemembran	Porablot NCP , 0,45 µm 741280 ; Machery-Nagel, Düren, DE
Objektträger	Super Frost®Plus, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
PCR Tubes	Kisker Biotech, Steinfurt, DE
Phase lock tubes 2ml	5 PRIME, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	10 µl/200 µl/100 µl, Sarstedt, Nümbrecht, DE
qPCR 96Well Platten	MicroAmp® Fast optical 96Well Plate, Applied Biosystems, Darmstadt, DE
radiographischer Film	Fujifilm Medical X-Ray Film 100NIF 4.7410 19236 FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, DE
Whatman-Paper (Gel-Blotting-Papier)	Gel Blotting Paper GB005; Roth, Karlsruhe, DE
Zellkultur Flasche 75cm ²	Falcon Becton Dickson Labware, New Jersey, USA
Zellkultur Petrischalen	10cm, Falcon Becton Dickson Labware, New Jersey, USA
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE

2.1.6 Geräte und Software

Tabelle 12: Geräte

Bezeichnung	Bezeichnung/Größe, Hersteller, Ort
Asys Expert 96	Spectrophotometer, Anthos Mikrosysteme GmbH, DE
Brutschrank Zellkultur	Hera Cell 150, Heraeus, Hanau, DE
Kryomikrotom	Leica CM 3050S, Leica, Wetzlar, DE
Elektrophoresegerät (Agarose-Gel)	Pharmacia LKB GPS 200/400, Amersham Pharmacia, Freiburg, DE
Elektrophoresegerät (SDS Gel)	Bio-Rad Power Pac 2.1, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Filmentwickler	Agfa Curix 60, PMA Bode, Hamburg, DE

Heizblock	Thermomixer comfort Eppendorf 1,5ml 90W, Eppendorf AG, Hamburg, DE
Leica Fluoreszenzmikroskop	Leica DMRB, Wetzlar, DE
LSM 5 Exciter	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, DE
NanoPhotometer	Implen GmbH, München, DE
PCR Cycler	Primus 96 plus, MWG Biotech AG, Ebersberg, DE
pH-Meter	Knick 766 Calimatic, Knick, Berlin, DE
Real-time Cycler	7900 Fast, Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Roller-Rad	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DE
Schwenktisch	Biometra GmbH, Göttingen, DE
steriler Arbeitsplatz Zellkultur	Hera Safe HS 12/2, Heraeus, Hanau, DE
Tischzentrifuge	Micro 200R Typ 2405, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE
Ultra Turrax	Heidolph DIAX 600
Ultraschall-Homogenisator	Bandelin Sonopuls GM 70, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Waage	BP210S, Sartorius, Göttingen, DE

Tabelle 13: Software

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Auswertung von Sequenzen	BLAST	NCBI
Auswertung von Sequenzierungen	Chromas 2.01	Technelysium Pty Ltd
Densitometrie von Western Blots	Alphamager	Biozym
Geldokumentation	Alphamager	Biozym
Konfokalmikroskopie	Zen Version 8	ZEISS
Primerdesign	Primer-Blast	NCBI
Statistik	Excel	Microsoft

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1.1 Proteinisolierung aus Maus- und Rattennieren und Zelllinien

Für die Nierenentnahme wurden die Tiere mit Isofluran betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Nach der Entnahme wurden die Nieren entweder im Ganzen oder in Medulla und Cortex getrennt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Später wurden sie im Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff fein zerrieben, im Homogenisierungspuffer auf Eis aufgetaut, mit Ultraschall behandelt (3 x 3 Impulse) und zentrifugiert (10 min, 1000 x g). Die Proteinfraction befand sich dann im Überstand.

Um die Proteine aus kultivierten Zellen zu isolieren wurden die Zellen von den Petrischalen nach dem Waschen mit PBS mit einem Zellschaber in 200 μl Igepal- oder Homogenisierungspuffer abgekratzt und wie oben beschrieben weitergeführt.

2.2.1.2 Proteinbestimmung

Der Proteinanteil in jeder Probe wurde photometrisch (Asys Expert 96, MikroWin2000) in Dreifachbestimmung mittels der Bicinchoninsäure-(BCA)-Methode quantifiziert. Dabei kam eine Eichreihe aus BSA in 10 Schritten von 2 bis 0 mg/ml zum Einsatz. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

2.2.1.3 SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion

Die Proben wurden mit Homogenisierungspuffer auf eine Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein eingestellt und mit 1x Laemmli-Puffer versetzt. Zur Denaturierung wurde dieses Gemisch 15 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden je 20 μl pro Probe in die Geltaschen gefüllt. Proteine wurden dann während der Gelelektrophorese im 10%igen Trenngel (Tabelle 6) der Größe nach aufgetrennt. Der anschließende Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in der BioRad Blotkammer im Transferpuffer über 90 min bei 100 V. Für den immunologischen Nachweis wurden freie Bindungsstellen der Membran, abhängig vom Antikörper, 30 bis 60 min in Blockierlösung (Tabelle 14) abgesättigt. Es folgten Inkubationen der Membran mit spezifischen Primärantikörpern (Tabelle 3), verdünnt in der entsprechenden Blockierlösung und die Inkubation über Nacht bei 4°C . Am nächsten Tag wurde die Membran mit den entsprechenden Puffern (Tabelle 14) dreimal gewaschen und mit

passenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tabelle 4) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal gewaschen. Die Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgte durch die Inkubation der Membran mit ECL-Lösung. Diese bewirkt über Katalyse durch HRP die Entstehung von Chemilumineszenz, die durch Auflegen eines lichtsensitiven Films zu einer lokalen Belichtung führt. Die belichteten Bereiche erscheinen schwarz. Die Entwicklung erfolgte automatisch im Agfa Curix 60.

Zum Auswerten der Intensität der Proteinbanden wurde der Filmstreifen digitalisiert und die Pixeldichte einzelner Banden durch die Alpha Ease FC 4.0 Software (Alpha Innotech Corporation) densitometrisch erfasst und vom Hintergrund abgezogen (s. 2.2.6). Anschließend erfolgte mit diesen Daten eine statistische Auswertung mit Hilfe von Microsoft Excel.

Tabelle 14: Verwendete Blockierlösungen und Waschpuffer für einzelne Antikörper

Antikörper	Blockierlösung und Antikörperverdünnung	Waschpuffer
SPAK	1x TBS, 0,1% Tween-20, 5% Difco™ Skim Milk 1x TBS, 0,1% Tween-20, 5% BSA	1x TBS/T 0,1%
CnAβ	3% Difco™ Skim Milk in PBS	1x PBS/T 0,05%
alle restlichen	5% Difco™ Skim Milk in PBS	1x PBS/T 0,5%

2.2.1.4 Co-Immunpräzipitation

Für den Nachweis der Protein-Interaktion zwischen NKCC2 mit CnAβ, SORLA mit CnAβ und Clathrin mit NKCC2 und CnAβ, wurden zunächst 5 mg der magnetischen Dynabeads® jeweils mit 5 µg des NKCC2-Antikörpers (Isotyp Meerschweinchen), des SORLA-Antikörpers (Isotyp Ziege) oder des Clathrin-Antikörpers (Isotyp Maus) kovalent gebunden (*crosslinking*). Als Kontrolle dienten unspezifische IgG-Antikörper vom selben Isotyp und in der gleichen Konzentration wie der spezifische Antikörper (Tabelle 3). Die Durchführung erfolgte mit dem Dynabeads® Antibody Coupling Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben.

Die für den Versuch entnommenen Rattennieren wurden im eiskalten Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer) aufgenommen und zuerst mittels UltraTurrax, dann mittels Ultraschall homogenisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 1000 x g wurde

der Überstand abgenommen und je 40 µg/µl des Proteinhomogenats auf die mit IP-Puffer gewaschenen Beads gegeben und über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 20 µl des Lysats aufgehoben und mit 1x Laemmli-Puffer versetzt. Die magnetischen Beads wurden mit kaltem IP-Puffer und aufsteigender Salzkonzentration (150, 300 und 450 mM NaCl) 5 x je 5 min gewaschen und anschließend mit je 30 µl 1x Laemmli-Puffer eluiert. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. Die Auswertung der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion. Die Ergebnisse der Bindungsstudien wurden durch wiederholte Experimente mit neuen Beads bzw. mit den gleichen Beads nach einem etablierten Reinigungsprotokoll für die erneute Verwendung verifiziert. Die Abbildungen im Ergebnissteil zeigen repräsentative Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationen unter Verwendung von frischen Beads.

2.2.1.5 Expression und Affinitätschromatographie von GST-Fusionsproteinen

Für die Überexpression vom zytoplasmatischen C-Terminus von SORLA wurden *E.coli* Rosetta Zellen (Merck Millipore) mit dem pGEX-6P-1-SORLA-Expressionsplasmid sowie dem pGEX-6P-1-Leerplasmid transformiert und in 300 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Nachdem die Bakteriensuspension die optische Dichte von 0,5 erreicht hatte, wurde 20 µl von 1 M IPTG (Isopropyl-1-thio-β-DGalactopyranosid) hinzugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht schüttelnd inkubiert. Die beiden Flüssigkulturen wurde jeweils in zwei 50 ml Falkons 10 min bei 4500 x *g* zentrifugiert. Das jeweilige Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Die Pellets einer Flüssigkultur wurden in je 5 ml 1x Glutathion-S-Transferase (GST)-Puffer (Tabelle 6) resuspendiert und zusammengeführt. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte im Puffer mit 1 mg/ml Lysozym, 1% (v/v) Triton® X-100 und 2 Units DNaseI für 1 h bei Raumtemperatur und anschließendem Ultraschall (2x 3 Impulse; Cycle: 70). Zellreste und unlösliche Bestandteile wurden nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 x *g* und 4°C entfernt. Anschließend folgte die affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinant hergestellten Proteine. Das Bakterienlysate wurde mit 250 µl Pierce Glutathion Magnet Beads (Thermo Fisher Scientific Inc.) versetzt. Während der Inkubation über Nacht bei 4°C konnte die Glutathion-S-Transferase der Fusionsproteine an das Glutathion auf den Beads binden. Anschließend wurden die Beads mit den gebundenen rekombinanten Proteinen dreimal mit GST-Puffer gewaschen, um unspezifische Proteine zu entfernen.

2.2.1.6 GST-pulldown

Für den GST-pulldown wurden beide Rattennieren (insgesamt drei unabhängige Versuche) in GST-Puffer mit 1% (v/v) Triton® X-100 und EDTA-freiem Protease-Inhibitor mittels Ultra Turrax homogenisiert. Nach der Ultraschallbehandlung wurde das Homogenat zentrifugiert (1000 x g, 10 min, 4°C). Je 1 ml des erhaltenen Proteinlysats wurde auf die Beads mit daran gebundenen Fusionsproteinen (GST-gekoppeltes C-Terminus von SORLA; Kontroll-GST-Proteine) gegeben und über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat abgenommen und die jeweiligen Glutathion *magnetic beads* mit GST-Puffer sowie mit GST-Puffer unter Zusatz von 500 mM NaCl gewaschen. Anschließend wurden die Proteinkomplexe mit 45 µl 1x Laemmli eluiert. Mittels SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion wurden die Eluate analysiert.

2.2.2 Immunfluoreszenz und Mikroskopie

2.2.2.1 Immunhistochemie

Zur morphologischen Untersuchung wurden die Versuchstiere zunächst einer Perfusion über die *Aorta abdominalis* unterzogen, wie in *Bachmann et al.* (1992) beschrieben. Die Fixierung erfolgte mittels 5-minütiger Perfusion mit 3%-igem Paraformaldehyd (PFA) und 4%-iger Hydroxyethylstärke in 0,1 M Cacodylat-Sucrose-Puffer (pH 7.4) bei einem konstanten Druck von 1,8 m Wassersäule. Die Perfusionsfixierungen wurden von Dr. Mutig oder Prof. Bachmann durchgeführt. Durch diese Prozedur wird das Kollabieren der Nierentubuli verhindert und damit eine naturnahe Gestalt der Niere bewahrt. Nach der Entnahme der perfusionsfixierten Nieren wurden diese zum Gefrierschutz bei 4°C in einer 800 mosmol Sukrose/PBS-Lösung über Nacht inkubiert. Danach wurde das Gewebe mit auf -90°C gekühltem 2-Methylbutan schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Gefriermikrotoms geschnitten (7 µm dünne Schnitte). Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Die Gefrierschnitte von WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen wurden in einer 0,5% Triton-X100/PBS-Lösung für 30 min inkubiert. Vor der Zugabe des spezifischen Primärantikörpers wurden freie Bindungsstellen auf den Schnitten durch 5 % Milch als Blockierlösung über 30 min abgesättigt. Der spezifische Primärantikörper wurde für 1 h

bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht auf den Schnitten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit einfacher PBS-Lösung wurde mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern (Tabelle 4) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellkerne anschließend mit DAPI markiert. Es wurden überwiegend Doppelmarkierungen zur Kolokalisation der zu untersuchenden Proteine durchgeführt.

2.2.2.2 Immunzytochemie

Die Zellen auf den Deckgläschen wurden in 3% PFA/PBS-Lösung für 10 min bei 4°C fixiert. Nach dem Spülen der Deckgläschen mit einfacher PBS-Lösung wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf den Zellen mit 5% Milchpulver/PBS-Lösung 30 min lang abgeblockt. Im Anschluss wurde der spezifische Primärantikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit einfacher PBS-Lösung wurde der fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zellkerne wurden mit DAPI markiert.

2.2.2.3 Konfokalmikroskopie

Die Detektion der Fluorophore erfolgte durch ihre Anregung mit definierter Wellenlänge (Tabelle 15) am konfokalen Laserrastermikroskop (LSM 5 Exciter von Zeiss). Mit dem 40x-Objektiv (EC Plan-NEOFLUAR 40x/1,3 Oil DIC $\infty/0,17$) wurden einzelne optische Schnitte im sequenziellen Verfahren mit den in der Tabelle 15 aufgeführten Emissionsfiltern aufgenommen. Aufnahmen von Experiment- und Kontrollgruppen erfolgten mit den gleichen Parametern, so dass die Vergleichbarkeit gewährleistet war. Die Auswertung erfolgte mittels ZEN Software (Zeiss) von Experiment- und Kontrollgruppen aus derselben Versuchsreihe. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Für die Auswertung der Kolokalisation zweier Fluoreszenzsignale wurden pro Tier jeweils 15 Tubuli aus insgesamt 4 Aufnahmen von Einzelebenen mit ZEN Software markiert und analysiert. Der Hintergrund (*Threshold*) wurde vorher im Streudiagramm (*Scatter diagram*) mit den so genannten *Crosshairs* über die jeweils einzeln aufgenommenen Kanäle (543 nm und 488 nm) festgelegt. Nach der Markierung der einzelnen Tubuli konnte der jeweilige Kolokalkisationskoeffizient in einer Tabelle abgelesen und in Prozent umgerechnet werden.

Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgte ebenfalls mittels der ZEN Software von Zeiss. Bei Experimenten an kultivierten raTAL-Zellen wurden je 3 Bilder (n=20 Zellen)

von Einzelebenen pro Experiment ausgewertet. Dabei wurde ein linearer Bereich von 5 μm über die laterale Zellregion in die Auswertung einbezogen. Als Referenz für den Hintergrund wurden zellfreie Bereiche verwendet (5 Markierungen pro Bild). Die gemittelten Hintergrundswerte wurden von gemittelten Signalintensitäten subtrahiert.

Bei Nierenschnitten wurde der lineare Auswertungsbereich quer über den gesamten Tubulus gelegt, so dass die Signale in der Apikalregion der Zelle zweimal pro Tubulus erfasst wurden (je $n=15$ Tubuli pro Tier). Hierbei wurden die apikalen Signale zusätzlich mit je einem Marker (1 μm) versehen, so dass die markierten Peaks der Signalintensitäten sowohl in einem Diagramm als auch in einer Tabelle abgelesen werden konnten. Auch die Hintergrundsignale wurden über den jeweiligen Zellkern markiert und abgelesen. Der Hintergrund wurde anschließend vom Signal subtrahiert und die Mittelwerte der Signale wurden statistisch analysiert.

Tabelle 15: Angabe der Wellenlängen zur Anregung der Fluorophore

Fluorophor	Extinktion	Emission	Emissionsfilter
Cy 2	488 nm	520 nm	HFT: 405/488/543/633; NFT: 545; BP: 505-530
Cy 3	543 nm	560 nm	HFT: 405/488/543/633; NFT: 545; LP: 560
Cy 5	633 nm	650 nm	HFT: 405/488/543/633; NFT: 545; LP: 650
DAPI	405 nm	420 nm	HFT: 405/488/543/633; NFT: 490; BP: 420-480

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolation aus Mausgewebe

Eine Skalpellspitze des gemörserten Mausnierengewebes (ca. 30 mg) wurde mit 500 μl Trizol versetzt. Die RNA-Isolierung erfolgte durch Phenol-Chlorophorm-Extraktion in *Phase-lock-gel*-Gefäßen entsprechend den Herstellerangaben von 5 PRIME GmbH. Die RNA wurde nach der Elution in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 cDNA Synthese

Die Konzentration der RNA wurde mittels eines Nanophotometers (Implen) bei 260 nm bestimmt. Für die cDNA Synthese wurden 1 μg RNA mit Random Hexamer Primern

(0,4 µl) und mit RNase freiem Wasser auf 12 µl Gesamtvolumen versetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 70°C und anschließender Inkubation auf Eis wurde zu jeder Probe 7,5 µl Mastermix hinzugefügt (0,25 µl RNase Inhibitor RiboLock, 0,25 µl BioScript Polymerase, 2 µl RNase freies Wasser, 1 µl dNTPs und 4 µl BioScript-Pufferlösung). Die Proben wurden 2 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert und die Reaktion schließlich durch 10 minütiges Erhitzen bei 70°C abgestoppt. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *real-time*-PCR (qPCR)

Für die qPCR wurde die cDNA von je 7 WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen hergestellt. Ein Mastermix, bestehend aus verdünnten spezifischen Primern (Tabelle 16), EvaGreen® (5xHOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)) und nukleasefreiem Wasser, wurde vorbereitet. Die vorab 1:10 verdünnte cDNA wurde jeweils in eine 96-Well-Platte vorgelegt (je 10 µl; jede Probe wurde dreifach bestimmt) und mit je 10 µl Mastermix versetzt. GAPDH (Tabelle 17) diente zur Kontrolle für jede Probe. Als Negativkontrolle fungierte der Ansatz mit den spezifischen Primern ohne cDNA. Die Kontrollen unterlagen ebenfalls einer Dreifachbestimmung. Die 96-Well-Platte wurde im Fast 7900 Cycler (Applied Biosystems) gemessen (Tabelle 18) und mit der SDS2.1 Software analysiert. Unspezifische Amplifikation konnte mit einem darauffolgenden Dissoziationslauf (Analyse der Schmelztemperatur der Produkte) ausgeschlossen werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, auf GAPDH normalisiert.

Die Effizienz der Primer wurde vorab mit verschiedenen c-DNA-Konzentrationen von Wildtyp-Proben überprüft.

Tabelle 16: Verwendete Primer für qRT-PCR

Richtung	Sequenz
CnAβ fw	gcaacatgaatgcagacacc
CnAβ rev	caaggggcaagctgcaaaag
FL-SPAK fw	tgccagacgagatggatga
FL-SPAK rev	ccacagctcatcttgacca
KS-SPAK fw	gcactgcctggaggttatgt
KS-SPAK rev	tgtggctaagaatgcgctta

Tabelle 17: Verwendete GAPDH Primer

Richtung	Sequenz
forward	tgaccaccaactgcttagc
reverse	ggcatggactgtggctatgag

Tabelle 18: qPCR-Programm

Temperatur	Zeit	Wiederholung
50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15 sec	44 Zyklen
60°C	1 min	

2.2.3.4 Klonierung

Für den Nachweis der Interaktion zwischen dem zytoplasmatischen Teil von SORLA und CnA β wurde zunächst aus dem pEYFP-SORLA Plasmid (T. Willnow) der C-Terminus von SORLA durch die spezifischen Primer (Tabelle 19) im PCR-Ansatz amplifiziert (Tabelle 20 und 21). Das Amplifikat (50 μ l) wurde auf ein 1,5% Agarose-Gel, versetzt mit GelRed®, aufgetragen. Die Produktgröße betrug 280 bp.

