

**Die hyperosmolaritätsvermittelte Induktion des  
nierenspezifischen Chloridkanals CLC-K1 und  
seiner Untereinheit Barttin wird durch die Serum  
und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 und das  
Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein  
reguliert**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

Biologie und vorklinische Medizin

der Universität Regensburg



vorgelegt von

Roland Jeblick aus Leverkusen

Regensburg Januar 2010

**Promotionsgesuch eingereicht am:**

12. Januar 2010

**Die Arbeit wurde angeleitet von:**

Prof. Dr. med. Armin Kurtz

**Prüfungsausschuss:**

Vorsitzender :

1. Gutachter (1. Prüfer):

2. Gutachter (2. Prüfer):

3. Prüfer :

Prof. Dr. K. Kunzelmann

Prof. Dr. A. Kurtz

Prof. Dr. BK. Krämer

Prof. Dr. WH. Castrop

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 2006 bis Januar 2010 in der  
Klinik und Poliklinik für innere Medizin II des Klinikums der Universität  
Regensburg.

## Inhalt

1. Einleitung.....	7
1.1. Die Niere.....	7
1.1.1. Nierenanatomie.....	7
1.1.2. Nierenfunktion .....	10
1.2. Chloridkanäle .....	14
1.2.1. Die Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2 und ihre Untereinheit Barttin .....	15
1.2.2. Regulation von CLC-K1, CLC-K2 und Barttin.....	18
1.3. Osmolarität und hyperosmolarer Stress.....	19
1.3.1. TonEBP /OREBP /NFAT5 .....	20
1.3.2. Die Serum und Glukokortikoid induzierbare Kinase1 (SGK1) ....	23
1.3.3. Aldosteron und das Renin-Angiotensin-Aldosteron System.....	25
2. Fragestellung.....	27
3. Material und Methoden .....	28
3.1. Methoden .....	28
3.1.1. Zellkultur .....	28
3.1.2. Bestimmung der Zellzahl .....	30
3.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	30
3.1.4. RNA Isolation aus Zellkulturproben.....	30
3.1.5. Reverse Transkription.....	31
3.1.6. Real-time PCR.....	31
3.1.7. RNA Interferenz mittels siRNA .....	33
3.1.8. Zytotoxizitätstest MTT-Test .....	34
3.1.9. Proteinisolation.....	34
3.1.10. Proteingehaltsbestimmung .....	35
3.1.11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	35
3.1.12. Western Blot .....	37
3.1.13. Genomatix Analyse zur Promotoruntersuchung .....	38
3.1.14. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....	39
3.1.15. DAB Färbung von Kryoschnitten .....	41
3.1.16. Dehydratationsversuch.....	41
3.1.17. Hoch- und Niedrigsalzdiät bei Dahl salzsensitiven bzw. resistenten Ratten .....	42
3.1.18. Aldosteron RIA .....	42
3.1.19. Statistik .....	43

---

<b>3.2. Materialien</b> .....	43
<b>3.2.1. Geräte</b> .....	43
<b>3.2.2. Verbrauchsmaterialien</b> .....	44
<b>3.2.3. Chemikalien und Reagenzien</b> .....	45
<b>3.2.4. Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie</b> .....	46
<b>4. Ergebnisse</b> .....	47
<b>4.1. Einfluss von Hyperosmolarität auf Zellen des Pars convoluta (DCT) ..</b> .....	47
<b>4.1.1. Regulation der mRNA Expression von SGK1 unter</b> <b>hyperosmolaren Bedingungen</b> .....	47
<b>4.1.2. Regulation der Protein Expression von SGK1 unter</b> <b>hyperosmolaren Bedingungen</b> .....	48
<b>4.1.3. Regulation der mRNA Expression von CLC-K1 und Barttin unter</b> <b>hyperosmolaren Bedingungen</b> .....	49
<b>4.1.4. Regulation der Protein Expression von CLC-K1 und Barttin unter</b> <b>hyperosmolaren Bedingungen</b> .....	50
<b>4.1.5. Einfluss der Hyperosmolarität auf die p38 MAPK und die</b> <b>phospho-p38 MAPK</b> .....	52
<b>4.1.6. Einfluss des MAPK und MEK1 Signalwegs auf SGK1, CLC-K1</b> <b>und Barttin</b> .....	54
<b>4.1.7. Transfektion der DCT Zellen mit SGK1 spezifischer siRNA</b> .....	55
<b>4.1.8. MTT Assay</b> .....	59
<b>4.2. Einfluss von Hyperosmolarität auf Zellen des innermedullären</b> <b>Sammelrohrs</b> .....	60
<b>4.2.1. Regulation der mRNA Expression von TonEBP unter</b> <b>hyperosmolaren Bedingungen</b> .....	60
<b>4.2.2. Regulation der mRNA Expression von AR, BGT1 und SMIT unter</b> <b>hyperosmolaren Bedingungen</b> .....	61
<b>4.2.3. Regulation der Proteinexpression von TonEBP, AR, BGT1 und</b> <b>SMIT unter hyperosmolaren Bedingungen</b> .....	64
<b>4.2.4. Einfluss des p38 MAPK und MEK1 Signalwegs auf TonEBP und</b> <b>die osmoprotektiven Gene</b> .....	67
<b>4.2.5. Einsatz von TonEBP spezifischer siRNA</b> .....	69
<b>4.2.6. Einsatz TonEBP spezifischer siRNA unter Hyperosmolarität</b> ....	72
<b>4.2.7. Proteinexpression nach Einsatz TonEBP spezifischer siRNA</b> ...	75
<b>4.2.8. MTT Assay</b> .....	76
<b>4.3. Genomatix Analyse zur Promotoruntersuchung</b> .....	76
<b>4.3.1. EMSA</b> .....	76
<b>4.4. In vivo Experiment – Dehydratationsversuch</b> .....	78
<b>4.4.1. mRNA Expressionsanalysen nach Dehydratation</b> .....	79

---

4.4.2. Proteinexpression nach Dehydratation .....	81
4.4.3. Färbung von Nierenschnitten nach Dehydratation.....	81
4.5. Aldosteron RIA aus Rattenurinen nach Hoch- bzw. Nidrigsalzdiät	82
4.6. Aldosteronstimulation auf mpkCCD Zellen .....	83
5. Diskussion .....	86
5.1. Regulation von CLC-K1 und Barttin unter Hyperosmolarität.....	86
5.2. Regulation von CLC-K1 und Barttin durch SGK1 unter hyperosmolaren Bedingungen .....	86
5.3. Regulation von CLC-K1 und Barttin durch TonEBP unter hyperosmolaren Bedingungen .....	90
5.4. Regulation von CLC-K1 und Barttin durch klassische Aktivatoren von SGK1 .....	93
6. Ausblick .....	95
7. Zusammenfassung.....	96
8. Abkürzungen .....	98
9. Literaturverzeichnis .....	102
10. Abbildungsverzeichnis .....	117
11.1. Vortragsverzeichnis .....	120
11.2. Publikationsverzeichnis .....	120
11.3. Posterbeiträge .....	121
12. Danksagung .....	123
13. Eidesstattliche Erklärung.....	124

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Niere

Die Niere ist für die Homöostase des Wasserhaushalts, des Elektrolytgleichgewichts sowie des Blut-pH-Wertes verantwortlich und spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und Fremdstoffen.

Zu den über die Niere ausgeschiedenen Stoffwechselprodukten zählen die sogenannten harnpflichtigen Substanzen Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin und das Rest-N, welches stickstoffhaltige Substanzen aus dem Eiweißstoffwechsel wie z.B. Ammoniak und Ammonium umfasst, die über die Blut-Hirnschranke ins zentrale Nervensystem gelangen und zum sogenannten urämischen Koma führen können.

Durch die Bildung verschiedener Hormone und Enzyme, besitzt die Niere ferner maßgeblichen Einfluss für die Blutbildung (über Erythropoetin), den Blutdruck (über Renin) sowie den Knochenstoffwechsel (über Calcitriol).

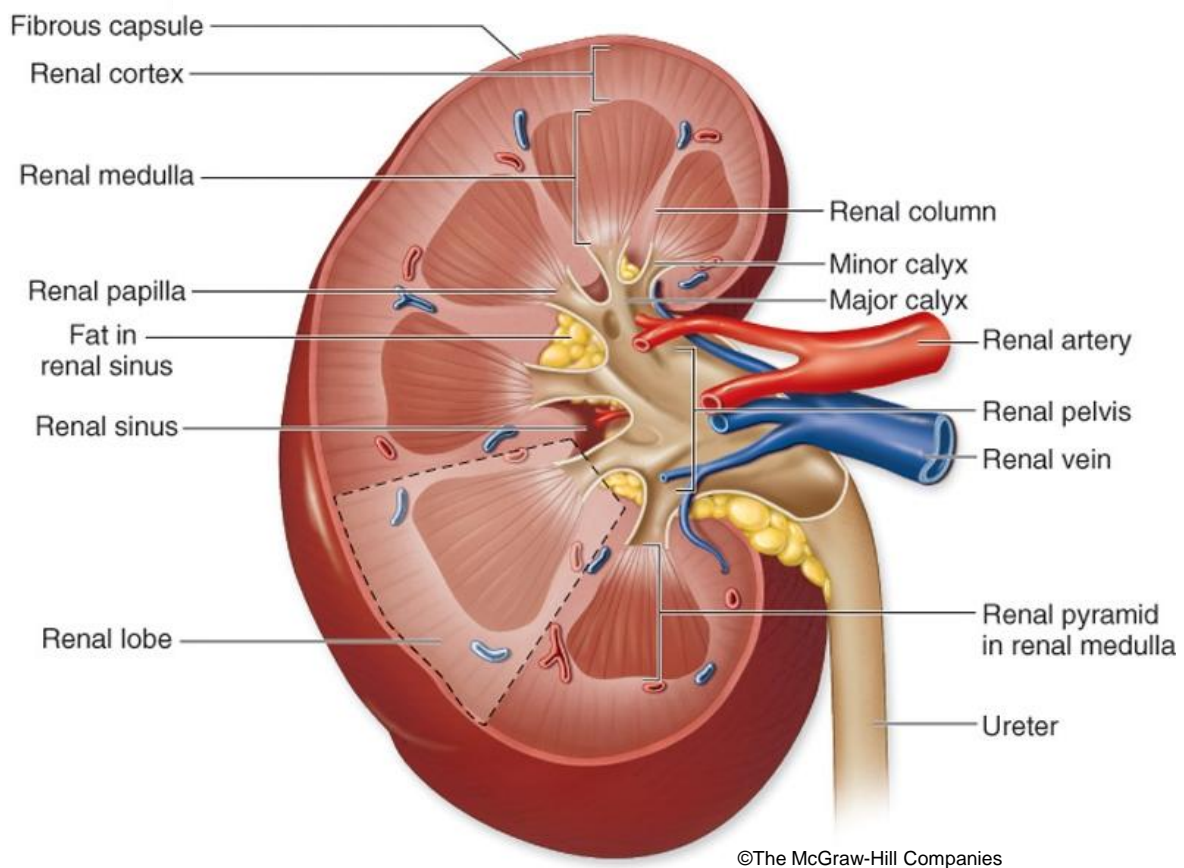
### 1.1.1. Nierenanatomie

Die Niere ist ein paarig, retroperitoneal beiderseits der Wirbelsäule angelegtes Organ in Höhe der unteren Rippen. Wegen der Nähe zur Leber, liegt die rechte Niere etwa eine halbe Wirbelhöhe tiefer als die linke. Die Nieren sind in einem Fettgewebkörper, der Capsula adiposa eingebettet und abgepolstert. Die Niere in der Capsula adiposa wird zusammen mit der Nebenniere von einem Faszien sack, der Fascia renalis eingefasst. Das Gewicht der menschlichen Nieren liegt zwischen 120 und 200g, bei einer Länge von zehn bis zwölf Zentimetern und einer Breite von fünf bis sechs Zentimetern.

Der nach medial gerichtete Rand der Niere bildet eine Einziehung, den sogenannten Nierenhilus, in dem die Blutgefäße münden und der Harnleiter entspringt. Die arterielle Versorgung der Niere wird über die Arteria renalis, welche aus der Aorta abdominalis entspringt sichergestellt und über die Vena renalis wird das Blut in die Vena cava inferior zurückgeführt. Unter dem Fettgewebkörper wird die Niere von einer bindegewebigen Organkapsel, der Capsula fibrosa umhüllt. Das Nierenparenchym wird in die Nierenrinde (Cortex renalis) und das zum Nierenhilus gerichtete Nierenmark (Medulla renalis) unterteilt. Das Nierenmark

bildet 10-20 pyramidenförmige Mark- oder Nierenpyramiden, welche mit ihrer Spitze zum Hilus zeigen und in den Hohlraum der Nierenkelche (Calix renalis) reichen. Die Spitzen der Markpyramiden, die Papillen, besitzen viele kleine Öffnungen, die Foramina papillaria, über welche der Harn austritt. Die Nierenkelche bilden das Nierenbecken (Pelvis renalis) welches in den Ureter übergeht. Das Mark lässt sich bereits makroskopisch aufgrund farblicher Unterschiede in äußeres und inneres Mark unterteilen.

Die Nierenrinde liegt zwischen den Basen der Markpyramiden und der Organkapsel. Sie wird, von den Markpyramiden ausgehend, durch die Markstrahlen (Radii medullares) durchzogen. (Abbildung 1)



**Abbildung 1** Nierenaufbau

Rechte Niere Koronarschnitt – schematischer Nierenaufbau [1]

In der Nierenrinde befinden sich beim Menschen pro Niere etwa eine Million Nephrone, in denen der Primärharn gebildet wird. Jedes Nephron besteht aus dem Nierenkörperchen (Corpusculum renalis) und den Nierenkanälchen (Tubulus renalis). Das Nierenkörperchen liegt überwiegend in der Nierenrinde, während die

Nierentubuli aus der Nierenrinde kommend in das angrenzende Nierenmark ziehen. Das Nierenkörperchen besteht aus einem Gefäßkonvolut, dem sogenannten Glomerulus, und der ihn umgebenden Bowman Kapsel (Capsula glomeruli). Die Gefäßwand in den Glomeruli ist nur für niedermolekulare Substanzen (bis 70 kDa) durchlässig. Hochmolekulare Substanzen wie das Plasmaalbumin und Blutzellen können unter physiologischen Umständen die Kapillarwand nicht passieren und gelangen damit nicht in den von den Glomeruli gebildeten Primärharn. Vom in den Tubuli gesammelten Primärharn werden pro Minute etwa 125 ml also etwa 180 Liter/ Tag gebildet. Er besteht aus Wasser, Harnstoff, Elektrolyten und anderen niedermolekularen Stoffen wie Glucose und Aminosäuren. Der überwiegende Teil der im Primärharn enthaltenen Moleküle wird bereits im proximalen Tubulus, vor allem durch aktive Transportvorgänge, zurückgewonnen. Der Großteil des Wassers wird passiv durch Osmose zurückgewonnen. Über die tubulären Zellen können auch andere Stoffe wie z.B. Medikamente und Drogen in den Primärharn abgegeben werden. Die Tubuli lassen sich in verschiedene Bereiche, den proximalen und den distalen Tubulus unterteilen. Der proximale Tubulus (PT) kann zytologisch in die Bereiche S1, S2 und S3 unterteilt werden. Anatomisch wird er in das proximale Konvolut (pars convoluta) und den geraden absteigenden Ast (pars recta) (dTL) unterteilt. Daran anschließend folgen die Henle Schleife, der gerade, dünne aufsteigende Abschnitt (aTL) des distalen Tubulus, welcher in den dicken aufsteigenden Ast übergeht (TAL) und schließlich das distale Konvolut (DCT), an welches ein Verbindungstubulus (CNT) als Übergang zu einem Sammelrohr (CD) folgt. Die Sammelrohre beginnen in der Nierenrinde (kortikales Sammelrohr – CCD), ziehen sich durch das Nierenmark (medulläres Sammelrohr – MCD) [93], in dessen Innenzone sie sich vereinen, um schließlich an der Papille in das Nierenbecken zu münden. In Abhängigkeit davon, wie weit die Henle´sche Schleife der Nephrone in das Nierenmark hineinziehen, unterscheidet man zwischen kortikalen, kurzen und langen Nephrone. (Abbildung 2)

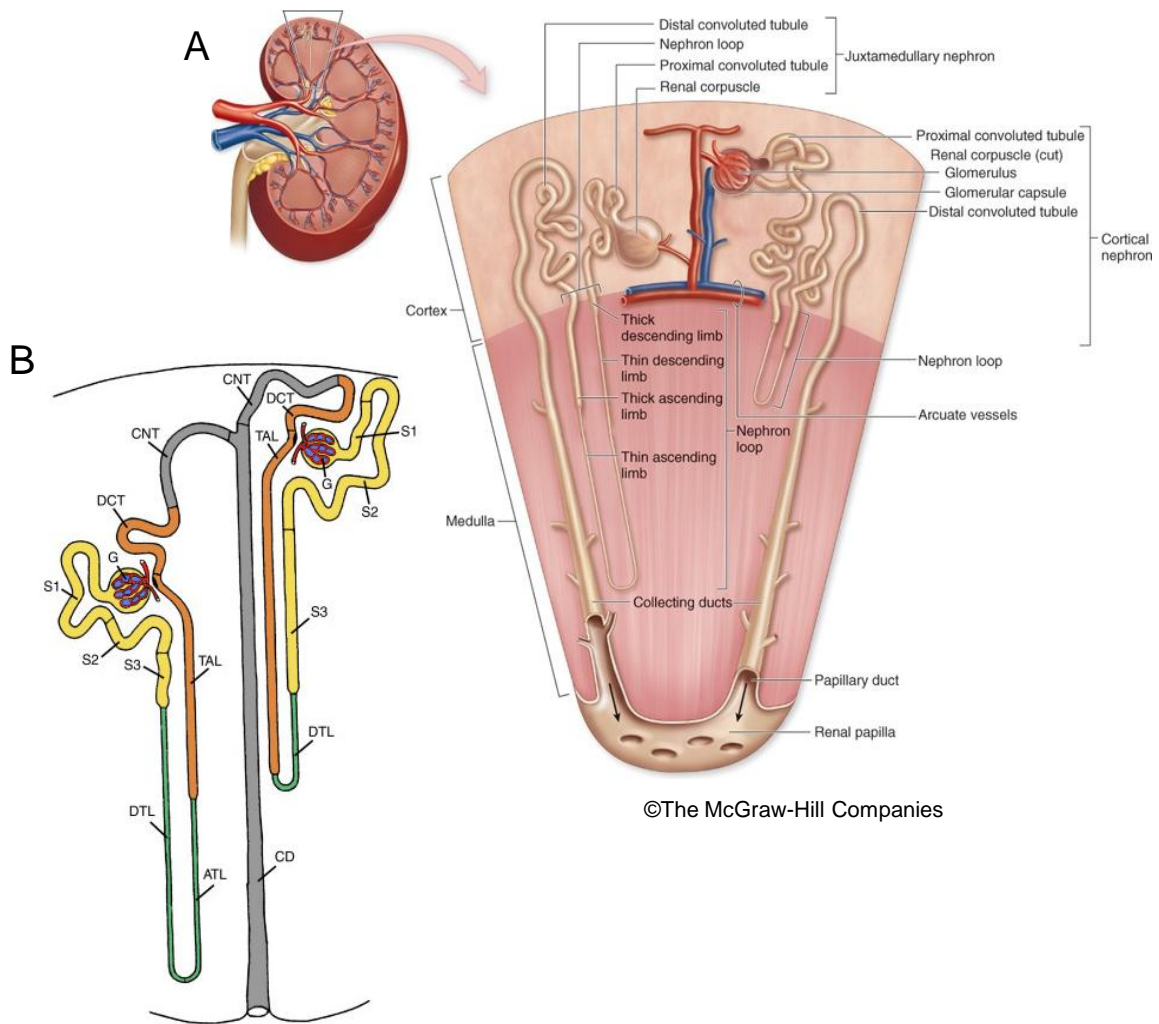


Abbildung 2 Nephronstruktur

A: Schematische Nephronstruktur [1] und B: Nephronnomenklatur [134]

### 1.1.2. Nierenfunktion

Die Rückresorption von Wasser, Salzen, Glukose und Aminosäuren verläuft in den einzelnen Tubulusabschnitten über aktive energiepflichtige oder passive Transportmechanismen. Die Rückresorption von Wasser wird überwiegend durch Aquaporine (AQP) reguliert, die je nach Nephronsegment in verschiedenen Formen vorliegen und teilweise durch das antidiuretische Hormon (ADH) gesteuert werden [84]. Die verschiedenen tubulären Segmente weisen unterschiedliche Expressionsmuster an luminal und oder basolateral lokalisierten Ionenkanälen und Transportern auf, die am Transport von Natriumionen und weiteren Elektrolyten beteiligt sind [7;84;105]. Im proximalen Tubulus erfolgt bereits eine 75%ige Rückresorption von Wasser, Elektrolyten wie Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid

und Hydrogencarbonat sowie kleiner Makromoleküle wie Kohlenhydrate und Aminosäuren. Dabei erzeugt die basolateral exprimierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ein Membranpotential welches dafür sorgt, dass Ionen durch sekundär aktive Ionenkanäle, wie beispielsweise die KCNQ-Kaliumkanäle [100], passieren können. Durch den Verbrauch von ATP werden von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase drei Natriumionen aus der Zelle ins Blut transportiert, aber nur zwei Kaliumionen zum Ausgleich in die Zelle transportiert. Des Weiteren wird von der Carboanhydrase Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) luminal gespalten, wobei  $\text{CO}_2$  entsteht. Intrazellulär produziert sie aus  $\text{CO}_2$  und Wasser in einer Hydratisierungsreaktion wieder Hydrogencarbonat. Die dabei auch frei werdenden Protonen werden dann, ebenfalls im proximalen Tubulus, über Natrium/ Protonen Antiporter aus der Zelle in das Lumen transportiert, während im Ausgleich Natriumionen aus dem Lumen in die Zelle transportiert werden [62]. Hydrogencarbonat verlässt über einen  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  Symporter, getrieben über das Membranpotential, gegen den Konzentrationsgradienten die Zelle auf der Blutseite. Organische Substanzen (z.B. Glukose, Aminosäuren) werden über Natrium abhängige Symporter (z.B. Glucose über die Natrium-Glucose-Transporter SGLT1/2) aus dem proximalen Tubulus rückresorbiert. Im absteigenden Ast der Henle Schleife (dTL) wird kein  $\text{Na}^+$  mehr, dafür weiterhin Wasser, nun getrieben durch den osmotischen Druck im Interstitium, zurück gewonnen und im Harn dadurch die Salzkonzentration erhöht. Hingegen wird im aufsteigenden Ast (aTL) kein Wasser, aber  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ , passiv entlang eines elektrochemischen Gradienten, in das Interstitium transportiert. Im distalen Tubulus erfolgt dann die weitere Rückresorption von Salzen. Der dicke aufsteigende Ast ist für Wasser impermeabel und bildet den entscheidenden Motor für das osmotische Konzentrationsgefälle innerhalb der Niere mit seiner zentralen Aufgabe, der Harnkonzentration. Die Rückresorption von Wasser und Salzen aus dem Primärharn verursacht im Verlauf der Henle Schleife starke Unterschiede in der Osmolarität der Tubulusflüssigkeit. Vom zu Beginn isotonen Primärharn (300 mosm/kg) nimmt die Osmolarität zur Scheitelspitze der Henle Schleife bis auf 1200 mosm/kg zu. Im aufsteigenden Ast nimmt die Osmolarität wegen der Rückresorption von Salzen dann wieder ab, wird aber im Sammelrohr durch Wasserrückresorption wieder erhöht. Über die parallele Ausrichtung von absteigendem und aufsteigendem Ast der Henle Schleife, den Sammelrohren und der Vasa recta, entsteht ein Gegenstromsystem, das bedeutenden Einfluss auf die

unterschiedlichen Osmolaritäten und somit die Rückresorption aller Substanzen hat. Im absteigenden Ast der Henle Schleife wird Wasser aus dem Tubulus in das umgebende hyperosmolare Interstitium gezogen, wodurch die Osmolarität im Tubulus stark zunimmt. Im aufsteigenden wasserundurchlässigen Ast kommt es, unter anderem über den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  Transporter (NKCC2 [64;130]), zur Rückresorption von Ionen aus der Tubulusflüssigkeit, wodurch deren Osmolarität sinkt. Aus den Sammelrohren tritt schließlich wieder Wasser in das hyperosmolare Interstitium über, wodurch der Harn wieder stärker hyperosmolare wird. (Abbildung 3)

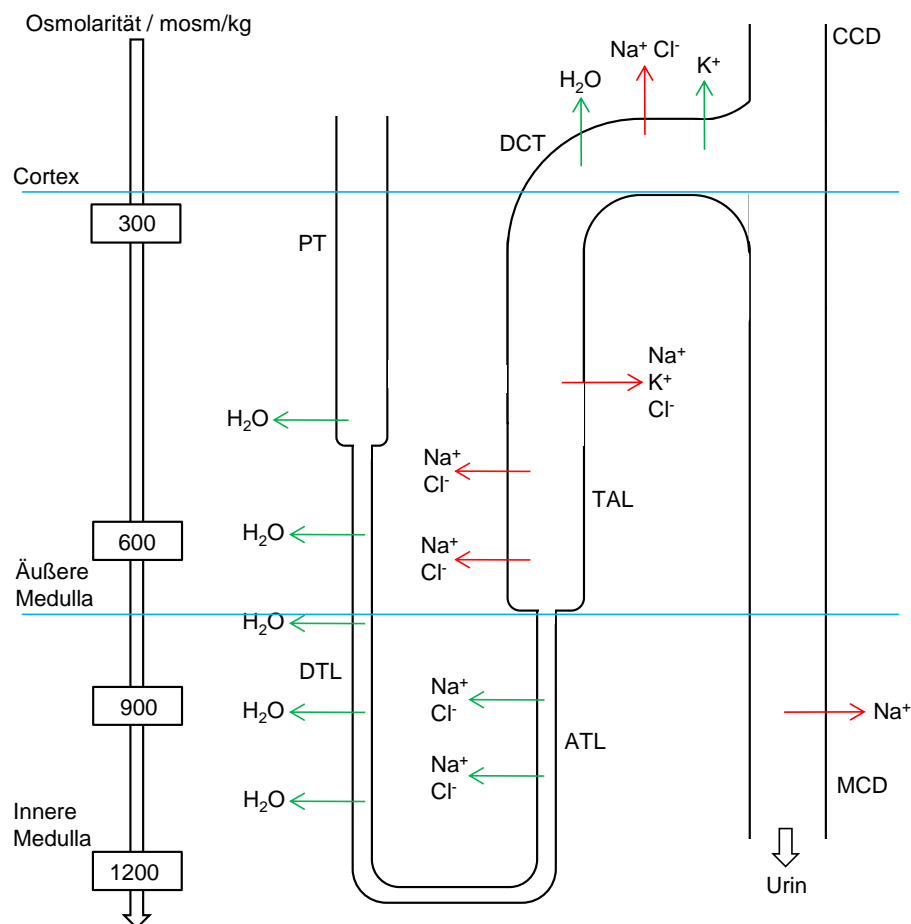


Abbildung 3 Elektrolytrückresorption

Wasser- und Elektrolytrückresorption unter Einfluss des Gegenstromprinzips entlang des Nephrons. Grüne Pfeile kennzeichnen passiven Transport, rote Pfeile aktiven Transport.