Tabelle 19: SORLA Primer

Richtung	Sequenz
forward	tatatagaattctctacggatgttgctgctgtgg
reverse	tatatactcgagctagtgaggaaagctcttc

Tabelle 20: Touchdown PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Wiederholung
98°C	30 sec	
98°C	10 sec	3 Zyklen
61°C	45 sec	
72°C	3:15 min	
98°C	10 sec	3 Zyklen
59°C	45 sec	
72°C	3:30 min	
98°C	10 sec	3 Zyklen
57°C	45 sec	
72°C	3:45 min	
98°C	10 sec	33 Zyklen
55°C	45 sec	
72°C	4 min	
72°C	10 min	
4°C	halten	

Tabelle 21: Einfacher PCR-Ansatz

Reagenz	Menge in µl
MilliQ	29,5
5x Phusion HF buffer	5
10x Invitaeq buffer	2,5
DMSO	1,5
MgCl ₂ (50mM)	2
dNTPs	2
Taq DNA Polymerase	1
Phusion Polymerase	0,5
Primer F und R	je 2,5 µl
Template	1

Für weiteres Vorgehen wurde die DNA aus den Banden mit Hilfe des Spin DNA Extraction Kit (Invisorb®) nach Herstellerangaben isoliert und in 45 µl MilliQ-Wasser eluiert. Das aufgereinigte SORLA Insert (40 µl) und der GST-Vektor pGEX-6P-1 (3 µl) wurden jeweils mit 10 µl 10x Tango Puffer, 0,5 µl EcoRI Enzym und 0,5 µl XhoI Enzymen versetzt und mit MilliQ-Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Beide Ansätze wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der von den Enzymen geschnittene Vektor mit 0,5 µl CIAP (*Calf intestine alkaline phosphatase*) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die geschnittenen Enden des Vektors waren dadurch dephosphoryliert und damit seine Schließung verhindert. Die restriktionsverdauten Produkte (50 µl) wurden auf ein 1,5% Agarose-Gel aufgetragen, dann aus dem Gel aufgereinigt und in 25 µl MilliQ-Wasser eluiert. Die Produktgröße des Inserts betrug 280 bp und des pGEX-6P-1 Vektors 4985 bp. Das aufgereinigte Insert (13,5 µl) und der Vektor (2 µl) wurden im Ligationsansatz mit 4 µl 5x Ligase Puffer und 0,5 µl T4 Ligase versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis und anschließend 20 min Inkubation bei Raumtemperatur war das pGEX-SORLA-Plasmid verwendungsbereit. Zur Vermehrung des pGEX-SORLA-Plasmids wurden 20 µl mit 100 µl TOP10 kompetente *E.coli* Bakterien vermengt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Gemisch für 45 sec einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt. Nach anschließender Kühlung auf Eis wurden die Bakterien mit 300 µl Antibiotika-freiem LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden

die mit pGEX-SORLA-Plasmid transformierten Bakterien auf eine Ampicillin-haltige LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der auf der Agar-Platte gewachsenen Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden 10 voneinander entfernte Kolonien gepickt und sowohl auf eine mit Sektoren eingeteilte Agarplatte gestrichen, als auch direkt in PCR-Gefäße mit Reaktionsansatz (Tabelle 22) gegeben. Nach dem PCR-Lauf (Tabelle 23) wurden die Amplifikate (20 µl) auf ein 1,5% Agarose-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese analysiert.

Tabelle 22: Einfacher Kolonie-PCR Ansatz

Reagenz	Menge in µl
MilliQ	15
10x Inviteq buffer	1,5
DMSO	0,75
MgCl ₂ (50mM)	0,75
dNTPs	0,15
Taq DNA Polymerase	0,15
pGEX Primer F und R	je 0,75

Tabelle 23: *Touchdown* PCR-Ansatz für Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Wiederholung
95°C	3 min	
95°C	30 sec	2 Zyklen
61°C	45 sec	
72°C	1 min	
95°C	30 sec	2 Zyklen
59°C	45 sec	
72°C	1 min	
95°C	30 sec	2 Zyklen
57°C	45 sec	
72°C	1 min	
95°C	30 sec	33 Zyklen
55°C	45 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	halten	

Die positive Kolonie wurde von der in Sektoren eingeteilten Agarplatte gepickt und in 1,8 ml LB-Medium mit Ampicillinresistenz über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide mit Invisorb® Spin Plasmid Mini Two von Stratec Molecular GmbH nach Herstellerangaben aus den Bakterien isoliert und mit 70 µl MilliQ-Wasser eluiert. 10 µl des aufgereinigten pGEX-SORLA-Plasmids wurden zum Sanger-Sequenzieren gegeben.

2.2.3.5 Überexpression von SORLA in HEK-293 Zellen

Die HEK-293 Zellen wurden in 10 cm Ø Petrischalen bis zu 70% Konfluenz in DMEM mit 5% FKS gezüchtet. Pro Versuch wurden 8 Petrischalen angesetzt. Anschließend wurden 4 Schalen mit je 4 µg pcDNA3-SORLA-WT-Plasmid und die anderen 4 mit je 4 µg des pcDNA3-Kontrollplasmid transfiziert. Das Transfektionsreagenz setzte sich zusammen aus dem jeweiligen Plasmid, 600 µl sterilem PBS und 12 µl JetPEI®. Dieser Mix wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium in den Schalen wurde abgenommen, der Transfektionsmix direkt auf die Zellen gegeben und anschließend mit je 4 ml HEK-Zell-Medium aufgefüllt. Die Zellen wuchsen im Brutschrank über 48 h. Danach wurden sie in 200 µl Igepal-Puffer pro Schale abgekratzt. Im Anschluss folgte die Homogenisierung der Zellen und die Proteinmenge wurde mittels BCA-Methode bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels Western blot. Es wurden sechs unabhängige Experimente durchgeführt und analysiert.

2.2.4 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Zur Bestätigung der Proteininteraktion zwischen SORLA und CnAβ wurden flüssige Proben von Co-Immunpräzipitationen und GST-*pull-down*-Ansätzen massenspektrometrisch analysiert (Kooperation mit V. Jankowski, Charité Berlin). Weil die Methode sehr aufwendig ist, wurde sie zwar nur einmal durchgeführt, jedoch mit Proben von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Die Proben wurden mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat Puffer (pH 7,8) equilibriert. Anschließend wurden diese mit je 0,25 µl Trypsin bei 37°C für 24 h verdaut. Nach der Inkubation wurden die Peptide entsalzt, mit Hilfe eines ZipTipC18 Verfahrens (Millipore, Billerica, USA) aufkonzentriert und auf einer Proben-Platte (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) durch eine α-Cyano-4-Hydroxymizsäure Matrix eluiert. Die

massenspektrometrische Analyse erfolgte mit Hilfe der *Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland). Detektierte Spektren der Peptidfragmente wurden in die Swiss-Prot Sequenz-Datenbank mittels der Hersteller-Software (Bruker Bio-Tools 3.2 und Mascot 2.2) eingefügt und von dieser statistisch ausgewertet.

2.2.5 Versuche mit Cyclosporin A

2.2.5.1 Behandlung der Zellen mit Cyclosporin A

raTAL-Zellen wurden auf Deckgläschen ausplattiert und wuchsen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ bis zu 100% Konfluenz. Ins Medium (Tabelle 2) der Zellen wurden 6 ng/μl Cyclosporin A (CsA) gegeben und 4 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Immunzytochemie. Diese Versuche wurden 3 Mal unabhängig durchgeführt.

2.2.5.2 Behandlung von WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen mit Cyclosporin A

Die Mäuse (je n=8) wurden mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde ihnen intraperitoneal entweder Vehikel (Cremophor) (je n=4) oder Cyclosporin A (30 mg/kg Körpergewicht) (je n=4) injiziert. Nach einer Stunde Behandlung wurden sie erneut narkotisiert und einer Perfusion unterzogen (Bachmann et. al, 1992). Weiterer Ablauf gleicht dem im Abschnitt 2.2.2.1.

2.2.6 Statistik

Die Signalstärken von Proteinbanden wurden mit Hilfe der Alpha Ease FC 4.0 Software (Alpha Innotech Corporation) gemessen. Dazu wurden die Banden eng von einem Rechteck umschlossen. Die darin enthaltene Anzahl von Pixeln wurde registriert und gegen den Hintergrund (bandenfreier Bereich auf dem Blot) verrechnet. Auf diese Weise war auch das Messen von schwachen Signalen möglich. Der jeweilige Messwert pro Bande des Proteins von Interesse wurde gegen den dazugehörigen Wert vom Referenzprotein (β-Aktin oder GAPDH, je nach der Verfügbarkeit der gegen diese gerichteten Antikörper) zwecks Normalisierung der Daten mit Hilfe der Microsoft Excel Software verrechnet. Die Mittelwerte der Kontrollgruppen wurden als Referenz benutzt, die Daten aus den Experimentgruppen wurden darauf bezogen und im Prozentsatz der

jeweiligen Kontrollwerte ausgedrückt. Die Standardabweichungen wurden mittels der Excel Software berechnet und die Signifikanz des jeweils untersuchten Unterschieds zwischen den Gruppen mittels des Student-t-Tests analysiert. p-Werte unter 0,05 galten als signifikant und wurden im Diagramm mit einem Stern über dem Balken versehen. Es wurde stets von der Normalverteilung aller erzeugten Daten ausgegangen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 SORLA

Zur Untersuchung der Rolle von SORLA bei der NKCC2-Regulation wurde die SORLA-defiziente Maus als Modell benutzt.

3.1.1 Lokalisation und Expression von SORLA in der Niere

Für die Bestätigung und Erweiterung von publizierten Daten zur Expression von SORLA in der Niere (Reiche et al., 2002) wurden zunächst immunhistochemische Doppelmarkierungen von SORLA und Markerproteinen für TAL (NKCC2) oder DCT (NCC) auf Kryoschnitten von je vier WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen durchgeführt (Abb. 9). SORLA war in apikalen und perinukleären Bereichen von medullären und kortikalen TAL- sowie DCT-Zellen lokalisiert und zeigte eine partielle apikale Kolo-kalisation mit NKCC2 bzw. NCC. Zudem konnte im NKCC2- und NCC-negativen Sammelrohr ein apikales und perinukleäres SORLA-Signal beobachtet werden, wobei die SORLA-Expression in diesem Segment am stärksten war. Hingegen zeigten der medulläre TAL und der DCT eine moderate SORLA-Expression und im kortikalen TAL konnte lediglich eine schwache SORLA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 9 und 10). Die Spezifität des SORLA-Antikörpers wurde durch Applikation in *Sorla*^{-/-}-Nieren verifiziert. Wie erwartet, produzierte der Antikörper kein signifikantes Signal in *Sorla*^{-/-}-Nieren (Abb. 9).

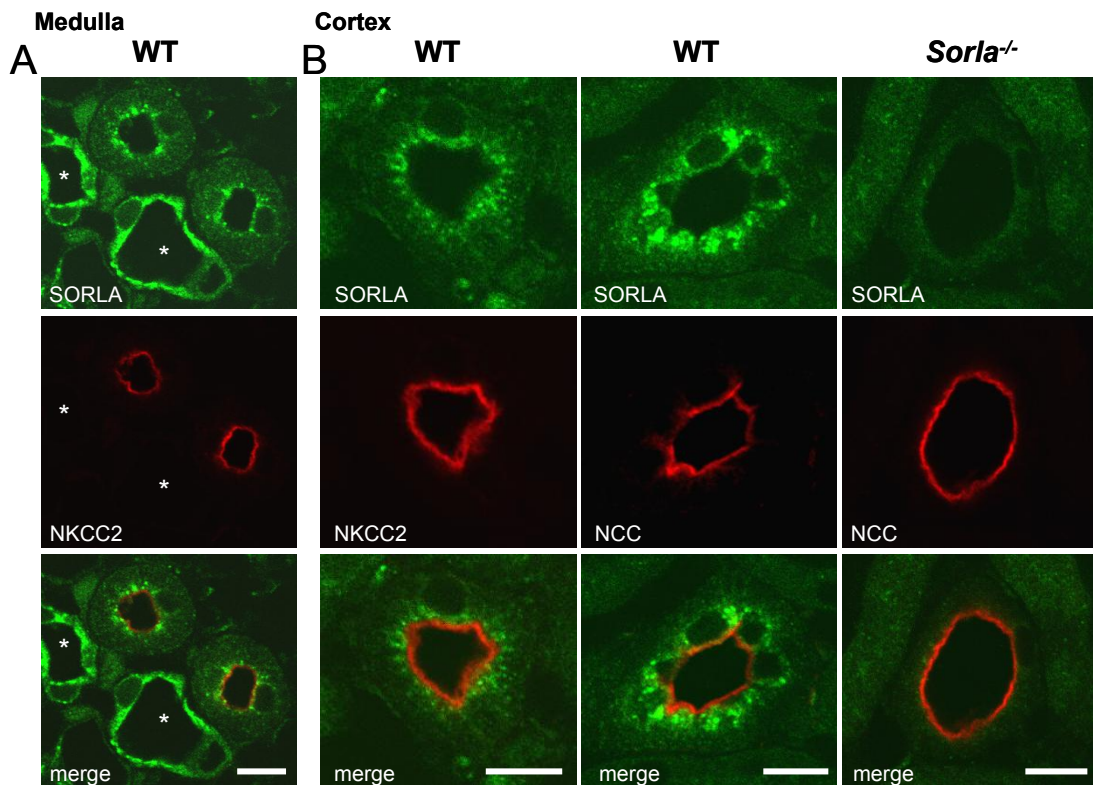


Abbildung 9: Verteilung von SORLA im distalen Nephron und im Sammelrohr. Repräsentative Aufnahmen von WT- und *Sorla*^{-/-}-Mausnieren. A: In der WT-Maus ist SORLA im medullären TAL apikal und perinukleär lokalisiert. Überlagerungen der SORLA- (grün) und NKCC2-Signale (rot) zeigen deren partielle Kolo-kalisation im apikalen Bereich des TAL (merge). Im Sammelrohr (Sternchen) findet sich eine starke SORLA-Expression, sowohl apikal als auch perinukleär. B: SORLA ist im kortikalen TAL und im DCT apikal und perinukleär lokalisiert. In beiden Nephronsegmenten ist SORLA partiell mit NKCC2 bzw. mit NCC kolo-kalisiert (merge). In der *Sorla*^{-/-}-Maus fehlt das Signal für SORLA vollständig. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10 μ m.

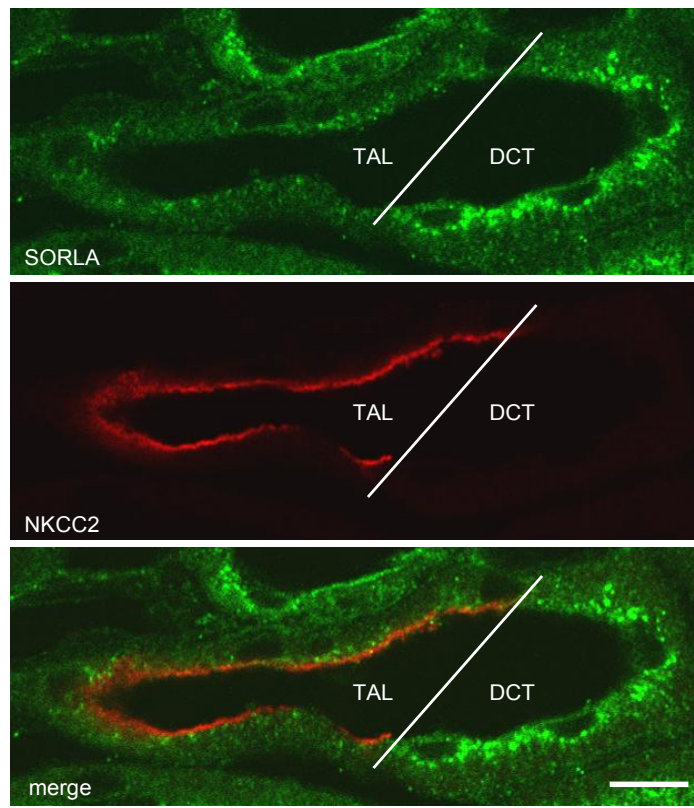


Abbildung 10: Expression von SORLA im kortikalen TAL vs. DCT. Die Doppelmarkierung von SORLA (grün) und NKCC2 (rot) zeigt repräsentativ ein schwaches Signal für SORLA im kortikalen TAL und ein stärkeres Signal im DCT, ermittelt durch den Übergang von TAL zu DCT (weißer Querbalken). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

3.1.2 Auswirkung der SORLA-Defizienz auf die NKCC2-Phosphorylierung und die Gesamtproteinmenge

Die Effekte der SORLA-Defizienz auf die NKCC2-Gesamtproteinmenge sowie auf die Menge des phosphorylierten und somit aktiven Kotransporters wurden zunächst immunhistochemisch untersucht. NKCC2 und seine phosphorylierte Form (pT96/pT101-NKCC2) wurden auf den WT- und *Sorla*^{-/-}-Nierenschnitten mittels spezifischer Antikörper detektiert. Während die Expression und die zelluläre Verteilung von NKCC2 in WT- und *Sorla*^{-/-}-Nieren vergleichbar war, war die Phosphorylierung von NKCC2 im medullären und kortikalen TAL von *Sorla*^{-/-}-Nieren stark reduziert (Abb. 11). Die Präsenz von SORLA ist demnach für die Phosphorylierung von NKCC2 entscheidend.

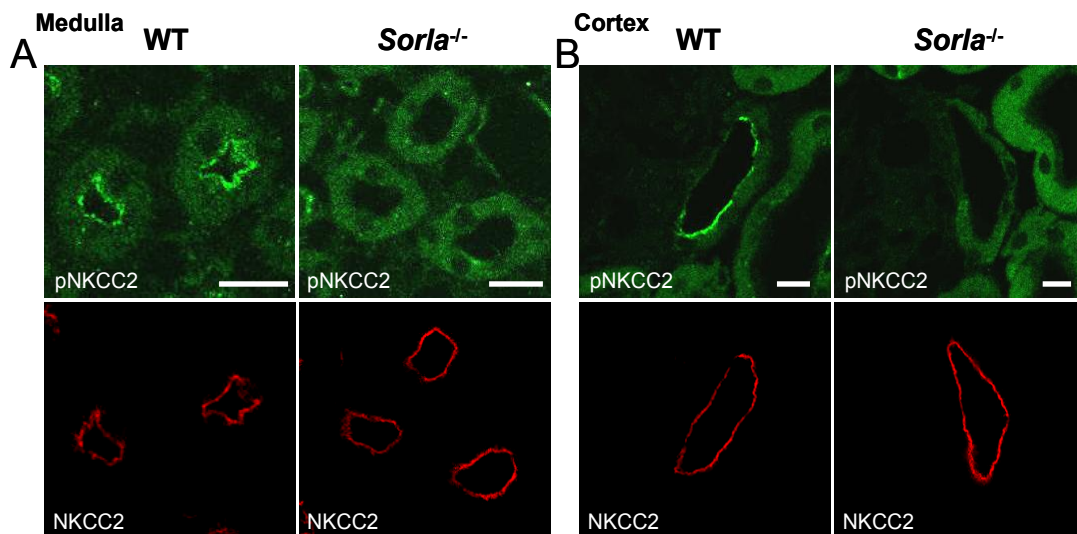


Abbildung 11: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von NKCC2 und phospho-NKCC2 in WT- und *Sorla*^{-/-}-Nieren. A, B: Doppelmarkierungen von NKCC2 (rot) und phospho-(p)-NKCC2 (grün; pT96/pT101-NKCC2) zeigen vergleichbar starke NKCC2-Signale in WT- und *Sorla*^{-/-}-Nieren sowohl in der Medulla (A) als auch im Cortex (B). Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierung des Transporters in *Sorla*^{-/-}-Nieren stark vermindert; die Signale für pNKCC2 fehlen nahezu vollständig (A, B). Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10 µm.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz wurden mittels Western blot von Nierenlysaten von WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen verifiziert und densitometrisch quantifiziert, wobei die SORLA-Defizienz auch mit dieser Methode bestätigt werden konnte (Abb. 12). Da neben dem TAL auch im DCT eine substantielle SORLA-Expression nachgewiesen wurde, wurden die Expression und die Phosphorylierung des mit NKCC2 strukturell verwandten NCC parallel evaluiert. Die Gesamtproteinmengen von NKCC2 und NCC blieben in *Sorla*^{-/-}-Nieren im Vergleich zu WT-Nieren unverändert. Dagegen war die Phosphorylierung von NKCC2 an seinen SPAK- und OSR1-abhängigen Threoninen (pT96/pT101) in *Sorla*^{-/-}-Mäusen um 84% signifikant verringert ($p < 0,05$). Obwohl die Phosphorylierung von NKCC2 am PKA- und AMPK-abhängigen Serin 126 (S126) ebenfalls für seine Aktivität wichtig ist, konnte keine Veränderung der Menge von pS126-NKCC2 in *Sorla*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von NCC am Threonin 58 blieb ebenfalls unverändert.

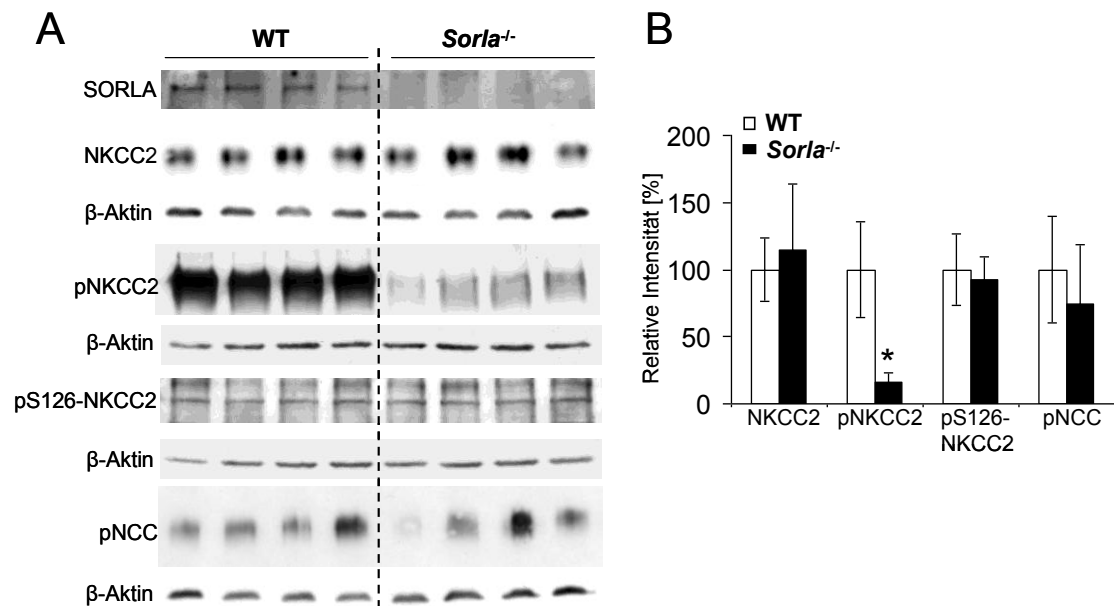


Abbildung 12: Western blot Analyse von NKCC2 und NCC sowie deren phosphorylierten Formen in WT- und *Sorla*^{-/-}-Mausnierenhomogenaten. A: Die SORLA-Defizienz wird mit Hilfe des SORLA-Antikörpers bestätigt. Repräsentative blots zeigen Signale für NKCC2, pT96/pT101-NKCC2, pS126-NKCC2 und pT58-NCC. β-Aktin fungiert als endogene Beladungskontrolle. B: Densitometrische Auswertung der Western blots. Während sich die Gesamtproteinmenge von NKCC2 sowie deren Phosphorylierung an dem PKA- und AMPK-abhängigen S126 zwischen den beiden Tiergruppen nicht unterscheiden, ist die Phosphorylierung von NKCC2 an seinen SPAK/OSR1-abhängigen Threoninen (T96/T101) in *Sorla*^{-/-}-Nieren stark vermindert. NCC und phospho-NCC Signale zeigen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Daten sind Mittelwerte ± SD; *p<0,05. Teile der Abbildung (Blot von SORLA, NKCC2, pNKCC2) wurden publiziert in *Borschewski et al.*, (2015).

Diese Ergebnisse stützen die Bedeutung von SORLA für die Phosphorylierung von NKCC2 an seinen SPAK- und OSR1-abhängigen Phosphoakzeptoren (T96 und T101). Gleichzeitig zeigen die Daten, dass die SPAK- und OSR1-unabhängige aktivierende Phosphorylierung des Transporters (S126) durch die SORLA-Defizienz nicht betroffen ist. Daher ist mit einer Restaktivität des Transporters in *Sorla*^{-/-}-Mäusen zu rechnen. Der strukturell verwandte NCC-Kotransporter des DCT war durch die SORLA-Defizienz ebenfalls nicht verändert.

3.1.3 Auswirkung der SORLA-Defizienz auf die Expression und zelluläre Verteilung der Kinasen SPAK und OSR1

Um herauszufinden durch welche Mechanismen die starke Verringerung der NKCC2-Phosphorylierung an den SPAK- und OSR1-abhängigen Threoninen 96 und 101 in *Sorla*^{-/-}-Mäusen zustande kam, wurden zunächst die Gesamtproteinmengen und die Verteilung der beiden Kinasen in WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen untersucht (Abb. 13, 15). Für die Detektion von SPAK wurde ein C-terminaler Antikörper verwendet, der alle drei renalen SPAK-Isoformen erkennt: FL-SPAK, SPAK 2 und KS-SPAK (McCormick et al., 2011). Da SPAK sowohl im TAL als auch im DCT vorkommt, wurden Medulla und Cortex disseziert und separat analysiert. Dabei ist zu beachten, dass die Medulla einen substanziellen Anteil an TAL, aber keine DCT Segmente enthält, während im Cortex die Masse an DCT über der von TAL dominiert. In der Medulla der *Sorla*^{-/-}-Mäuse waren alle drei SPAK-Isoformen im Vergleich zum WT signifikant verringert (FL-SPAK -67%, SPAK 2 -59%, KS-SPAK -48%; $p < 0,05$), wogegen im Cortex keine Unterschiede bestanden (Abb. 13). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Verminderung der SPAK-Isoformen aufgrund der SORLA-Defizienz auf den TAL beschränkt ist.

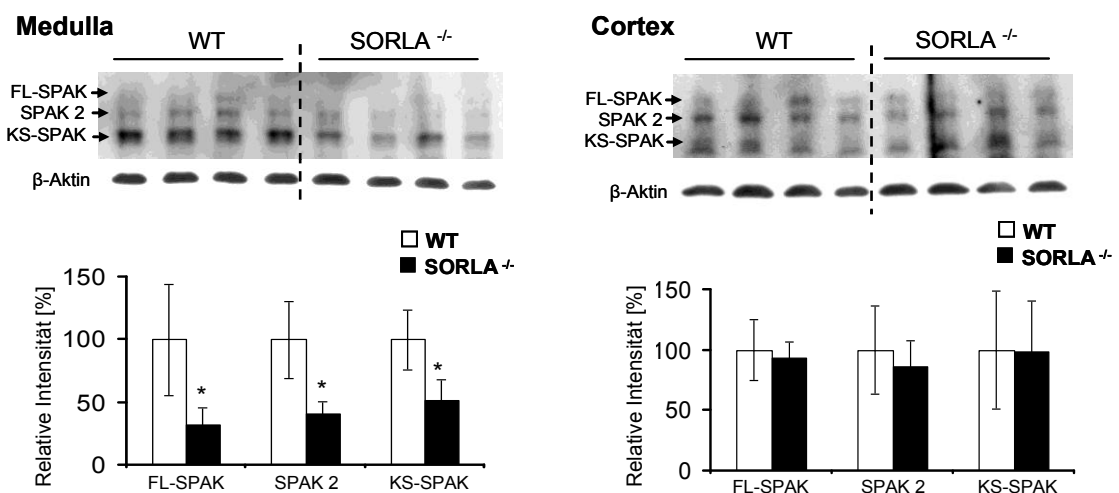


Abbildung 13: Western blot Analyse der SPAK-Isoformen in WT- und *Sorla*^{-/-}-Nierenhomogenaten. Repräsentative blots sind gezeigt. In der Medulla der *Sorla*^{-/-}-Mäuse sind alle drei SPAK-Isoformen signifikant verringert ($p < 0,05$). β -Aktin fungiert als endogene Beladungskontrolle. Die Balkendiagramme zeigen densitometrische Auswertungen der Western blots. Daten sind Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$. Teil der Abbildung (Medulla) wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015).

Mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) wurde anschließend untersucht, ob die Ursache für die verminderten Proteinmengen von FL-SPAK und KS-SPAK in *Sorla*^{-/-}-Mausnieren an verringerter Transkription der Kinase-Isoformen lag (Abb. 14). Hierbei wurden nur die *Splice* Varianten FL-SPAK und KS-SPAK berücksichtigt, da SPAK 2 der FL-SPAK RNA über einen alternativen Translationsstart entstammt. Die mRNA-Expression von FL-SPAK und KS-SPAK war in den Nieren der *Sorla*^{-/-}-Mäuse signifikant verringert (FL-SPAK -21%, KS-SPAK -31%; p<0,05). Dieses Ergebnis zeigt, dass die verminderten Proteinmengen vermutlich auf herabgesetzter Biosynthese durch die Defizienz von SORLA beruhen.

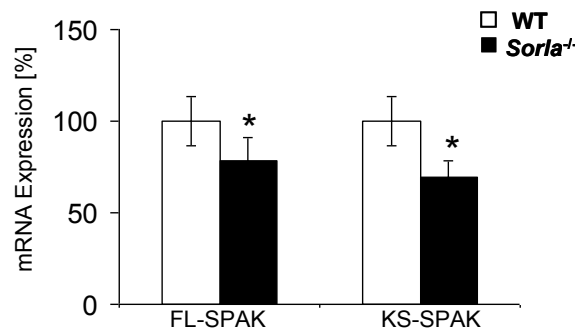


Abbildung 14: qPCR Analyse von FL- und KS-SPAK in Gesamtnierenextrakten von WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen. Die mRNA-Expression von FL-SPAK und KS-SPAK in *Sorla*^{-/-}-Mäusen ist signifikant verringert. Daten sind Mittelwerte ± SD; *p<0,05.

Für die Untersuchung von OSR1 wurde ein Antikörper verwendet, der beide OSR1-Isoformen erkennt: FL-OSR1 und t-OSR1 (Piechotta et al., 2003). Die Bestimmung der Gesamtproteinmengen in WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen wurde mittels Western blot durchgeführt (Abb. 15). Die Expression der beiden OSR1-Isoformen war in den Nieren von WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen gleich.

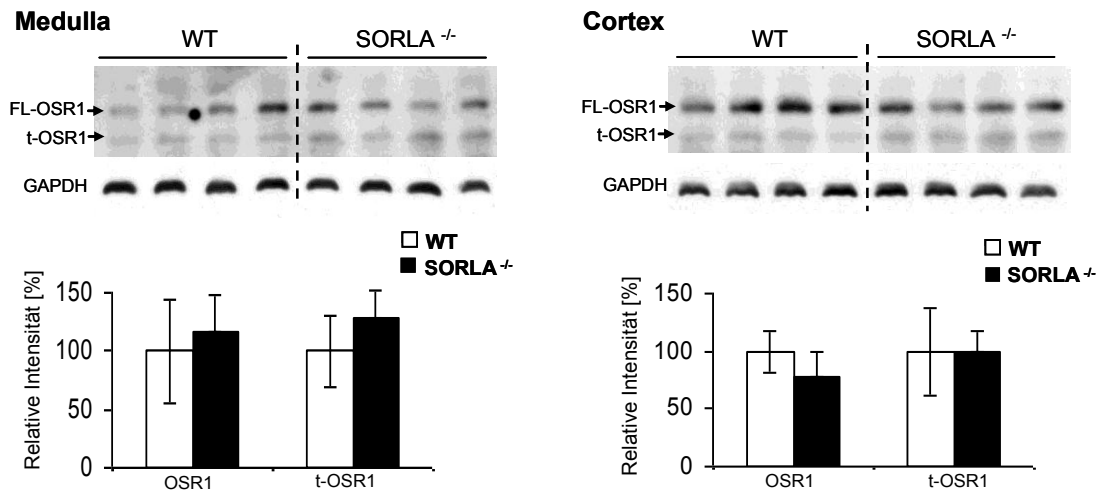


Abbildung 15: Western blot Analyse der OSR1-Isoformen in WT- und *Sorla*^{-/-}-Mausnierenhomogenaten. Repräsentative blots sind gezeigt. Weder in der Medulla noch im Cortex gibt es eine Veränderungen in den Gesamtproteinmengen der OSR1-Isoformen in *Sorla*^{-/-}-Mäusen. GAPDH fungiert als endogene Beladungskontrolle. Die Balkendiagramme zeigen densitometrische Auswertungen der Western blots. Daten sind Mittelwerte ± SD. Teil der Abbildung (Medulla) wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015).

Als nächstes wurden die Lokalisation und die Phosphorylierung von SPAK und OSR1 im medullären und kortikalen TAL immunhistochemisch zwischen den WT- und *Sorla*^{-/-}-Nieren verglichen (Abb. 16, 17). Für den Nachweis von SPAK wurde ein Antikörper gegen den N-terminalen Teil von SPAK verwendet, der selektiv die katalytisch aktive FL-SPAK-Isoform erkennt. FL-SPAK war sowohl in WT- als auch in *Sorla*^{-/-}-Mäusen apikal im medullären und kortikalen TAL mit NKCC2 kolokalisiert. Dabei war das medulläre FL-SPAK-Signal in *Sorla*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT stark verringert, während im kortikalen TAL die Intensitäten des FL-SPAK-Signals in den beiden Genotypen vergleichbar waren (Abb. 16). FL-OSR1 wurde apikal im medullären und kortikalen TAL in WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen lokalisiert. Sowohl die medullären als auch die kortikalen Signalintensitäten von FL-OSR1 waren in *Sorla*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT nicht verändert (Abb. 17). Die konfokale Auswertung der zellulären Verteilung der beiden Kinasen im medullären TAL zeigte einen vergleichbaren Grad von deren Kolokalisation mit NKCC2 in WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen (Abb. 18). Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse aus der Western blot Analyse und weisen darauf hin, dass das zelluläre *Trafficking* von FL-SPAK und FL-OSR1 bei der SORLA-Defizienz nicht betroffen ist.

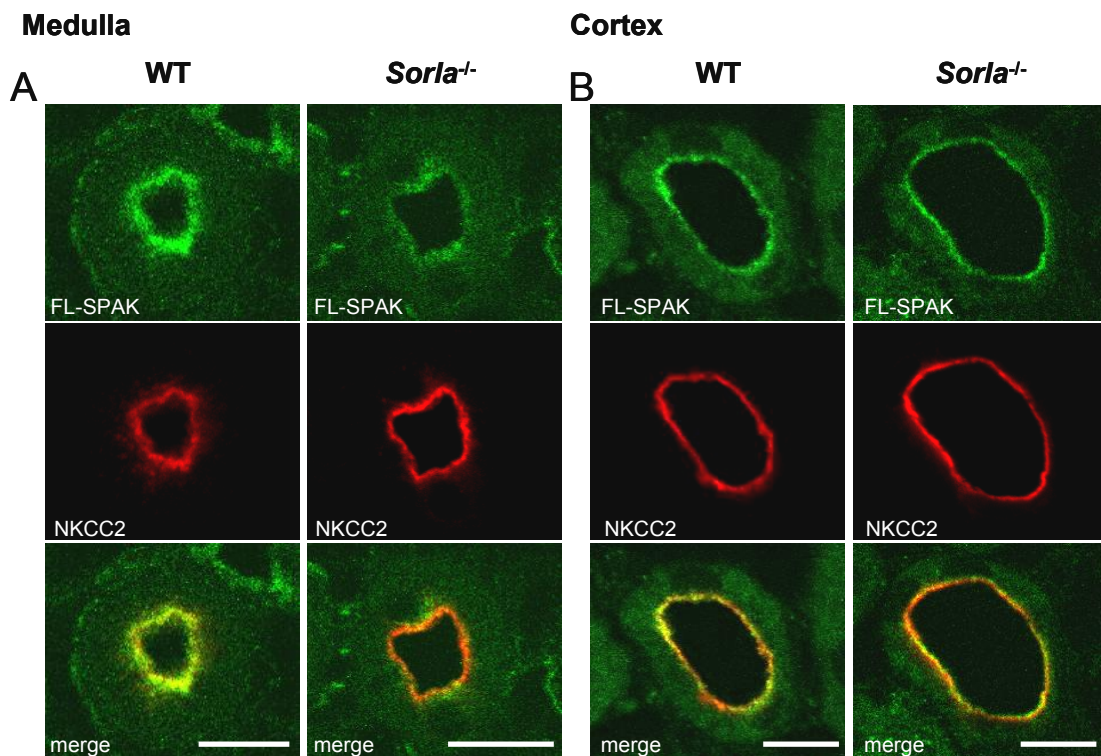


Abbildung 16: Zelluläre Verteilung von FL-SPAK im medullären und kortikalen TAL der WT- und *Sorla*^{-/-}-Mausnieren. Repräsentative Aufnahmen sind hier gezeigt. A, B: Doppelmarkierung von FL-SPAK (grün) und NKCC2 (rot) zeigt sowohl im medullären (A) als auch im kortikalen TAL (B) eine unveränderte apikale Kolokalisation von FL-SPAK mit NKCC2 (merge). A: In der Medulla ist die Signalstärke von FL-SPAK in den *Sorla*^{-/-}-Nieren im Vergleich zu WT-Nieren verringert. B: Im Cortex gibt es keinen nennenswerten Unterschied bezüglich der Signalstärke von FL-SPAK zwischen WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10 μm .