Der NKCC2 im TAL übernimmt eine entscheidende Rolle in der Rückresorption von Elektrolyten, da er neben 30% der Natriumionen auch  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  aus dem Lumen in die Zelle transportiert. Dort wird  $\text{K}^+$  durch den ROMK (Renaler

außermedullärer Kaliumkanal) wieder ins Lumen transportiert, basolateral durch den CLC-K1 und CLC-K2  $\text{Cl}^-$  aus der Zelle ins Blut transportiert und durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase elektrogen  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{K}^+$  ausgetauscht, wodurch apikal der Ionentransport in die Zelle gefördert wird. Der NKCC2 und somit ein wichtiger Bestandteil der Rückresorption, kann durch Schleifendiuretika, wie zum Beispiel Furosemid und Bumetanid gehemmt werden [143]. Bei der Hemmung bindet es an die Chloridbindungsstelle des Kotransporters und hemmt so kompetitiv den Chloridtransport [52]. Da der Chloridtransport des NKCC2 mit dem von Kalium und Natrium gekoppelt ist, bewirkt es auch eine Hemmung der Kalium- und Natriumreabsorption [70]. Das Resultat der Hemmung liegt neben der verringerten Rückresorption der Elektrolyte vor allem in einer im folgenden stark eingeschränkten Wasserrückresorption, resultierend in einer forcierten Diurese mit Harnausscheidungen von theoretisch bis zu 50 Litern (Furosemid) am Tag. Im DCT werden über den thiazidhemmbaren  $\text{Na}^+,\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NCC) [8;54] weitere Natrium- sowie Chloridionen rückresorbiert. Basolateral ist, wie auch im TAL, die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aktiv und vor allem über CLC-K2 wird  $\text{Cl}^-$  ins Blut rückresorbiert. (Abbildung 4)

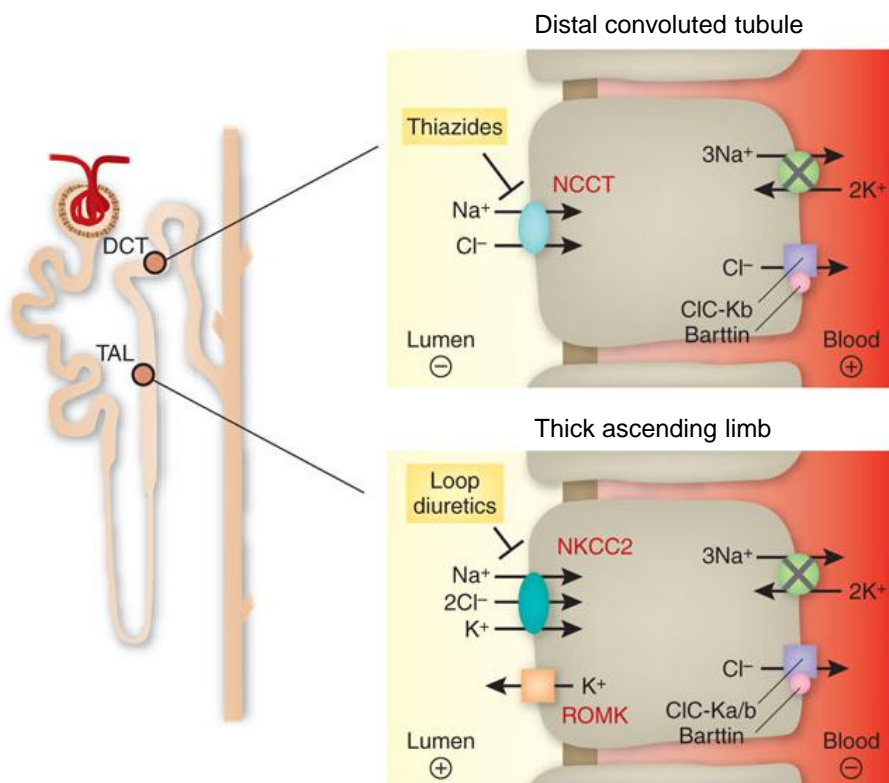


Abbildung 4 Rückresorption in TAL und DCT

Schematische Darstellung der Elektrolytreabsorption im TAL und DCT des Nephrons [40]

Im DCT, CNT und Sammelrohr spielt der epitheliale Natriumkanal (ENaC) eine herausragende Rolle in der finalen  $\text{Na}^+$  Rückresorption. Der aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) aufgebaute ENaC ermöglicht den apikalen Einstrom von  $\text{Na}^+$  entlang des Konzentrationsgefälles in die Zelle. Er wird durch Mineralkortikoide verstärkt exprimiert und kann durch Amiloriddiuretika inhibiert werden [138]. Mutationen im Gen des ENaC können zu Unter- als auch zu Überfunktionen des Kanals führen. Eines der bekanntesten Syndrome durch Überfunktion des ENaC ist das sogenannte Liddle-Syndrom, bei dem die  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Untereinheit defekt ist und es so zu einer verlangsamten Degradation des Kanals und dadurch zur Überfunktion mit daraus resultierender Hypertonie und Hypokaliämie kommt [147]. Bei Mutationen in der  $\alpha$ -Untereinheit kann es zum Pseudohypoaldosteronismus Typ I kommen, bei welchem eine Unterfunktion des Kanals vorliegt, resultierend in hypovolämischer Hyponatriämie und Hyperkaliämie [26]. Des Weiteren findet im Bereich von DCT bis Sammelrohr auch die finale  $\text{K}^+$ -Ausscheidung über den ROMK (renaler außermedullärer Kaliumkanal) statt [181]. Im Sammelrohr wird nochmals über Aquaporine (AQP2, AQP3 und AQP4) Wasser durch den osmotischen Gradienten, der entscheidend im TAL aufgebaut wurde, rückresorbiert [142]. Die letztlich aufkonzentrierte und ausgeschiedene Harnmenge beträgt beim Menschen etwa 1,4 Liter am Tag.

## 1.2. Chloridkanäle

1980 wurde der erste Chloridkanal von Miller et al. [117] in Vesikeln des elektrischen Organs des Torpedorochens entdeckt.

Chloridkanäle sind in den Zellmembranen der meisten Zellen zu finden und besitzen eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellvolumens, des transepithelialen Transports, der Sekretion von Flüssigkeit und der Stabilisierung des Membranpotentials [179]. Sie erlauben den passiven Fluss von Anionen durch biologische Membranen und können durch Stimuli, wie Ligandenbindungen (GABA, Glycin), Veränderungen im intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  oder Spannungsänderungen, an- oder ausgeschaltet werden.

Es gibt drei Arten von Chloridkanälen, zum einen die ligandenabhängigen Kanäle, den CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) und die CLC-Kanäle. Die ligandenabhängigen Kanäle bestehen aus vier

Transmembrandomänen und bilden homo- oder heteromere Kanäle [12;27;195]. Der CFTR gehört zur Superfamilie der ABC Transporter. Er besteht aus zwei Blöcken mit jeweils sechs vermeintlichen Transmembrandomänen, welche durch eine cytoplasmatische Region voneinander getrennt sind [19;36;145]. Die CLC Kanäle sind vom Bakterium bis zum Menschen konserviert. Der zuerst entdeckte CLC Kanal war CLC-0, welcher bei Expressionsklonierungen aus dem elektrischen Organ des Torpedorochens beschrieben wurde [78]. Bei Säugern gibt es neun CLC-Gene [3;20;77;81;140;155;156;160;169], die aufgrund ihrer Homologie in drei Äste aufgeteilt werden. Die CLC Kanäle des ersten Astes (CLC-1, CLC-2, CLC-Ka und CLC-Kb) üben ihre Funktion in der Plasmamembran aus, während die CLC Kanäle aus Ast zwei (CLC-3, CLC-4, CLC-5) sowie die aus Ast drei (CLC-6 und CLC-7) in intrazellulären Membranen fungieren. Die Proteine aus Ast zwei und drei werden neueren Daten zufolge als  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  Austauscher bezeichnet [2]. In der Niere finden sich hauptsächlich drei CLC Kanäle, der CLC-5, CLC-Ka und CLC-Kb.

### **1.2.1. Die Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2 und ihre Untereinheit Barttin**

Die für das Innenohr und die Nieren spezifischen Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2, sowie deren gemeinsame Untereinheit Barttin sind für die renale Elektrolytresorption, sowie die Urinkonzentrierung von großer Bedeutung. Die Gene ihrer humanen Homologe, CLC-Ka und CLC-Kb, wurden mittels in situ Hybridisierung auf Chromosom 1, Abschnitt p36 lokalisiert [139]. CLC-K1 wurde aufgrund seiner Homologie zu anderen Chloridkanälen über PCR-Klonierungsstrategien identifiziert [167]. Die Identifizierung von CLC-K2 folgte kurz darauf mit ähnlichen Methoden [3].

Die Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2 spielen zusammen mit ihrer gemeinsamen Untereinheit Barttin [46;178] eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des kortikalen osmotischen Gradienten (CLC-K1) [82] und bei der Reabsorption von Chlorid im distalen Tubulus (CLC-K2) [112;148]. Die Aminosäuresequenz zwischen CLC-K1 und CLC-K2 ist zu 80% identisch, wobei die humanen Homologe (CLC-Ka und CLC-Kb) eine 90%ige Übereinstimmung zu den Sequenzen der Rattenhomologe aufweisen [3;83]. Trotz ihrer starken Homologie besitzen die beiden Chloridkanäle unterschiedliche Funktionen und sind im

Nephron an verschiedenen Positionen lokalisiert [114;164]. CLC-K1 wird überwiegend im dünnen aufsteigenden Ast der Henle Schleife in der inneren Medulla exprimiert [169]. Dort liegt er sowohl auf der apikalen, als auch auf der basolateralen Seite der Plasmamembran vor (Abbildung 5). CLC-K2 wird hauptsächlich im medullären Teil der dicken Henle Schleife exprimiert [89]. Man findet ihn auch im distalen konvoluten Tubulus [110;128;129], im Verbindungstubulus und dem kortikalen Sammelrohr [159;193] (Abbildung 6). Beide CLC-K Kanäle finden sich zudem in der Stria vascularis in der Schnecke des Innenohrs [5].

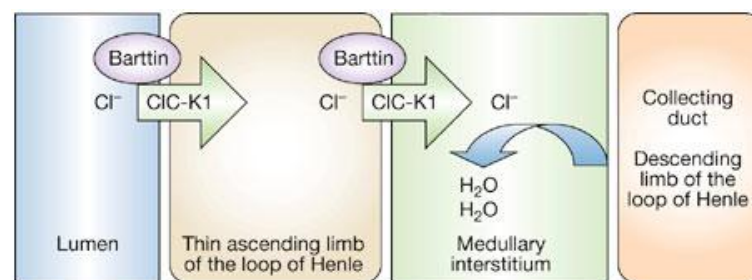


Abbildung 5 Cl<sup>-</sup> Reabsorption durch CLC-K1

Schematische Darstellung der Cl<sup>-</sup> Reabsorption durch den CLC-K1 (CLC-Ka) im dünnen aufsteigenden Ast der Henle Schleife [92].

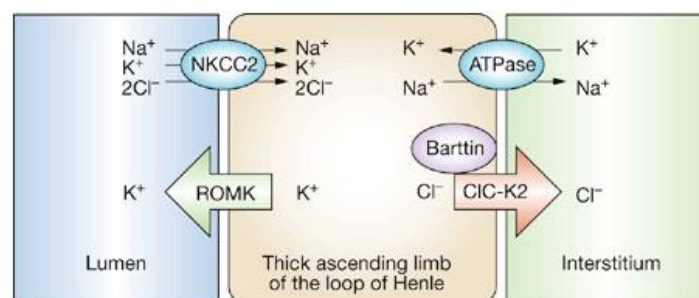


Abbildung 6 Cl<sup>-</sup> Reabsorption durch CLC-K2

Schematische Darstellung der Cl<sup>-</sup> Reabsorption durch den CLC-K2 (CLC-Kb) im dicken aufsteigenden Ast (und im distal konvoluten Tubulus) der Henle Schleife [92].

Barttin besitzt mehrere funktionelle Domänen, von denen zwei transmembranär lokalisiert sind [46]. Mit der porenbildenden Untereinheit der CLC-K Kanäle verbunden, ist es für die intrazelluläre Lokalisation der Kanäle aus dem endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberflächenmembran [144] verantwortlich. Für CLC-Kb und die Untereinheit Barttin sind Erbkrankheiten

definiert [92;180]. Loss of function Mutationen im Barttin führen zum Barttersyndrom Typ IV, assoziiert mit sensorineuraler Taubheit [15]. Betroffene Patienten zeigen erhöhte Plasminwerte, einen Hyperaldosteronismus, einen veränderten Prostaglandinmetabolismus und eine gestiegene Chloridausscheidung über den Urin. Mutationen im CLC-Kb können das Barttersyndrom Typ III verursachen [148], welches mit gestörter Salzurückresorption im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife, hyperkaliämischer metabolischer Alkalose und Kalziurie definiert ist. Insgesamt sind fünf verschiedene Barttersyndrome beschrieben, die bis auf Typ V alle autosomal rezessiv vererbt werden und auf Defekten tubulärer Transportproteine basieren. Beim Barttersyndrom Typ I ist der NKCC2 defekt [149;153], beim Typ II der ROMK [150]. Beim Typ V liegt ein Defekt des Calcium-sensing Rezeptors [136] CaR vor [172;182], der NKCC2 und ROMK inhibiert. Nur Typ V wird autosomal dominant vererbt.

<b>Bartter Syndrom</b>	<b>Gen</b>	<b>Kodierendes Protein</b>
Typ I	SLC12A1	NKCC2
Typ II	KCNJ1	ROMK
Typ III	CLCNKB	CLC-Kb
Typ IV	BSND	Barttin
Typ V	CASR	CaR

Zu ähnlichen Symptomen wie beim Barttersyndrom Typ I, also hypokaliämischer Alkalose, renalem Salzverlust und erniedrigtem Blutdruck, kommt es auch beim sogenannten Gittelmansyndrom, bei welchem Mutationen im NCC auftreten [149]. Eine häufig auftretende Variation im CLC-Kb Gen führt zu erhöhter NaCl-Reabsorption, was zu einer salzsensitiven Hypertonie führen kann [75;76]. Für CLC-K1 ist kein Zusammenhang mit einer Erbkrankheit beschrieben, jedoch führt ein CLC-K1 Knockout bei Mäusen zum renalen Diabetes insipidus [112] und zum kompletten Fehlen des Chloridtransport in der dünnen aufsteigenden Henle Schleife [104]. Die Knockouttiere besitzen bei normaler Hydrierung eine gestörte Osmolarität in der Nierenpapille (ca. 0,5 gegenüber 1,25 mosm/g), die auch bei Flüssigkeitsentzug nicht relevant ansteigt (0,7 gegenüber 1,8 mosm/g) [4].

### 1.2.2. Regulation von CLC-K1, CLC-K2 und Barttin

In Dehydratationsversuchen wurde bei der Ratte eine bis zu vierfache Hochregulation der CLC-K1 mRNA in der Niere gefunden [167;171]. Dies geschieht vermutlich um dem Volumenmangel entgegenzuwirken. CLC-K1 und Barttin werden unter Gabe des Schleifendiuretikums Furosemid im dünnen aufsteigenden Ast der Henle Schleife herab reguliert [185]. In ACE2 Mäusen (Tiere ohne Gewebe-ACE) ist der CLC-K1 auf 6% herab reguliert, was ACE als möglichen Regulator für CLC-K1 kennzeichnet und den renalen Konzentrierungsdefekt der Tiere erklären könnte [86]. Die Regulationen des CLC-K1 zeichnen den Kanal als wichtige Determinante der medullären Osmoregulation aus. CLC-K2 verhält sich gegensätzlich zu CLC-K1. Er wird durch Dehydratation nicht hochreguliert [171], wird aber im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife (mTAL) unter Hochsalzdiät herab- und unter Furosemid hochreguliert [25;173;184]. Dies zeichnet CLC-K2 als verantwortlich für die tubuläre NaCl-Reabsorption aus. Die Regulation der beiden CLC-K Kanäle durch Veränderungen im Salz-Wasser-Haushalt ist spezieübergreifend, da z.B. bei einer Buntbarschart (*Oreochromis mossambicus*), nach einem Wechsel von Salz- zu Süßwasser eine Hochregulation des OmCLC-K gefunden wurde [120]. Bei Promotoruntersuchungen an CLC-K1 und CLC-K2 konnte eine Vielzahl mutmaßlicher Bindungsstellen gefunden [135;166] werden. Im Promotorbereich von CLC-K1 wurden z.B. Bindungsstellen für ein Aktivator-Protein 3 (AP3), mehrere AP2 Stellen, eine für Hitzeschock-Faktoren, ein Glucocorticoid-responsive Element, und mehrere E-Boxen gefunden [166]. Der Promotor von CLC-K2 enthält mehrere Bindungsstellen für AP2, zwei für cAMP-responsive-Elements, eine für ein Glucocorticoid-responsive Element, eine für Hitzeschock-Faktoren und eine für NF-IL6 [135]. Eine TATA Box, die in vielen Promotoren für die Aktivierung der Transkription verantwortlich ist, fehlt in den Promotoren der beiden Chloridkanäle. Dafür besitzen beide Promotoren GA-Elemente nahe dem Transkriptionsstart, welche besonders für die zellspezifische Promotoraktivität von Bedeutung sind. GA-Elemente werden durch das myc-assoziierte Zinkfinger-Protein (MAZI) gebunden, wodurch der Promotor aktiviert wird [170]. Durch den Zinkfingerrepressor „kidney-enriched Krüppel-like factor“ (KKLF) wird die Promotoraktivität blockiert [168].

### 1.3. Osmolarität und hyperosmolarer Stress

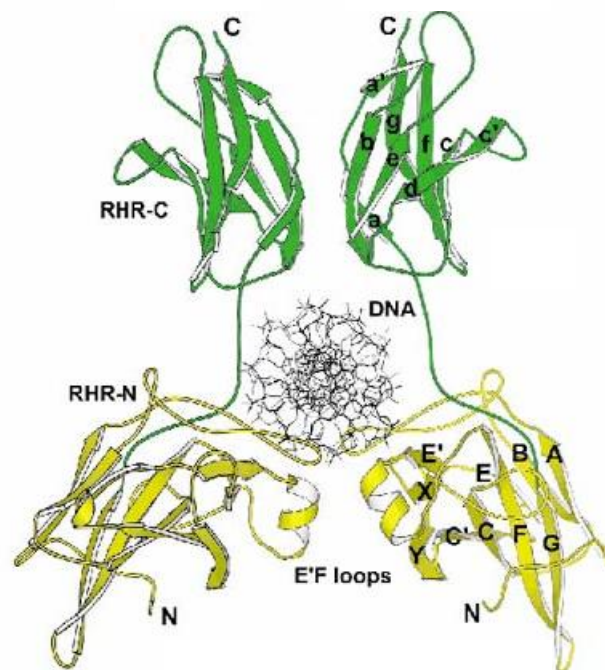
Der Erhalt der Salz- und Wasserhomöostase ist für alle eukaryotischen Organismen überlebenswichtig. Hefen als einzellige Eukaryoten haben aufgrund ihrer extremen Lebensbedingungen häufig mit starken Schwankungen in der Umgebungsmolarität zu tun und besitzen ein gutes Anpassungsvermögen und spezialisierte Abwehrmechanismen. Bei den höheren Eukaryoten, besonders den Säugern, ist die Salzhomöostase im Körper aufgrund eines engen Toleranzrahmens besonders wichtig. So unterliegt die durch die Niere aufrechterhaltene Plasmaosmolarität normalerweise maximal Schwankungen von 2-3% [63]. Zellen unter osmotischem Stress versuchen diesem, wenn möglich, durch Wasserfluss entlang des osmotischen Gradienten zu entgehen [71]. Ist die Osmolarität außerhalb der Zelle größer als innerhalb, so kommt es zum Wasserefflux. Dieser verläuft über wasserpermeable Proteine, die sogenannten Aquaporine [84]. Ist es der Zelle nicht möglich über diesen Mechanismus die Homöostase wieder herzustellen, kommt es zu Zellschädigungen, z.B. durch Schäden in der DNA [94], Behinderungen der DNA Reparatur [44], Störungen in der mitochondrialen Funktion [39], Veränderungen im Zytoskelett [41] und schließlich Apoptose [45]. Unmittelbar nach dem Auftreten von osmotischem Stress kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration geladener Ionen, wie Chlorid, Kalium und Natrium über z.B. den  $\text{Na}^+/\text{K}^+2\text{Cl}^-$  Kotransporter, den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauscher oder den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austauscher [97;113], um den Unterschied der Osmolaritäten auszugleichen und damit dem Zellvolumenverlust durch den Wasserefflux entgegen zu wirken. Die Erhöhung der intrazellulären Konzentration der geladenen Ionen bewirkt eine für die Zelle ungünstige Ionenstärke, die für den Erhalt der weiteren Zellfunktion regulatorisch verändert werden muss. So kommt es nach hypertone Stress zur Hochregulation regulatorischer Gene, welche dafür sorgen, dass ionische Osmolyte gegen nichtionische Osmolyte (organische Osmolyte) ausgetauscht werden [22;66]. Unter den nichtionischen Osmolyten finden sich mehrwertige Alkohole wie Sorbitol und Myoinositol, Methylamine wie Betain, sowie Aminosäuren wie Taurin, Alanin und Prolin, welche auch in hohen Konzentrationen die Zellfunktionen nicht negativ beeinflussen [191]. Einige der nichtionischen Osmolyte, wie Betain, Inositol und Taurin, werden durch Natrium gekoppelte bzw.  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  gekoppelte Transporter

entgegen eines starken Konzentrationsgradienten in die Zelle transportiert. Sorbitol hingegen wird aus Glukose durch die Aldose-Reduktase synthetisiert [55]. Die Expression der Transporter für Betain (Betain/GABA Transporter (BGT1)) [118;189] und Myoinositol (Sodium Myoinositol Transporter (SMIT)) [190], sowie für Aldose-Reduktase (AR) [151;165], wird unter Hypertonizität verstärkt. In den Promotorregionen ihrer Gene finden sich sogenannte tonicity responsive enhancers (TonEs) [137;158] bzw. osmotic response elements (ORE) [88], wie das Equivalent des TonE im Gen der Aldose-Reduktase genannt wird. An diese Elemente kann ein Transkriptionsfaktor, das Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein (TonEBP) binden.

### **1.3.1. TonEBP /OREBP /NFAT5**

Das Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein (TonEBP) trägt Verantwortung für überlebenswichtige Aufgaben im Organismus von Vertebraten und Invertebraten [61]. Es wirkt entscheidend beim Mechanismus der Urinkonzentration durch Regulation des Harnstofftransporters UT-A [65;125;141] und des Aquaporins AQP2 [67;80] mit. Das Signal für die TonEBP Stimulation ist Hypertonizität im Interstitium, welche durch den NCC und NKCC2 aufgebaut wird. Auch bei sehr hohen Harnstoffkonzentrationen, die potentiell tödlich für die Zellen wären [116], spielt TonEBP über die Stimulation von HSP70 eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund ist in der Medulla die HSP70 Konzentration wegen der hohen Osmolarität etwa 20-fach höher als im Cortex [122]. Heterozygot vorliegendes TonEBP bedeutet für den Organismus Störungen im adaptiven Immunsystem mit lymphoider Hypozellularität und gestörter antigen-spezifischer Antikörper Resonanz [59]. Ein homozygoter Knockout [107] im Mausmodell ist in der Regel bereits embryonal letal. Die wenigen überlebenden Föten weisen eine fortgeschrittene medulläre Atrophie auf, ausgelöst durch eine gestörte Aktivierung der osmoprotektiven Gene AR, BGT1 und SMIT [107]. TonEBP gehört zu den Rel-Transkriptionsfaktoren. Zu diesen gehören auch der Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und die anderen Nuclear factors of activated T-cells (NFAT1-4) [109;157]. Auf Grund seiner relativ hohen Sequenzhomologie (bis zu 43%) mit anderen Mitgliedern der NFAT Familie, und wegen der großen Ähnlichkeit mit NF $\kappa$ B in der Dimerisierung und der daraus resultierenden DNA Bindung, bildet TonEBP sozusagen ein Brückenglied zwischen der NFAT- und der NF $\kappa$ B-Familie. TonEBP

liegt im Gegensatz zu einigen anderen NFAT Familienmitgliedern, die als Monomer vorliegen oder mit den Transkriptionsfaktoren Fos und Jun interagieren, als konstitutives Homodimer vor [108]. Die Dimerisierung verläuft über zwei am NH<sub>2</sub>-Terminus liegende Dimerisierungsdomänen und ist für die Bindung an die DNA notwendig [108]. Jedes Monomer des TonEBP Dimers besteht aus zwei immunoglobulinartigen Domänen, den für die Familie typischen Rel Homologie Regionen (RHR). Die vier RHRs des Homodimers umschließen die DNA ringförmig [157], wodurch ein stabiler Komplex gebildet wird (Abbildung 7).



**Abbildung 7** TonEBP Struktur

Struktur des TonEBP-DNA Komplexes [157]

TonEBP bindet die DNA als Dimer in der klassischen „butterfly“-Konformation ähnlich wie im NF $\kappa$ B-DNA Komplex [58].

Unter hyperosmolarem Stress wird TonEBP phosphoryliert, wozu es ebenfalls als Homodimer vorliegen muss [102]. Die Phosphorylierung wird durch die Casein-Kinase 1 (CK1) an Serin 155 und 158 bewirkt und ist essentiell für das nukleozytoplasmatische Trafficking des Proteins [34;188]. TonEBP ist bisher der einzige bei Säugern bekannte, von Hypertonizität abhängige Transkriptionsfaktor [119]. Unter Hyperosmolarität wird TonEBP auf verschiedene Weisen beeinflusst, was zu seiner Hochregulation führt [23;162;186]. Ein wichtiger Einfluss ist die

Akkumulierung und Stabilisierung der TonEBP mRNA, wodurch diese längere Zeit als Matrize zur Proteinsynthese dienen kann. Die Stabilisierung der mRNA wird durch Elemente in der 5`UTR (untranslated region) des Gens bewirkt [23], wobei ein Effekt auf die Proteindegradation dabei nicht erkennbar ist. Weitere wichtige Effekte sind Änderungen in der Proteinstabilität, posttranslationelle Veränderungen und Veränderungen der innerzellulären Lokalisation [187]. Als Transkriptionsfaktor bindet TonEBP an ein DNA Consensusmotiv, das Osmotic Response Element (ORE) [48;49;88] oder auch Tonicity Responsive Enhancer (TonE) genannt [74;158]. Die Consensussequenz lautet TGGAAANNYYN, wobei N für ein beliebiges Nukleotid und Y für ein Pyrimidin steht. Dieses Motiv findet sich wie bereits erwähnt in der DNA der Aldose Reduktase, des Natrium Myoinositol Transporter und des Betain/GABA Transporters.

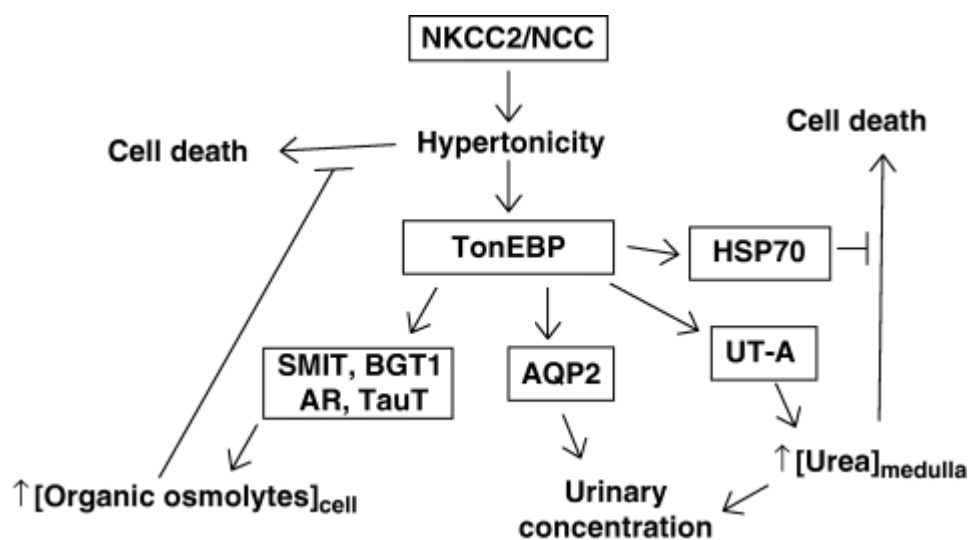


Abbildung 8 Nierenphysiologie von TonEBP

Hypertonizität stimuliert TonEBP, welcher dann SMIT, BGT1, AR und TauT reguliert, was zur Akkumulation der organischen Osmolyte führt und dem Zelltod entgegenwirkt [79].