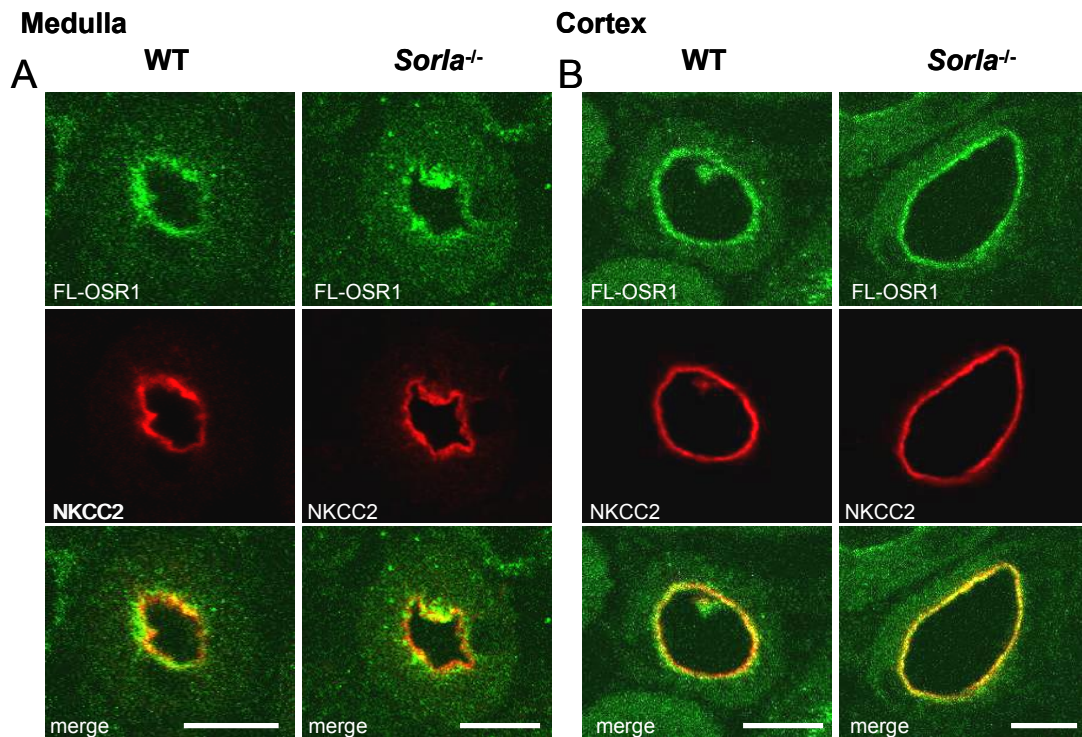


Abbildung 17: Zelluläre Verteilung von FL-OSR1 im medullären und kortikalen TAL der WT- und *Sorla*^{-/-}-Nieren. Repräsentative Aufnahmen sind gezeigt. A, B: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von FL-OSR1 (grün) und NKCC2 (rot) zeigt im medullären (A) und im kortikalen TAL (B) eine unveränderte apikale Kolo­kalisierung von FL-OSR1 mit NKCC2 (merge). Zudem ist sowohl in der Medulla als auch im Cortex die Signalstärke von FL-OSR1 zwischen WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen gleich. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10 µm.

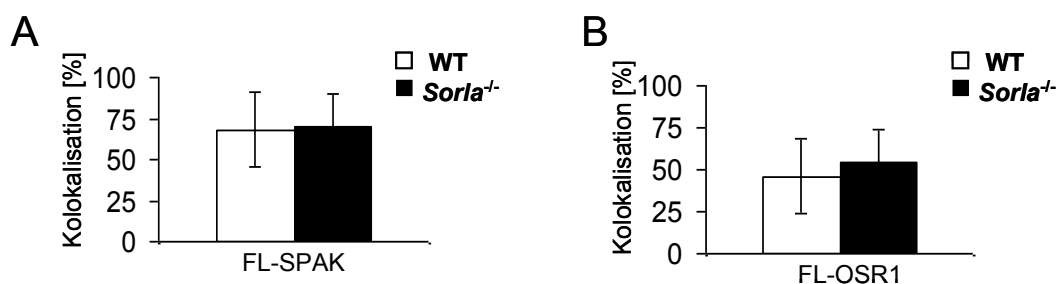


Abbildung 18: Auswertung der Kolo­kalisierung von FL-SPAK und FL-OSR1 mit NKCC2. Die Quantifizierung der apikalen FL-SPAK (A) und FL-OSR1 (B) Immunfluoreszenzsignalen mittels ZEN-Software von Zeiss zeigt für beide Produkte eine unveränderte Kolo­kalisierung mit NKCC2 im medullären TAL der WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäuse. Daten sind Mittelwerte ± SD.

Die Aktivität der SPAK- und OSR1-Kinasen hängt wesentlich von der Phosphorylierung ihrer katalytischen (Threonin 243 bei SPAK, Threonin 185 bei OSR1) und

regulatorischen (Serin 383 bei SPAK, Serin 325 bei OSR1) Domänen ab (Rafiqi et al., 2010; Vitari et al., 2005). Daher wurde als nächstes die Phosphorylierung der Kinasen zwischen WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen mittels Immunfluoreszenz verglichen (Abb. 19). Aufgrund der hohen Konservierung der Phosphoakzeptorstellen erkennen die hier verwendeten Antikörper jeweils die beiden homologen Kinasen. Daher werden die Kinasen in Abb. 19 zusammen aufgeführt. Die konfokale Auswertung der pT243-SPAK/pT185-OSR1- und pS383-SPAK/pS325-OSR1-Signale ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich deren Intensitäten oder deren zellulärer Lokalisation zwischen WT- und *Sorla*^{-/-}-Nieren (Abb. 19 A, B). Die Kollokalisierung von pT243-SPAK/pT185-OSR1 mit NKCC2 betrug in SORLA-defizienten Mäusen 40% und war somit mit dem Ergebnis aus den WT-Mäusen (43%) vergleichbar. Ebenso war die Kollokalisierung von pS383-SPAK/pS325-OSR1 mit NKCC2 in *Sorla*^{-/-}-Mäusen (68%) im Vergleich zu WT-Mäusen (71%) nicht verändert (Abb. 19 C, D).

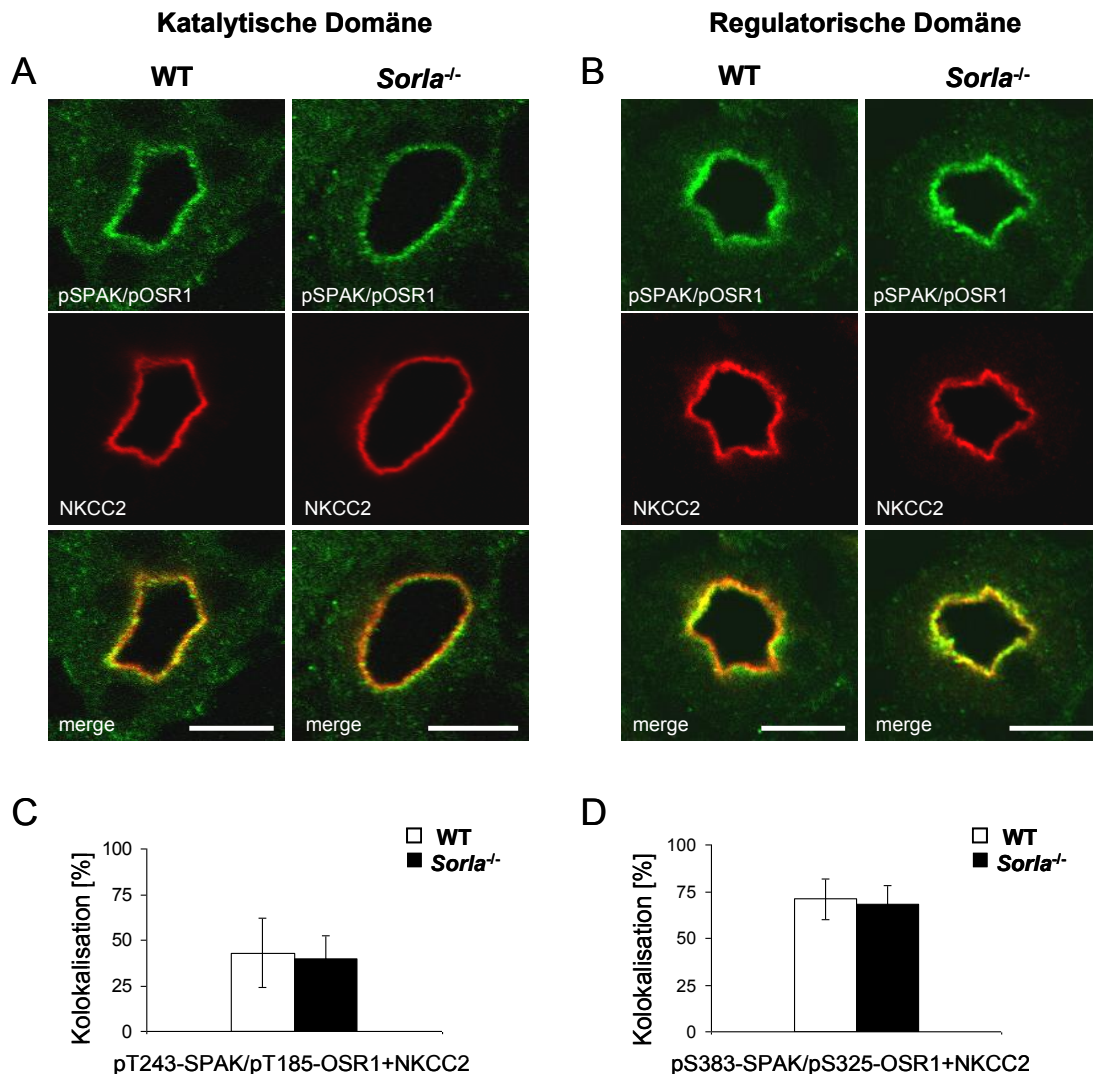


Abbildung 19: Zelluläre Verteilung von phosphorylierten SPAK- und OSR1-Kinasen im medullären TAL von WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen. Repräsentative Aufnahmen sind gezeigt .A, B: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von phosphorylierten (p) katalytischen (pT243-SPAK/pT185-OSR1) (A) und regulatorischen (pS383-SPAK/pS325-OSR1) (B) Kinasedomänen von SPAK und OSR1 (grün) mit NKCC2 (rot) zeigt eine apikale Lokalisation der Kinasen im medullären TAL. Diese sind mit NKCC2 kolokalisiert (merge). C, D: Die Quantifizierung der apikalen Immunfluoreszenzsignale der phosphorylierten katalytischen (C) und regulatorischen (D) Kinasedomänen von SPAK und OSR1 mittels ZEN-Software von Zeiss zeigt eine unveränderte Kolokalisation der beiden Produkte mit NKCC2 im medullären TAL der WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäuse. Daten sind Mittelwerte \pm SD. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10 μ m.

Aufgrund dessen, dass die Phosphorylierung und die zelluläre Verteilung der SPAK- und OSR1-Kinasen im TAL der *Sorla*^{-/-}-Mäuse ähnlich sind, kann der Rückschluss gezogen werden, dass SORLA keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität der Kinasen im Sinne der NKCC2-Phosphorylierung und damit Aktivierung nimmt.

3.2 Calcineurin A β -Isoform

Als nächstes wurde untersucht, ob SORLA anstatt der NKCC2-aktivierenden Kinasen eine der NKCC2-dephosphorylierenden Phosphatasen reguliert. Obwohl die Identität der in die NKCC2-Dephosphorylierung involvierten Phosphatasen nicht vollständig geklärt ist, gaben publizierte Daten Hinweise auf eine Beteiligung der Phosphatase Calcineurin. Tumlin *et al.* fanden eine hohe Expression der Calcineurin A β -Isoform (CnA β) im TAL (Tumlin *et al.*, 1995). Hoorn *et al.* haben gezeigt, dass die Dephosphorylierung des mit NKCC2 strukturell verwandten NCC-Kotransporters im DCT durch die hier reichlich exprimierte Calcineurin A α -Isoform (CnA α) gesteuert wird (Hoorn *et al.*, 2011). Aufgrund dessen wurde der weitere Fokus der vorliegenden Arbeit auf CnA β gelegt.

3.2.1 Verifikation der Calcineurin A β -Antikörper

Zunächst wurden kommerziell verfügbare CnA β -Antikörper mittels Western blot und Immunhistochemie eingehend getestet. Hierbei hat sich der Antikörper von Millipore für beide Methoden als geeignet erwiesen. Für die Kontrolle der Spezifität dieses Antikörpers wurden Gehirnproben von CnA β ^{-/-}-Mäusen aus einer Kooperation im Vergleich zu Proben von WT-Mäusen verwendet (Bueno *et al.*, 2002). Dabei lieferte dieser Antikörper im Western blot bei WT ein immunreaktives Produkt der publizierten Größe von ca. 60 kDa, welches bei CnA β ^{-/-}-Mäusen vollständig fehlte (Abb. 20). In Nierenhomogenaten von Wildtypmäusen wurde ein zusätzliches kleineres, immunreaktives Produkt detektiert (Tumlin *et al.* 1995). Dieses könnte durch proteolytische Spaltung oder durch alternatives *Splicing* der Phosphatase zustande gekommen sein. Die vergleichende Western blot Analyse verschiedener kultivierter Nierenepithelzellen zeigte, dass das kleinere Produkt nur bei den Sammelrohrzellen MCD4 und MDCK, jedoch nicht bei TAL- oder MD-Zellen exprimiert wird (Abb. 21). Da sich die vorliegende Arbeit mit dem TAL aber nicht mit dem Sammelrohr beschäftigt, wurde die Charakterisierung des renalen, schneller migrierenden CnA β -Produktes nicht weiter verfolgt. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für die Spezifität des gewählten CnA β -Antikörpers.

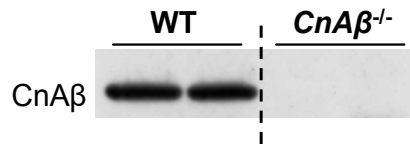


Abbildung 20: Verifikation des CnAβ-Antikörpers mittels Western blot. Im Gehirn der CnAβ Knockout-Maus fehlt die in der Literatur beschriebene 60 kDa Proteinbande. Der Antikörper von Millipore erkennt somit spezifisch CnAβ.

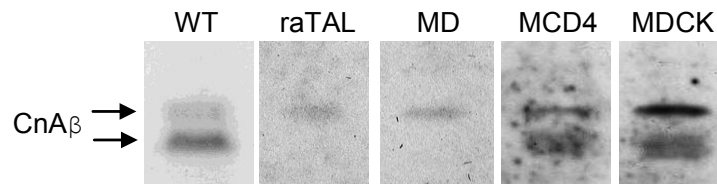


Abbildung 21: Überprüfung von kultivierten renalen Zellen auf endogene CnAβ-Expression. In TAL-Zellen (raTAL)- und Macula densa (MD)-Zellen von der Ratte wurde jeweils nur das größere CnAβ-Produkt von 60 kDa detektiert. In MCD4- und MDCK-Zellen dagegen wurde zusätzlich zur 60 kDa Bande noch das schneller migrierende Produkt von ca. 53 kDa detektiert.

Zusätzlich zum Antikörper von Millipore wurde ein CnAβ-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology für die Immunhistochemie verwendet.

3.2.2 Lokalisation und Verteilung von CnAβ in der WT-Mausniere

Zunächst wurden die segmentale Lokalisation und die zelluläre Verteilung von CnAβ im distalen Nephron von WT-Nieren immunhistochemisch untersucht (Abb. 22). Dabei wurden TAL, DCT und Sammelrohr mittels Doppelmarkierung segmentspezifischer Proteine identifiziert. CnAβ zeigte eine moderate Expression im medullären TAL, eine stärkere Expression im kortikalen TAL und eine starke Expression im Sammelrohr. Im medullären und kortikalen TAL befand sich das CnAβ-Signal vorwiegend im apikalen Zellkompartiment und überlappte mit dem NKCC2-Signal, während das Sammelrohr eine diffuse zelluläre Verteilung der Phosphatase zeigte (Abb. 22).

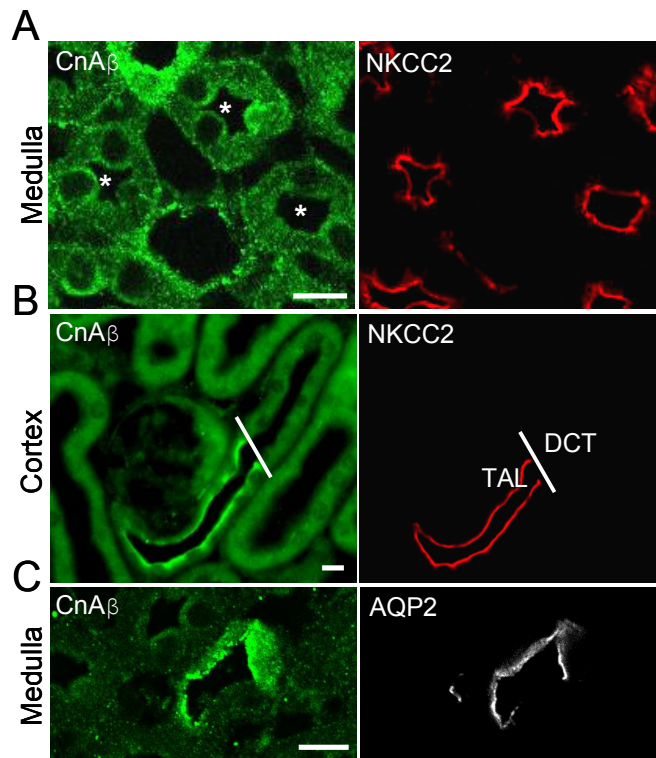


Abbildung 22: Lokalisation von CnAβ in der WT-Mausniere. Repräsentative Aufnahmen sind hier gezeigt. A: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von CnAβ (grün) mit NKCC2 (rot) zeigt im medullären TAL (Sternchen) ein apikales und perinukleäres Signal. B: Im Cortex zeigt die Doppelmarkierung im kortikalen TAL ein stärkeres apikales Signal, als im medullären TAL. Im DCT fehlt dieses Signal vollständig. C: Eine Doppelmarkierung mit Aquaporin 2 (AQP2, grau) in der Medulla zeigt eine apikale und zytoplasmatische Verteilung von CnAβ im Sammelrohr. Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015). Hier modifiziert mit Farbe und Maßstabsbalken eingefügt. Diese entsprechen jeweils 10 µm.

Die Kolokalisation von CnAβ und NKCC2 deutet darauf hin, dass diese Phosphatase an der Regulation von NKCC2 beteiligt ist.

3.2.3 Interaktion zwischen CnAβ und NKCC2

Im nächsten Schritt wurde die potentielle Interaktion zwischen CnAβ und NKCC2 mittels Co-Immunpräzipitation evaluiert. In Experimenten mit Mausnierenhomogenaten entstand jedoch ein starker, durch den Einsatz von Immunglobulin G (IgG) bedingter Hintergrund, wodurch keine Aussage über die spezifische Bindung beider Kandidaten möglich war. Beim Einsatz von Rattennieren trat das Problem nicht auf, weswegen im weiteren Verlauf diese Spezies für die Interaktionsstudien verwendet wurde.

Nach einer erfolgten Co-Immunpräzipitation wurden die im Eluat enthaltenen Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt und im anschließenden Western blot nachgewiesen.

NKCC2 wurde erfolgreich immunpräzipitiert und CnA β als Co-Immunpräzipitat detektiert (Abb. 23). Dabei präzipitierte die reguläre Form (obere Bande von 60 kDa) viel stärker mit NKCC2 als das kleinere Produkt (untere Bande von 53 kDa). Dieses Resultat zeigt, dass das größere CnA β -Produkt eine höhere Affinität zu NKCC2 besitzt als das kleinere CnA β -Produkt.

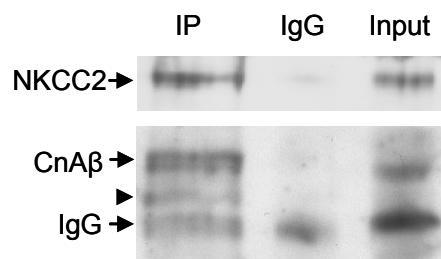


Abbildung 23: Co-Immunpräzipitation von CnA β mit NKCC2. Repräsentative blots sind gezeigt. Der obere Teil der Western blot-Membran zeigt, dass NKCC2 an die mit NKCC2-Antikörper beschichteten Dynabeads® gebunden ist (IP). An den mit unspezifischen IgG beschichteten Dynabeads® erfolgte keine Bindung von NKCC2 (IgG). Der untere Teil zeigt, dass das größere CnA β -Produkt (obere Bande, Pfeil) stärker mit NKCC2 präzipitierte als das kleinere CnA β -Produkt (untere Bande, Dreieck). CnA β band nicht an die IgG-beschichteten Dynabeads®. IgG wurde bei 50 kDa detektiert. IP = Immunpräzipitation; IgG = Immunglobulin G. Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015). Hier zusätzlich mit Input gezeigt.

Die Substrate von Calcineurin enthalten typischerweise PxIxIT- und LxVP-Bindungsmotive, an denen sie von Calcineurin erkannt und gebunden werden (Roy et al., 2009). Die Überprüfung der NKCC2-Sequenz ergab keine der möglichen Bindungsmotive für Calcineurin. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Interaktion zwischen CnA β und NKCC2 durch Gerüstproteine (*Scaffold*-Proteine) vermittelt wird.

NKCC2 ist im *Steady state* in der luminalen Membran und in subapikalen Vesikeln lokalisiert, während seine phosphorylierte Form fast ausschließlich in der apikalen Membran vorkommt (Gimenez and Forbush, 2003). Daher ist die Internalisierung des Transporters wahrscheinlich mit seiner Dephosphorylierung verbunden. Ares *et al.* zeigten, dass die Endozytose von NKCC2 durch Clathrin vermittelt wird (Ares et al., 2012). Aufgrund dessen wurde die Hypothese verfolgt, dass die *Clathrin coated pits* als Gerüstplattform für die Interaktion zwischen CnA β und NKCC2 dienen könnten. Co-Immunpräzipitationen von NKCC2, und CnA β mit Clathrin deuteten darauf hin, dass diese Proteine miteinander interagieren (Abb. 24).

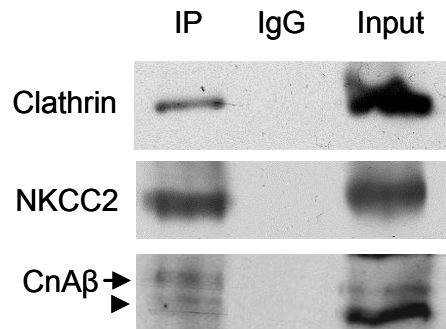


Abbildung 24: Co-Immünpräzipitation von CnA β und NKCC2 mit Clathrin. Repräsentative blots sind gezeigt. Der obere Blot zeigt als Kontrolle, dass Clathrin an die mit Clathrin-Antikörper beschichteten Dynabeads® gebunden war (IP), nicht jedoch an die IgG beschichteten Dynabeads® (IgG). Im mittleren Blot ist dargestellt, dass NKCC2 mit Clathrin koimmunpräzipitiert. Die untere Membran zeigt, dass CnA β mit Clathrin koimmunpräzipitiert, wobei die reguläre Isoform von CnA β (obere Bande) stärker mit Clathrin präzipitiert als das kleinere Produkt (untere Bande, Dreieck). Das Kontrollexperiment mit IgG-beschichteten Dynabeads® lieferte keine immunreaktiven Banden. IP = Immunpräzipitation; IgG = Immunglobulin G.

Aus diesem Experiment lässt sich schlussfolgern, dass *Clathrin coated pits* als Gerüst für die Interaktion zwischen NKCC2 und CnA β dienen könnten.

3.2.4 Effekte der Calcineurin-Inhibition auf NKCC2

Cyclosporin A (CsA) ist der spezifische Inhibitor von Calcineurin (Liu et al., 1991), durch dessen Einsatz folglich die Rolle von CnA β bei der Regulation von NKCC2 untersucht werden kann. Dafür wurden WT-Mäuse fünf Tage lang mit 60 mg/kg Körpergewicht CsA behandelt. Für die anschließende Western blot Analyse wurden die Nierenhomogenate von fünf mit Vehikel- und fünf mit CsA-behandelten WT-Mäusen verwendet (Abb. 25). Die Gesamtproteinmenge von NKCC2 war weder in der Medulla noch im Cortex der CsA-behandelten Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Tieren verändert. Dagegen war die Phosphorylierung von NKCC2 an den Stellen T96/T101 im Cortex der behandelten Mäuse signifikant erhöht (+230%), in der Medulla jedoch nicht. Die Phosphorylierung an der Stelle S126 blieb in beiden Tiergruppen unverändert. Die Resultate zeigen, dass sich die Inhibition von CnA β auf die Phosphorylierung von NKCC2 auswirkt, wobei dieser Effekt im kortikalen TAL stärker ausgeprägt war als im medullären TAL. Dieses Ergebnis passt zu der CnA β -Lokalisationsstudie, in der eine stärkere CnA β -Expression

im kortikalen TAL als im medullären TAL beobachtet wurde (Abschnitt 3.2.2). Diese Resultate bestärken die Annahme einer Interaktion zwischen CnA β und NKCC2.

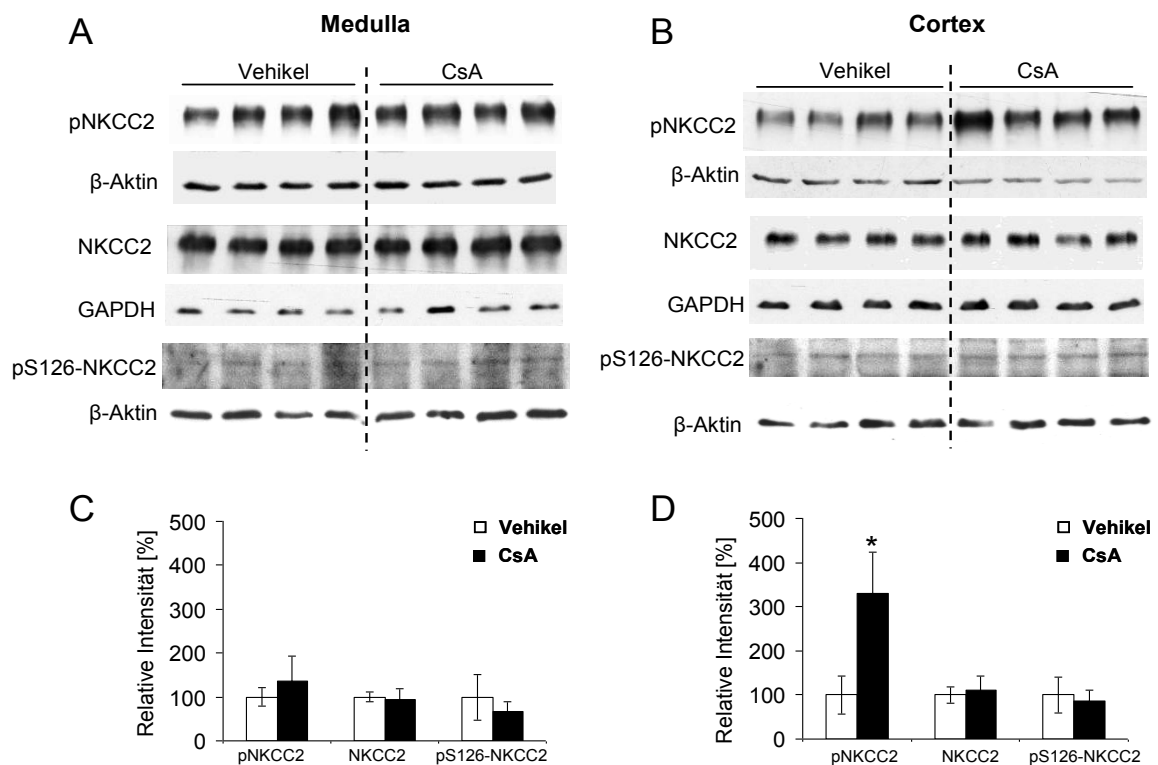


Abbildung 25: Auswirkung von CsA auf die NKCC2-Expression und Phosphorylierung in WT-Mäusen. A, B: Western blot Analyse CsA- und Vehikel-behandelter WT-Mäuse bezüglich des Vorkommens von NKCC2, pT96/pT101-NKCC2 und pS126-NKCC2. β -Aktin bzw. GAPDH fungierten als endogene Beladungskontrolle. In der Medulla (A) gab es keine Veränderung nach der Behandlung. Im Cortex (B) nahm nach der Behandlung mit CsA die Phosphorylierung von NKCC2 an den Stellen pT96/pT101 signifikant zu (+230%, $p < 0,05$). Die Proteinmengen an NKCC2 und pS126-NKCC2 blieben unverändert. C, D: Densitometrische Auswertung der Western blots. Daten sind Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$.

Um systemische Einflüsse auszuschließen, wurde der funktionelle Nachweis auch an kultivierten Ratten-TAL-Zellen (raTAL) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen bei nahezu 100% Konfluenz für vier Stunden mit 6 ng/ml CsA behandelt. Die Gabe von CsA zum Medium führte im Vergleich zu den Kontrollzellen (Vehikel) zu einer 7-fach gesteigerten Phosphorylierung von NKCC2 entlang der lateralen Zellregion (Abb. 26).

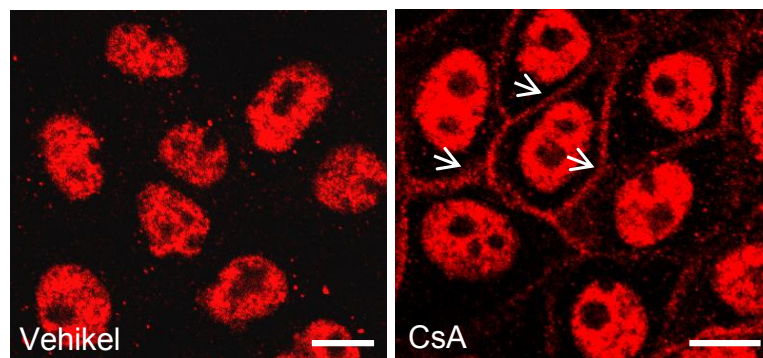


Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung von phospho-NKCC2 in raTAL-Zellen. Die Gabe von CsA (6 ng/ml) auf konfluente raTAL-Zellen für vier Stunden erhöhte das phospho-NKCC2-Signal in der lateralen Zellregion (weiße Pfeile) um das 7-fache. Die Zellkerne zeigen ein unspezifisches Signal. Da die endogene Expression von NKCC2 relativ schwach ist, war die zur Visualisierung erforderliche Antikörperkonzentration so hoch, dass sich in diesem Ansatz die nukleäre Hintergrundreaktion einstellte. Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10 µm.

Dieser Zellversuch lieferte einen zusätzlichen Beweis dafür, dass eine Inhibition von Calcineurin mittels CsA die Phosphorylierung von NKCC2 an den Stellen T96/T101 auf lokaler Ebene beeinflusst.

3.2.5 Auswirkung der SORLA-Deletion auf die CnA β -Expression und -Verteilung im TAL

Im Kontext der stark verminderten NKCC2-Phosphorylierung in SORLA-Knockout-Nieren wurde als nächstes die Auswirkung der SORLA-Deletion auf die CnA β -Expression mittels SDS-PAGE und Western blot analysiert (Abb. 27). In den Nieren der *Sorla*^{-/-}-Mäuse war sowohl in der Medulla als auch im Cortex die CnA β -Expression signifikant gesteigert (Medulla: größeres CnA β -Produkt +146%, kleineres CnA β -Produkt +124%; Cortex: größeres CnA β -Produkt +105%, kleineres CnA β -Produkt +150%; $p < 0,05$).

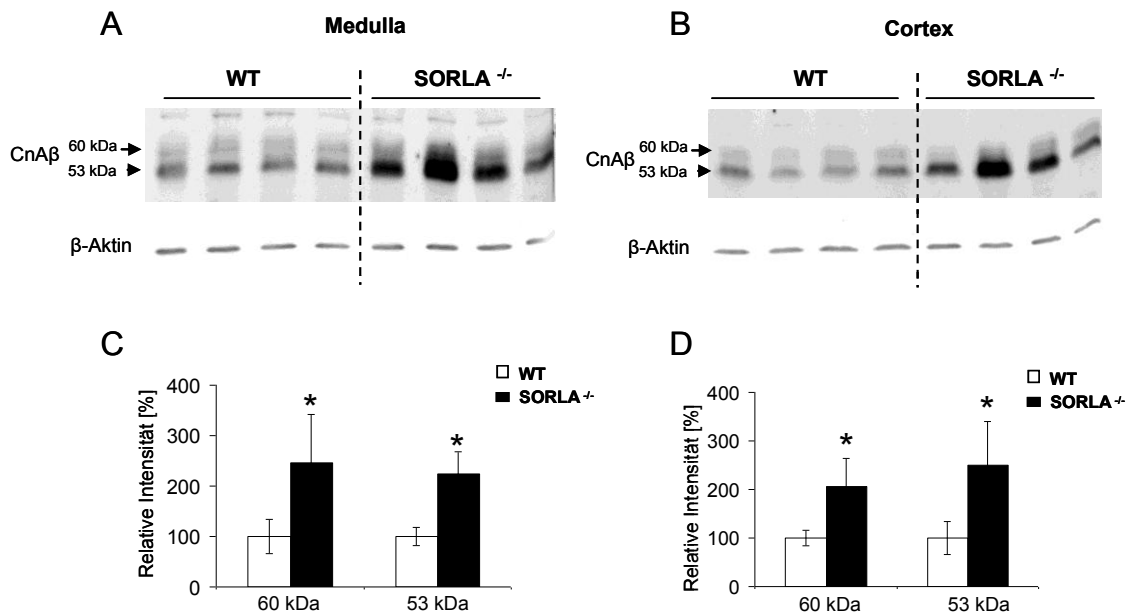


Abbildung 27: Auswirkung der SORLA-Deletion auf CnAβ-Proteinmenge. A, B: Western blot von CnAβ aus Nierenhomogenaten von WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen. β-Aktin fungiert als endogene Beladungskontrolle. Sowohl in der Medulla (A) als auch im Cortex (B) ist die Proteinmenge beider CnAβ-Produkte in *Sorla*^{-/-}-Mäusen signifikant gesteigert (Medulla: +146% beim größeren Produkt (60 kDa), +124% beim kleineren Produkt (53 kDa); Cortex: +105% beim größeren Produkt (60 kDa), +150% beim kleineren Produkt (53 kDa)). C, D: Densitometrische Auswertung der Blots. Daten sind Mittelwerte ± SD; *p<0,05. Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015).

Ob die erhöhte Proteinmenge von CnAβ auf eine gesteigerte Genaktivität zurückzuführen ist, wurde anschließend mittels qPCR überprüft (Abb. 28). Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Da sich die mRNA-Expression von CnAβ in den *Sorla*^{-/-}-Mäusen nicht änderte, ist die Akkumulation des Proteins in diesem Tiermodell nicht auf eine gesteigerte Genaktivität zurückzuführen.

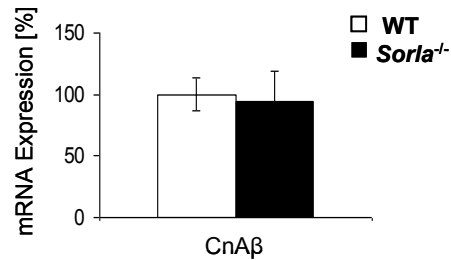


Abbildung 28: mRNA Expression von CnA β in WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen. qPCR mit GAPDH als endogener Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die mRNA-Expression von CnA β in *Sorla*^{-/-}-Mäusen ist im Vergleich zu WT-Mäusen nicht verändert. Daten sind Mittelwerte \pm SD.

Um zu bestätigen, dass die SORLA-Defizienz die Akkumulation der Phosphatase im TAL induziert, wurde mittels Immunfluoreszenz die Verteilung von CnA β in *Sorla*^{-/-}-Nieren im Vergleich zu WT-Nieren untersucht und mit Hilfe konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Abbildung 29 zeigt, dass CnA β in *Sorla*^{-/-}-Nieren angereichert im apikalen Bereich der TAL-Zellen vorlag, wobei die Intensität des Signals im Durchschnitt um 40% höher war als im WT-TAL.

Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die gesteigerte Menge an CnA β in SORLA-defizienten TAL-Zellen zur vermehrten Dephosphorylierung von NKCC2 führen könnte.

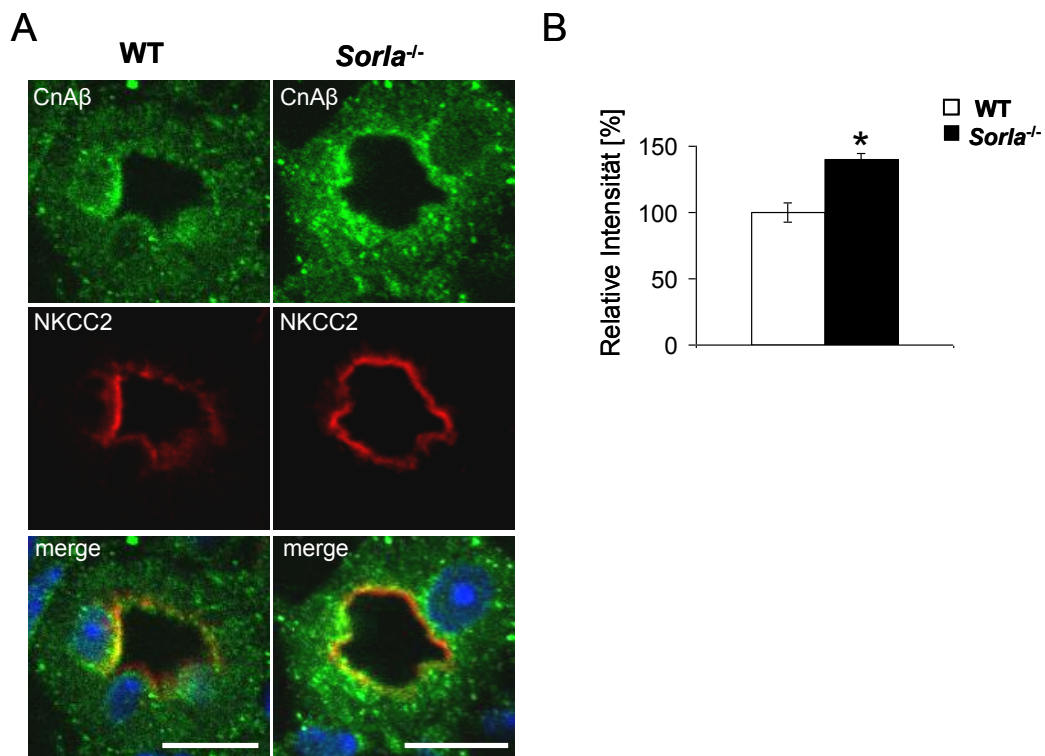


Abbildung 29: Verteilung von CnAβ im TAL von WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen. Repräsentative Aufnahmen sind gezeigt. A: CnAβ (grün) ist im TAL der *Sorla*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen im apikalen Zellkompartiment angereichert. Das perinukleäre Signal von CnAβ ist in beiden Genotypen vergleichbar. B: Die Quantifizierung der mit NKCC2 kolokalisierten apikalen CnAβ-Immunfluoreszenzsignale mittels ZEN-Software von Zeiss zeigt in *Sorla*^{-/-}-Mäusen eine um 40% gesteigerte Signalintensität. Daten sind Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$. Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015). Hier mit Maßstabsbalken gezeigt. Diese entsprechen jeweils 10 μ m.

3.2.6 Auswirkung der SORLA-Überexpression auf die CnAβ-Expression und -Verteilung in HEK-Zellen

HEK-293-Zellen zeigen eine starke endogene Expression von CnAβ, während SORLA in diesen Zellen nur schwach exprimiert wird. Somit sind diese Zellen für Überexpressionsexperimente von SORLA geeignet. Dabei führte die Transfektion des Plasmids pcDNA3-SORLA, welches das SORLA-Gesamtprotein codiert, zu einer starken Steigerung der SORLA-Menge, die mit einer signifikanten Verringerung der CnAβ-Abundanz einher ging (-56%, $p < 0,05$) (Abb. 30).