Somit hat TonEBP zwei wichtige Aufgabenbereiche im Organismus. Zum einen schützt er die medullären Nierenzellen vor den negativen Effekten hoher Salz- und Harnstoffkonzentrationen, die bei der Urinkonzentration auftreten. Zum anderen besitzt er auch selber eine Rolle in der Urinkonzentration, da er durch Stimulation des Urea Transporters (UT) das Harnstoffrecycling zwischen aufsteigendem Ast der Henle Schleife und dem innermedullären Sammelrohr fördert und durch

Stimulation des Aquaporin 2 im Sammelrohr die Wasserpermeabilität erhöht (Abbildung 8)

### **1.3.2. Die Serum und Glukokortikoid induzierbare Kinase1 (SGK1)**

Die zur Gruppe der Serin/Threonin Kinasen gehörende SGK1 wurde ursprünglich in einer Rattenkrebszelllinie entdeckt und beschrieben [183]. Über Disulfidbindungen zwischen Cys258 und Cys193 bildet die Kinase Dimere [196]. Die Regulation der Serum und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 ist Zellvolumen abhängig. Bei Zellschrumpfung wird sie hochreguliert [176], was ihre Bedeutung unter hyperosmolaren Bedingungen definiert. Ebenso übt sie wichtige Funktionen in der Regulation der Natriumhomöostase und des Blutdrucks aus. SGK1 besitzt zwei nahe verwandte Isoformen, SGK2 und SGK3, welche eine etwa 80% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne mit SGK1 besitzen [91]. Die nichtkatalytischen Domänen der Isoformen sind nur zu 44-68% homolog und die N-terminalen Enden sind nicht homolog [91]. SGK1 ist die größte der drei Isoformen, mit einem Molekulargewicht von 49kD. Das Molekulargewicht von SGK2 liegt bei 41,1kD und das von SGK3 bei 47,5kD [91]. Die Gene der drei Isoformen liegen auf verschiedenen Chromosomen, wobei das Gen für SGK1 auf Chromosom 6q23 [177], das für SGK2 auf Chromosom 20q12 [98] und das für SGK3 auf Chromosom 8q12 [35] liegt. Bei der Gewebeverteilung der drei Isoformen zeigen sich ebenfalls Unterschiede. SGK1 wird in allen menschlichen Geweben exprimiert, wobei je nach Zelltyp und Gewebe verschiedene Expressionsmuster auftreten [91;176]. SGK3 wird ebenfalls in fast allen menschlichen Geweben exprimiert, mit besonders hohen Konzentrationen im Embryo, sowie in Herz und Milz von Erwachsenen [72;101]. SGK2 wird hauptsächlich in Epithelien von Niere, Leber und Pankreas exprimiert [90;175]. Ihre hohe Konservierung lässt SGK1 als Orthologe (Ypk1/Ypk2) in der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) [24] über *Caenorhabditis elegans* [69] bis zum Säuger, wo sie in allen Geweben zu finden ist [176], auftreten. Nach Aktivierung von SGK1 durch Serum wird sie durch den Rezeptor für nukleären Transport, Importin  $\alpha$ , in den Zellkern vermittelt [111]. Der Kontakt zu Importin  $\alpha$  wird durch das im SGK1 Molekül an der Oberfläche liegende NLS (nuclear localization signal) hergestellt. Ein hyperosmotischer Schock oder Stimulation durch Glukokortikoide

fördern dagegen die Lokalisation der Kinase im Zytosol [50]. Glukokortikoide [21;73;127], Serum [183], Mineralokortikoide [13;146], Gonatotropine [60], TGFbeta [99], Interleukin-6 [115] sowie viele weitere Zytokine [33], bewirken eine Hochregulation der SGK1 Transkription. Auch eine hohe Glukosekonzentration [99], Hitzeschock, UV Licht und oxidativer Stress [103] führen zu einer Hochregulation. Durch Heparin hingegen wird die Transkription von SGK1 inhibiert [38]. An der Regulation der Transkription von SGK1 sind zahlreiche Moleküle, vor allem Kinasen, beteiligt. So besitzen zum Beispiel die Protein-Kinasen C und -Raf [121], sowie die p38 Kinase [9] eine regulatorische Funktion. Auch hohe zytosolische  $Ca^{2+}$ - [87], sowie NO- [163] Konzentrationen steigern die SGK1 Transkription.

Aufgrund ihrer Eigenschaft, durch zahlreiche Stoffe und Milieubedingungen reguliert zu werden, in zellulären Stresssignalwegen aufzutauchen und Funktionen in Zellproliferation, Zellüberleben und Apoptose auszuüben, finden sich im Promotor von SGK1 viele mutmaßliche und bereits bestätigte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören unter anderem die Bindungsstellen für den Glukokortikoid Rezeptor, den Mineralokortikoid Rezeptor, den *heat shock factor* (HSF) und NFκB [50].

Funktionell aktive SGK1 muss durch Phosphorylierung aktiviert werden. Die Phosphorylierung läuft über eine Signalkaskade, die mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) [132] beginnt. Diese phosphoryliert Phosphatidylinositol-Biphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3), welches dann von der PH Domäne (Pleckstrin homology) der PIP3-abhängigen Kinase1 (PDK1) [14;90] gebunden wird. Diese phosphoryliert dann SGK1. Als Stimulus für die SGK1 Aktivierung fungiert z.B. das Mineralkortikoid Aldosteron, welches in der Nebennierenrinde gebildet wird. Unter Aldosteronstimulation kommt es in den Verbindungstübuli und Sammelrohren der Niere zu verstärkter  $Na^+$  Rückresorption, welche über den vermehrten Einbau des epithelialen Natriumkanals (ENaC) in die apikale Plasmamembran [106;126] geschieht. ENaC lässt Natriumionen passiv entlang des elektrochemischen Gradienten passieren. Zur Resorption von  $Na^+$  aus dem Lumen wird deshalb von der  $Na^+/K^+$ -ATPase der basolateralen Plasmamembran aktiv  $Na^+$  in das Interstitium transportiert und somit die zytoplasmatische Konzentration niedrig gehalten. Die  $Na^+$  Rückresorption durch ENaC wird durch SGK1 in verschiedener Weise reguliert. Zum einen

stimuliert SGK1 die Aktivität der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, wodurch die zytoplasmatische Na<sup>+</sup> Konzentration niedrig, der elektrochemische Gradient aber hoch gehalten wird [68]. Des Weiteren phosphoryliert SGK1 die Ubiquitin Protein Ligase Nedd4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4-2), wodurch diese inaktiv wird [37;51;152]. Aktives Nedd4-2 bindet ENaC mehrfach an prolinreichen Motiven der β- und γ-Untereinheiten und polyubiquitiniert diese, sodass es zum Abbau des Kanals kommt [154;197]. Wird Nedd4-2 von SGK1 phosphoryliert, so bindet es bevorzugt an ein 14-3-3 Protein [123], wodurch die Bindung an ENaC, wie auch die Dephosphorylierung von Nedd4-2 nicht mehr möglich ist [123]. Zuletzt besteht die Vermutung, dass SGK1 den ENaC auch durch direkte Phosphorylierung aktivieren kann [42]. Neben ENaC hat SGK1 auch regulatorische Effekte auf zahlreiche weitere Kanäle und Transporter. So findet man z.B. Regulationen auf den K<sup>+</sup> Kanal ROMK1 [131;192], den Na<sup>+</sup> Kanal SCN5A [16], oder den NaCl Cotransporter NCC [47]. Durch seinen Einfluss auf die zahlreichen Kanäle und Transporter spielt SGK1 eine wichtige Rolle in der Elektrolytexkretion innerhalb der Niere.

### **1.3.3. Aldosteron und das Renin-Angiotensin-Aldosteron System**

Die Freisetzung von Aldosteron in der Nebennierenrinde wird über das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) gesteuert. Das RAAS ist eine Kaskade von Hormonen und Enzymen, die den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers reguliert und als wichtiges blutdruckregulierendes System agiert. Die Kaskade beginnt mit der Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat. Der juxtaglomeruläre Apparat misst den Blutdruck im Vas afferens, den Salzgehalt des Harns im Harnkanälchen und reagiert auf Signale des vegetativen Nervensystems. Der juxtaglomeruläre Apparat ist aus drei Teilen aufgebaut. Er besteht zum einen aus der Macula densa, einem chemosensitiven Feld aus hohen, dicht stehenden Epithelzellen in der Wand des distalen konvoluten Tubulus. Ferner besteht er aus dem Polkissen, welches aus epitheloiden Zellen in der Wand des Vas afferens gebildet wird und Renin enthält, sowie aus extraglomerulären Mesangiumzellen, die vom Vas afferens, Vas efferens und Macula densa umschlossen sind. Die Polkissen und die extraglomerulären Mesangiumszellen bilden gemeinsam das Enzym Renin. Zur Freisetzung von

Renin kommt es bei Blutdruckabfall oder Verlust von NaCl und Wasser. Das als Protease wirkende Renin spaltet aus Angiotensinogen Angiotensin I ab. Dieses wird vom Angiotensin converting Enzyme (ACE) in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II erhöht über Vasokonstriktion direkt den Blutdruck. In der Nebennierenrinde bewirkt Angiotensin II die Bildung von Aldosteron, welches wie bereits beschrieben die Na<sup>+</sup>- und Wasserrückresorption antreibt (Abbildung 9). Mittels des Medikaments Spironolacton kann die Wirkung von Aldosteron inhibiert werden. Das Spironolacton aus der Gruppe der Aldosteron-Antagonisten blockiert die Aldosteron-Rezeptoren, wodurch es zu einer vermehrten Ausscheidung von Natrium und Wasser, bei gleichzeitigem vermehrtem Einbehalten von Kalium kommt.

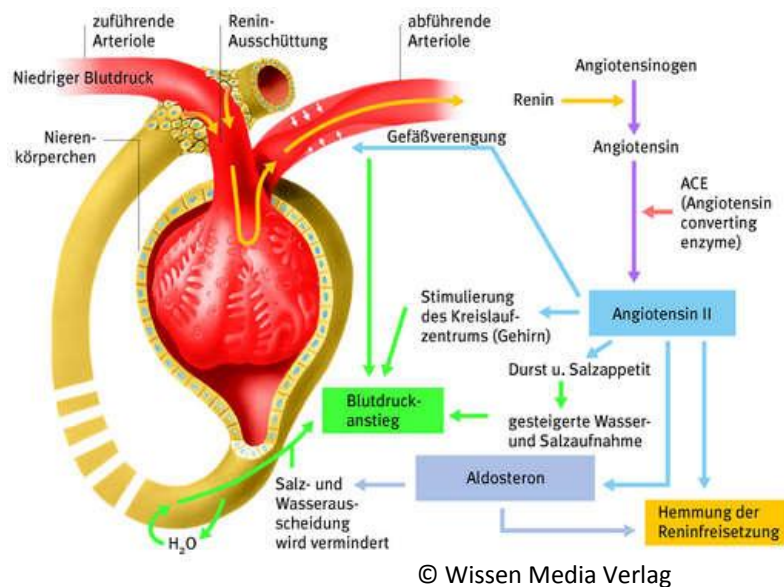


Abbildung 9 Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Übersicht über das Renin-Angiotensin-Aldosteron System mit seinen wichtigsten Funktionen im Bereich des Salz- und Wasserhaushalts sowie der Regulation des Blutdrucks.

## 2. Fragestellung

CLC-K1 mit seiner regulatorischen Untereinheit Barttin spielt eine wichtige Rolle für die Erhaltung des kortikomedullären osmotischen Gradienten und bei der Reabsorption von Chlorid im Tubulus. Die bekannten Beobachtungen der Hochregulation von CLC-K1 unter hyperosmolaren Bedingungen, sei es durch Dehydratation in vivo oder Erhöhung der Mediumosmolarität in vitro, passen demnach gut in das bisher bekannte Bild der CLC-K1 Funktion. Weitergehendes Wissen im Bezug auf Regulationen des CLC-K1 und Barttins befinden sich noch in den Anfängen und machen eine detailliertere Untersuchung notwendig. Aufgrund unterschiedlicher, teilweise stark schwankender Osmolaritäten im Nephron, ist eine Regulation aller an der Rückresorption von Elektrolyten aus dem Primärharn beteiligten Kanäle und Transporter notwendig. Solche Regulationen können den bereits in der Membran liegenden fertigen Kanal, z.B. über strukturelle Veränderungen betreffen, oder sie laufen prätranskriptionär, z.B. über Transkriptionsfaktoren ab. Besonders Einflussfaktoren wie das Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein (TonEBP) und die Serum und Glukokortikoid abhängige Kinase1 (SGK1), welche bekanntermaßen wichtige Funktionen für das Zellüberleben bei erhöhter Osmolarität besitzen, wurden in dieser Arbeit auf ihre Funktion als mögliche regulatorische Faktoren für CLC-K1 und seiner regulatorischen Untereinheit Barttin untersucht. Da SGK1 wie bereits beschrieben durch viele Faktoren, unter anderem auch durch Hyperosmolarität, hochreguliert werden kann und seinerseits an der Regulation etlicher Proteine, wie passiv und aktiv operierender Ionenkanäle in der Niere beteiligt ist, liegt eine Untersuchung hinsichtlich einer möglichen Regulation von CLC-K1 durch SGK1 nahe. Zur Untersuchung eines regulatorischen Einflusses von TonEBP auf CLC-K1 liegen wegen seiner bereits bekannten Genregulationen z.B. der osmoprotektiven Gene AR, BGT1 und SMIT, ebenfalls Untersuchungen auf DNA Ebene nahe. Wann, wie und wo kommt es zu Regulationen, sind diese direkt oder über, wie bereits für SGK1 in anderen Regulationen bekannt, mit MAPK- oder MEK- Signalkaskaden verbunden? Die Untersuchungen der möglichen Regulationen werden auf DNA-, RNA- und Proteinebene durchgeführt. In vitro Ergebnisse werden soweit möglich in vivo verifiziert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Methoden

##### 3.1.1. Zellkultur

Für die in vitro Versuche wurden verschiedene immortalisierte Zelllinien aus der Mausnieren verwendet. Die aus dem distal konvoluten Tubulus stammende mDCT Zelllinie besitzt CLC-K1 und CLC-K2 sowie Barttin, wohingegen die innermedulläre Sammelrohr Zelllinie mIMCD kein CLC-K2 exprimiert (Abbildung 10).

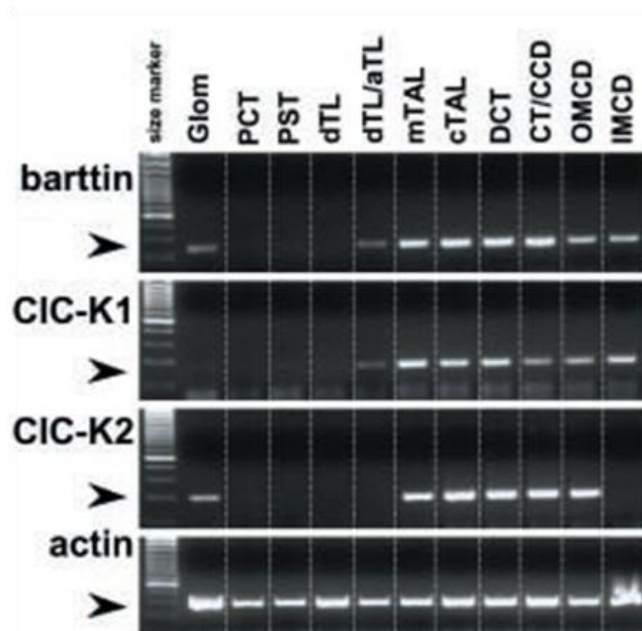


Abbildung 10 Tubuläre Verteilung von CLC-K1/2 und Barttin

Verteilung von Barttin, CLC-K1/2 entlang des Tubulus [178]

Die mpkCCD Zelllinie aus dem kortikalen Sammelrohr wurde aufgrund der dort vorliegenden hohen Aldosteronkonzentration für die Versuche eingesetzt, um möglichst nah an den physiologischen Bedingungen im Organismus zu bleiben. Die drei verwendeten adhärenenten Zelllinien wurden bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Heraeus, Hanau) kultiviert. Als Grundmedium für die aus Maus stammenden Zelllinien des distalen konvoluten Tubulus (mDCT), des innermedullären Sammelrohrs (mIMCD) und des kortikalen Sammelrohrs (mpkCCD) diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (mit 15mM HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, Pyridoxin und L-Glutamin). Das

Medium für alle Zelllinien wurde mit 1% Penicillin/ Streptomycin/ Neomycin versetzt. Für die DCT Zellen [56;57;133] wurde 5% FCS, für IMCD [18] 10% FCS zugegeben. Die mpkCCD Zelllinie erhielt neben 2% FCS Insulin (5µg/ml), Dexamethason ( $5 \times 10^{-8}$ M), Selenium (60nM), Transferrin (5µg/µl), Trijodthyronin ( $10^{-9}$ M), EGF (10ng/ml) und Glukose (0,224%). Das FCS wurde vor Verwendung für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurden sie bei 250 x g für 5 min zentrifugiert, danach in neuem Medium resuspendiert und 1:10 gesplittet bzw. nach Bedarf in neue Kulturflaschen ausgesät. Die Osmolarität der Normalmedien betrug jeweils 300 mosm/kg H<sub>2</sub>O. Für die Stimulationsversuche unter hyperosmolaren Bedingungen wurden die Zellen entsprechend der gewünschten Inkubationszeit in hyperosmolarem Medium inkubiert. Dieses Medium bestand aus dem für die jeweilige Zelllinie normalen Kulturmedium, welches durch Zugabe von NaCl, Mannitol, Raffinose oder Harnstoff auf eine Osmolarität von 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O gebracht wurde. Die IMCD Zellen konnten durch langsame Steigerung der Osmolarität des Kulturmediums mit Osmolaritäten bis zu 900 mosm/kg H<sub>2</sub>O stimuliert werden. Dazu wurde nach 12h Inkubation in Medium mit 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O, die Hälfte des Mediums durch 600 mosm/kg H<sub>2</sub>O getauscht. Nach 24h wurde das Medium komplett gegen 600 mosm/kg H<sub>2</sub>O gewechselt. Nach weiteren 12h wurde die Hälfte des Mediums gegen 900 mosm/kg H<sub>2</sub>O getauscht, bevor die Zellen nach erneuten 24h vollständig in 900 mosm/kg H<sub>2</sub>O Medium stimuliert wurden.

Für die Versuche zum Einfluss von MAPK- oder MEK-Signalwegen wurden die Inhibitoren SB203580, PD98059 und UO126 zu jeweils 10µM in Normalmedium oder hyperosmolares Medium gegeben.

Für die Untersuchungen zum Einfluss von Aldosteron, wurden Aldosteron oder Spironolacton mit jeweils 10µM in das Kulturmedium gegeben. Um unerwünschte Nebeneffekte durch das im Kulturmedium enthaltene Insulin und Dexamethason auszuschließen, wurde in den Versuchsreihen deren Zugabe ins Medium unterlassen.

Alle Arbeiten an und mit den Zelllinien wurden unter einer Sterilbank und mit Einwegartikeln oder sterilisierten Materialien durchgeführt.

### **3.1.2. Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl wurde mikroskopisch mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und werden im Gegensatz zu lebenden Zellen, die den Farbstoff nicht aufnehmen, dunkel gefärbt. Von den abgelösten und resuspendierten Zellen wurde ein Aliquot mit gleichem Volumen Trypanblau versetzt. In der Neubauer Zählkammer wurde im Anschluss unter dem Phasenkontrast-Mikroskop ausgezählt. Zwei von vier Großquadraten, welche aus jeweils 16 Kleinquadraten bestehen, wurden mindestens ausgezählt und ein Mittelwert wurde berechnet. Die Zellzahl ergibt sich, wenn die mittlere Zellzahl eines Großquadrates mit dem Verdünnungsfaktor und mit  $10^4$  multipliziert wird.

### **3.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese vor Erreichen der Konfluenz geerntet und in Einfriermedium, bestehend aus 50% DMEM-F12 Ham Medium, 40% FCS und 10% DMSO suspendiert. Die suspendierten Zellen wurden als 1,5ml Aliquots in Kryoröhrchen langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gefroren und nach 24h zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff im warmen Wasserbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) aufgetaut und anschließend im Kulturmedium aufgenommen. Zur Entfernung des restlichen DMSO wurden die Zellen zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert.

### **3.1.4. RNA Isolation aus Zellkulturproben**

Die RNA Isolation aus Zellkulturproben erfolgte mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen gemäß Handbuch des Herstellers. Durch Verwendung von QIAshredder wurden die Proben zuvor gemäß Herstellerprotokoll homogenisiert. Die Methode des Kits [30] beginnt mit der Lyse der Proben durch Guanidinisothiocyanatlösung (GTC), zur Inaktivierung von RNasen. Durch Zugabe von Ethanol wird die RNA ausgefällt und bleibt anschließend beim Zentrifugieren in der Silikamembran der Säule hängen. Durch mehrmaliges Waschen werden andere Zellbestandteile entfernt. Ebenfalls in der Silikamembran gebundene genomische DNA wird über einen DNase Verdau (RNase-Free DNase Set) auf der Silikasäule entfernt, um bei folgenden PCR Analysen Störungen ausschließen zu können. Die Konzentration der RNA und ihre Reinheit wurden mittels Photometer über Messung der

optischen Dichte (OD) bestimmt. Die RNA Konzentration wird dabei durch die  $OD_{260}$  bestimmt, bei der ein Wert von 1 einer RNA Konzentration von 40 $\mu$ g/ml entspricht. Über das Verhältnis der  $OD_{260}$  zur  $OD_{280}$  wird die Reinheit der RNA berechnet. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.1.5. Reverse Transkription

Für die Synthese der cDNA wurde 1 $\mu$ g Gesamt-RNA verwendet. Zusammen mit 0,5 $\mu$ g oligo dT-Primer wurde der Ansatz mit Wasser auf 10 $\mu$ l Gesamtvolumen gebracht und für 3 min bei 70°C erhitzt. Nach Abkühlung im Eis wurden 4 $\mu$ l dNTP (je 2,5mM), 4 $\mu$ l 5x Transkriptionspuffer, 1 $\mu$ l RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l) und 1 $\mu$ l M-MLV Reverse Transkriptase (200U/ $\mu$ l) zugegeben. Bei 37°C wurde der Ansatz für 1h inkubiert. Im Anschluss daran wurde bei 95°C für 2 min das Enzym denaturiert. Durch Zugabe von 130 $\mu$ l Wasser wurde die cDNA auf die für Real-Time-PCR notwendige Konzentration gebracht. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### 3.1.6. Real-time PCR

Die Analysen der Genexpression wurden durch relative Quantifizierung mittels LightCycler und Taqman (ABI PRISM 7900) durchgeführt. Grundlage bildete dabei die Ermittlung der CT-Werte (Cycle Threshold) oder auch Crossing Points genannt. Der CT-Wert bezeichnet den PCR-Zyklus, in welchem die Fluoreszenz signifikant den Wert der Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wobei diese eine bestimmte Menge an amplifiziertem Transkript definiert. Aus der Steigung der Standardkurve, die aus je 4 Verdünnungen gebildet wurde, kann für jedes Primerpaar die Effizienz des PCR Laufs berechnet werden ( $\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$ ). Die Steigung erhält man, indem die eingesetzte Menge an cDNA in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl des CT-Wertes dargestellt wird. Alle zur Auswertung verwendeten Läufe wiesen Effizienzen nahe dem Optimum von 1 bzw. 100% auf. Über die Standardkurve wurden die relativen Mengen an cDNA berechnet. Um für eventuell auftretende Schwankungen, die durch die eingesetzte RNA Menge resultieren und damit Unterschiede in der reversen Transkription oder in der PCR Effizienz bedingen zu korrigieren, wurde die Expression des Zielgens im Verhältnis zur Expression eines Referenzgens normalisiert. Als Referenzgene wurden sogenannte Housekeeping-Gene wie Cyclophilin B und GAPDH

verwendet, welche unter allen Stimulationsbedingungen in den verwendeten Zelllinien keine Veränderungen in der Expression zeigten. Die Spezifität der PCR Produkte wurde mittels einer Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Für die PCR Reaktionen wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Qiagen verwendet. Dieses besteht aus SYBR Green I, HotStarTaq DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Puffer und dNTP Mix. Pro 20µl Ansatz wurden 10pmol des forward und reverse Primers, 10µl SYBR Green I Master Mix und 5µl der cDNA aus der reversen Transkription bzw. Wasser oder RT-Kontrolle eingesetzt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der SDS 2.2.2 Software von Applied Biosystems.

### PCR Programm

Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	
Primerannealing	58°C	30 sec	35 Zyklen
Elongation	72°C	30 sec	
Schmelzkurve	65-95°C	0,1°C/sec	

### Primersequenzen für die Real-time PCR

AR (forward)	5'-AGTGCGCATTGCTGAGAACTT-3'
AR (reverse)	5'-GTAGCTGAGTAGAGTGGCCATGTC-3'
Barttin (forward)	5'-AGCCTCCCAGACTTCACTCA-3'
Barttin (reverse)	5'-GGGATTTCTCTCCCTCGTTC-3'
BGT1 (forward)	5'-CTGGGAGAGACGGGTTTTGGGTATTACATC-3'
BGT1 (reverse)	5'-GGACCCAGGTCGTGGAT-3'
CLC-K1 (forward)	5'-CCTCTCACTTCTCCGTCTGG-3'
CLC-K1 (reverse)	5'-ATGGAGGTGATGGTCTCCTG-3'
Cyclophilin-β (forward)	5'-TGATCCAGGGTGGAGACTTC-3'
Cyclophilin-β (reverse)	5'-ATTGGTGTCTTTGCCTGCAT-3'
SGK1 (forward)	5'-TGCAATGTGCCTTTTCTGAG-3'
SGK1 (reverse)	5'-GCCAAGGGAAAAACAAACA-3'
SMIT (forward)	5'-CCGGGCGCTCTATGACCTGGG-3'

---

SMIT (reverse)	5'-CAAACAGAGAGGCCACCAATCG-3'
TonEBP (forward)	5'-GTGACAACACTTCTTTCTCAGCAA-3'
TonEBP (reverse)	5'-TTCCATGTTCTGACTGCTGTTCA-3'

---

### 3.1.7. RNA Interferenz mittels siRNA

Mit der Methode der RNA Interferenz kann die Expression einzelner Gene auf mRNA- und Proteinebene sequenzspezifisch herab reguliert werden. Die Methode beruht auf der Spaltung von doppelsträngiger RNA in kleine ca. 21-25 Nucleotide lange Fragmente, die sogenannte small interfering RNA (siRNA), welche jeweils am 3'-Ende einen zwei Nucleotide langen Überhang besitzen. Das Enzym DICER, eine RNase III ähnliche Nuklease, bewirkt diese Spaltung. Am sogenannten RISC-Komplex (RNA Induced Silencing Complex) kommt es zum Entwinden der siRNA Fragmente, wonach einer der beiden Stränge von der Endonuclease Argonaute2 des RISC-Komplexes entfernt wird. Noch in Verbindung mit dem RISC-Komplex bindet das verbliebene RNA-Fragment an die zu ihm homologe Sequenz der Ziel-mRNA. Durch den RISC-Komplex wird dann die Ziel-RNA entwunden und gespalten und schließlich von intrazellulären Nukleasen abgebaut. Als Folge daraus wird die Synthese des entsprechenden Proteins stark herab reguliert.

Für die in dieser Arbeit benötigten spezifischen Herabregulationen der Genexpressionen, wurden kommerziell erhältliche doppelsträngige siRNAs der Firma Qiagen verwendet. Als Transfektionskontrolle zur Indikation unspezifischer Regulationen, wurde eine sogenannte nonsilencing siRNA (AllStars Negative Control) verwendet, die keine Homologie zu bekannten Säugergenen besitzt. Zur Überprüfung eventuell auftretender regulatorischer Effekte durch das Transfektionsreagenz, wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt (MOCK-Kontrolle). Die Transfektion der Zellen erfolgte mit HiPerFect Transfektionsreagenz gemäß den Herstellerangaben. Für die Transfektion in 6-well-Platten, wurden die Zellen 24h vor der Transfektion in einer Dichte von  $7,5 \times 10^5$  Zellen/well ausgesät. Kurz vor der Transfektion wurde das alte Medium gegen 2,3ml neues Medium gewechselt. Die Zellen wurden je nach Versuch für 4-24h mit 10 bzw. 20nM siRNA inkubiert. Bei zusätzlicher hyperosmolarer Stimulation wurden die Zellen 24h mit siRNA vorinkubiert und anschließend für 4-24h mit hyperosmolarem Medium (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl/ Mannitol/ Raffinose),

welches weiterhin siRNA enthielt, inkubiert. Zum Nachweis des spezifischen Gen-Knockdowns wurde RNA bzw. Protein der Zellen isoliert und mittels PCR bzw. Western Blot analysiert.

### **3.1.8. Zytotoxizitätstest MTT-Test**

Um auszuschließen, dass die siRNA bedingte Herabregulation der Genexpression negative Effekte auf die Proliferation oder Vitalität der Zellen hat, wurden MTT-Tests angefertigt. Der MTT-Test weist Zellvitalität über die Reduktion des gelben wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein violette, wasserunlösliches Formazan nach. Das violette Formazan wird aus den Zellen herausgelöst, wobei die Konzentration an Formazan mit dem Proliferationsverhalten der Zellen korreliert.

Zum Vergleich der Proliferationsverhalten wurden untransfizierte, nur mit der Transfektionsreagenz behandelte (MOCK), mit AllStar Negative Control transfizierte und siRNA transfizierte Zellen getestet. Zu den in einer 96 well-Platte kultivierten Zellen wurden jeweils 10µl MTT gegeben und für 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 20% SDS für weitere 2h unter gleichbleibenden Bedingungen inkubiert. Über Messung der optischen Dichte bei 540nm Wellenlänge wurde nach Unterschieden zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gesucht.

### **3.1.9. Proteinisolation**

Die Zellen zur Gewinnung der Proteinlysate wurden mit kaltem PBS gewaschen. Auf Ansätze in 6-well-Platten wurden pro Vertiefung 200µl Ripa-Puffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) gegeben. Für Ansätze in Kulturflaschen wurde die Menge an benötigtem Ripa-Puffer entsprechend der Oberfläche hochgerechnet. Der Ansatz wurde für 30min auf Eis inkubiert und danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für weitere 30min wurden die Lysate unter regelmäßigem Vortexen auf Eis inkubiert. Bei Zentrifugation für 2min bei 14000 rpm und 4°C, wurden die Zelltrümmer vom Lysat getrennt.

**Ripa Puffer :**

	20mM	Hepes pH 7,9
	150mM	NaCl
	20mM	EDTA
	1%	Nonidet-P40
	0,1%	SDS
	1%	DCA
Erst kurz vor Verwendung zugeben:	4%	Protease Inhibitor

Zur Proteingewinnung aus Geweben wurde das peqGOLD TriFast Kit von Peqlab verwendet, welches auf einer optimierten Guanidiniisothiocyanat/Phenol-Methode basiert, mit der neben dem Protein gleichzeitig auch RNA und DNA extrahiert werden kann. Die Isolation erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

**3.1.10. Proteingehaltsbestimmung**

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurde der BCA-Test (Bicinchoninsäure) nach Pierce angewandt. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung gemäß einer sogenannten Biuret-Reaktion einen Komplex bilden. Durch Reduktion werden die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Komplexes zu  $\text{Cu}^+$ , welches mit Bicinchoninsäure einen violett gefärbten Komplex mit Absorptionsmaximum bei 562nm bildet.

Von jeder zu bestimmenden Probe wurden 10µl mit 200µl einer Mischung aus BCA und  $\text{Cu}^{2+}$  (50:1) in einer 96-well-Platte gemischt und bei 37°C für 1h inkubiert. In einem Microplate-Reader wurde die Absorption gegen das Reaktionsgemisch als Leerwert gemessen. Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve aus Werten einer Verdünnungsreihe von Proteinstandardlösung (BSA) ermittelt.

**3.1.11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese trennt Proteine entsprechend ihres Stokes-Radius und damit ihrem Molekulargewicht auf. Das verwendete Polyacrylamidgel aus Acrylamidmonomeren und Bisacrylamid, bildet abhängig vom Volumenanteil der beiden Bestandteile verschieden große Poren. Je nach Größe des gesuchten Proteins wird deshalb zuvor die Prozentualität des Gels

festgelegt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese nach Laemmli [96]. Passend zur Größe der nachzuweisenden Proteine, wurden 10%ige Gele verwendet. Die angegebenen Mengen entsprechen zwei kleinen (8 x 7,5cm) Gelen.

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
30% Acrylamid	3,3ml	850µl
1,5M Tris/HCl pH 8,8	2,5ml	
0,5M Tris/HCl pH 6,8		1,25ml
10% SDS	100µl	50µl
H <sub>2</sub> O	4ml	2,8ml
TEMED	5µl	10µl
10% APS	100µl	100µl

In die Gelformen wurde zuerst das Trenngel gegeben. Dieses wurde mit Isobutanol überschichtet, um eine glatte Gelkante zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isobutanol wieder entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde vor dessen Polymerisation ein Gelkamm mit entsprechender Taschenzahl und Größe gesteckt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit dem Elektrophoresepuffer aufgefüllt.

#### **Elektrophoresepuffer**

	25mM	Tris/HCl pH 8,3
	192mM	Glycin
	0,1%	SDS

Die zu trennenden Proben wurden 2:1 mit Laemmli-Puffer versetzt und für 5min bei 95°C denaturiert. Das stark negative SDS aus dem Laemmli-Puffer bindet dabei an die hydrophoben Regionen der Proteine, wodurch diese unabhängig ihrer ursprünglichen Ladung, stark negativ werden und in der Elektrophorese zur Anode wandern. Zur Konzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte die

Elektrophorese bis zum Erreichen des Trenngels langsam mit 20mA. Im Trenngel erfolgte die Auftrennung bei 50mA.

### 3.1.12. Western Blot

Mit dem sogenannten Halbtrockenverfahren wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit 0,2µm Porengröße transferiert. Dazu wurden zwischen die Elektroden des Elektrobloppers drei Lagen mit Transferpuffer getränktes Blotting-Papier, eine getränkte Nitrozellulosemembran, das Gel und erneut 3 Lagen getränktes Blotting-Papier gelegt, welche alle auf die Gelgröße zugeschnitten wurden. Mit einer Stromstärke von 1mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche wurden die Proteine in 90min vom Gel auf die Nitrozellulose transferiert.

---

#### Transfer-Puffer

---

25mM	Tris/HCl pH 8,3
192mM	Glycin
20%	Methanol

---

Anschließend an den Transfer auf die Nitrozellulosemembran, wurden die Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert und durch einen Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper über Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrats nachgewiesen.

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran zweimal für 5min mit TBS gewaschen. Danach erfolgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindestellen durch 1h Inkubation bei RT in 5% Milchpulver in TBS-T. Nach dreimaligem Waschen für 10min mit TBS-T wurde der in 1% Milchpulver in TBS-T verdünnte Erstantikörper (Konzentrationen gemäß Antikörper-Datenblatt) über die Membran gegeben und für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 10min in TBS-T gewaschen. Der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper wurde ebenfalls in 1% Milchpulver in TBS-T verdünnt. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 90min bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T, erfolgte die Detektion der entstandenen Immunkomplexe mittels ECL-Reagenz. Die durch die Peroxidase des Zweitantikörpers katalysierte Oxidation von Luminol aus dem ECL-Reagenz setzt Chemolumineszenz frei, welche einen aufgelegten Röntgenfilm an den

entsprechenden Stellen belichtet. Zur Inkubation der Membran mit einem weiteren Erstantikörper wurde durch ein sogenanntes „easy stripping“ der gebundene Antikörperkomplex entfernt. Die Membran wurde hierzu für 30min bei 60°C in der Strippinglösung inkubiert und im Anschluss dreimal für 5min mit TBS-T gewaschen. Danach konnte die Membran erneut mit einem Erstantikörper inkubiert werden.

---

### 10xTBS

pH 7,8	60,5g	Tris (0,5M)
	87,6g	NaCl (1,5M)
	Auf 1L	H <sub>2</sub> O

---

### 1X TBS-T

	100ml	TBS 10x
	1ml	Tween20
	Auf 1L	H <sub>2</sub> O

---

### Stripping solution

	100mM	2-Mercaptoethanol
	2%	SDS
	62,5mM	Tris/HCl pH 6,7

---

Für semiquantitative Analysen der Western Blot Ergebnisse wurden die auf den Röntgenfilmen vorliegenden Banden mittels MetaMorph 4.6.9r Software von Universal Imaging (Visitron Systems, Puchheim) quantifiziert.

### 3.1.13. Genomatix Analyse zur Promotoruntersuchung

Mit der Genomatix Analyse wurde im theoretischen Promotorbereich von CLC-K1 (clcnka / NM\_024412) und Barttin (NM\_080458) nach Bindungsstellen für den TonEBP Transkriptionsfaktor gesucht. Die Analyse wurde mit dem Genomatix-Softwaremodul Eldorado 4.7 unter Verwendung von Matrix library 8.0 für einen Bereich von 5000 Basenpaaren stromaufwärts des Transkriptionsstarts durchgeführt.

### 3.1.14. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) ist eine Methode, bei der radioaktiv markierte doppelsträngige DNA-Oligonukleotide durch spezifische Proteinbindungen ihr Laufverhalten im Elektrophoresegel gegenüber freier DNA ändern. Mit ihm können DNA bindende Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden [6]. Eine Proteinfraction wird mit doppelsträngigen, radioaktiv markierten DNA Fragmenten und eventuell einem spezifischen Antikörper (Supershift) inkubiert. Aufgetragen auf ein Polyacrylamidgel laufen im elektrischen Feld Komplexe aus DNA, Protein und Antikörper aufgrund ihrer Größe langsamer als Komplexe aus DNA und Protein, wobei freie DNA am schnellsten läuft. Im Supershift wird ein spezifischer Antikörper gegen das vermeintlich bindende Protein zugegeben. Dadurch vergrößert sich der Komplex aus DNA und Protein und wird im Shift höher liegend detektiert. Als weitere Kontrolle neben dem Supershift wird eine sogenannte Kaltverdrängung mitgeführt um die Bindungsspezifität zu bestätigen. Dabei wird zusätzlich zur radioaktiv markierten DNA und dem Proteinlysat ein Überschuss der gleichen aber unmarkierten DNA zugegeben. Da die unmarkierte DNA im Überschuss vorliegt, wird sie öfter vom Protein gebunden als die radioaktiv markierte DNA und die Intensität der Bande im Shift wird deutlich abgeschwächt.

Mittels Genomatix-Analyse konnten im CIC-K1 Promotor zwei Bindungsstellen für TonEBP (NFAT5) vorhergesagt werden. Für die entsprechenden Bereiche wurden jeweils Oligos (Biomers) für den sense und antisense Strang bestellt.

Vorhergesagte Bindungsstelle	Sequenz
<b>TonEBP-Bind 1</b>	5'-tattggaaataaaaaattctc-3' 5'-ataacctttatTTTTAAGAG-3'
<b>TonEBP-Bind 2</b>	5'-ccctggaaagatgctgcttac-3' 5'-gggaccttctacgacgaatg-3'

Die Oligopaare wurden am Abend zuvor zu Doppelsträngen verknüpft. Hierzu wurden jeweils 10µl des forward und reverse Oligos (100µM) mit 80µl H<sub>2</sub>O für 5min bei 95°C inkubiert. Nach Abschalten des Heizblockes wurden die Proben über Nacht im Block belassen, wo sie langsam abkühlen konnten. Zur radioaktiven

Markierung der nach dem Annealing doppelsträngigen DNA Fragmente, wurden 2µl dsDNA-Fragment mit 2µl PNK Puffer (NEB B0201s 10x T4-Polynucleotide Kinase) und 12µl H<sub>2</sub>O versetzt. Danach wurden 1µl PNK und 3µl γ<sup>32</sup>ATP zugegeben und der Ansatz bei 37°C für 30min inkubiert. Über eine Säule wurden unmarkierte Fragmente entfernt. Die radioaktiv markierten dsDNAs wurden in vier Elutionen mit 200µl 5x TE Puffer aus der Säule eluiert und das am stärksten radioaktive Eluat wurde verwendet. Zur Bindung von Protein an die dsDNA-Fragmente wurden 6µg Proteinfraction, 4µl Blau-Puffer, 1µl poly(dI-dC) Blocking Puffer und 3µl markierte Oligos zusammen gegeben und mit Wasser auf 20µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde im Anschluss daran für 90min bei 100mA im Acrylamidgel laufen gelassen. Für die Kaltverdrängung wurden zusätzlich 6µl unmarkierte Oligos zugegeben. Für den Supershift kamen zusätzlich 5µg NFAT5 Antikörper in das Gemisch.

---

### **Polyacrylamidgel**

---

12ml	30% Polyacrylamid
1,5ml	10x TBE
56,5ml	H <sub>2</sub> O
75µl	TEMED
300µl	APS

---

### **Laufpuffer**

---

25ml	10x TBE
Auf 1L	H <sub>2</sub> O

---

Danach wurde das Gel für 100min vakuumgetrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde über Nacht bzw. für mehrere Tage ein Röntgenfilm aufgelegt, welcher nach der Entwicklung ein spezifisches Bandenmuster zeigen sollte. Die verwendeten Proteinfractionen wurden aus IMCD Zellen, die bis zu 24h mit hyperosmolarem Medium (450/ 600/ 900mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl und Raffinose) inkubiert wurden gewonnen. Mit dem NE-PER-Kit (Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) von Pierce wurden die geernteten Proteine in ihre cytoplasmatische und ihre nukleäre Fraktion getrennt, welche im EMSA separat untersucht wurden.

### 3.1.15. DAB Färbung von Kryoschnitten

Die Peroxidase basierende Diaminobenzidin (DAB) Färbung wurde an Kryoschnitten von Nieren der Mäuse aus dem Dehydratationsversuch (siehe 2.1.15) durchgeführt. Der DAB Farbstoff wird durch Reduktion (z.B. durch die an viele Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase, welche zugegebenes  $H_2O_2$  umsetzt, wonach dabei gebildete Protonen dann den Farbstoff reduzieren) zu einem braunen, durch wässrige oder organische Lösungsmittel unlöslichen Präzipitat. Zuerst wurden die Kryoschnitte fixiert. Dazu wurden sie 2 x 2min in PBS gewaschen und für 30min bei 4°C in 96% Ethanol inkubiert. Anschließend wurden sie 1min in 100% Aceton bei RT inkubiert und danach 2 x 5min mit PBS gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte eine 20minütige Inkubation in 3%  $H_2O_2$  in Methanol. Nach 2 x 5min waschen in PBS wurden die Schnitte 15min in 0,2% Triton-X inkubiert und danach erneut 2 x 5min mit PBS gewaschen. Unspezifische Proteinbindungen wurden durch Inkubation in 5% Milchpulver in PBS für 1h blockiert. Erneutes Waschen 2 x 5min in PBS. Danach erfolgte eine jeweils 15minütige Inkubation mit Avidin und Biotin. Dazwischen und danach wurde je 2 x 5min mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden danach mit Antikörper (TonEBP/ CLC-K) in 1% Milchpulver in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 2 x 5min Waschen in PBS wurde der in 1% Milchpulver in PBS vorliegende Zweitantikörper für 1h auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurde 2 x 5min mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit der ABC-Peroxidase (1ml PBS + 15µl A + 15µl B) für 30min bei RT wurde erneut 2 x mit PBS für 5min gewaschen. Für die DAB Entwicklung wurden 4ml DAB mit 200ml PBS auf 37°C angewärmt. Dazu wurden unmittelbar vor der Entwicklung 1ml  $NiCl_2$  (8%) und 400µl  $H_2O_2$  (3%) gegeben. Die Schnitte wurden für etwa 3min in die Lösung gehalten, bis eine adäquate Braunfärbung erkennbar war. Abschließend wurden die Schnitte 2 x mit PBS gewaschen und schließlich eingedeckelt.

### 3.1.16. Dehydratationsversuch

Der Tierversuch wurde gemäß des NIH Handbuchs zur Pflege und Handhabung von Labortieren und konform zum deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Im Versuch wurden 20 männliche C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld) mit Körpergewichten von 17-20g eingesetzt. Bis zum Beginn des Experiments wurden die Tiere auf Standardeinstreu mit unbegrenztem Wasser- und Futterzugang

gehalten. Für den Versuch wurden die Tiere in zwei Gruppen mit jeweils 10 Tieren geteilt. Die eine Gruppe hatte während der Versuchsdauer von 36h weiterhin unbegrenzt Zugang zu Wasser und Futter, während der zweiten Gruppe der Zugang zum Wasser, nicht aber zum Futter, über die gesamte Versuchsdauer verwehrt wurde. Nach 36h wurden alle Tiere getötet und ihre Nieren entnommen. Unter dem Stereomikroskop wurden Cortex und innere Medulla von jeweils einer der beiden Nieren pro Tier separat präpariert. Die Proben wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zudem wurden Blutproben der beiden Gruppen entnommen und aus den Blasen der Tiere Urinproben gesammelt. Aus den gesammelten Gewebeproben wurde RNA isoliert bzw. aus den ganzen Nieren Kryoschnitte angefertigt.

### **3.1.17. Hoch- und Niedrigsalzdiät bei Dahl salzsensitiven bzw. resistenten Ratten**

Aus einem unabhängig von dieser Arbeit laufenden Tierversuch konnten Urinproben zur Messung der Aldosteronkonzentration nach speziellen Salzdiäten heran gezogen werden. Der Tierversuch wurde gemäß des NIH Handbuchs zur Pflege und Handhabung von Labortieren und konform zum deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Jeweils fünf Dahl salzsensitive Ratten (DSS) und fünf Dahl salzresistente Ratten (DSR) wurden für 14 Tage mit Hochsalzfutter (HS) ernährt. Parallel dazu wurden je fünf Ratten beider Spezies für dieselbe Zeitspanne mit Niedrigsalzfutter (LS) ernährt. Nach sieben und nach 14 Tagen wurde von allen Tieren eine 24h Urinprobe gesammelt. Diese konnte in Folge für ein Aldosteron RIA verwendet werden.

### **3.1.18. Aldosteron RIA**

Mittels RIA wurde quantitativ radioimmunologisch die Aldosteronkonzentration im Urin von Ratten bestimmt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Diasorin). Die Bestimmung basiert auf Competition zwischen markiertem Aldosteron und Aldosteron in den Kalibratoren oder den Proben um eine bestimmte limitierte Zahl von an die Röhrchenwand gebundenen Antikörperbindungsstellen. Das an die Röhrchenwand gebundene markierte Aldosteron ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Aldosterons aus den Kalibratoren oder den Proben. Vor der Bestimmung des

Aldosterons wurden jeweils 100µl der Urinproben mit 1ml 0,1M HCl für ca. 20h bei 30°C hydrolysiert. Nach Messung der Proben im Gammacounter wurden die mittleren Prozentwerte der Kalibratoren auf der Ordinate in Funktion zur Aldosteronkonzentration in pg/ml auf der Abszisse aufgetragen und eine Kalibrationskurve erstellt. Zur Berechnung der Aldosteronmenge in µg wurde bei 20µl eingesetztem Volumen, der von der Kalibrationskurve abgelesene Wert mit 110 multipliziert. Der Koeffizient 110 stammt vom Verdünnungsfaktor des hydrolysierten Urins (11) multipliziert mit dem Verhältnis Kalibrator/Probe (10).

### 3.1.19. Statistik

Die zur statistischen Auswertung verwendeten Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten gewonnen und als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Microsoft Excel. Signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zur im Ansatz mitgeführten Kontrolle durch den Student t-Test bestimmt.

## 3.2. Materialien

### 3.2.1. Geräte

---

#### Geräteliste

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Technomara, Fernwald
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammern für Acrylamidgele	BioRad, München
Elektroblotter	PeqLab, Erlangen
Emax precision microplate reader	MWG Biotech, Ebersberg
Entwicklerapparatur	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Fotokamera	Nikon, Düsseldorf
Gammacounter Cobra II	Packard Bioscience (Perkin Elmer)

---

---

Gelgießapparatur Mini Protean 3	BioRad, München
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
LightCycler	Roche, Mannheim
Nanodrop	PeqLab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR Thermocycler	Thermo Hybaid, Dreieich
pH-Meter	Mettler-Toledo Schwerzenbach, CH
Photometer	Biochrom, Cambridge, UK
Spannungsquelle	Biometra, Göttingen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
TaqMan	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	BioRad, München
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	Lauda, Königshofen
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

---

### 3.2.2. Verbrauchsmaterialien

#### Verbrauchsmaterialien

---

Einwegpipetten	Sarstedt, Nürnberg
Blotting Pad	VWR International, Darmstadt
Hyperfilm	Amersham, Braunschweig
Illustra NICK columns Sephadex G50	GE Healthcare Europe, München
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville, USA
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR Platten 384well	Corning, Corning, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6/24well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz

---

---

Zentrifugenröhrchen (15/50ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
-------------------------------	--------------------------------

---

### 3.2.3. Chemikalien und Reagenzien

---

#### Chemikalien und Reagenzien

---

2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
$\gamma^{32}$ -ATP	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Acrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Aldosteron	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
dATP	Promega, Mannheim
dCTP	Promega, Mannheim
dGTP	Promega, Mannheim
dTTP	Promega, Mannheim
Dual Color Protein Standard	BioRad, München
ECL-Reagenz	Amersham Biosciences, Freiburg
Elektrophoresepuffer	BioRad, München
Ethidiumbromid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching Österreich
Glycerol 100%	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HiPerFect	Qiagen, Hilden
Kaleidoscope Prestained Standard	BioRad, München
Kupfersulfat-Lösung 4%	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Laemmli-Puffer	BioRad, München
Mannitol D-(-)	Merck, Darmstadt
MAPK Inhibitor SB203580	LC Laboratories, Woburn USA
MEK1 Inhibitor PD98059	LC Laboratories, Woburn USA
MEK1/2 Inhibitor UO126	LC Laboratories, Woburn USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Oligo-dT Primer	Sigma Aldrich, Taufkirchen

---

PBS (Dulbecco's PBS)	PAA, Pasching Österreich
PIC (Proteaseinhibitor Cocktail)	Roche Diagnostics, Mannheim
Poly(dI-dC)	Amersham Biosciences, Freiburg
Proteinstandard für BCA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
QuantiTect SYBR green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Raffinose D-(+)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
RNase-freie DNase	Qiagen, Hilden
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
Spirolacton	Sigma Aldrich, Taufkirchen
T4 Polynucleotid Kinase	NEB, Frankfurt
T4 Polynucleotid Kinase Puffer	NEB, Frankfurt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching Österreich
Transferpuffer	BioRad, München
Tween 20	Merck, Darmstadt
Tris	USB, Cleveland, USA

### 3.2.4. Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Reaktivität
Actin	Santa Cruz Biotechnology	Ziege polyklonal
Aldose Reductase	Santa Cruz Biotechnology	Ziege polyklonal
Barttin	Acris Antibodies	Hase polyklonal
BGT1	Alpha Diagnostic International	Hase polyklonal
CLC-K	Alomone Labs	Hase polyklonal
NFAT5	Aviva Systems Biology	Hase polyklonal
Phospho-p38-MAPK	Cell Signaling Technology	Hase polyklonal
p38-MAPK	Cell Signaling Technology	Hase polyklonal
SGK1	Upstate	Hase polyklonal
SMIT	Santa Cruz Biotechnology	Ziege polyklonal

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Einfluss von Hyperosmolarität auf Zellen des Pars convoluta (DCT)**

#### **4.1.1. Regulation der mRNA Expression von SGK1 unter hyperosmolaren Bedingungen**

Nach Erhöhung der Osmolarität des Zellmediums von isoosmolaren 300 mosm/kg H<sub>2</sub>O auf hyperosmolare 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O durch entsprechende Zugabe von NaCl in das Zellmedium, stieg die mRNA Expression von SGK1 nach 4h Inkubation signifikant an. Nach 12h Stimulation war das Maximum der Expression mit einer 20-fachen Erhöhung gegenüber basal erreicht ( $p=4 \times 10^{-5}$ ). Die mRNA Expression blieb bis zu 24h nach Stimulationsbeginn signifikant erhöht. Nach Erhöhung der Mediumosmolarität durch die Zugabe von Mannitol anstelle von NaCl, war ebenfalls ein Anstieg der mRNA Expression von SGK1 erkennbar. Bereits nach 4h Inkubation war der Maximalwert mit einer siebenfachen Erhöhung gegenüber basal erreicht ( $p=9 \times 10^{-5}$ ). Für weitere 32h blieb die Expression signifikant erhöht, nahm dabei aber kontinuierlich ab. Nach Erhöhung der Mediumosmolarität mit Harnstoff auf 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O, war zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung der mRNA Expression von SGK1 zu erkennen (Abbildung 11).

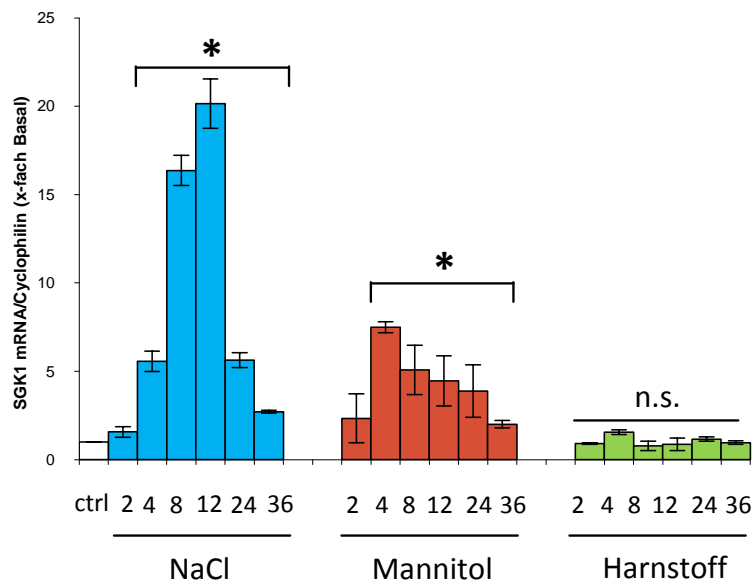


Abbildung 11 SGK1 mRNA Expression nach Hyperosmolarität

mRNA Expression von SGK1 unter hyperosmolaren Bedingungen (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl, Mannitol oder Harnstoff für den Zeitraum 2 - 36h. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber ctrl  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2. Regulation der Protein Expression von SGK1 unter hyperosmolaren Bedingungen

Auf Proteinebene wurden Ergebnisse, die vergleichbar zu denen auf mRNA Ebene sind gewonnen. Die Inkubation in Medium mit 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O, bedingt durch NaCl Zugabe, führte nach 4 - 8h zu einer signifikanten, etwa dreifachen Erhöhung der SGK1 Proteinexpression. Unter Mannitol induzierter Hyperosmolarität kam es nach 8h Inkubation ebenfalls zu einer signifikanten, etwa dreifachen Erhöhung der Proteinexpression. Erhöhung der Osmolarität durch Harnstoff bewirkte keine signifikante Änderung der Proteinexpression (Abbildung 12).