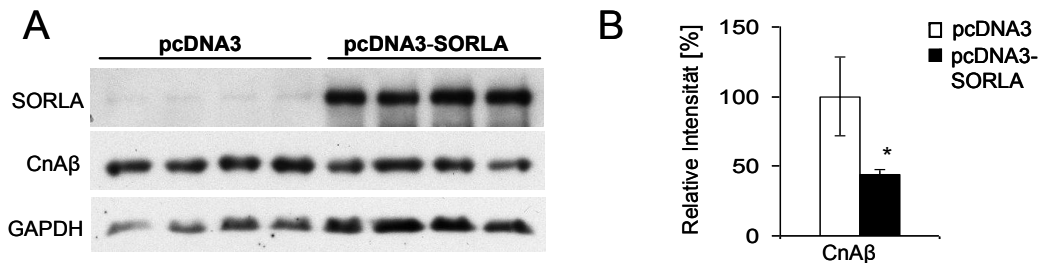


Abbildung 30: Auswirkung der SORLA-Überexpression auf CnA β in HEK-293-Zellen. A: Repräsentative Western blots von SORLA und CnA β aus Lysaten transfizierter HEK-293-Zellen. β -Aktin fungiert als endogene Beladungskontrolle. In pcDNA3-SORLA transfizierten Zellen ist die SORLA-Proteinmenge signifikant angestiegen, gleichzeitig ist die Menge an CnA β um 56% verringert. B: Densitometrische Auswertung. Daten sind Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$. Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015).

Die Überexpressionsstudie in HEK-293-Zellen zeigt, dass SORLA die Proteinmenge von CnA β verringern kann. Diese Ergebnisse sind somit im Einklang mit der gesteigerten Abundanz der Phosphatase in SORLA-defizienten Nieren.

3.2.7 Interaktion zwischen SORLA und CnA β

Die vorausgehenden Resultate deuten darauf hin, dass SORLA am zellulären Transport und *Turnover* von CnA β beteiligt sein könnte. Die Interaktion zwischen beiden Proteinen wurde anschließend mit Hilfe von Kolokalisations- und Bindungsassays genauer betrachtet.

Die Kolokalisation der beiden Proteine in Kryo-Schnitten von WT-Mausnieren wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht (Abb. 31). SORLA war im TAL apikal, subapikal sowie perinukleär mit CnA β kolokalisiert.

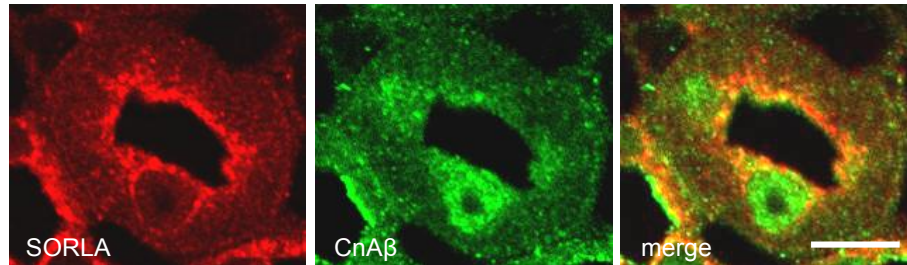


Abbildung 31: Lokalisation von SORLA und CnA β im TAL von WT-Mäusen. Repräsentative Aufnahme ist hier gezeigt. Die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von SORLA (rot) und CnA β (grün) zeigt eine weitestgehende Kolo-kalisation der beiden Proteine im apikalen, subapikalen und perinukleären Bereich des TAL (merge). Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015). Hier mit Maßstabsbalken gezeigt. Dieser entspricht 10 μ m.

Für alle Bindungsassays wurden Rattennierenlysate verwendet, weil Mausnierenlysate in Vorversuchen einen starken IgG-Hintergrund (im Western blot verdeckte die IgG-Bande bei 50 kDa spezifische Signale) erzeugten und die Ergebnisse dadurch nicht auswertbar waren.

Die Co-Immunpräzitationen wurden mit einem gegen SORLA gerichteten Antikörper durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Western blot (Abb. 32) und MALDI-TOF Massenspektrometrie (Abb. 33).

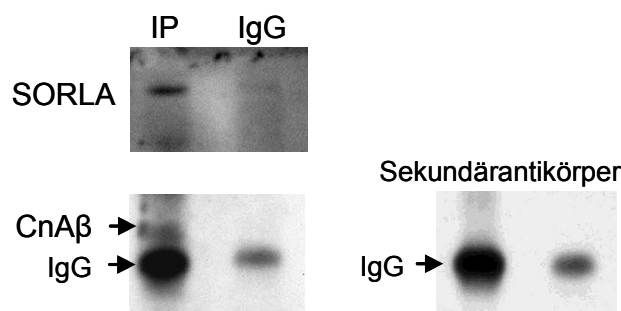


Abbildung 32: Co-Immunpräzitation von CnA β mit SORLA. SORLA ist an die mit SORLA-Antikörper beschichteten Dynabeads® gebunden (IP). Mit SORLA präzitierte das größere CnA β -Produkt (Pfeil in IP). Der Sekundärantikörper (anti *rabbit*) erzeugte einen kräftigen IgG-Hintergrund (rechtes Bild). IP = Immunpräzitation; IgG = Immunglobulin G. Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015). Hier noch zusätzlich mit einem Blot vom Sekundärantikörper gezeigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass SORLA aus dem Rattennierenhomogenat an die Dynabeads® gebunden war und CnA β zusammen mit SORLA präzitierte.

Zur Bestätigung der im Western blot dokumentierten Resultate aus den Co-Immunpräzitationen wurden die Eluate auch massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF MS analysiert (Abb. 33). Die registrierten Peptidfragmente konnten mit Hilfe der Mascot Software (Perkins et al., 1999) identifiziert werden. Für die Auswertung wurde die Datenbank SwissProt verwendet. Die statistische Auswertung der Signale erfolgte in Form von Indizes ($-10 \cdot \log(P)$), wobei P für die Wahrscheinlichkeit steht, in wie weit der verzeichnete Treffer ein zufälliges Ereignis ist. Ein Index von 50 und höher zeigt einen signifikanten Treffer an ($p < 0,05$). Im Eluat der SORLA-Immunpräzitation wurden Peptidfragmente sowohl von SORLA als auch von CnA β , letzteres in signifikanter Menge, gefunden (Index 52). Dagegen bestand dieser Befund in der Kontrollprobe nicht. Zudem wurden zwar auch Peptidfragmente von CnA α in signifikanter Menge registriert, dies jedoch auch in der Kontrolle.

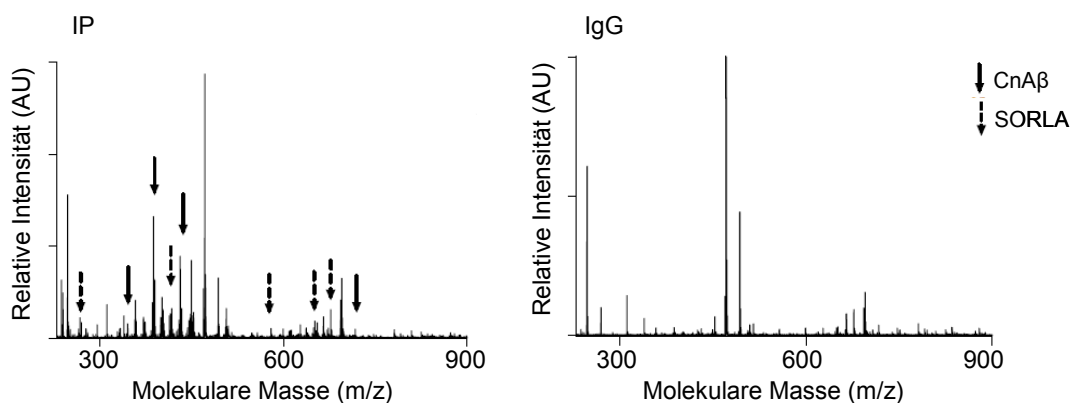


Abbildung 33: MALDI-TOF MS Analyse der Co-Immunpräzitation von CnA β mit SORLA. Die Peaks im Diagramm stellen detektierte Peptidfragmente dar. SORLA (gestrichelter Pfeil) und CnA β (durchgehender Pfeil) waren im Eluat der SORLA-Immunpräzitation signifikant vorhanden (IP), in der Kontroll-Probe dagegen nicht (IgG). IP = Immunpräzitation; IgG = Immunglobulin G; AU = *arbitrary unit*; m/z = Verhältnis von Masse zu Ladung. Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015).

Die Ergebnisse aus der MALDI-TOF-MS bestätigen die Western blot Befunde der Co-Immünpräzipitationen und bekräftigen eine mögliche Interaktion zwischen SORLA und CnA β .

Weil SORLA eine große extrazelluläre Domäne besitzt, welche mehrere Bindungsmodule enthält und theoretisch mit CnA β unspezifisch bei der Co-Immünpräzipitation interagieren könnte, sollte im Folgenden gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse auf spezifischen Interaktionen mit der intrazellulären Domäne von SORLA basieren. Dazu wurde ein GST-*pull-down assay* mit dem an GST-gebundenen C-Terminus von SORLA und Rattennierenhomogenaten durchgeführt. Die intrazelluläre Domäne von SORLA wurde in einen GST-Vektor (pGEX-6P1) kloniert, rekombinantes GST-Fusionsprotein hergestellt und an Glutathion-Beads gebunden, die anschließend mit den Homogenaten inkubiert wurden. Während der Inkubation banden Interaktionspartner an das Matrix-gekoppelte SORLA-GST-Fusionsprotein. Anschließend wurden die gebundenen Proteine zusammen eluiert und mittels MALDI-TOF MS analysiert, da diese Methode sensitiver als ein Western blot ist. Die MS ergab, dass CnA β signifikant an die intrazelluläre SORLA-Domäne gebunden hatte (Abb. 34). Zudem wurden auch Peptidfragmente von CTBP2 (*C-terminal binding protein 2*), CnA α und GRINL1A (*Glutamate receptor-linke gene complex locus protein 1*) registriert. Auch in der GST-Kontrolle wurden CnA α -Peptidfragmente in signifikanter Anzahl gefunden. Abgesehen von CnA α sind die anderen beiden Proteine nicht im Zusammenhang mit der Regulation der renalen Salztransporter bekannt.

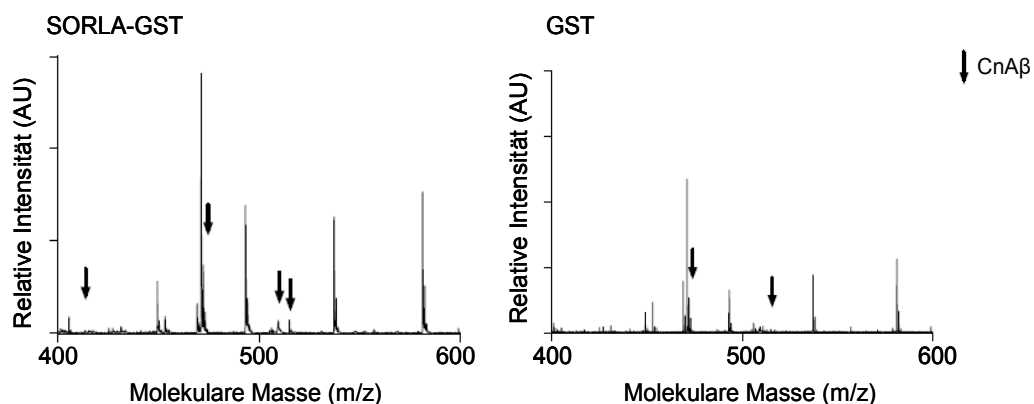


Abbildung 34: MALDI-TOF MS Analyse des GST-Pull-down-Assays. CnA β (durchgehender Pfeil) ist signifikant in der SORLA-GST-Probe vorhanden, in der GST-Kontroll-Probe dagegen nicht. AU = *arbitrary unit*, m/z = Verhältnis von Masse zu Ladung. Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015).

Dieser *Pulldown assay* bestätigt die Interaktion zwischen CnA β und der intrazellulären Domäne von SORLA.

3.2.8 Funktioneller Nachweis der Interaktion zwischen CnA β und SORLA

Um den funktionellen Zusammenhang zwischen CnA β und SORLA zu überprüfen, wurden WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäuse kurzzeitig (eine Stunde) mit dem spezifischen Calcineurin Inhibitor Cyclosporin A (CsA; 30 mg/ml Körpergewicht) behandelt. Anschließend wurden die Nieren perfundiert. Die fertigen Nierenschnitte wurden immunhistochemisch ausgewertet (Abb. 35). In Cremophor- (Vehikel) behandelten *Sorla*^{-/-}-Mäusen war die NKCC2-Phosphorylierung an den Threoninen 96 und 101 im Vergleich zu WT-Mäusen wie erwartet stark verringert. Die Inhibition von CnA β durch CsA führte sowohl in den WT- als auch in den *Sorla*^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der NKCC2-Phosphorylierung (+84% in WT; +103% in *Sorla*^{-/-}), wobei der Anstieg in den *Sorla*^{-/-}-Mäusen das Niveau der Vehikel-behandelten WT erreichte.

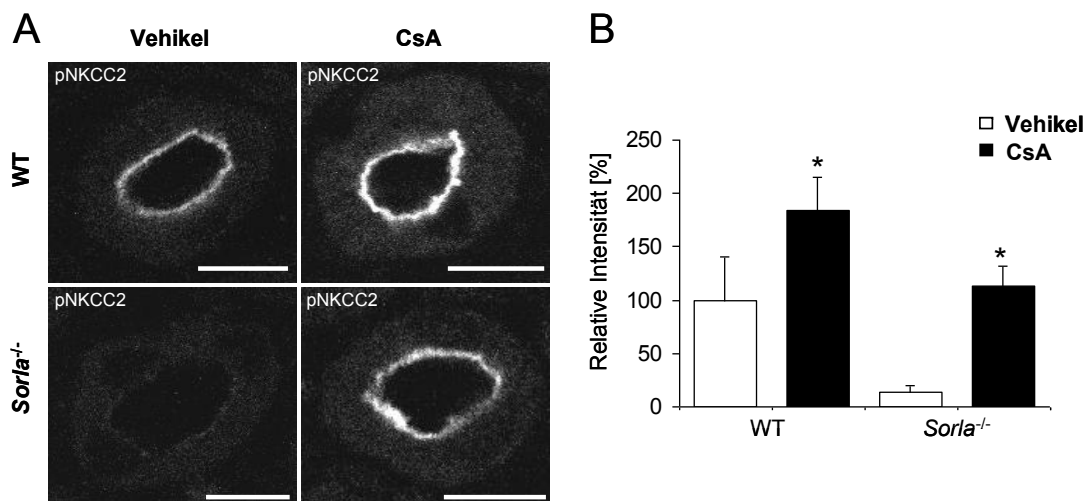


Abbildung 35: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von phosphoryliertem NKCC2 in Vehikel- vs. CsA-behandelten WT- und *Sorla*^{-/-}-Mausnieren. A: CsA bewirkt eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung von NKCC2 an den Threoninen 96/101 (pNKCC2). B: Die Quantifizierung der pNKCC2-Immunfluoreszenzsignale in der Apikalregion der Zelle mittels ZEN-Software von Zeiss zeigt bei WT-Mäusen eine um 84% und bei *Sorla*^{-/-}-Mäusen sogar eine um 103% gesteigerte Signalintensität unter CsA-Behandlung. Daten sind Mittelwerte \pm SD (* $p < 0,05$). Abbildung wurde publiziert in *Borschewski et al.*, (2015). Hier mit Maßstabsbalken gezeigt. Diese entsprechen jeweils 10 μ m.

4 Diskussion

4.1 SORLA im distalen Nephron

Die VPS10P-Rezeptoren, zu denen auch SORLA gehört, sind zwischen Hefe und Mensch hoch konserviert. Die Charakterisierung der Mitglieder der VPS10P-Rezeptorfamilie bei Säugern zeigte, dass SORLA im Gehirn reichlich exprimiert wird und in den Stoffwechsel des Amyloid- β Peptids involviert ist. Der Rezeptor dient hier als Schutzfaktor vor der toxischen Akkumulierung des Amyloid- β Peptids und spielt somit eine Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit (Übersicht in Andersen and Willnow, 2006). Obwohl SORLA auch in der Niere deutlich exprimiert wird, ist seine renale Funktion bisher nur in wenigen Ansätzen untersucht worden. Die vorliegende Dissertationsschrift erläutert neue Aspekte der Funktion von SORLA in der Niere im Zusammenhang mit der Calcineurin-abhängigen Regulation von NKCC2.

4.1.1 Lokalisation von SORLA

Die Lokalisation von SORLA in der Niere wurde von Riedel *et al.* (2002) erstmals publiziert. Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde dort SORLA-Transkript im Nierenmark und in der Nierenrinde gezeigt und das Protein immunhistologisch im Sammelrohr nachgewiesen. Reiche *et al.* fanden SORLA hingegen im distalen Nierentubulus (TAL, DCT), im Verbindungstubulus (CNT) und im Sammelrohr (Reiche *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Information über die renale Lokalisation von SORLA durch Vertiefung der segmentspezifischen und zellulären Aspekte substanziell erweitert. Die axiale Heterogenität der SORLA-Expression entlang des TAL mit stärkerer Expression im seinem medullären Abschnitt kann im Kontext ebenfalls axial heterogener Expressionsmuster einiger Interaktionspartner von SORLA, wie z.B. der Kinase SPAK oder der Phosphatase Calcineurin, betrachtet werden. Auf zellulärer Ebene war SORLA sowohl apikal als auch perinukleär verteilt. Dieses Muster ist mit seiner angenommenen Funktion als intrazellulärer Sortierungsrezeptor vereinbar und entspricht auch der beschriebenen Verteilung in Zellen anderer Organe (Jacobsen *et al.*, 2001).

4.1.2 Auswirkungen von SORLA-Defizienz auf NKCC2 und beteiligte Kinasen

Die Deletion von SORLA führt zur starken Verminderung der NKCC2-Phosphorylierung (Reiche et al., 2010) an den SPAK/OSR1-abhängigen, N-terminalen Threoninresten T96 und T101, die grundsätzlich mit verminderter Transportaktivität im TAL in Zusammenhang steht, und zu verminderter Kolo-kalisation von SPAK und NKCC2 führt (Richardson et al., 2011). Man ging hier von einer signifikant permissiven Rolle von SPAK im TAL aus. Im DCT, in dem SPAK für die Phosphorylierung von NCC definitiv bedeutsam ist (McCormick et al., 2011), besteht zwar ebenfalls eine Kolo-kalisation mit SORLA, jedoch war hier in unserem Befund die Deletion von SORLA ohne Effekt. Im TAL wurde SORLA eine Rolle beim apikalen *Trafficking* von SPAK zugedacht (Reiche et al., 2010). Später wurde allerdings erkannt, dass SPAK in der Niere vorwiegend in trunkierter, katalytisch inaktiver Form vorkommt (McCormick et al., 2011). Die kurzen Isoformen SPAK2 und KS-SPAK können durch kompetitive Bindung an NKCC2 die Wirkung von aktiver SPAK (lange FL-SPAK Isoform) sowie von OSR1 zur Phosphorylierung des Transporters hemmen (McCormick et al., 2011; Saritas et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings eine gleichmäßige Verminderung der Proteinmenge aller SPAK-Isoformen im Nierenmark von *Sorla*^{-/-}-Mäusen festgestellt. Dies unterstützt zwar die frühere Arbeitshypothese, dass SORLA in die Regulation von SPAK im TAL involviert ist. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die verringerte SPAK-Gesamtmenge eine derart starke Verminderung der NKCC2-Phosphorylierung verursachen kann, da sowohl die aktivierenden als auch die inhibierenden SPAK-Isoformen nahezu proportional betroffen waren. Eine neuere Studie weist entsprechend auch darauf hin, dass nicht SPAK, sondern die homologe Kinase OSR1 primär für die NKCC2-Phosphorylierung zuständig ist (Lin et al., 2011). Wir fanden OSR1 in der SORLA-defizienten Maus jedoch nicht beeinträchtigt. Ein weiterer, funktionell bedeutsamer N-terminaler Phosphoakzeptor von NKCC2, der SPAK/OSR1-unabhängige Serinrest S126, war von der SORLA-Defizienz nicht betroffen, was für eine Restaktivität an dieser Stelle spricht und den milden physiologischen Phänotyp der SORLA-defizienten Mäuse erklären könnte (Richardson et al., 2011). Die Gesamtproteinmenge von NKCC2 war ebenfalls durch das Fehlen von SORLA nicht beeinflusst.