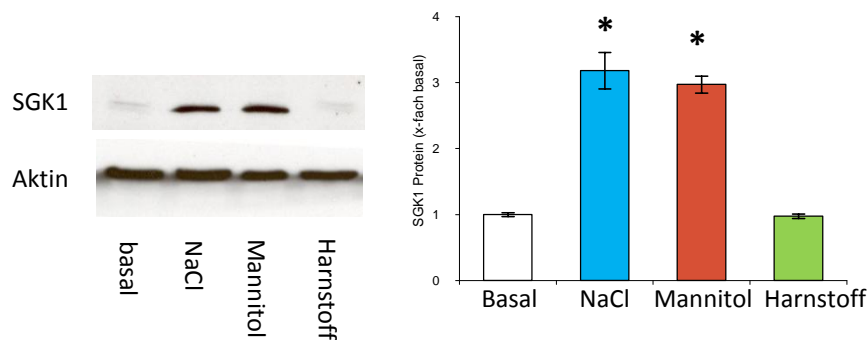


Abbildung 12 SGK1 Proteinexpression nach Hyperosmolarität

SGK1 Proteinexpression nach 8h Inkubation in hyperosmolarem Medium (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O), induziert durch NaCl, Mannitol oder Harnstoff. Linke Seite im Western Blot, rechts optische Analyse des Western Blots  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3. Regulation der mRNA Expression von CLC-K1 und Barttin unter hyperosmolaren Bedingungen

Parallel zu SGK1 wurde sowohl unter NaCl, wie auch Mannitol induzierter Hyperosmolarität die mRNA Expression von CLC-K1 und Barttin signifikant erhöht. Nach 12h Inkubation im NaCl-haltigen hyperosmolarem Medium (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) war bei einer 14-fachen Erhöhung der mRNA Expression von CLC-K1 der Maximalwert erreicht ( $p=0,005$ ). Unter Inkubation in Medium mit 900 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl war eine bis zu 33-fache Erhöhung der CLC-K1 mRNA Expression zu erzielen (nicht gezeigt). Für Barttin war ebenfalls mit einer 14-fachen Erhöhung der mRNA Expression das Maximum bereits nach 8h erreicht ( $p=0,003$ ). Unter Stimulation mit Mannitol kommt es auch bei CLC-K1 und Barttin zu signifikanten Erhöhungen der mRNA Expression. CLC-K1 wurde nach 24h maximal 12-fach ( $p=0,03$ ) und Barttin nach 12h etwa 15-fach hoch reguliert (Abbildung 13 und Abbildung 14). Wie auch für SGK1 ist unter Inkubation mit Harnstoff kein signifikanter Effekt auf die mRNA Expression von CLC-K1 und Barttin zu erkennen. (nicht gezeigt)

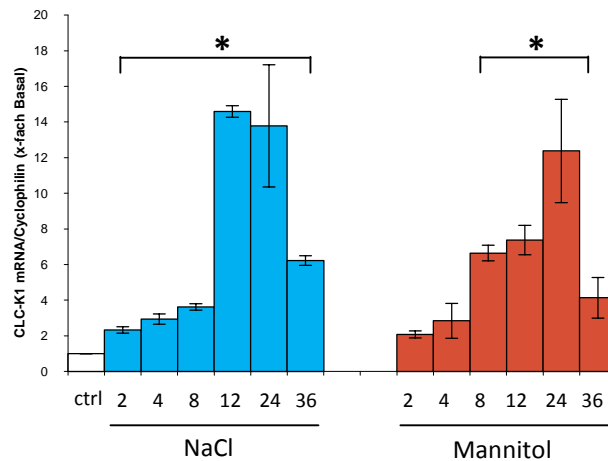


Abbildung 13 CLC-K1 mRNA Expression nach Hyperosmolarität

mRNA Expression von CLC-K1 unter hyperosmolaren Bedingungen (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl oder Mannitol für den Zeitraum 2 - 36h. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber ctrl  $p < 0,05$ .

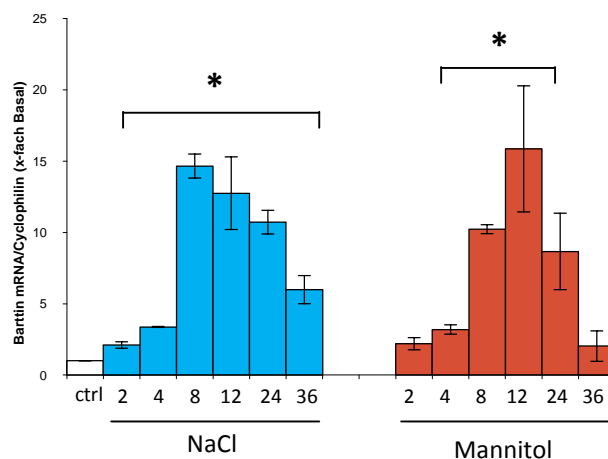


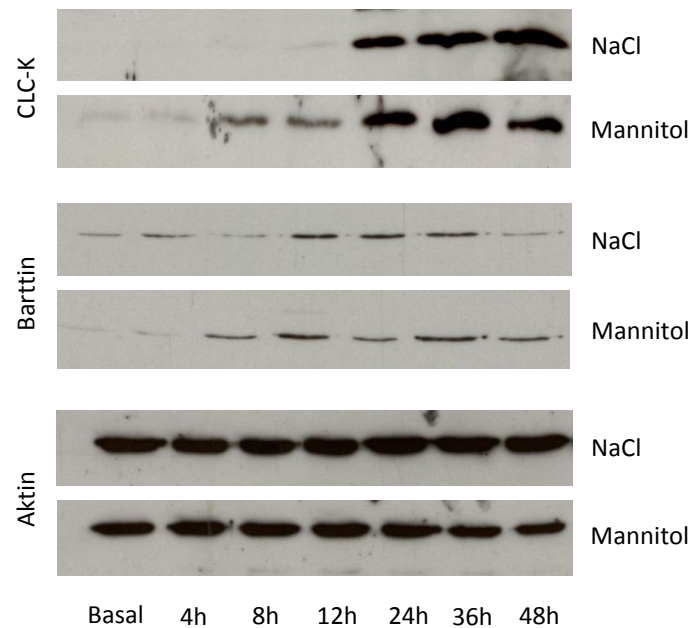
Abbildung 14 Barttin mRNA Expression nach Hyperosmolarität

mRNA Expression von Barttin unter hyperosmolaren Bedingungen (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl oder Mannitol für den Zeitraum 2 - 36h. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber ctrl  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4. Regulation der Protein Expression von CLC-K1 und Barttin unter hyperosmolaren Bedingungen

Die mRNA Ergebnisse ließen sich auch auf Proteinebene verifizieren. Unter NaCl induzierter hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) kam es nach 48h

Inkubation zu einer etwa 10-fachen Erhöhung des CLC-K Proteinlevels. Nach Inkubation im mannitolhaltigen Medium kam es nach 24h zu einer etwa 14-fachen Erhöhung der Proteinexpression. Das Proteinlevel von Barttin war nach 12-stündiger NaCl Inkubation etwa dreifach gegenüber dem isoosmolar inkubierter Zellen erhöht. Nach 12h Mannitol Inkubation war das Proteinlevel von Barttin etwa vierfach erhöht (Abbildung 15 und Abbildung 16).



**Abbildung 15** CLC-K1 und Barttin Proteinexpression nach Hyperosmolarität

Western Blot für CLC-K, Barttin und  $\beta$ -Aktin unter hyperosmolaren Bedingungen (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O), induziert durch NaCl oder Mannitol für den Zeitraum 4 - 48h.

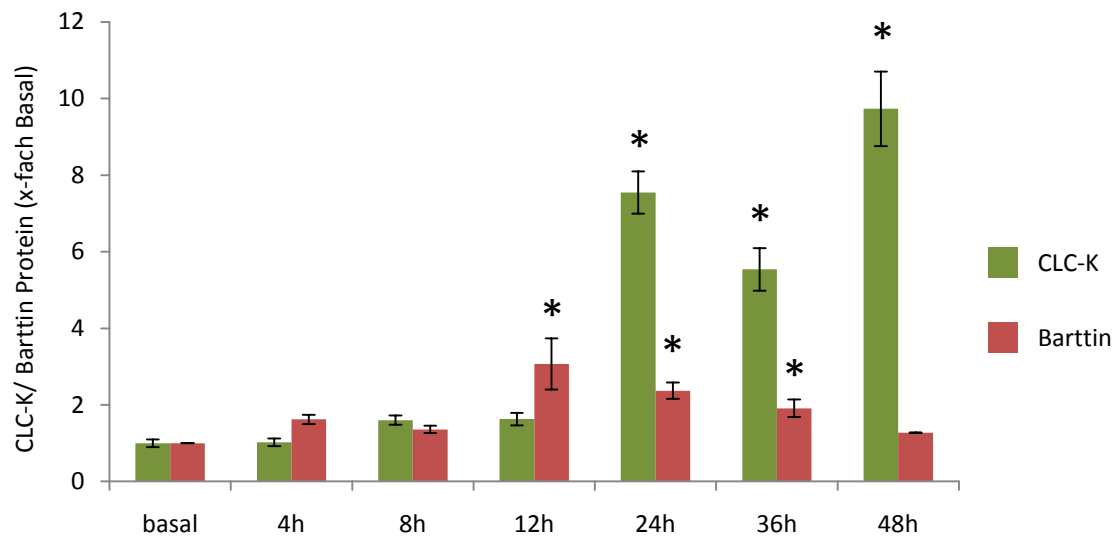


Abbildung 16 CLC-K1 und Barttin relative Proteinexpression nach Hyperosmolarität

Relativer Proteingehalt nach optischer Analyse des Western Blots für CLC-K und Barttin nach hyperosmolarer Stimulation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) durch NaCl für den Zeitraum 4 - 48h. Werte ± SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal p<0,05.

#### 4.1.5. Einfluss der Hyperosmolarität auf die p38 MAPK und die phospho-p38 MAPK

Unter NaCl induzierter Hyperosmolarität (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) kam es zu einer Induktion des phospho-p38 MAPK Proteins gegenüber dem unphosphorylierten p38-MAPK Protein (Abbildung 17 und Abbildung 18). Dies zeigt, dass Hyperosmolarität einen adäquaten Stimulus für die Induktion der phosphorylierten p38 MAPK darstellt. Durch Inkubation der Zellen mit dem MAPK Inhibitor SB203580 (10µM) wurde der durch die hyperosmolaren Bedingungen (NaCl / Mannitol) bewirkte Anstieg der mRNA Expression von SGK1 vollständig inhibiert, was auf eine Abhängigkeit der SGK1 mRNA Induktion von einem funktionell aktiven p38 MAPK Signalweg hinweist. Inhibition des MEK1 Signalwegs mit dem Inhibitor PD98059 (10µM) zeigten dagegen keinen Effekt auf die hyperosmolaritätsinduzierte Hochregulation der SGK1 (nicht gezeigt).

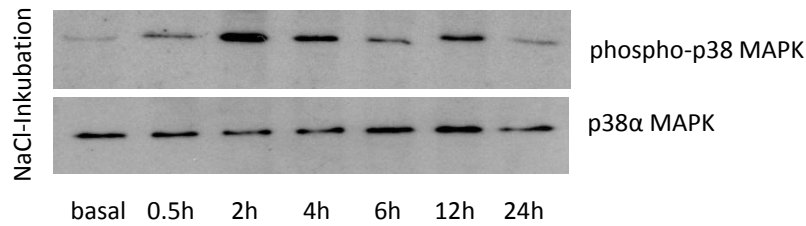


Abbildung 17 p38- und phospho p38 MAPK Protein Expression nach Hyperosmolarität

Western Blot der Proteinexpression der p38 MAPK und der phospho-p38 MAPK nach hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) mit NaCl für 0,5 - 24h in DCT Zellen.

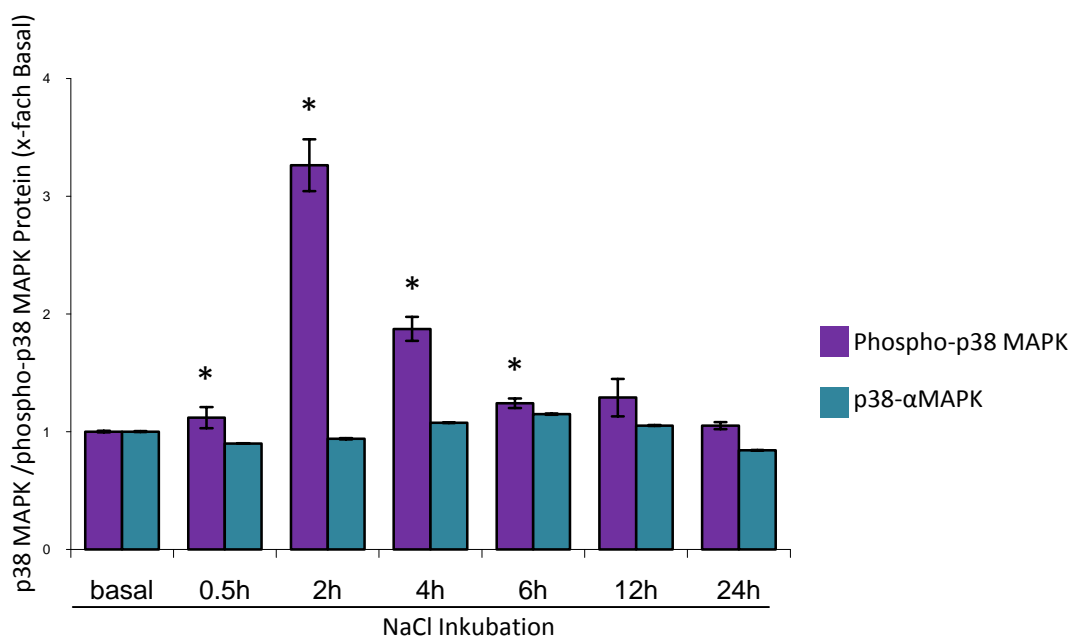
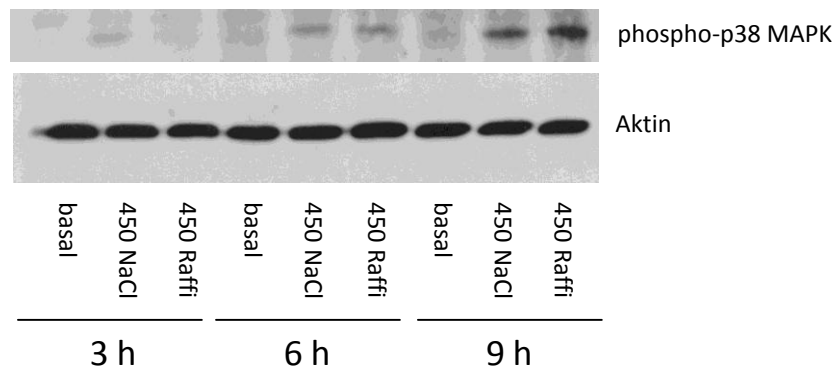


Abbildung 18 p38- und phospho p38 MAPK relative Protein Expression nach Hyperosmolarität

Relative Proteinexpression nach optischer Analyse des Western Blots der p38 MAPK und der phospho-p38 MAPK nach NaCl Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) für den Zeitraum 0,5 - 24h. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ .

Für die phospho-p38 MAPK war sowohl unter NaCl, als auch unter Raffinose induzierter Hyperosmolarität (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) auch in IMCD Zellen eine zeitabhängige Hochregulation erkennbar. Im Zeitverlauf von 3 – 9h lagen die Maxima der Hochregulation bei 9h (Abbildung 19).

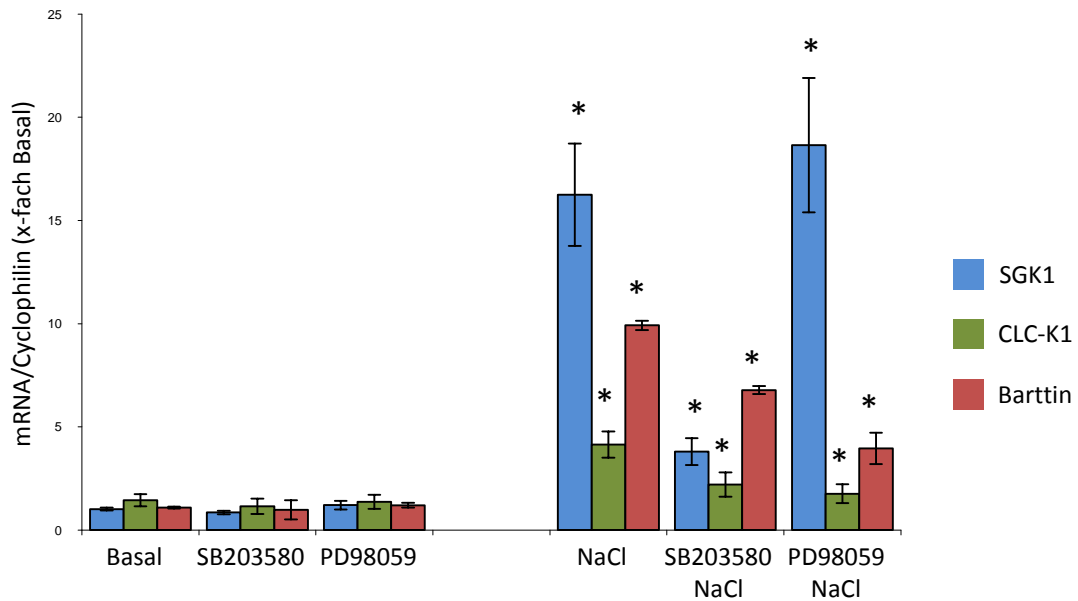


**Abbildung 19** phospho p38 MAPK Protein Expression nach Hyperosmolarität

Western Blot der Proteinexpression der phospho-p38 MAPK nach hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) mit NaCl und Raffinose für 3 - 9h.

#### **4.1.6. Einfluss des MAPK und MEK1 Signalwegs auf SGK1, CLC-K1 und Barttin.**

Unter dem Einfluss des p38 MAPK Inhibitors SB203580 (10µM) wurden neben der SGK1 mRNA Expression auch die mRNA Expression von CLC-K1 und Barttin signifikant reduziert, wenn die Zellen vor der hyperosmolaren Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) mit dem Inhibitor für 1h präinkubiert wurden. Die Expression von SGK1 wurde etwa vierfach herab reguliert (p=0,003), die von CLC-K1 etwa zweifach und die von Barttin etwa 1,5-fach (p=0,008). Gegenätzlich zu SGK1, wurde die durch Hyperosmolarität induzierte Hochregulation von CLC-K1 und Barttin auch durch einstündige Präinkubation mit dem MEK1/2 Inhibitor PD98059 (10µM) signifikant herab reguliert. Die CLC-K1 mRNA wurde etwa 2,3-fach und die Barttin mRNA etwa 2,5-fach herab reguliert (Abbildung 20).

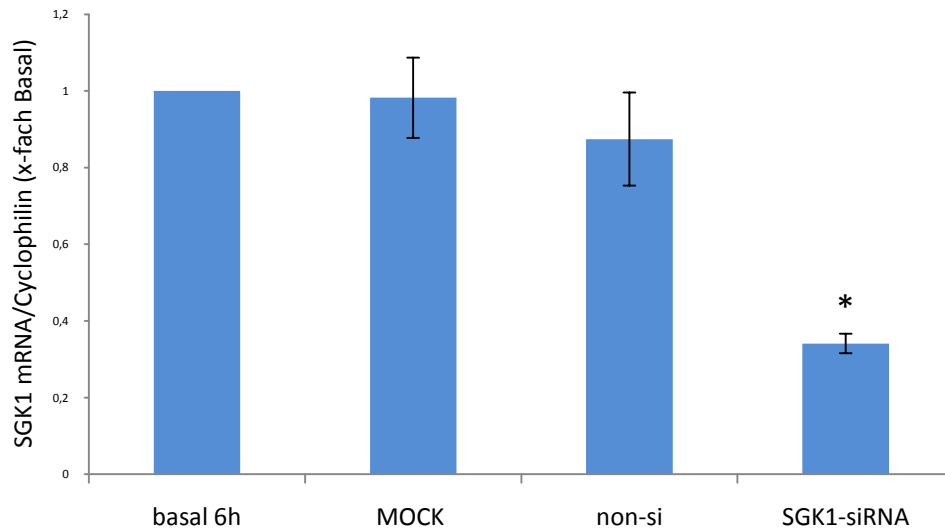


**Abbildung 20** SGK1, CLC-K1 und Barttin mRNA Expression nach Hyperosmolarität + MAPK/MEK1/2 Inhibition

mRNA Expression von SGK1, CLC-K1 und Barttin nach Präinkubation (1h) mit dem p38-MAPK- bzw. dem MEK1/2 Inhibitor und nachfolgender NaCl Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) für 8h. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ .

#### 4.1.7. Transfektion der DCT Zellen mit SGK1 spezifischer siRNA

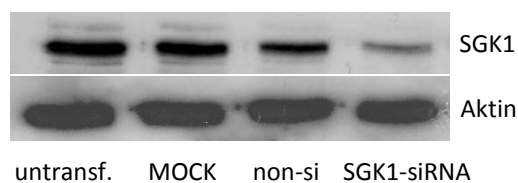
Nach Transfektion der DCT Zellen mit SGK1 spezifischer siRNA wurde die mRNA Expression von SGK1 gegenüber untransfizierten Zellen signifikant auf etwa 30% des Basalwertes herab reguliert ( $p = 0,0007$ ), wohingegen sich bei alleiniger Behandlung mit dem liposomalen Transfektionsreagenz (MOCK) behandelten und unspezifisch transfizierten Zellen (non-si) die Expression der mRNA nicht signifikant veränderte (Abbildung 21).



**Abbildung 21** SGK1 mRNA Expression nach SGK1-siRNA

Die SGK1 mRNA Expression nach Transfektion mit spezifischer SGK1 siRNA, unspezifischer siRNA und alleiniger Transfektion mit dem liposomalen Transfektionsmittel (MOCK). Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ .

Auf Proteinebene war die Herabregulation des SGK1 Proteins nach Transfektion mit der SGK1 spezifischen siRNA gegenüber der Expression der untransfizierten Zellen ebenfalls deutlich erkennbar (Abbildung 22). Die Behandlung alleinig mit dem liposomalen Transfektionsreagenz (MOCK) oder Transfektion mit unspezifischer siRNA (non-si) beeinflusste die SGK1 Proteinexpression nicht.



**Abbildung 22** SGK1 Protein Expression nach SGK1-siRNA

Western Blot zur SGK1 und  $\beta$ -Aktin Proteinexpression nach Transfektion mit der SGK1-siRNA im Vergleich zu untransfizierten, unspezifisch transfizierten und MOCK behandelten Zellen.

Wurden die DCT Zellen in hyperosmolarem Medium (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) inkubiert, so zeigten untransfizierte, mit dem liposomalen Transfektionsreagenz (MOCK) behandelte und unspezifisch transfizierte sowohl bei NaCl als auch bei Mannitol

induzierter Hyperosmolarität eine signifikante Hochregulation ( $p < 0,0005$ ) der SGK1 mRNA Expression. Zellen die mit SGK1 spezifischer siRNA vorbehandelt wurden, zeigten hingegen weder unter NaCl induzierter, noch unter Mannitol induzierter Hyperosmolarität eine signifikante Hochregulation gegenüber basalen, untransfizierten Zellen (Abbildung 23).

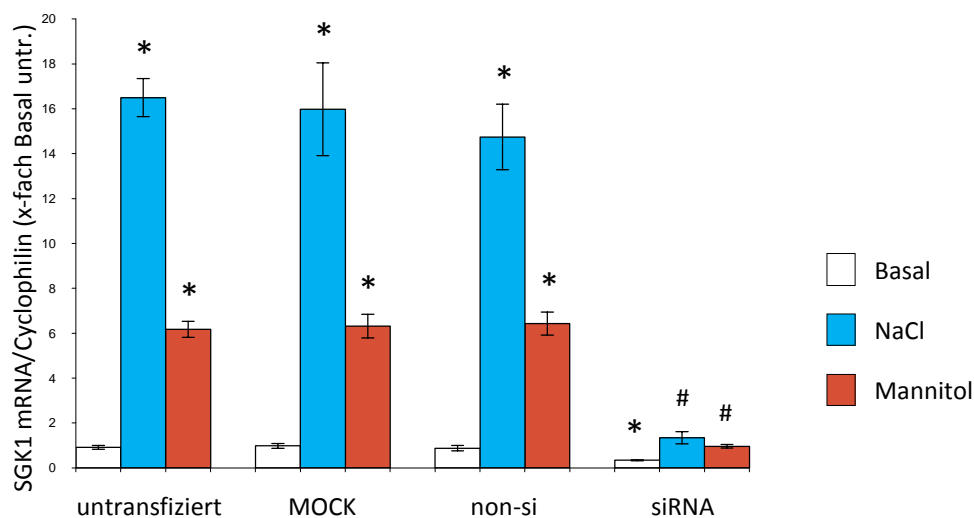


Abbildung 23 SGK1 mRNA Expression nach SGK1-siRNA + Hyperosmolarität

SGK1 mRNA Expression nach Transfektion mit SGK1 spezifischer siRNA, unspezifischer siRNA und alleiniger Inkubation mit dem Transfektionsmittel (MOCK) sowie gleichzeitiger hyperosmolarer Stimulation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl oder Mannitol. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE.

\* = signifikant gegenüber basal untransfiziert  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber untransfiziert + NaCl/ Mannitol  $p < 0,05$ .

Nach Transfektion der Zellen mit SGK1 spezifischer siRNA war die durch hyperosmolares Medium (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) bewirkte Hochregulation der CLC-K1 und Barttin mRNA Expression ebenfalls signifikant verringert. Verglichen mit der mRNA Expression nach hyperosmolarer Inkubation, wurde die Expression von CLC-K1 und Barttin in Zellen, die zusätzlich zur Hyperosmolarität auch mit SGK1 siRNA transfiziert wurden, signifikant herab reguliert. Hingegen zeigten die mit dem liposomalen Transfektionsreagenz (MOCK) behandelten und die unspezifisch transfizierten Zellen weiterhin eine signifikante Hochregulation der mRNA Expression von CLC-K1 und Barttin nach hyperosmolarer Inkubation. Auf die Expression von CLC-K1 und Barttin in Zellen unter isosmotischen Bedingungen

hatte die Transfektion mit der SGK1 spezifischen siRNA keinen Effekt, was die Spezifität der siRNA demonstriert (Abbildung 24 und Abbildung 25).