SPAK und OSR1 werden außerdem selber durch Phosphorylierung ihrer katalytischen und regulatorischen Domänen aktiviert (Vitari et al., 2005). Die immunhistochemische

Einschätzung des gemeinsamen SPAK/OSR1-Phosphorylierungssignals ergab denn auch keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und *Sorla*^{-/-}-Mäusen im TAL. Damit gab es keinen Hinweis darauf, dass die Aktivität von SPAK oder OSR1 durch die SORLA-Deletion verändert war. Die selektive Auswirkung der SORLA-Deletion auf die NKCC2-Phosphorylierung ist demnach allein durch die Interaktion zwischen SORLA und SPAK schwer zu erklären. Daher wurde nach einem anderen Kontext gesucht.

4.2 Calcineurin A β im distalen Nephron

In weiterführenden Schritten wurde untersucht, ob SORLA die NKCC2-Phosphorylierung über die Regulation von Phosphatasen beeinflussen kann. Obwohl bisher keine NKCC2-dephosphorylierenden Phosphatasen identifiziert wurden, hatten vorangegangene Studien auf eine mögliche Beteiligung der Calcineurin Phosphatase bei der Dephosphorylierung von NKCC2 und NCC hingewiesen (Hoorn et al., 2011; Wu et al., 2000; Esteva-Font et al., 2007). Calcineurin kommt in drei Isoformen vor, deren Expression entlang des Nephrons in vorangegangenen Arbeiten beschrieben wurde (Tumlin et al., 1995; Gooch et al., 2004). Hierbei konnte die CnA α -Isoform vorwiegend im DCT lokalisiert werden, während CnA β als die dominante Isoform im TAL beschrieben wurde (Tumlin et al., 1995). Es wurde auch gezeigt, dass die Inhibition von Calcineurin mittels Cyclosporin A die Aktivität von NKCC2 stimulieren kann; allerdings waren die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen noch nicht verstanden (Esteva-Font et al., 2007; Damiano et al., 2010). Basierend auf diesen Vorarbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle der CnA β in der Regulation von NKCC2 überprüft.

4.2.1 Inhibierung von Calcineurin durch Cyclosporin A

Die Calcineurin-inhibierende Wirkung von CsA und Tacrolimus wird durch deren intrazelluläre Interaktion mit bestimmten Mitgliedern der Immophilin-Familie, den Cyclophilinen bzw. dem *FK-506-binding protein*, vermittelt (Überblick in Li et al., 2011). Hierbei bindet CsA an Cyclophiline, die mit der Phosphatase aggregieren und ihre katalytische Aktivität hemmen (Huai et al, 2002). Demnach ist das Vorhandensein von Cyclophilinen im TAL die Voraussetzung für die Calcineurin-hemmende Wirkung von CsA in diesem Nephronsegment. Cyclophiline finden sich in unterschiedlichen Zellkompartimenten: CyPA, CyP40 und CyPNK im Zytosol; CyPB und CyPC im

endoplasmatischen Retikulum; CyPD in Mitochondrien und CyPE im Nukleus (Überblick in Wang and Heitman, 2005). Die Expression des zytosolischen CyPA im TAL wurde in vorangegangenen Arbeiten unserer und anderer Gruppen nachgewiesen (Borschewski et al., 2015; Otsuka et al., 1994). CyPA vermittelt im Wesentlichen die immunsuppressive Wirkung von CsA in T-Lymphozyten (Colgan et al., 2004). Somit könnte CyPA die Effekte von CsA auf Calcineurin in TAL-Zellen vermitteln. Die enzymatische Aktivität der Cyclophiline wird durch CsA ebenfalls gehemmt (Daum et al., 2009). Daher könnte CsA über Interaktion mit Cyclophilinen der Mitochondrien, des Kerns und des endoplasmatischen Retikulum heterogene Effekte auf den zellulären Stoffwechsel ausüben (Überblick in Wang and Heitman, 2005). Zum Beispiel wurde die Hemmung von CyPD durch CsA mit mitochondrialer Permeabilität, Regulation des intrazellulären Calciumspiegels und der Vitalität der Zelle in Zusammenhang gebracht (Azzolin et al. 2010). Diese und ähnliche Effekte könnten sekundär die Transportfunktion der TAL-Zellen beeinflussen. Eine klare Trennung zwischen den Calcineurin- und Cyclophilin-abhängigen Effekten von CsA ist hier ohne weitere Experimente an entsprechenden nierenspezifischen Knockout-Mäusen nicht möglich.

4.2.2 Lokalisation von CnA β

Im Einklang mit den bekannten Lokalisationsstudien wurde im Rahmen dieser Arbeit die CnA β -Isoform im TAL in enger Kolo-kalisation mit NKCC2 detektiert. Außerdem konnte eine axiale Heterogenität der CnA β -Expression entlang des TAL dokumentiert werden. Das CnA β -Signal war im kortikalen TAL stärker ausgeprägt als im medullären TAL. Auf zellulärer Ebene konnte die Phosphatase apikal und perinukleär detektiert werden. Dieses Verteilungsmuster spricht dafür, dass CnA β an der Dephosphorylierung verschiedener Substrate beteiligt sein könnte, wie zum Beispiel von NKCC2 apikal und von NFAT oder NF- κ B perinukleär (Borschewski et al., 2015; Alzuherri et al., 2003). Zusätzlich zum TAL wurde eine starke CnA β -Expression in den Aquaporin 2 (AQP2)-positiven Hauptzellen des Sammelrohrs beobachtet. Die Calcineurin-abhängige Regulation von AQP2 im Sammelrohr wurde in vorangegangenen Studien beschrieben; hier soll Calcineurin als Teil eines Multiprotein-Komplexes in die Dephosphorylierung von AQP2 involviert sein (Jo et al., 2001; Li et al., 2007).

4.2.3 Interaktion zwischen CnA β und NKCC2

Die hier beschriebene, morphologische Nähe von CnA β und NKCC2 weist auf deren Interaktion hin. Verschiedene Bindungsstudien haben dies nachgewiesen. In Pilotversuchen wurden diese an Homogenaten von Maus- und Rattennieren durchgeführt. Wegen des gegenüber der Mausniere besseren Verhältnisses von spezifischem Signal zum Hintergrund bei Rattenpräparationen wurden Rattennieren bevorzugt. Die CnA β -Proteinsequenz zwischen Maus und Ratte ist nach NCBI Protein-BLAST-Information zu 99% identisch. Für NKCC2 ist die Identität zwischen beiden Spezies ebenfalls hoch (98%). Es ist daher davon auszugehen, dass NKCC2 in beiden Organismen durch ähnliche Mechanismen reguliert wird und die Verwendung von Rattennieren weitgehende Extrapolation zur Situation in der Maus erlaubt. NKCC2 und CnA β co-immunpräzipitierten eindeutig, die Frage stand jedoch im Raum, ob eine unmittelbare Interaktion daraus geschlossen werden kann. Substrate von Calcineurin weisen typischerweise PxlIT- und/oder LxVP-Bindungsmotive in ihrer Sequenz auf, die eine direkte Interaktion mit der Phosphatase ermöglichen (Roy and Cyert, 2009). Die NKCC2 Proteinsequenz weist jedoch keine derartigen Bindungsstellen auf. Alternativ kann eine Bindung über Gerüstproteine (*Scaffolding*-Proteine) vermittelt sein. Entsprechend konnten wir NKCC2 und CnA β als Bestandteile eines gemeinsamen Proteinkomplexes mit dem Endozytoseprotein Clathrin über Co-Immünpräzipitation nachweisen. Clathrin bildet zusammen mit Adaptin die Hülle von zu internalisierenden Vesikeln (*Clathrin coated pits*) und vermittelt auch die Endozytose von NKCC2 (Schmid, 1997; Ares et al., 2012). Die Assoziation von CnA β mit Clathrin und NKCC2 könnte bedeuten, dass die *Clathrin coated pits* bei der NKCC2-Dephosphorylierung als Gerüstproteinkomplexe fungieren könnten. Somit könnte die endozytotische Internalisierung von NKCC2 mit seiner Dephosphorylierung einhergehen. Ein ähnlicher Regulationsweg wurde bereits für den strukturell-verwandten NCC beschrieben (Rosenbaek et al., 2014). Auch die vorwiegende Lokalisation des phosphorylierten NKCC2 in der apikalen Membran spricht dafür, dass der Transporter im Zuge der endozytotischen Internalisierung dephosphoryliert wird (Gimenez and Forbush, 2003). Die konfokalmikroskopische Detektion von NKCC2 und phospho-NKCC2 im Rahmen dieser Arbeit erlaubte allerdings keine genaue Trennung zwischen der Plasmamembran und dem apikalen vesikulären Kompartiment. Daher ist die Aussage über die Auswirkung der CsA-abhängigen Steigerung der NKCC2-Phosphorylierung auf deren zelluläre Verteilung nicht hinreichend sicher zu treffen.

Dass CnA β in die Dephosphorylierung von NKCC2 involviert ist, wurde weiter mit einem funktionellen Nachweis über Einsatz des Calcineurin-Inhibitors CsA *in vivo* und in kultivierten TAL-Zellen bestätigt. Akute und chronische Behandlungen von Mäusen mit CsA führten zu einer substantiellen Steigerung der - vorwiegend kortikalen - NKCC2-Phosphorylierung. Dieser Befund korreliert mit der Beobachtung, dass CnA β im kortikalen TAL eine stärkere apikale Präsenz aufwies als im medullären TAL. Unsere Befunde an den Ratten-TAL-Zellen unter CsA haben den Befund einer gesteigerten NKCC2-Phosphorylierung bestätigt. Da in der Zellkultur keine systemischen Einflüsse bestehen, zeigen unsere Daten klar, dass die lokale Inhibition der CnA β -Aktivität in TAL-Zellen ausreichend ist, um Veränderungen der NKCC2-Phosphorylierung zu induzieren. Obwohl stimulierende Effekte von CsA auf die NKCC2-Aktivität in vorangegangenen Studien beschrieben wurden, blieb der dafür verantwortliche Mechanismus weitgehend unklar (Esteva-Font et al., 2007; Damiano et al., 2010). Die vorliegenden Daten und neue Experimente weisen zusammen darauf hin, dass CsA durch Inhibition von CnA β die Steigerung der NKCC2-Phosphorylierung herbeiführt und damit seine Aktivierung induziert (Borschewski et al., 2015).

4.3 Zusammenspiel von SORLA und CnA β im distalen Nephron

Sorla^{-/-}-Nieren zeigten eine signifikante Steigerung der CnA β -Proteinmenge. In WT- und *Sorla*^{-/-}-Nieren wurden allerdings zwei immunreaktive CnA β Produkte beobachtet: Eines hatte das erwartete Molekulargewicht von ca. 60 kDa, während das andere nur ca. 50-55 kDa aufwies; das kleinere Produkt wurde bereits zuvor beschrieben, seine Rolle ist jedoch unklar (Tumlin et al., 1995). Um beide Produkte im renalen Kontext näher zu charakterisieren, wurde der Vergleich zwischen Ratten-TAL- und Macula densa-Zellen und den Sammelrohr-ähnlichen MCD4- und MDCK-Zellen hinzugezogen. Das größere Produkt der Mausniere stammt im Ergebnis demnach aus dem TAL, während das kürzere dem Sammelrohr entstammen dürfte, wo eine starke CnA β -Expression auch immunhistochemisch detektiert wurde, der NKCC2 jedoch fehlt. Es ist denkbar, dass das kürzere CnA β -Produkt durch alternatives *Splicing* oder durch proteolytische Spaltung entsteht (Jabr et al., 2007; Lee et al., 2009).

Die Steigerung von CnA β bei SORLA-Defizienz konnte nicht auf eine erhöhte Genaktivität zurückgeführt werden, indem die CnA β mRNA Menge in Wildtyp- und Knockout-Stamm nicht verschieden war. Die im *Sorla*^{-/-}-TAL offensichtlich vermehrte

apikale Akkumulation von CnA β zeigte, dass SORLA die CnA β -Abundanz besonders im apikalen Bereich von TAL-Zellen offenbar steuert bzw. normalerweise konstitutiv niedrig hält. Diese These wurde funktionell durch den Einsatz von CsA bei *Sorla*^{-/-}-Mäusen gestützt. Bereits nach kurzzeitiger Gabe steigerte sich die Menge von phospho-NKCC2 und erreichte den WT-Spiegel. Dieser Ansatz entsprach somit einem *Rescue*-Experiment. Der funktionelle Zusammenhang zwischen SORLA, CnA β und NKCC2 wurden damit vorerst *in vivo* belegt. In kultivierten HEK-Zellen, die endogene Expression von SORLA und CnA β besitzen, haben wir zudem eine verringerte CnA β Abundanz bei SORLA Überexpression gezeigt. Hier war nur die größere CnA β Variante involviert; ob die kleinere Variante dennoch, ggf. in anderem Kontext, in der Niere Bedeutung hat, konnte nicht gezeigt werden.

Anhand von Bindungsexperimenten konnte eine physikalische Interaktion zwischen SORLA und CnA β überzeugend nachgewiesen werden. Ansätze über Co-Immünpräzipitation wurden durch GST-*pulldown* assay bekräftigt und dienten insgesamt dazu, eine spezifische Bindung von CnA β mit dem zytoplasmatischen C-Terminus von SORLA zu demonstrieren. Dieser ist insbesondere entscheidend für die *Sorting*-Funktion von SORLA (Jacobsen et al., 1996; Riedel et al., 2002). Die Ergebnisse der MALDI-TOF MS Analyse sprechen weiterhin für die intrazelluläre Interaktion zwischen SORLA und CnA β *in vivo*. Weil SORLA keine typische Calcineurin-Bindestelle in der intrazellulären Domäne besitzt, ist es anzunehmen, dass die Bindung indirekt über Adapterproteine erfolgt. Es wurde beschrieben, dass SORLA in der zytoplasmatischen Domäne über ein Tyrosin-haltiges Motiv (Phe-Ala-Asn-Ser-His-Tyr) verfügt, welches für die Interaktion mit Adapterproteinen verantwortlich ist (Fjorback et al., 2012; Gliemann et al., 2004). SORLA kann an der Zelloberfläche mit einem Adapterprotein-2 Komplex interagieren und durch *Clathrin coated pits* internalisiert und zum Endosomenkompartiment transferiert werden (Nielsen et al., 2007). Da CnA β ebenfalls mit Clathrin assoziiert ist, könnte SORLA im Zug der Endozytose an CnA β binden und CnA β über *Trafficking* dem lysosomalen Abbauweg effizient in seiner Eigenschaft als "Endozytosefaktor" zuführen. Diese Sicht wird zumindest illustriert durch die Beobachtung, dass in HEK-Zellen radioaktiv markiertes apoA-V Protein 2,5-mal stärker degradiert wurde, wenn es zu SORLA-transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen gegeben wurde (Nilsson et al., 2008).

4.4 Schlussfolgerung

Die hier gewonnenen Resultate beschreiben einen neuen Signalweg der NKCC2-Regulation. Die Abbildung 36 stellt diesen schematisch dar. Einerseits wurde die Rolle der β -Isoform der Calcineurin-Phosphatase in der Dephosphorylierung und Deaktivierung von NKCC2 charakterisiert, andererseits wurde SORLA als ein endogener Regulator der Phosphatase identifiziert. Da Calcineurin-Inhibitoren derzeit die Grundlage der immunsupprimierenden Therapie darstellen, haben die Ergebnisse dieser Arbeit eine klinische Relevanz. Angesichts der Co-Expression von SORLA und CnA β in verschiedenen Organen können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über den nephrologischen Schwerpunkt hinaus auch Bezug für andere Systeme haben.

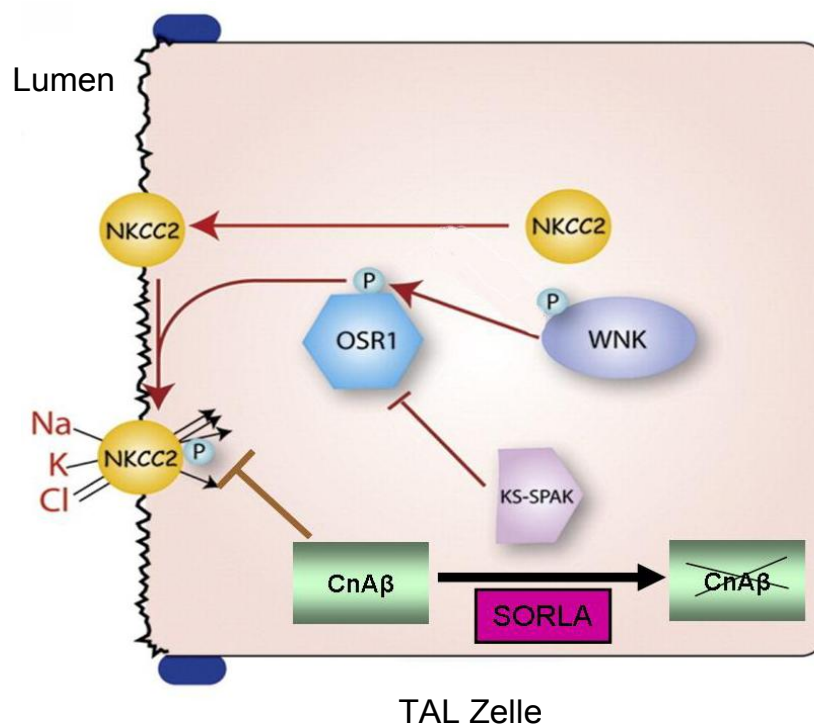


Abbildung 36: Schematische Darstellung der NKCC2-Regulation. NKCC2 wird an der luminalen Seite der Plasmamembran durch die Kinase OSR1 phosphoryliert und aktiviert. OSR1 wird wiederum von WNK-Kinasen aktiviert. KS-SPAK kann die Bindung von OSR1 an NKCC2 blockieren, wodurch seine Aktivität ausbleibt. Zudem befindet sich CnA β in räumlicher Nähe zu NKCC2 und vermag diesen zu dephosphorylieren. SORLA fungiert als endogener Regulator von CnA β , in dem es die Phosphatase bindet und diese von der apikalen Membran entfernt. Dadurch wird die apikale Expression von CnA β reduziert und die Phosphorylierung und Aktivierung von NKCC2 unterstützt. Quelle: Modifiziert nach Hoom EJ et al., (2012).