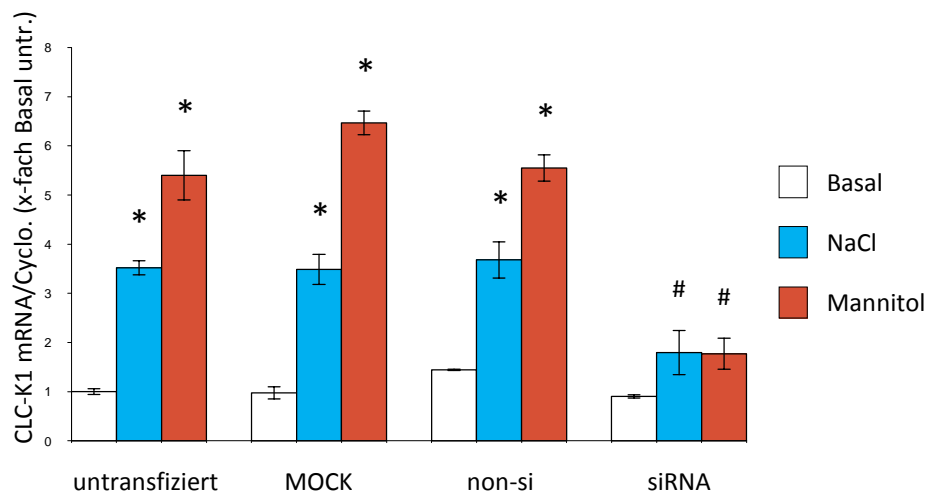


Abbildung 24 CLC-K1 mRNA Expression nach SGK1-siRNA + Hyperosmolarität

CLC-K1 mRNA Expression nach Transfektion mit SGK1 spezifischer siRNA, unspezifischer siRNA und alleiniger Behandlung mit dem Transfektionsmittel (MOCK) sowie gleichzeitiger hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl oder Mannitol. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber Basal untransfiziert  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber untransfiziert + NaCl/ Mannitol  $p < 0,05$ .

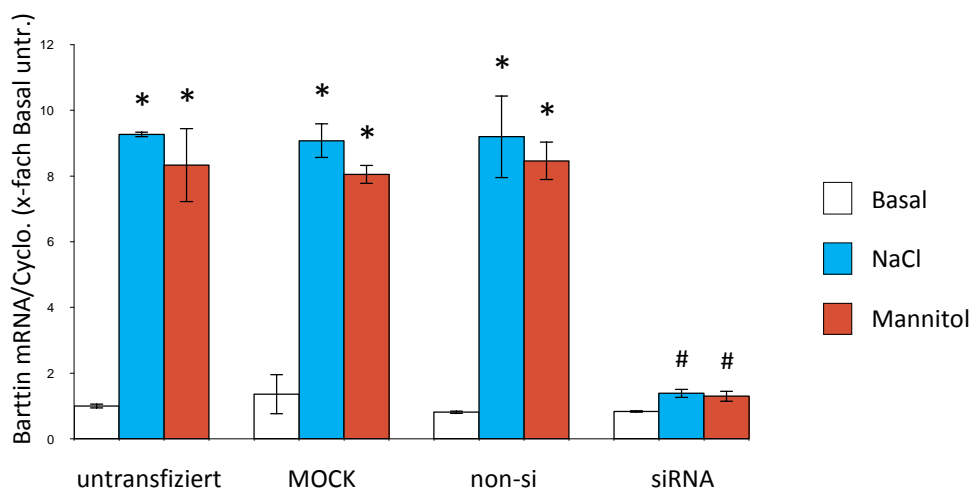


Abbildung 25 Barttin mRNA Expression nach SGK1-siRNA + Hyperosmolarität

Barttin mRNA Expression nach Transfektion mit SGK1 spezifischer siRNA, unspezifischer siRNA und alleiniger Behandlung mit dem Transfektionsmittel (MOCK) sowie gleichzeitiger hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl oder Mannitol. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber Basal untransfiziert  $p < 0,05$  angegeben. # = signifikant gegenüber untransfiziert + NaCl/ Mannitol  $p < 0,05$ .

#### 4.1.8. MTT Assay

Um mögliche, unerwünschte Nebeneffekte, wie z.B. Apoptose, durch die Transfektion mit der SGK1-siRNA ausschließen zu können, wurde ein MTT Assay zur Überprüfung der Zellvitalität durchgeführt. Weder Zellen, die allein mit dem liposomalen Transfektionsreagenz (MOCK) behandelt wurden, noch unspezifisch transfizierte (non-si) oder mit siRNA transfizierte Zellen zeigten signifikante Unterschiede in ihrer Zellvitalität gegenüber unbehandelten Zellen (Abbildung 26).

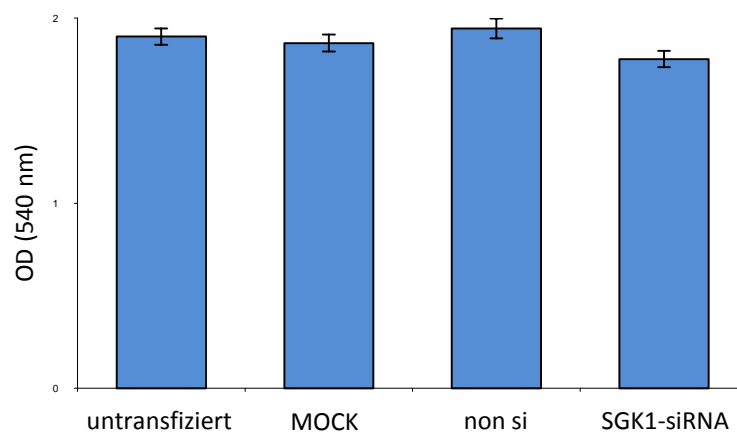


Abbildung 26 MTT Assay nach SGK1 siRNA

MTT Assay zur Überprüfung der Zytotoxizität der SGK1 siRNA gegenüber untransfizierten, MOCK behandelten oder mit unspezifischer siRNA transfizierten Zellen. Werte  $\pm$  SE.

## **4.2. Einfluss von Hyperosmolarität auf Zellen des innermedullären Sammelrohrs**

### **4.2.1. Regulation der mRNA Expression von TonEBP unter hyperosmolaren Bedingungen**

Die Inkubation von Zellen aus dem innermedullären Sammelrohr (IMCD) unter hyperosmolaren Bedingungen (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O), induziert durch Zugabe von NaCl, Mannitol oder Raffinose in das Kulturmedium, bewirkte eine Hochregulation der mRNA Expression von TonEBP. Bei einer durch NaCl induzierten Hyperosmolarität war diese Hochregulation für den Zeitverlauf von 3 - 24h signifikant. Der Maximalwert war dabei nach 9h mit einer 3,4-fachen Hochregulation ( $p=0,02$ ) erreicht. Die Erhöhung der Osmolarität durch Zugabe von Mannitol, bewirkt ebenfalls eine signifikante Hochregulation der mRNA Expression im Zeitverlauf von 3 - 9h, mit maximal fünffacher Hochregulation nach 9h ( $p=0,0005$ ). Nach 24h war der Basalwert wieder erreicht. Raffinose induzierte Hyperosmolarität bewirkte für 3 - 24h eine signifikante Hochregulation mit einem Maximum nach 6h und einer sechsfachen Hochregulation ( $p=3 \times 10^{-5}$ ). Harnstoff induzierte Hyperosmolarität hatte zu keinem der beobachteten Zeitpunkte einen signifikanten Einfluss auf die mRNA Expression von TonEBP. (Abbildung 27)

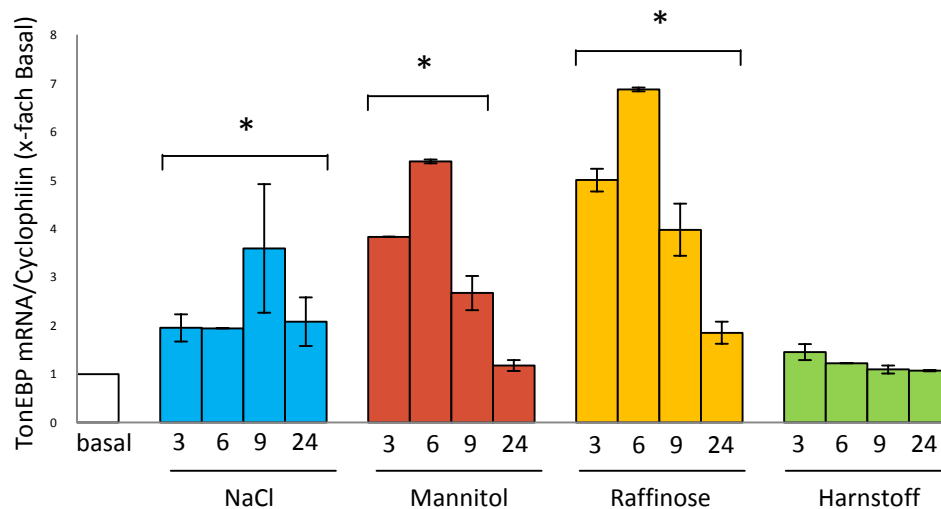
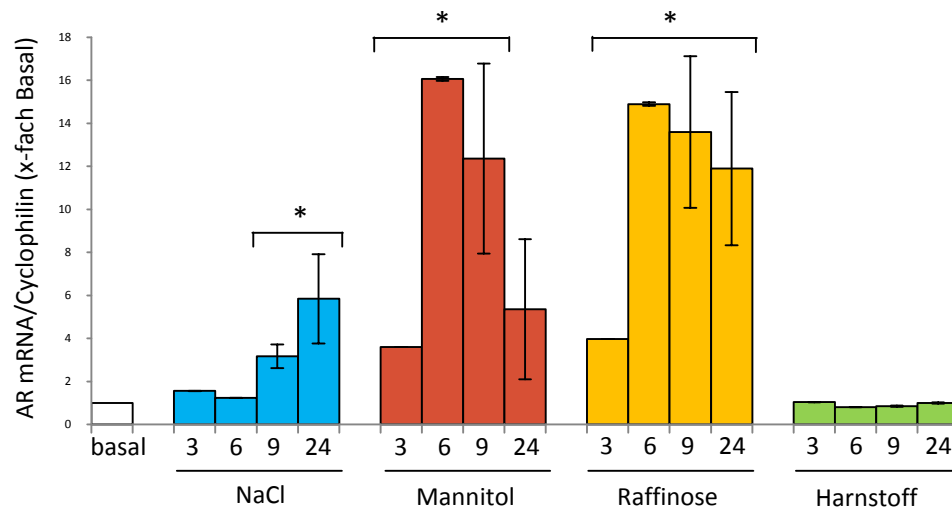


Abbildung 27 TonEBP mRNA Expression nach Hyperosmolarität

TonEBP mRNA Expression nach hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O), induziert durch NaCl, Mannitol, Raffinose oder Harnstoff über 3 - 24h. Die mRNA Expression wurde auf Cyclophilin B normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2. Regulation der mRNA Expression von AR, BGT1 und SMIT unter hyperosmolaren Bedingungen

Die mRNA Expression der TonEBP abhängigen, osmoprotektiven Gene AR, BGT1 und SMIT wurde durch Inkubation in hyperosmolarem Medium (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) (NaCl, Mannitol und Raffinose) ebenfalls signifikant induziert. Unter NaCl induzierter Hyperosmolarität wurde AR nach 9h maximal sechsfach gegenüber basal hochreguliert ( $p=0,008$ ). Durch Mannitol kam es nach 6h zu einer 16-fachen Hochregulation ( $p=3 \times 10^{-6}$ ) und durch Raffinose nach 6h zu einer 14-fachen Hochregulation ( $p=2 \times 10^{-6}$ ). Harnstoff hatte keinen induzierenden Effekt auf die Expression der AR mRNA. (Abbildung 28)



**Abbildung 28 AR mRNA Expression nach Hyperosmolarität**

AR mRNA Expression nach hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O), induziert durch NaCl, Mannitol, Raffinose oder Harnstoff für 3 - 24h. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ .

SMIT wurde unter NaCl induzierter Hyperosmolarität nach 9h maximal vierfach hochreguliert ( $p=0,0007$ ), durch Mannitol wurde er nach 9h 10-fach ( $p=0,0008$ ) und durch Raffinose nach 9h 12-fach hochreguliert ( $p=0,0004$ ). Harnstoff bedingte Hyperosmolarität hatte keinen Effekt auf die SMIT mRNA Expression. (Abbildung 29)

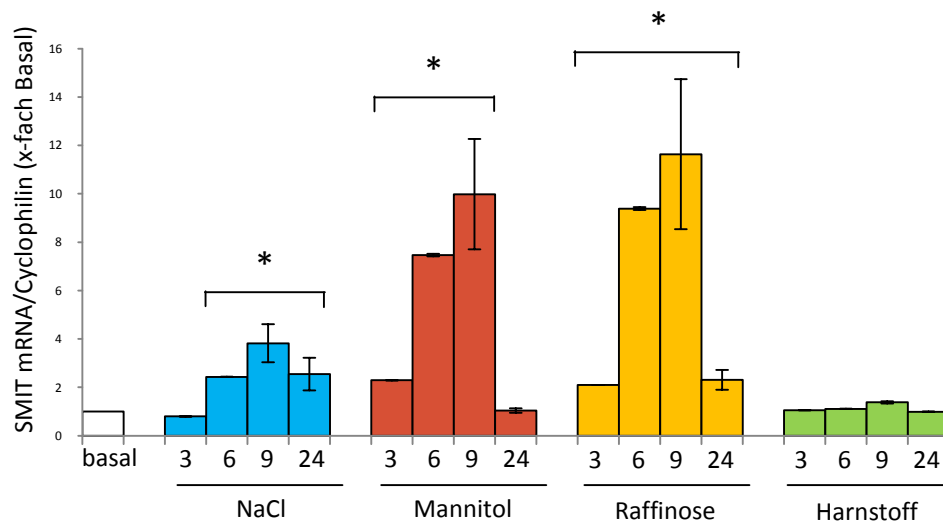


Abbildung 29 SMIT mRNA Expression nach Hyperosmolarität

SMIT mRNA Expression nach hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O), induziert durch NaCl, Mannitol, Raffinose oder Harnstoff für 3 - 24h. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ .

Unter hyperosmolarer Inkubation wurde eine bis zu 250-fache Hochregulation der BGT1 mRNA Expression gesehen, wobei sowohl für Mannitol ( $p=0,004$ ) wie Raffinose ( $p=0,007$ ) die Maxima nach 9h erreicht waren. (Abbildung 30)

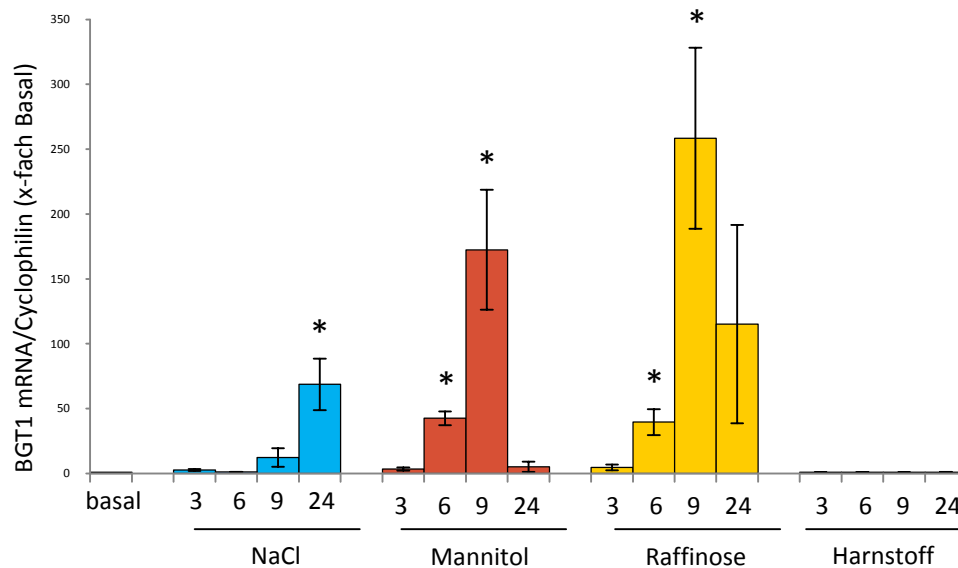


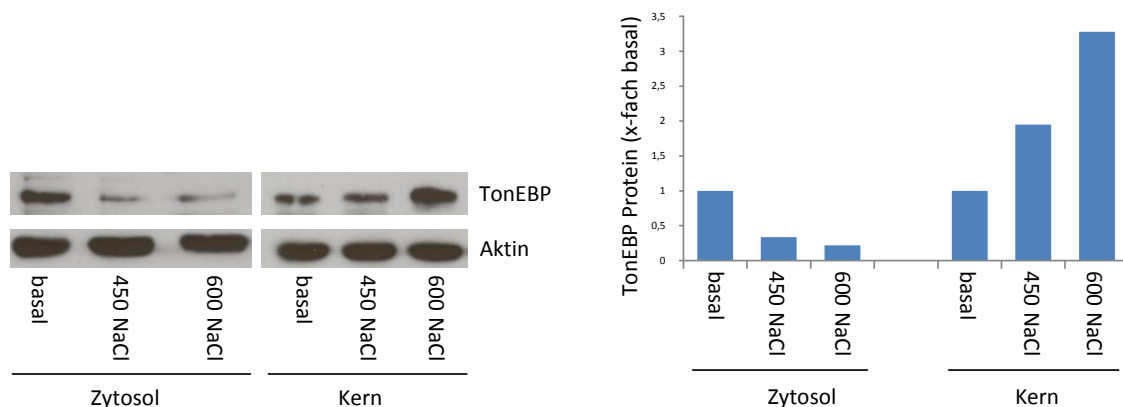
Abbildung 30 BGT1 mRNA Expression nach Hyperosmolarität

BGT1 mRNA Expression nach hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O), induziert durch NaCl, Mannitol, Raffinose oder Harnstoff für 3 - 24h. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3. Regulation der Proteinexpression von TonEBP, AR, BGT1 und SMIT unter hyperosmolaren Bedingungen

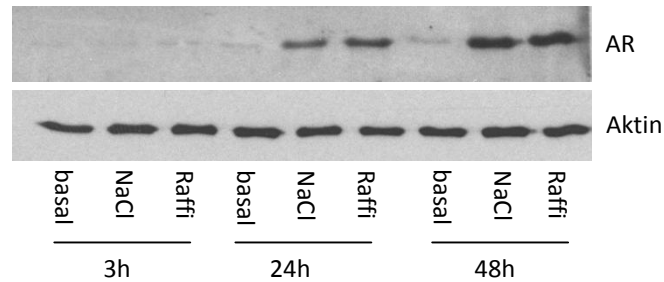
Auf Proteinebene ist für TonEBP und die osmoprotektiven Gene AR, und BGT1 ebenfalls eine deutliche Hochregulation nach hyperosmolarer Inkubation (450, 600 und 900 mosm/kg H<sub>2</sub>O) mit NaCl und Raffinose erkennbar. Für TonEBP war auf Western Blots aus Gesamtprotein nur eine sehr schwache Hochregulation zu erkennen (nicht gezeigt). Beim separaten Blick auf die Proteinfractionen des Zytoplasmas und des Zellkerns war der Grund dafür ersichtlich. Unter hyperosmolaren Bedingungen (450 und 600 mosm/kg H<sub>2</sub>O) war das TonEBP Proteinlevel im Zytoplasma deutlich gegenüber dem Basallevel herab reguliert (Abbildung 31). Nach Inkubation in Medium mit 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl, war eine Abnahme des Proteinlevels auf 34% des Basalwerts erkennbar, bei Inkubation in Medium mit 600 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl ging die Expression sogar auf 22% des Basalwerts zurück. Im Zellkern dagegen war eine deutliche Induktion der Proteinexpression mit steigender Hyperosmolarität erkennbar. Bei Inkubation mit 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl war das Proteinlevel etwa doppelt so hoch wie basal.

Nach Inkubation mit 600 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl, erreichte das Proteinlevel etwa den 3,3-fachen Wert des Basallevels. Bei AR war sowohl unter NaCl induzierter, als auch unter Raffinose induzierter Hyperosmolarität nach 24h eine deutliche Induktion der Proteinexpression zu erkennen, die zum Zeitpunkt 48h ihren Maximalwert erreichte (Abbildung 32). Die Proteinlevel von AR stiegen mit steigender Hyperosmolarität sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern an. Nach 24h Inkubation in Medium mit 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl war im Zytoplasma eine etwa fünffache Hochregulation erkennbar. Bei 600 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl war eine etwa siebenfache Hochregulation messbar. Im Zellkern war nach Inkubation in 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl eine etwa 2,3-fache Hochregulation, bei 600 mosm/kg H<sub>2</sub>O eine etwa 3,8-fache Hochregulation erkennbar (Abbildung 33). Für BGT1 war das Maximum unter NaCl induzierter Hyperosmolarität bereits nach 4h erreicht. Das Maximum unter Raffinose induzierter Hyperosmolarität lag bei 8h Inkubationszeit (Abbildung 34).



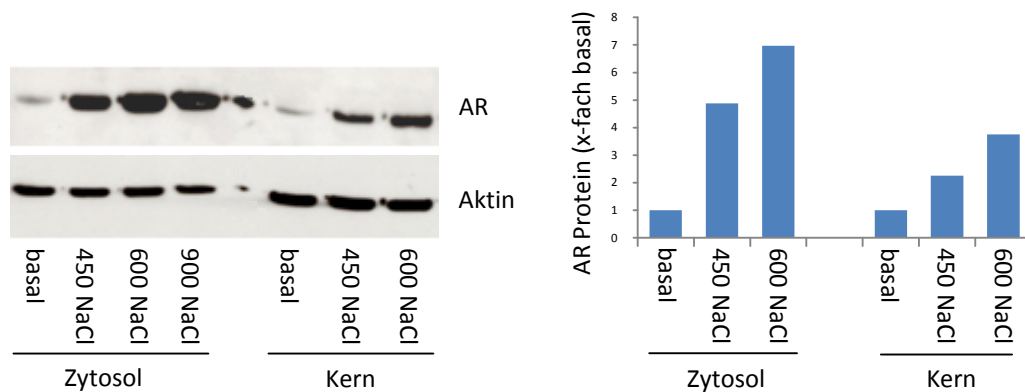
**Abbildung 31** TonEBP Proteinexpression aus Kern und Zytosol nach Hyperosmolarität

Western Blot Analyse der Proteinexpression von TonEBP und  $\beta$ -Aktin aus nukleären und zytosolischen Proteinfraktionen nach hyperosmolarer Inkubation (450 und 600 mosm/kg H<sub>2</sub>O) für 24h, induziert durch NaCl, sowie die dazugehörige relative Proteinexpression nach optischer Analyse des Western Blots.



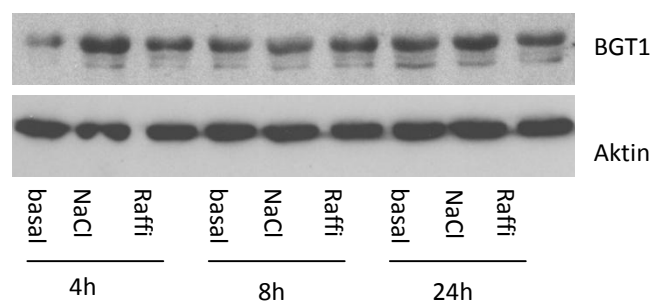
**Abbildung 32 AR Proteinexpression nach Hyperosmolarität**

Western Blot Analyse der Proteinexpression von AR und  $\beta$ -Aktin nach hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg  $H_2O$ ), induziert durch NaCl oder Raffinose für die Zeitpunkte 3,24 und 48h.



**Abbildung 33 AR Proteinexpression aus Kern und Zytosol nach Hyperosmolarität**

Western Blot Analyse der Proteinexpression von AR und  $\beta$ -Aktin aus nukleären und zytosolischen Proteinfraktionen nach hyperosmolarer Inkubation (450, 600 und 900 mosm/kg  $H_2O$ ) für 24h, induziert durch NaCl, sowie die dazugehörige relative Proteinexpression nach optischer Analyse des Western Blots.



**Abbildung 34 BGT1 Proteinexpression nach Hyperosmolarität**

Western Blot Analyse der Proteinexpression von BGT1 und  $\beta$ -Aktin nach hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg  $H_2O$ ), induziert durch NaCl oder Raffinose für die Zeitpunkte 4,8 und 24h.

#### 4.2.4. Einfluss des p38 MAPK und MEK1 Signalwegs auf TonEBP und die osmoprotektiven Gene

Voruntersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Inhibitoren zeigten den größten inhibitorischen Effekt bei Konzentrationen von 10 $\mu$ M für alle drei Inhibitoren. (Abbildung 35) (PD98059 und UO126 nicht gezeigt).

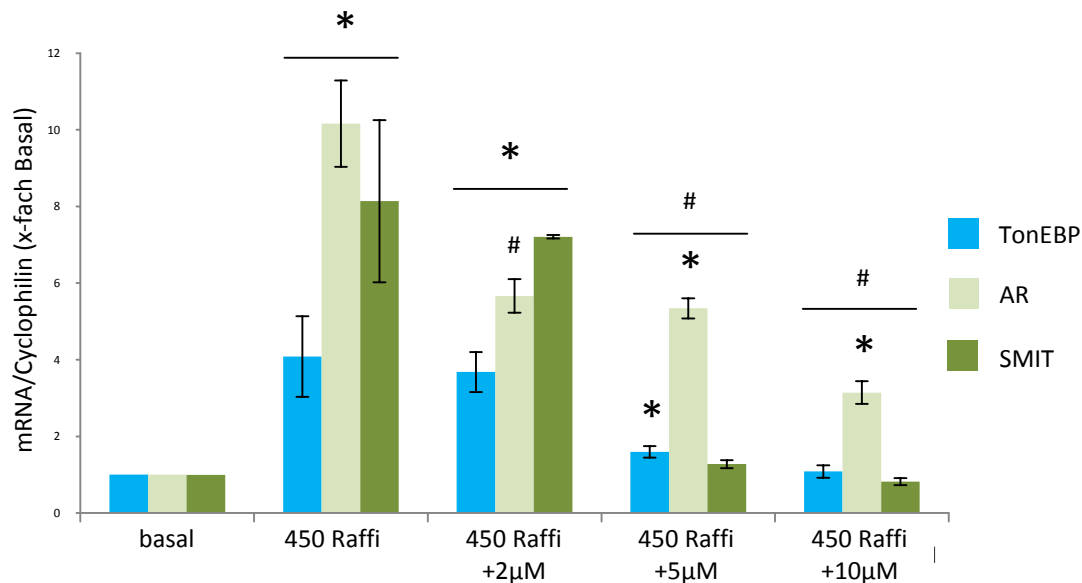
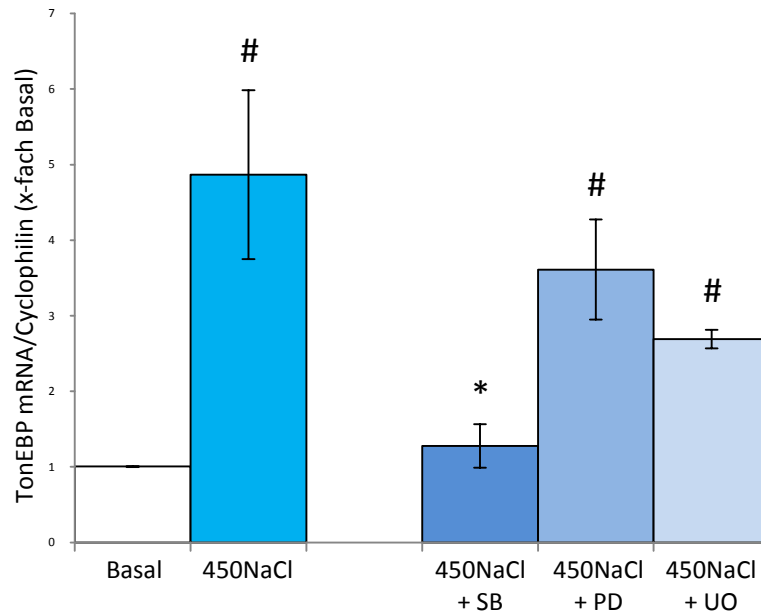


Abbildung 35 Konzentrationsabhängiger Effekt von SB203580

Konzentrationsabhängiger Einfluss von SB203580 auf die mRNA Expression von TonEBP, AR und SMIT nach 6h Inkubation in hyperosmolrem Medium, induziert durch Raffinose (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O). Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber 450 Raffinose  $p < 0,05$ .

Nach Inkubation der Zellen mit dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 (10 $\mu$ M) und gleichzeitiger NaCl induzierter hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O), wurde die zuvor unter Hyperosmolarität beobachtete Hochregulation der TonEBP mRNA vollständig inhibiert (Abbildung 36). Dies bestätigt die Abhängigkeit der TonEBP Induktion unter hyperosmolaren Bedingungen von einem funktionellen p38 MAPK Signalweg.

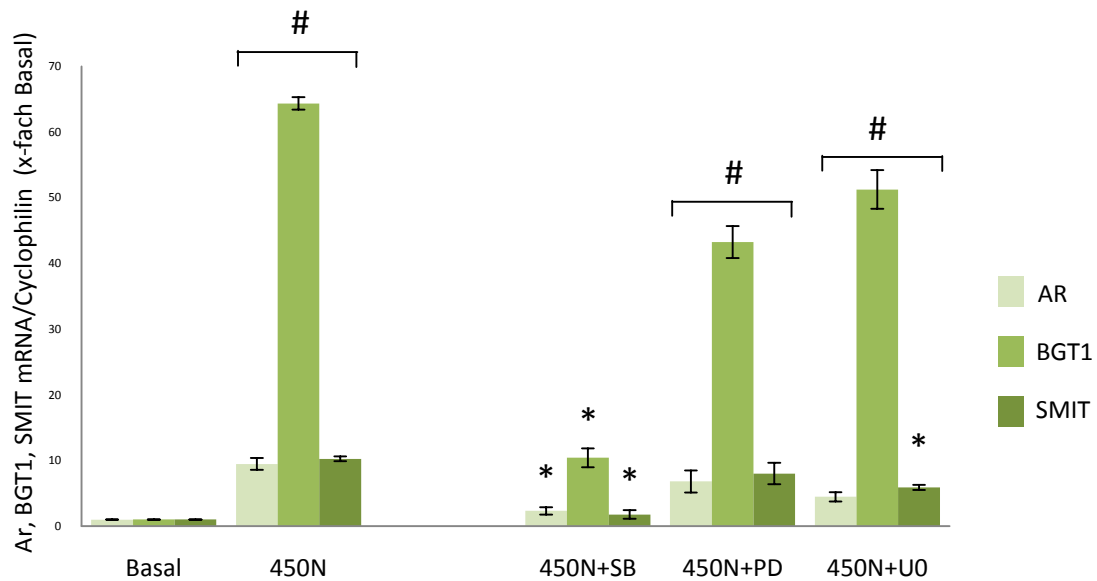


**Abbildung 36 TonEBP mRNA Expression nach Hyperosmolarität + MAPK/MEK1/2 Inhibition**

mRNA Expression von TonEBP nach Inkubation mit dem p38-MAPK- bzw. den MEK1/2 Inhibitoren und unter zusätzlicher NaCl induzierter Hyperosmolarität (450mosm/kg H<sub>2</sub>O). Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber 450NaCl  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber basal  $p < 0,05$ .

Inhibition des MEK1 Signalwegs mit PD98059 (10 $\mu$ M) und MEK1/2 mit UO126 (10 $\mu$ M) konnten, im Gegensatz zum p38 MAPK Inhibitor, die signifikante Hochregulation der TonEBP mRNA unter Hyperosmolarität nicht verhindern.

Die mRNA Expression der osmoprotektiven Gene AR, BGT1 und SMIT wurde ebenso wie die von TonEBP durch Inhibition der p38 MAPK mit SB203580 unter hyperosmolaren Bedingungen signifikant reduziert. AR wurde dabei etwa vierfach, BGT1 etwa sechsfach und SMIT etwa fünffach herab reguliert. Eine vollständige Inhibition der hyperosmolaritätsinduzierten Hochregulation, wie etwa für TonEBP, wurde nicht erreicht. Für SMIT wurde zudem eine signifikante zweifache Inhibition der Hochregulation nach Inkubation mit dem MEK1/2 Inhibitor UO126 beobachtet (Abbildung 37).

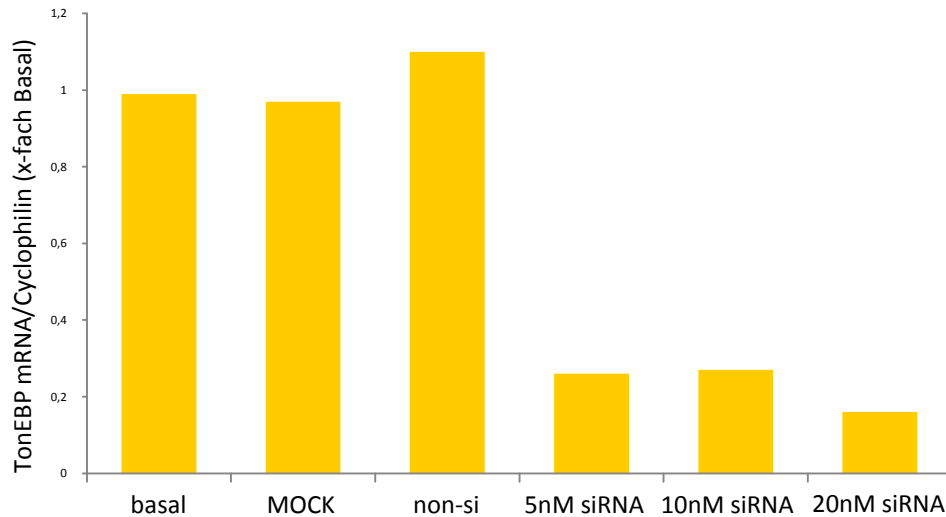


**Abbildung 37 AR, BGT1 und SMIT mRNA Expression nach Hyperosmolarität + MAPK/MEK1/2 Inhibition**

mRNA Expression von AR, BGT1 und SMIT unter Inkubation mit dem MAPK- bzw. den MEK1/2 Inhibitoren und zusätzlicher durch NaCl induzierter Hyperosmolarität (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O). Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber 450NaCl  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber basal  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5. Einsatz von TonEBP spezifischer siRNA

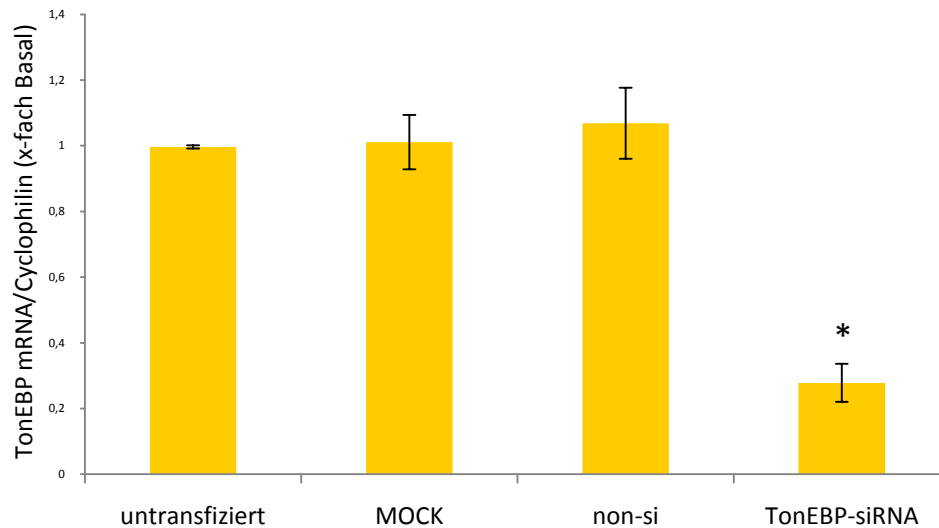
Voruntersuchungen bezüglich einer konzentrationsabhängigen Herabregulation durch die siRNA brachten keine wesentlichen Unterschiede im Konzentrationsbereich von 5 – 20nM siRNA (Abbildung 38). Für weitere Versuche wurde mit 10nM siRNA gearbeitet.



**Abbildung 38** TonEBP mRNA Expression unter verschiedenen TonEBP siRNA Konzentrationen

TonEBP mRNA Expression nach Transfektion mit 5, 10 und 20nM TonEBP spezifischer siRNA, unspezifischer siRNA und alleiniger Behandlung mit dem Transfektionsmittel (MOCK). Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert.

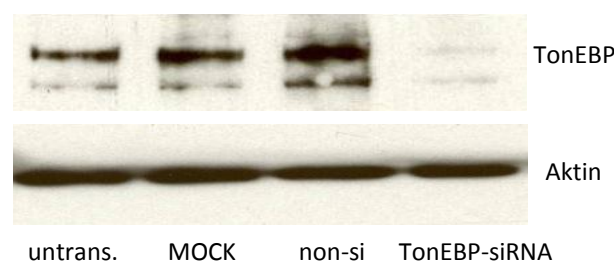
Nach Transfektion der IMCD Zellen mit TonEBP spezifischer siRNA (10nM), wurde die basale mRNA Expression von TonEBP signifikant auf etwa 27% der Expression von untransfizierten Zellen herab reguliert ( $p=7 \times 10^{-7}$ ). Bei unspezifisch transfizierten und Zellen unter MOCK Behandlung waren keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression zu erkennen (Abbildung 39).



**Abbildung 39** TonEBP mRNA Expression unter TonEBP siRNA

TonEBP mRNA Expression nach Transfektion mit TonEBP spezifischer siRNA (10nM), unspezifischer siRNA und alleiniger Behandlung mit dem Transfektionsmittel (MOCK). Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber Basal  $p < 0,05$ .

Auf Proteinebene konnte die Herabregulation von TonEBP durch die spezifische siRNA ebenfalls gezeigt werden. Zellen, die mit TonEBP spezifischer siRNA transfiziert wurden, zeigten eine deutlich reduzierte TonEBP Proteinexpression. Die Behandlung der Zellen alleinig mit Transfektionsreagenz (MOCK) oder die Transfektion mit unspezifischer siRNA, führte nicht zu einer reduzierten Proteinexpression (Abbildung 40).



**Abbildung 40** TonEBP Proteinexpression unter TonEBP siRNA

Western Blot Analyse der TonEBP und  $\beta$ -Aktin Proteinexpression nach Transfektion mit TonEBP spezifischer siRNA im Vergleich zu untransfizierten, unspezifisch transfizierten und MOCK behandelten Zellen.

#### 4.2.6. Einsatz TonEBP spezifischer siRNA unter Hyperosmolarität

Durch NaCl oder Raffinose hyperosmolar inkubierte Zellen (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) zeigten im untransfizierten, unspezifisch transfizierten und MOCK behandelten Zustand eine signifikante Hochregulation der TonEBP mRNA Expression ( $p \leq 0,01$ ) gegenüber basal kultivierten Zellen. Nach Transfektion mit der spezifischen TonEBP siRNA (10nM) war die signifikante Hochregulation der mRNA Expression durch das hyperosmolare Medium vollständig inhibiert (Abbildung 41).

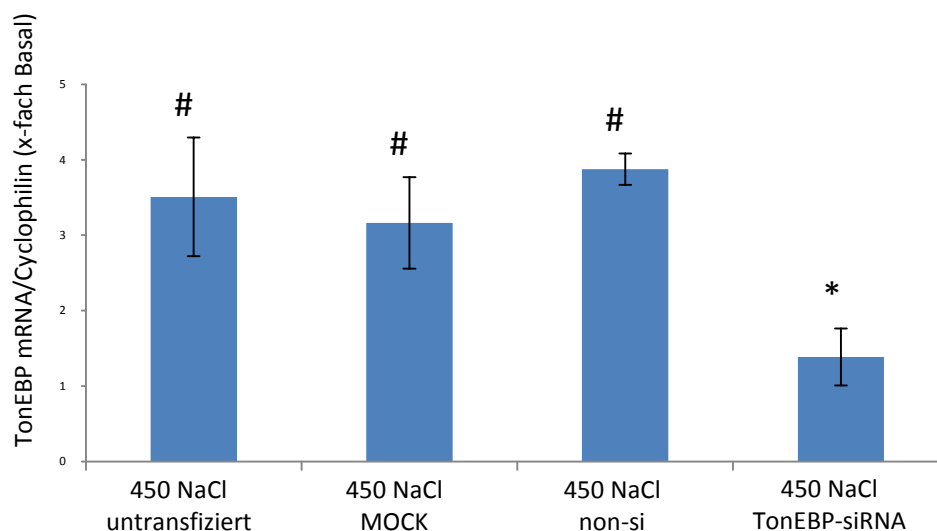


Abbildung 41 TonEBP mRNA Expression nach Hyperosmolarität + TonEBP siRNA

TonEBP mRNA Expression nach Transfektion mit TonEBP spezifischer siRNA, unspezifischer siRNA und alleiniger Transfektion mit dem Transfektionsmittel (MOCK) sowie gleichzeitiger hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber untransfiziert + NaCl  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber basal  $p < 0,05$ .

Die osmoprotektiven Gene AR, BGT1 und SMIT wurden unter basalen, isoosmolaren Bedingungen nicht durch Transfektion der Zellen mit TonEBP spezifischer siRNA beeinflusst (nicht gezeigt). Unter hyperosmolaren Bedingungen wurde die Expression der Gene gegenüber denen isoosmolar inkubierter Zellen hochreguliert. Diese Hochregulation war ebenfalls unter MOCK Behandlung, Transfektion mit unspezifischer oder TonEBP spezifischer siRNA erkennbar. Gegenüber Zellen die hyperosmolar inkubiert wurden, aber untransfiziert blieben, war für alle drei Gene jedoch eine signifikante

Herabregulation der mRNA Expression nach Präinkubation mit der TonEBP spezifischen siRNA erkennbar. Die mRNA Expression von AR wurde etwa dreifach, die von BGT1 etwa 2,5-fach und die von SMIT etwa vierfach herab reguliert (

Abbildung 42).

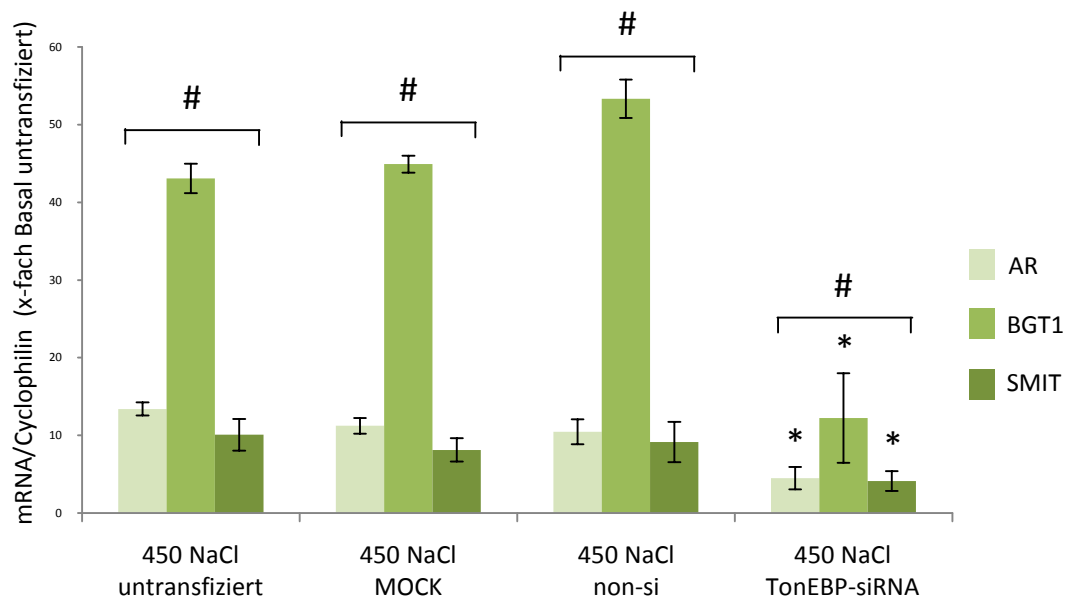
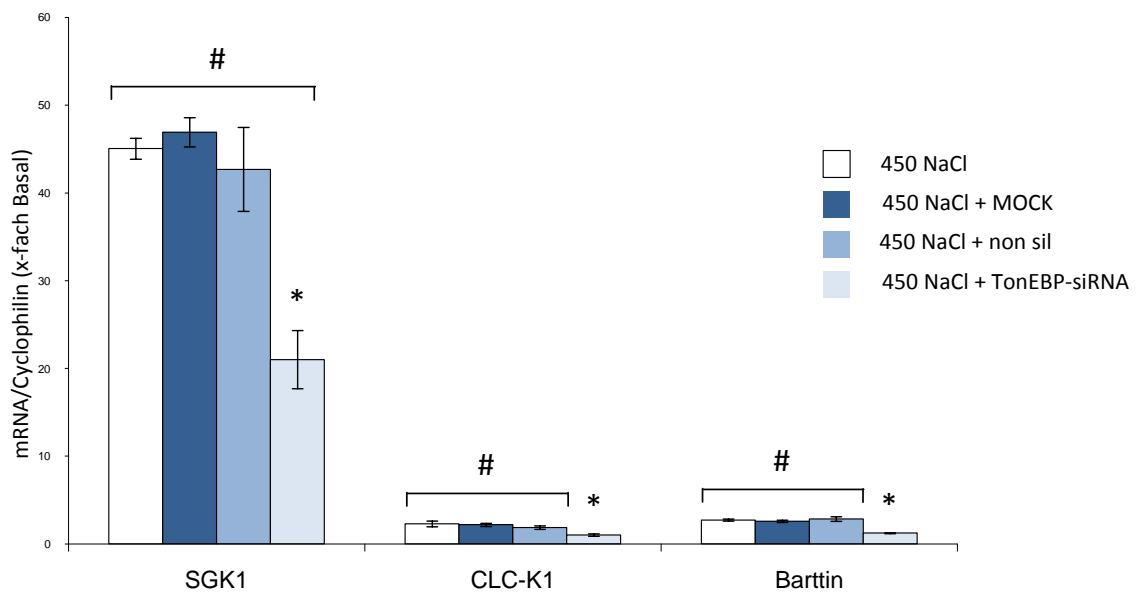


Abbildung 42 AR, BGT1 und SMIT mRNA Expression nach Hyperosmolarität + TonEBP siRNA

mRNA Expression von AR, BGT1 und SMIT nach Transfektion mit TonEBP spezifischer siRNA, unspezifischer siRNA und alleiniger Transfektion mit dem Transfektionsmittel (MOCK) sowie gleichzeitiger hyperosmolarer Stimulation (450mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber untransfiziert + NaCl  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber basal  $p < 0,05$ .

Wie bereits beschrieben, wurde die mRNA Expression von SGK1, CLC-K1 und Barttin unter hyperosmolaren Bedingungen hochreguliert. Nach Transfektion mit TonEBP spezifischer siRNA wurden diese Hochregulationen signifikant gegenüber untransfizierten Zellen reduziert. Die mRNA Expression von SGK1, CLC-K1 und Barttin wurde durch die Präinkubation mit TonEBP spezifischer siRNA jeweils etwa zweifach herab reguliert, wohingegen der Einsatz von MOCK und der unspezifischen siRNA keinen Einfluss zeigte (Abbildung 43). Die Expression der

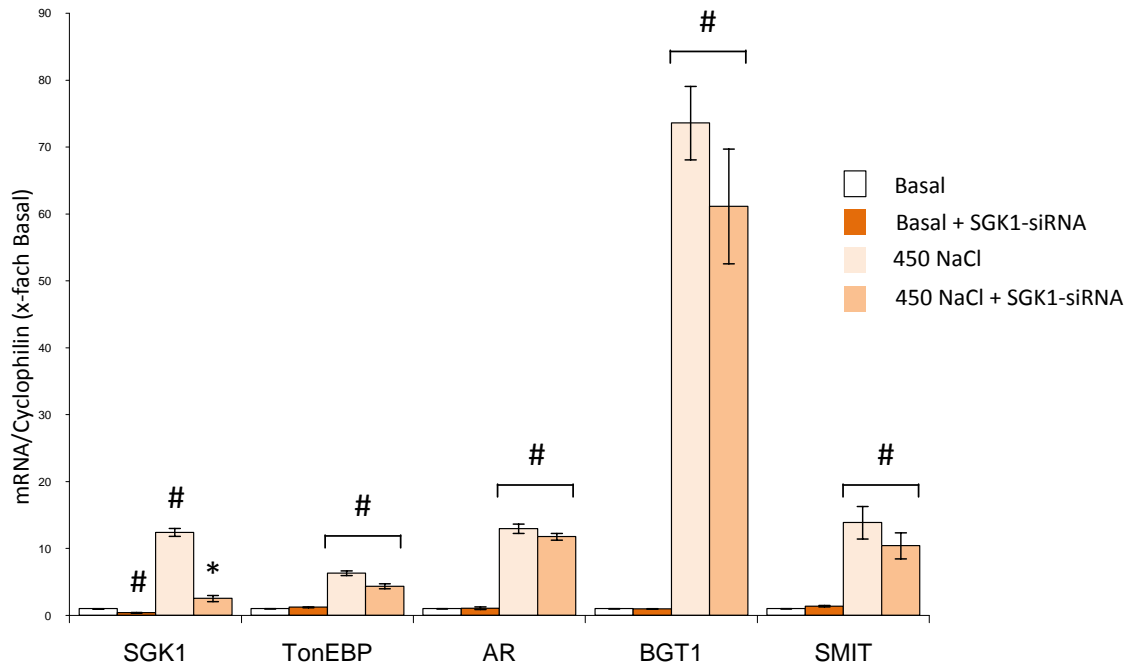
Gene in Zellen unter basalen Inkubationsbedingungen blieb dagegen nach Transfektion mit der TonEBP siRNA unverändert (nicht gezeigt).



**Abbildung 43** SGK1, CLC-K1 und Barttin mRNA Expression nach Hyperosmolarität + TonEBP siRNA

mRNA Expression von SGK1, CLC-K1 und Barttin nach Transfektion mit TonEBP spezifischer siRNA, unspezifischer siRNA und alleiniger Transfektion mit dem Transfektionsmittel (MOCK) sowie gleichzeitiger hyperosmolarer Stimulation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber untransfiziert + NaCl  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber basal  $p < 0,05$ .

Zur Klärung, ob eventuell auch eine Abhängigkeit von SGK1 gegenüber TonEBP besteht, wurden Zellen mit SGK1 spezifischen siRNA transfiziert. Die mRNA Expression von SGK1 wurde wie erwartet herab reguliert. Die mRNA Expression von TonEBP und den osmoprotektiven Genen AR, BGT1 und SMIT wurde sowohl in Zellen unter basaler Inkubation, als auch unter hyperosmolarer Inkubation durch die Transfektion mit SGK1 spezifischer siRNA nicht beeinflusst (Abbildung 44).

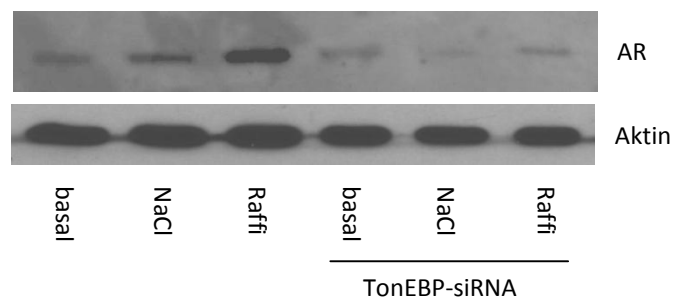


**Abbildung 44** SGK1, TonEBP, AR, BGT1 und SMIT mRNA Expression nach Hyperosmolarität + SGK1 siRNA

mRNA Expression von SGK1, TonEBP, AR, BGT1 und SMIT nach Transfektion mit SGK1 spezifischer siRNA, mit und ohne gleichzeitiger hyperosmolarer Stimulation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O) induziert durch NaCl bzw. alleiniger Inkubation in hyperosmolarem Medium. Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber untransfiziert mit NaCl  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber basal  $p < 0,05$ .

#### 4.2.7. Proteinexpression nach Einsatz TonEBP spezifischer siRNA

Nach Präinkubation der Zellen mit der TonEBP spezifischen siRNA und anschließender Inkubation in hyperosmolarem Medium (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl oder Raffinose), wurde die Proteinexpression von AR und BGT1 (nicht gezeigt) deutlich gegenüber der untransfizierter Zellen herab reguliert (Abbildung 45).



**Abbildung 45** AR Proteinexpression nach Hyperosmolarität + TonEBP siRNA

Western Blot Analyse der Proteinexpression von AR und  $\beta$ -Aktin nach 24h Präinkubation mit TonEBP spezifischer siRNA und anschließender hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O), induziert durch NaCl oder Raffinose für 8h.

#### 4.2.8. MTT Assay

Eine Überprüfung der Zellvitalität mittels MTT-Assay zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Zellvitalität der unterschiedlichen Gruppen (Daten nicht gezeigt).

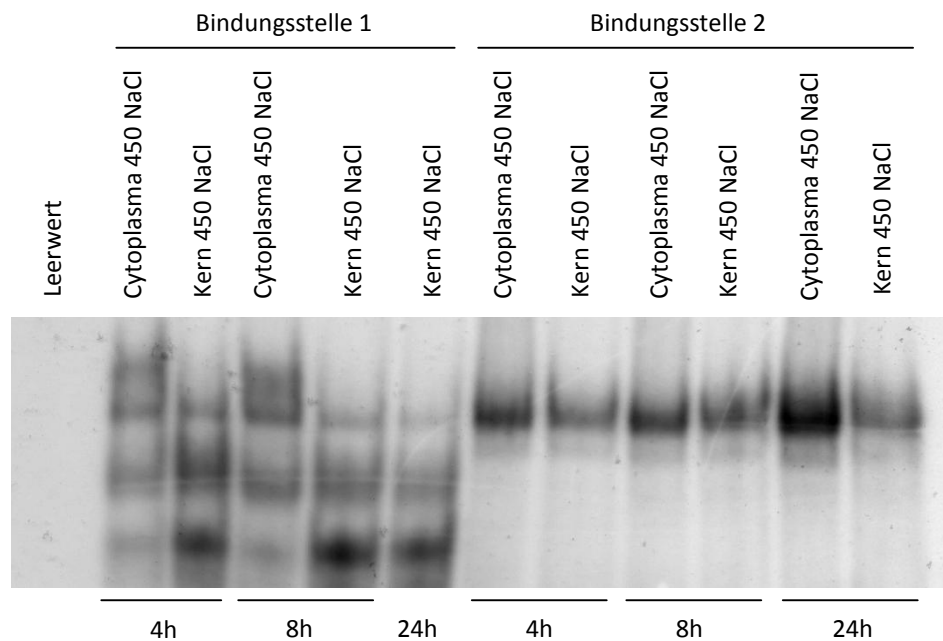
### 4.3. Genomatrix Analyse zur Promotoruntersuchung

Die Suche nach TonEBP Bindungsstellen im Promotorbereich von 5000 Basenpaaren vor dem Transkriptionsstart von Barttin (NM\_080458) brachte keine potentiellen Bindungsstellen hervor, was ein Binden von TonEBP am Barttin Promotor relativ unwahrscheinlich macht. Die Analyse von 5000 Basenpaaren vor dem Transkriptionsstart von CLC-K1(Clcnka / NM\_024412) wies zwei potentielle Bindungsstellen für TonEBP nach. Eine davon ist auf dem Minusstrang an Position 1943-1960 5' des Transkriptionsstarts gelegen. Die zweite theoretische Bindungsstelle liegt auf dem Plusstrang an Position 2354-2372 5' des Transkriptionsstarts. Zur Überprüfung der theoretischen Bindungsstellen wurde ein EMSA durchgeführt.