5 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretischen Hormon
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AP	Adapter-Protein
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
AQP2	Aquaporin 2
AS	Aminosäure
AVP	Arginin-Vasopressin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCT	<u>C</u> ONSTANS, <u>C</u> ONSTANS-like, <u>I</u> OC1
CD	<i>Collecting duct</i> (Sammelrohr)
CnA	Calcineurin A
CnB	Calcineurin B
CnA β	Calcineurin A β -Isoform
CNT	<i>Connecting tubule</i> (Verbindungstubulus)
CsA	Cyclosporin A
cTAL	Kortikaler TAL
CyPA	Cyclophilin A
DCT	<i>Distal convoluted tubule</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ENaC	<i>Epithelial Na channel</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FL-SPAK	<i>Full length</i> SPAK
FL-OSR1	<i>Full length</i> OSR1

GCK	Germinal Center Kinasen
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GST	Glutathion-S-Transferase
HEK-293	<i>Human embryonic kidney (cells)-293</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HFT	Hauptfarbverteiler
IgG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IT	Intermediärer Tubulus
KS-SPAK	<i>Kidney specific SPAK</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MCD4	<i>Morphogenesis checkpoint dependent 4</i>
MD	Macula densa
MDCK	<i>Madin-Darby canin kidney (cells)</i>
mTAL	Medullärer TAL
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NCC	Na ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter
NFT	Nebenfarbverteiler
NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OSR1	<i>Oxidative stress-responsive kinase</i>
PKA	Protein Kinase A
PP2B	Protein Phosphatase 2B
PT	Proximaler Tubulus
RAP	Rezeptor-assoziiertes Protein
ROMK	<i>Renal Outer Medullary Potassium (K) channel</i>

S	Serin
SORLA	<i>Sorting protein-related receptor with type A repeats</i>
SPAK	<i>Ste20- and SPS1-related proline and alanine reach kinase</i>
T	Threonin
TAL	<i>Thick ascending limb</i> (dicke aufsteigende Henle'sche Schleife)
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TM	Transmembrandomäne
t-OSR1	<i>Truncated OSR1</i>
VPS10P	<i>Vacuolar protein sorting 10 protein</i>
WNK	<i>With-no-lysine(K)-kinase</i>
WT	Wildtyp

6 Literaturverzeichnis

Aitken A, Klee CB, Cohen P. 1984. The Structure of the B-Subunit of Calcineurin. *European Journal of Biochemistry* 139: 663-671.

Alzuhheri H, Chang KC. 2003. Calcineurin activates NF-kappaB in skeletal muscle C2C12 cells. *Cell Signal* 15: 471-478.

Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CA, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, Bales KR, Cappai R, Masters CL, Gliemann J, Mufson EJ, Hyman BT, Paul SM, Nykjaer A, Willnow TE. 2005. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13461-13466.

Andersen OM, Willnow TE. 2006. Lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 29: 687-94.

Ares GR, Ortiz PA. 2012. Dynamin2, clathrin, and lipid rafts mediate endocytosis of the apical Na/K/2Cl cotransporter NKCC2 in thick ascending limbs. *J Biol Chem* 287: 37824-37834.

Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA. 2011. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F1143-1159.

Azzolin L, von Stockum S, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. 2010. The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett* 584: 2504-2509.

Bachmann S, Peters J, Engler E, Ganten D, Mullins J. 1992. Transgenic rats carrying the mouse renin gene--morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int* 41: 24-36.

Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. 1995. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 268: F885-898.

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

Borschewski A., Himmerkus N., Boldt C., Blankenstein K. I., McCormick J. A., Lazelle R., Willnow T. E., Jankowski V., Plain A., Bleich M., Ellison D. H., Bachmann S., Mutig K. 2015. Calcineurin and Sorting-Related Receptor with A-Type Repeats Interact to Regulate the Renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter. *J Am Soc Nephrol*. pii: ASN.2014070728. [Epub ahead of print]

Boyce KJ, Andrianopoulos A. 2011. Ste20-related kinases: effectors of signaling and morphogenesis in fungi. *Trends Microbiol* 19: 400-410.

Briggs JP, Kriz W, Schnermann JB. 2001. Overview of Renal Function and Structure. In *Primer on Kidney Disease*, (ed. A. Greenberg), pp. 3-20: National Kidney Foundation, Elsevier Saunders.

Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkentin JD. 2002. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta⁻deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4586-4591.

- Busauschina A, Schnuelle P, van der Woude FJ. 2004. Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 36: 229S-233S.
- Carmosino M, Gimenez I, Caplan M, Forbush B. 2008. Exon loss accounts for differential sorting of Na-K-Cl cotransporters in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 19: 4341-51.
- Castrop H, Schnermann J. 2008. Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2: expression and functional significance. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F859-866.
- Colgan J, Asmal M, Neagu M, Yu B, Schneidkraut J, Lee Y, Sokolskaja E, Andreotti A, Luban J. 2004. Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk. *Immunity* 21: 189-201.
- Damiano S, Scanni R, Ciarcia R, Florio S, Capasso G. 2010. Regulation of sodium transporters in the kidney during cyclosporine treatment. *J Nephrol* 23 Suppl 16: S191-198.
- Dathe C, Daigeler AL, Seifert W, Jankowski V, Mrowka R, Kalis R, Wanker E, Mutig K, Bachmann S, Paliege A. 2014. Annexin A2 mediates apical trafficking of renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 14: 9983-97.
- Daum S, Schumann M, Mathea S, Aumuller T, Balsley MA, Constant SL, de Lacroix BF, Kruska F, Braun M, Schiene-Fischer C. 2009. Isoform-specific inhibition of cyclophilins. *Biochemistry* 48: 6268-6277.
- Delpire E, Gagnon KB. 2008. SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells. *Biochem J* 409: 321-331.
- Doetschman T, Sholl A, Chen H, Gard C, Hildeman DA, Bommireddy R. 2011. Divergent effects of calcineurin Abeta on regulatory and conventional T-cell homeostasis. *Clin Immunol* 138: 321-330.
- Dublineau I, Pradelles P, de Rouffignac C, Elalouf JM. 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.
- Esteva-Font C, Ars E, Guillen-Gomez E, Campistol JM, Sanz L, Jimenez W, Knepper MA, Torres F, Torra R, Ballarin JA, Fernandez-Llama P. 2007. Ciclosporin-induced hypertension is associated with increased sodium transporter of the loop of Henle (NKCC2). *Nephrol Dial Transplant* 22: 2810-2816.
- Faulds D, Goa KL, Benfield P. 1993. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 45: 953-1040.
- Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. 1989. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337: 476-478.
- Fjorback AW., Seaman M., Gustafsen C., Mehmedbasic A., Gokool S., Wu C., Militz D., Schmidt V., Madsen P., Nyengaard JR., Willnow TE., Christensen EI., Mobley W., B., Nykjaer A., Andersen OM. 2012. Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J Neurosci* 32: 1467-80.
- Forbush B, 3rd, Palfrey HC. 1983. [³H]bumetanide binding to membranes isolated from dog kidney outer medulla. Relationship to the Na,K,Cl co-transport system. *J Biol Chem* 258: 11787-11792.
- Gagnon KB, Delpire E. 2012. Molecular physiology of SPAK and OSR1: two Ste20-related protein kinases regulating ion transport. *Physiol Rev* 92: 1577-1617.

- Gamba G. 1999. Molecular biology of distal nephron sodium transport mechanisms. *Kidney Int* 56: 1606-1622.
- Gamba G. 2005. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85: 423-493.
- Gamba G, Friedman PA. 2009. Thick ascending limb: the Na(+):K (+):2Cl (-) cotransporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR. *Pflugers Arch* 458: 61-76.
- Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, Hebert SC. 1994. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269: 17713-17722.
- Gimenez I, 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: 26946-26951.
- Gliemann J, Hermey G, Nykjaer A, Petersen CM, Jacobsen C, Andreasen PA. 2004. The mosaic receptor sorLA/LR11 binds components of the plasminogen-activating system and platelet-derived growth factor-BB similarly to LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein), but mediates slow internalization of bound ligand. *Biochemical Journal* 381: 203-212.
- Gooch JL, Roberts BR, Cobbs SL, Tumlin JA. 2007. Loss of the alpha-isoform of calcineurin is sufficient to induce nephrotoxicity and altered expression of transforming growth factor-beta. *Transplantation* 83: 439-447.
- Gooch JL, Pergola PE, Guler RL, Abboud HE, Barnes JL. 2004. Differential expression of calcineurin A isoforms in the diabetic kidney. *J Am Soc Nephrol* 15: 1421-1429.
- Greger R, Schlatter E. 1983. Properties of the basolateral membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Pflugers Arch* 396: 325-334.
- Hampe W, Riedel IB, Lintzel J, Bader CO, Franke I, Schaller HC. 2000. Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator. *J Cell Sci* 113: 4475-4485.
- Hampe W, Urny J, Franke I, Hoffmeister-Ullerich SAH, Herrmann D, Petersen CM, Lohmann J, Schaller HC. 1999. A head-activator binding protein is present in hydra in a soluble and a membrane-anchored form. *Development* 126: 4077-4086.
- Hannaert P, Alvarez-Guerra M, Pirot D, Nazaret C, Garay RP. 2002. Rat NKCC2/NKCC1 cotransporter selectivity for loop diuretic drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365: 193-199.
- Hebert SC, Andreoli TE. 1986. Ionic conductance pathways in the mouse medullary thick ascending limb of Henle. The paracellular pathway and electrogenic Cl- absorption. *J Gen Physiol* 87(4):567-90.
- Hermey G. 2009. The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci* 66: 2677-2689.
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205-2232.
- Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Furstenberg A, Yang CL, Roeschel T, Paliege A, Howie AJ, Conley J, Bachmann S, Unwin RJ, Ellison DH. 2011. The calcineurin inhibitor

- tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med* 17: 1304-1309.
- Hoorn EJ and Ellison DH. 2012. WNK kinases and the kidney. *Exp Cell Res* 318: 1020-1026.
- Huai Q, Kim HY, Liu Y, Zhao Y, Mondragon A, Liu JO, Ke H. 2002. Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12037-12042.
- Jabr RI, Wilson AJ, Riddervold MH, Jenkins AH, Perrino BA, Clapp LH. 2007. Nuclear translocation of calcineurin A β but not calcineurin A α by platelet-derived growth factor in rat aortic smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C2213–C2225
- Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J, Petersen CM. 2001. Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *Journal of Biological Chemistry* 276: 22788-22796.
- Jacobsen L, Madsen P, Moestrup SK, Lund AH, Tommerup N, Nykjaer A, Sottrup-Jensen L, Gliemann J, Petersen CM. 1996. Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the α 2-macroglobulin receptor-associated protein. *J Biol Chem* 271: 31379-31383.
- Jo I, Ward DT, Baum MA, Scott JD, Coghlan VM, Hammond TG, Harris HW. 2001. AQP2 is a substrate for endogenous PP2B activity within an inner medullary AKAP-signaling complex. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F958-965.
- Jung J, Basile DP, Pratt JH. 2011. Sodium reabsorption in the thick ascending limb in relation to blood pressure: a clinical perspective. *Hypertension* 57: 873-9
- Kanaki T, Bujo H, Hirayama S, Tanaka K, Yamazaki H, Seimiya K, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y. 1998. Developmental regulation of LR11 expression in murine brain. *DNA Cell Biol* 17: 647-657.
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Thick Ascending Limb of the Loop of Henle (TAL). In: *Basic & Clinical Pharmacology*. McGraw-Hill Medical, 10th Edition; 2012, Chapter 15.
- Ke H, Huai Q. 2003. Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 1095-1102.
- Kieferle S, Fong P, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ. 1994. Two highly homologous members of the CIC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6943-7.
- Klee CB, Ren H, Wang X. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273: 13367-13370.
- Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagel S. 2010. *Physiologie*. Kapitel 7. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- 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.
- Laupacis A, Keown PA, Ulan RA, McKenzie N, Stiller CR. 1982. Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant. *Can Med Assoc J* 126: 1041-1046.
- Lee JE, Jang H, Cho EJ, Youn HD. 2009. Down syndrome critical region 1 enhances the proteolytic cleavage of calcineurin. *Exp Mol Med* 41:471–477.

- Li SZ, McDill BW, Kovach PA, Ding L, Go WY, Ho SN, Chen F. 2007. Calcineurin-NFATc signaling pathway regulates AQP2 expression in response to calcium signals and osmotic stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1606-1616.
- Li H, Rao A, Hogan PG. 2011. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* 21: 91-103.
- Lin SH, Yu IS, Jiang ST, Lin SW, Chu P, Chen A, Sytwu HK, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Yang SS. 2011. Impaired phosphorylation of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter by oxidative stress-responsive kinase-1 deficiency manifests hypotension and Bartter-like syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 17538-17543.
- Lintzel J, Franke I, Riedel IB, Schaller HC, Hampe W. 2002. Characterization of the VPS10 domain of SorLA/LR11 as binding site for the neuropeptide HA. *Biol Chem* 383: 1727-1733.
- Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
- McCormick JA, Mutig K, Nelson JH, Saritas T, Hoorn EJ, Yang CL, Rogers S, Curry J, Delpire E, Bachmann S, Ellison DH. 2011. A SPAK isoform switch modulates renal salt transport and blood pressure. *Cell Metab* 14: 352-364.
- McCormick JA, Ellison DH. 2011. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol Rev* 91: 177-219
- Molony DA, Reeves WB, Hebert SC, Andreoli TE. 1987. ADH increases apical Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *Am J Physiol* 252: F177-187.
- Mount DB, Gamba G. 2001. Renal potassium-chloride cotransporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 685-91.
- Morwald S, Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Kanaki T, Seimiya K, Morisaki N, Nimpf J, Schneider WJ, Saito Y. 1997. A novel mosaic protein containing LDL receptor elements is highly conserved in humans and chickens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 996-1002.
- Muth TR, Caplan MJ. 2003. Transport protein trafficking in polarized cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 333-66
- Mutig K, Paliege A, Kahl T, Jons T, Muller-Esterl W, 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.
- Mutig K, Kahl T, Saritas T, Godes M, Persson P, Bates J, Raffi H, Rampoldi L, Uchida S, Hille C, Dosche C, Kumar S, Castañeda-Bueno M, Gamba G, Bachmann S. 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*. 26;286(34):30200-10.
- Nielsen MS, Gustafsen C, Madsen P, Nyengaard JR, Hermey G, Bakke O, Mari M, Schu P, Pohlmann R, Dennes A, Petersen CM. 2007. Sorting by the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA. *Mol Cell Biol* 27: 6842-6851.
- Nielsen S, Maunsbach AB, Ecelbarger CA, Knepper MA. 1998. Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am J Physiol* 275: F885-893.

- Nilsson SK, Lookene A, Beckstead JA, Gliemann J, Ryan RO, Olivecrona G. 2007. Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochemistry* 46: 3896-3904.
- Offe K, Dodson SE, Shoemaker JT, Fritz JJ, Gearing M, Levey AI, Lah JJ. 2006. The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *Journal of Neuroscience* 26: 1596-1603.
- Otsuka M, Terada Y, Yang T, Nonoguchi H, Tomita K, Marumo F. 1994. Localization of cyclophilin A and cyclophilin C mRNA in murine kidney using RT-PCR. *Kidney_Int* 45: 1340-1345.
- Park HJ, Curry JN, McCormick JA. 2013. Regulation of NKCC2 activity by inhibitory SPAK isoforms: KS-SPAK is a more potent inhibitor than SPAK2. *Am J Physiol Renal Physiol*. 305:F1687-96
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.
- Perrino BA, Soderling TR. Biochemistry and pharmacology of calmodulin-regulated phosphatase Calcineurin. In: *Calmodulin and Signal Transduction*. Eldik L, Watterson DM (editors). New York: Academic Press; 1998. pp. 169-236.
- Piechotta K, Lu J, Delpire E. 2002. Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem* 277: 50812-50819.
- Piechotta K, Garbarini N, England R, Delpire E. 2003. Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase. *J Biol Chem* 278: 52848-52856.
- Rafiqi FH, Zuber AM, Glover M, Richardson C, Fleming S, Jovanovic S, Jovanovic A, O'Shaughnessy KM, Alessi DR. 2010. Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO Mol Med* 2: 63-75.
- Reddy RN, Knotts TL, Roberts BR, Molkenin JD, Price SR, Gooch JL. 2011. Calcineurin A-beta is required for hypertrophy but not matrix expansion in the diabetic kidney. *J Cell Mol Med* 15: 414-422.
- Reiche J, Theilig F, Rafiqi FH, Carlo AS, Militz D, Mutig K, Todiras M, Christensen EI, Ellison DH, Bader M, Nykjaer A, Bachmann S, Alessi D, Willnow TE. 2010. SORLA/SORL1 functionally interacts with SPAK to control renal activation of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter 2. *Mol Cell Biol* 30: 3027-3037.
- Richardson C, Sakamoto K, de los Heros P, Deak M, Campbell DG, Prescott AR, Alessi DR. 2011. Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* 124: 789-800.
- Riedel IB, Hermans-Borgmeyer I, Hubner CA. 2002. SorLA, a member of the LDL receptor family, is expressed in the collecting duct of the murine kidney. *Histochem Cell Biol* 118: 183-191.
- Rosenbaek LL, Kortenoeven ML, Aroankins TS, Fenton RA. 2014. Phosphorylation decreases ubiquitylation of the thiazide-sensitive cotransporter NCC and subsequent clathrin-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 289:13347-13361.
- Roy J, Cyert MS. 2009. Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal* 2: re9.
- Rusnak F, Mertz P. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80: 1483-1521.

- Russel JM. 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 80: 2011-76
- Saritas T, Borschewski A, McCormick JA, Paliege A, Dathe C, Uchida S, Terker A, Himmerkus N, Bleich M, Demaretz S, Laghmani K, Delpire E, Ellison DH, Bachmann S, Mutig K. 2013. SPAK differentially mediates vasopressin effects on sodium cotransporters. *J Am Soc Nephrol* 24: 407-418.
- Schmid SL. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 66: 511-48
- Schmidt, Lang, Heckmann. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31. Auflage, 2010. Kapitel 29. Springer Medizin Verlag Heidelberg. ISBN-13 978-3-642-01650-9
- Schnermann J. 1998. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol* 274: R263-279.
- Skott O, Briggs JP. 1987. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* 237: 1618-1620.
- Starzl TE, Weil R, 3rd, Iwatsuki S, Klintmalm G, Schroter GP, Koep LJ, Iwaki Y, Terasaki PI, Porter KA. 1980. The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 151: 17-26.
- Stewart AA, Ingebritsen TS, Cohen P. 1983. The Protein Phosphatases Involved in Cellular-Regulation .5. Purification and Properties of a Ca-2+-Calmodulin-Dependent Protein Phosphatase (2b) from Rabbit Skeletal-Muscle. *European Journal of Biochemistry* 132: 289-295.
- Taira K, Bujo H, Hirayama S, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Ishii I, Miida T, Schneider WJ, Saito Y. 2001. LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE-rich lipoproteins in vitro. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21: 1501-1506.
- Tumlin JA. 1997. Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport. *Am J Kidney Dis* 30: 884-895.
- Tumlin JA, Someren JT, Swanson CE, Lea JP. 1995. Expression of calcineurin activity and alpha-subunit isoforms in specific segments of the rat nephron. *Am J Physiol* 269: F558-563.
- Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR. 2005. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 391: 17-24.
- Welker P, Bohlick A, Mutig K, Salanova M, Kahl T, Schluter H, Blottner D, Ponce-Coria J, Gamba G, 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.
- Williams CR, Gooch JL. 2012. Calcineurin inhibitors and immunosuppression - a tale of two isoforms. *Expert Rev Mol Med* 14: e14.
- Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A. 2008. VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci* 9: 899-909.
- Willnow TE, Kjolby M, Nykjaer A. 2011. Sortilins: new players in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 22: 79-85.

Wu MS, Yang CW, Bens M, Peng KC, Yu HM, Vandewalle A. 2000. Cyclosporine stimulates Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport activity in cultured mouse medullary thick ascending limb cells. *Kidney Int.* 58: 1652-1663.

Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y. 1996. Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem* 271: 24761-24768.

Zaarour N, Defontaine N, Demaretz S, Azroyan A, Cheval L, Laghmani K. 2011. Secretory carrier membrane protein 2 regulates exocytic insertion of NKCC2 into the cell membrane. *J Biol Chem* 286: 9489-9502.