#### 4.3.1. EMSA

Im EMSA war bei Verwendung der Oligos beider Bindungsstellen ein Bandenmuster auf dem Röntgenfilm erkennbar. Das Bandenmuster für die Bindungsstelle 1 war im Gegensatz zu dem der Bindungsstelle 2 aufgrund mehrerer teils weit entfernter Banden innerhalb einer Spur unspezifischer und

somit nicht einfach zu interpretieren, weshalb im Weiteren mit den Oligos für Bindungsstelle 2 gearbeitet wurde. Besonders in den Spuren für Bindungsstelle 2 war über den Zeitverlauf von 4 - 24h hyperosmolarer Inkubation (450 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl) ein deutlicher Anstieg der Intensität der Banden erkennbar (Abbildung 46).



**Abbildung 46** EMSA mit Oligos der beiden TonEBP Bindungsstellen

EMSA von Proteinlysaten aus Cytoplasma und Kern nach 4, 8 und 24h Inkubation in basalem Medium und in Medium mit 450 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl. Oligos beider TonEBP Bindungsstellen wurden verwendet.

Im EMSA mit Oligos der Bindungsstelle 2 war auch ein spezifisches Bandenmuster erkennbar. Sowohl bei den Lysaten aus unstimulierten Zellen, wie auch bei denen aus hyperosmolar (450/600/900 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl oder Raffinose (nicht gezeigt)) stimulierten Zellen, waren sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Fraktion Banden erkennbar. Die Banden traten als Doppelbanden auf. In der Spur der kalten Verdrängung war wie gewünscht nur eine sehr schwache Bande erkennbar. In der Spur des Supershifts mit dem NFAT5 Antikörper war eine starke etwas höher gelegene Bande sichtbar. In den Spuren der Lysate mit besonders hoher hyperosmolarer Stimulation (600 und 900 mosm/kg H<sub>2</sub>O) waren die Banden etwas höher gelegen als in den unstimulierten und den mit 450mosm/kg H<sub>2</sub>O stimulierten Lysaten (Abbildung 47).

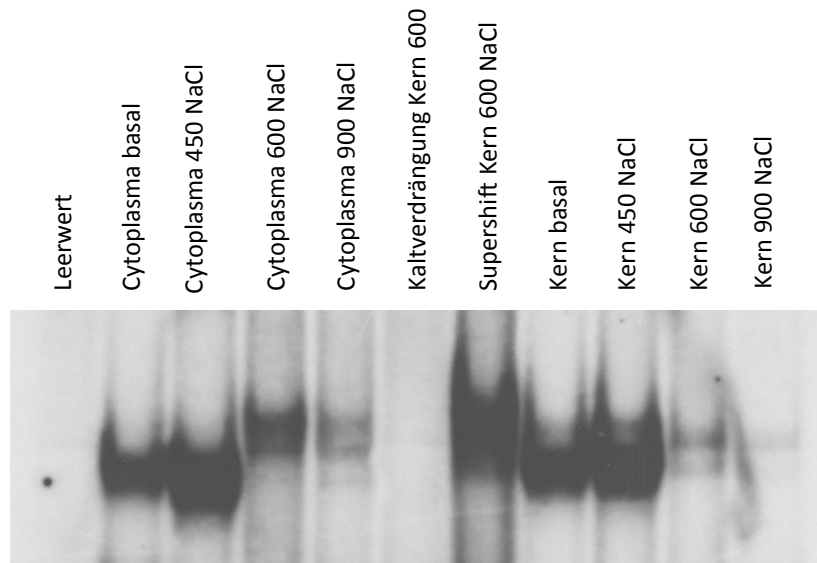


Abbildung 47 EMSA mit TonEBP Bindungsstelle 2

EMSA von Proteinlysaten aus Cytoplasma und Kern nach 8h Inkubation in basalem Medium und in Medium mit 450/ 600/ 900 mosm/kg H<sub>2</sub>O NaCl. Oligos entsprechen TonEBP Bindungsstelle 2. Supershift mit NFAT5 Antikörper.

#### 4.4. In vivo Experiment – Dehydrationsversuch

Die Ergebnisse zeigen, dass der Hydrierungsstatus männlicher C57BL6 Mäuse Einfluss auf CLC-K1, Barttin, SGK1, TonEBP und die osmolaritätsabhängigen Gene AR, BGT1 und SMIT hat. Während der 36stündigen Versuchsdauer nahmen die Mäuse aus der hydrierten Kontrollgruppe im Mittel etwa 3% Körpergewicht zu. Die dehydrierten Tiere aus der Gruppe unter Wasserentzug, nahmen innerhalb der 36h im Schnitt 15% Körpergewicht ab. Der Gehalt an Natrium, Chlorid und Harnstoff im Serum war nach Versuchsende bei den dehydrierten Tieren gegenüber den hydrierten Tieren signifikant erhöht.

	hydriert (n = 10)	dehydriert (n = 10)	p-Wert
<b>Körpergewicht (g)</b>	+ 3.16 ± 0.26	- 0.65 ± 0.20	1.8x10 <sup>-9</sup>
<b>Nierengewicht (g)</b>	0.292 ± 0.004	0.262 ± 0.004	0.0001
<b>Serum Natrium (mmol/l)</b>	149 ± 0.75	167.4 ± 1.66	1.8x10 <sup>-5</sup>
<b>Serum Chlorid (mmol/l)</b>	105.8 ± 0.91	126.6 ± 1.43	4.3x10 <sup>-6</sup>
<b>Serum Harnstoff (mg/dl)</b>	45.8 ± 2.79	67.25 ± 4.65	0.01
<b>Serum Osmolarität (mmol/kg)</b>	331.4 ± 0.92	409.75 ± 4.89	2.5x10 <sup>-6</sup>
<b>Urin Osmolarität (mmol/kg)</b>	1357 ± 189	2857 ± 536	0.002

#### 4.4.1. mRNA Expressionsanalysen nach Dehydratation

Die mRNA Expression von TonEBP ( $p=0,03$ ), AR ( $p=0,02$ ), BGT1 ( $p=0,004$ ) und SMIT ( $p=0,009$ ) war bei den dehydrierten Tieren in der inneren Medulla signifikant gegenüber der Expression der hydrierten Tiere erhöht. Die TonEBP mRNA Expression war etwa zweifach, die von AR etwa 1,5-fach, die von BGT1 etwa 3,7-fach und die von SMIT etwa vierfach erhöht. Im Cortex waren keine signifikanten Veränderungen der mRNA Expressionen der osmoprotektiven Gene erkennbar (Abbildung 48). Die mRNA Expression von SGK1, CLC-K1 und Barttin war parallel zur Expression der TonEBP mRNA hochreguliert. Für SGK1 war in den dehydrierten Tieren neben einer 3,4-fachen Hochregulation in der inneren Medulla auch im Cortex eine 2,4-fache Erhöhung erkennbar. Die CLC-K1 und Barttin mRNA war unter Dehydration jeweils 1,5-fach erhöht (Abbildung 49).

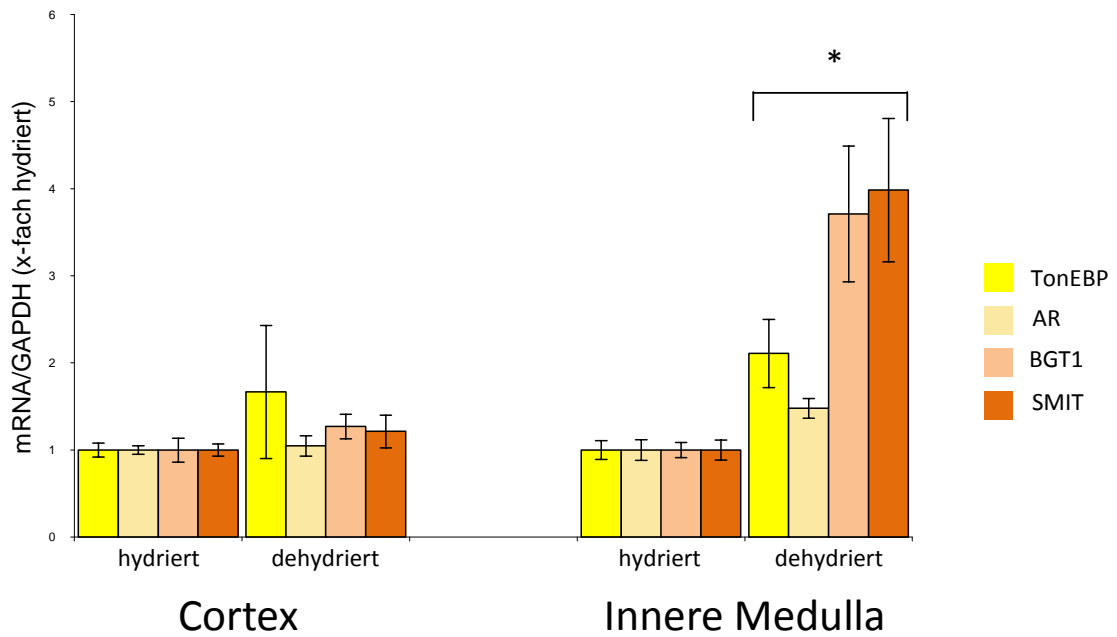


Abbildung 48 TonEBP, AR, BGT1 und SMIT mRNA Expression in dehydrierten Nieren

Kortikale und innermedulläre mRNA Expression von TonEBP, AR, BGT1 und SMIT von für 36h dehydrierten Mäusen im Vergleich mit Tieren ohne Wasserentzug. Die mRNA Level wurden auf GAPDH normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber hydriert  $p < 0,05$ .

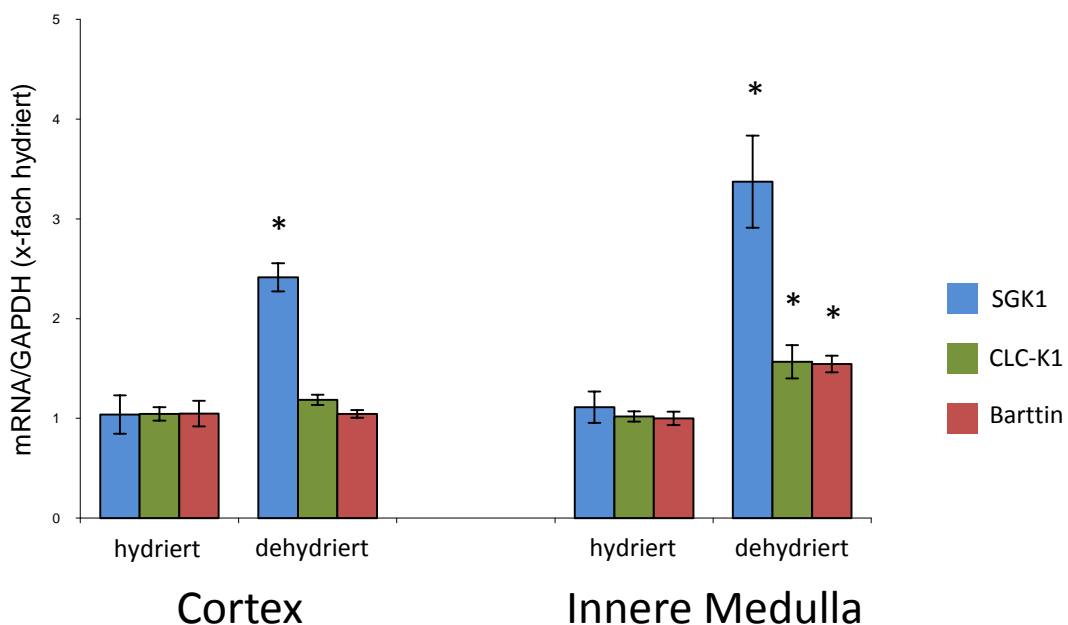
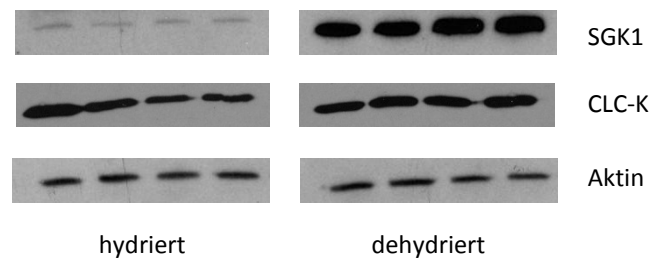


Abbildung 49 SGK1, CLC-K1 und Barttin mRNA Expression in dehydrierten und hydrierten Nieren

Kortikale und innermedulläre mRNA Expression von SGK1, CLC-K1 und Barttin von für 36h dehydrierten Mäusen im Vergleich mit Tieren ohne Wasserentzug. Die mRNA Level wurden auf GAPDH normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber hydriert  $p < 0,05$ .

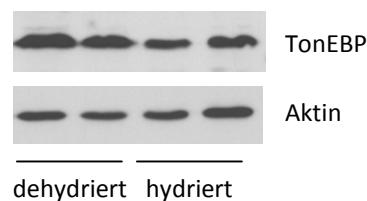
#### 4.4.2. Proteinexpression nach Dehydratation

Western Blot Analysen aus Gesamtnieren-Homogenaten bestätigten die auf mRNA Ebene beobachtete Hochregulation von TonEBP, SGK1 und CLC-K nach Wasserentzug. In den Nieren der dehydrierten Tiere ist die Proteinexpression von TonEBP, SGK1 und CLC-K deutlich stärker als in den Nieren der hydrierten Tiere (Abbildung 50 und Abbildung 51).



**Abbildung 50** SGK1 und CLC-K1 Proteinexpression in dehydrierten und hydrierten Nieren

Western Blot Analyse von SGK1, CLC-K und  $\beta$ -Aktin aus Gesamtnierenhomogenaten von Mäusen nach 36h Wasserentzug im Vergleich zu Tieren ohne Wasserentzug.

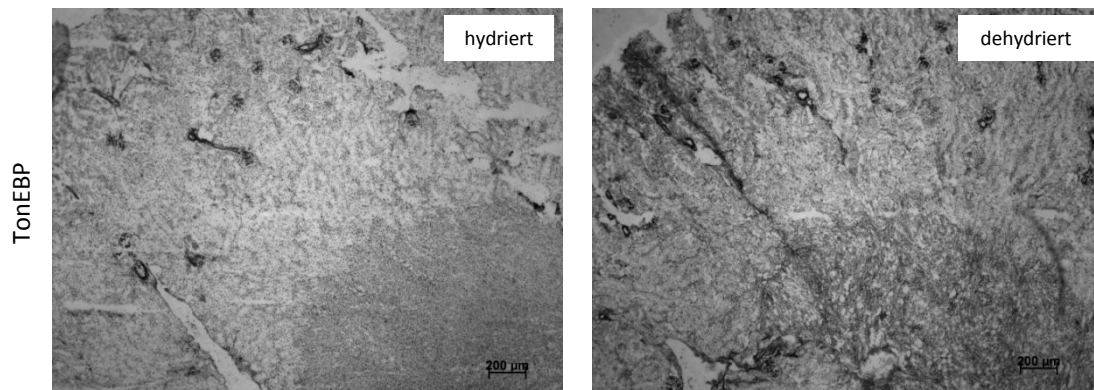


**Abbildung 51** TonEBP Proteinexpression in dehydrierten und hydrierten Nieren

Western Blot Analyse von TonEBP und  $\beta$ -Aktin aus Gesamtnierenhomogenaten von Mäusen nach 36h Wasserentzug im Vergleich zu Tieren ohne Wasserentzug.

#### 4.4.3. Färbung von Nierenschnitten nach Dehydratation

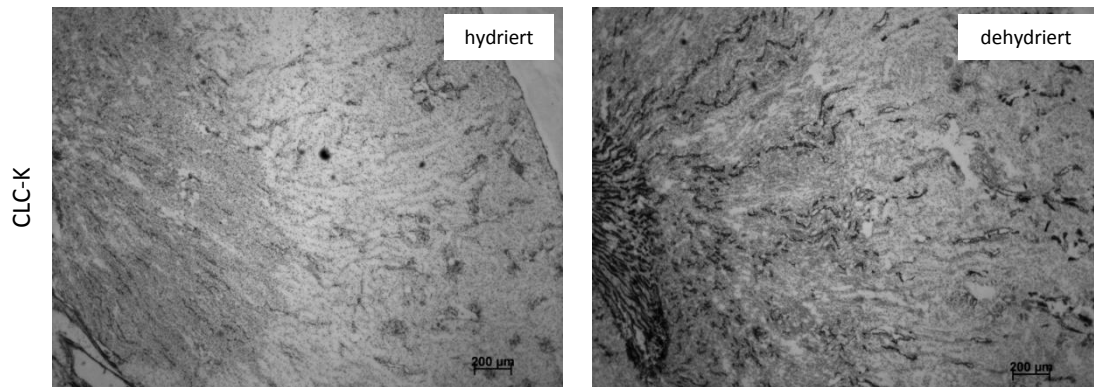
Auch in der Immunhistochemie aus Nierenschnitten von hydrierten und dehydrierten Tieren konnte eine erhöhte Expression von TonEBP nach Dehydratation dargestellt werden. In der inneren Medulla war gegenüber dem Cortex eine stärkere Hochregulation von TonEBP zu erkennen (Abbildung 52).



**Abbildung 52** TonEBP Verteilung in hydrierten und dehydrierten Nieren

Kryoschnitte von Mäusenieren nach 36h Wasserentzug im Vergleich zu Tieren ohne Wasserentzug.

Auch für CLC-K ist in der Immunhistochemie ein deutlicher Anstieg innerhalb der Niere der dehydrierten Tiere gegenüber der Niere der hydrierten Tiere erkennbar. Ebenso wie für TonEBP ist auch für CLC-K in der inneren Medulla eine stärkere Expression als im Cortex zu erkennen (Abbildung 53).



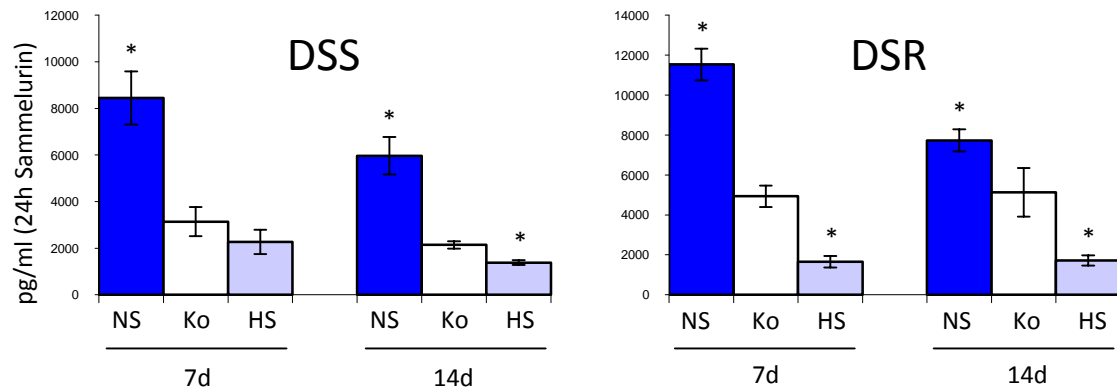
**Abbildung 53** CLC-K1 Verteilung in hydrierten und dehydrierten Nieren

Kryoschnitte von Mäusenieren nach 36h Wasserentzug im Vergleich zu Tieren ohne Wasserentzug.

#### **4.5. Aldosteron RIA aus Rattenurinen nach Hoch- bzw. Nidrigsalzdiät**

Bei den Dahl salzsensitiven Ratten (DSS), wie auch bei den Dahl salzresistenten Ratten (DSR), waren die Effekte nach Hoch- (HS) bzw. Nidrigsalzdiät (NS) vergleichbar. Nach Nidrigsalzdiät über sieben bzw. 14 Tage, waren die

Aldosteronkonzentrationen aus dem 24h Urin signifikant gegenüber den Kontrollwerten hochreguliert. Die Aldosteronkonzentrationen der 24h Urine der Ratten unter Hochsalzdiät waren dagegen signifikant gegenüber den Kontrollen herab reguliert (Abbildung 54).

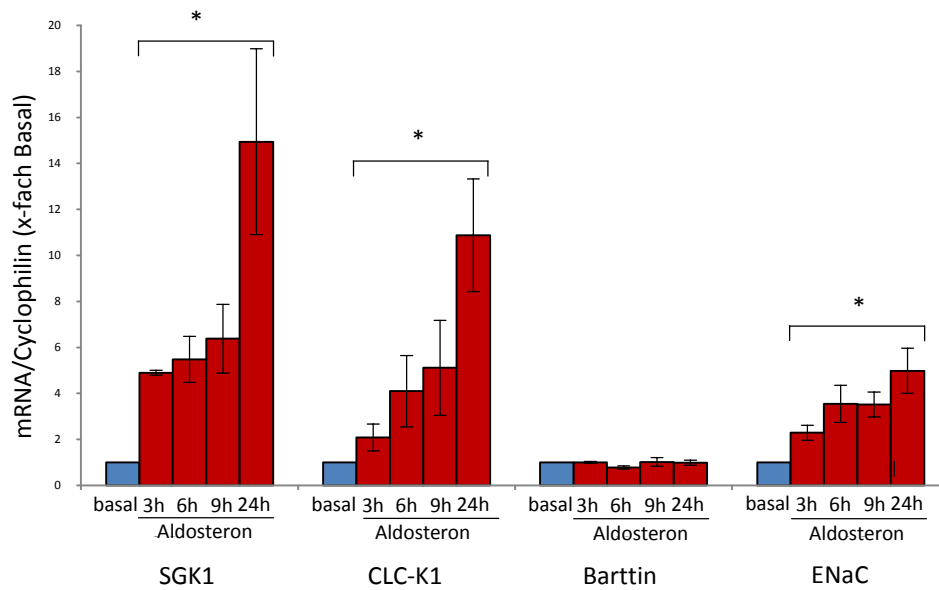


**Abbildung 54** Aldosteron RIA aus Rattenurin von Tieren nach Hoch- und Nidrigsalzfütterung

Aldosteronkonzentrationen im Urin nach 7 bzw. 14 Tagen Hoch- (HS) bzw. Nidrigsalzdiät (NS) von Dahl salzsensitiven (DSS) und salzresistenten (DSR) Ratten. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber Kontrolle  $p < 0,05$ .

#### 4.6. Aldosteronstimulation auf mpkCCD Zellen

Unter Inkubation der mpkCCD Zellen mit  $10\mu\text{M}$  Aldosteron im Kulturmedium waren signifikante, parallele Hochregulationen der mRNA Expression von SGK1, CLC-K1 und ENaC erkennbar. Für Barttin war keine Regulation ersichtlich. Die Maxima in den Hochregulationen waren bei den drei Genen jeweils nach 24h mit einer etwa 15-fachen Hochregulation von SGK1, 10-fachen Hochregulation von CLC-K1 und einer etwa fünffachen Hochregulation von ENaC zu verzeichnen (Abbildung 55).



**Abbildung 55** SGK1, CLC-K1, Barttin und ENaC mRNA Expression nach Aldosteroninkubation

mRNA Expression von SGK1, CLC-K1, Barttin und ENaC nach 3-36h Inkubation mit Aldosteron (10 $\mu$ M). Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ .

Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Aldosteronantagonisten Spironolacton bewirkte eine signifikante, etwa zweifache Verringerung der durch Aldosteron bewirkten Hochregulationen in der mRNA Expression nach 24h. Die durch Aldosteron bedingte Hochregulation von SGK1 und CLC-K1 blieb jedoch trotz der additiven Gabe von Spironolacton signifikant gegenüber der Expression unter Basalbedingungen bestehen (Abbildung 56).

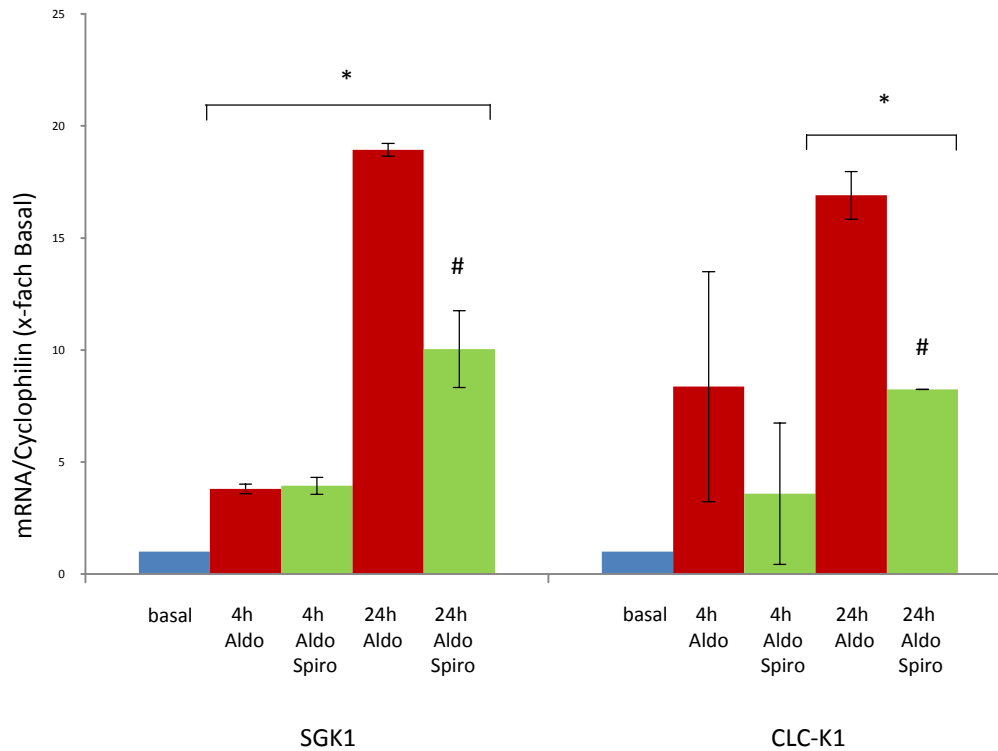


Abbildung 56 SGK1 und CLC-K1 mRNA Expression nach Aldosteroninkubation + Spironolacton

mRNA Expression von SGK1 und CLC-K1 nach 4 und 24h Inkubation mit Aldosteron (10 $\mu$ M) bzw. Aldosteron und Spironolacton (je 10 $\mu$ M). Die mRNA Level wurden auf Cyclophilin B normalisiert. Werte  $\pm$  SE. Signifikanz (\*) gegenüber basal  $p < 0,05$ . # = signifikant gegenüber Aldosteronstimulation  $p < 0,05$ .

## **5. Diskussion**

### **5.1. Regulation von CLC-K1 und Barttin unter Hyperosmolarität**

CLC-K1 und Barttin werden durch Hyperosmolarität im distalen konvoluten Tubulus (DCT), im medullären dicken aufsteigenden Ast (mTAL) und im innermedullären Sammelrohr (IMCD) signifikant hochreguliert. Die Expression von CLC-K1 und Barttin im DCT, wie IMCD wird durch frühere Arbeiten, mit Beteiligung unserer Arbeitsgruppe, an Mikrodissektionen bestätigt [178]. Diese Hochregulation ist nicht nur NaCl abhängig sondern wird durch extrazelluläre Hyperosmolarität per se bewirkt, da die mRNA Induktionen auch durch Mannitol und Raffinose ausgelöst werden kann. Durch membrangängigen Harnstoff induzierte Hyperosmolarität zeigte dagegen keinen regulatorischen Effekt, da es durch ihn nicht zum Aufbau einer hohen intrazellulären Ionenstärke oder zu Wasserefflux kommt. Sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene kann die Hochregulation beobachtet werden, wobei auf Proteinebene eine Verzögerung im Auftreten der Maxima erkennbar ist. Diese beobachtete Verzögerung lässt darauf schließen, dass es durch Hyperosmolarität zu einer Neusynthese von CLC-K1 und Barttin kommt.

### **5.2. Regulation von CLC-K1 und Barttin durch SGK1 unter hyperosmolaren Bedingungen**

Für SGK1 wurde in den Versuchen dieser Arbeit parallel zu CLC-K1 eine Hochregulation der mRNA- und Proteinexpression nach hyperosmolarer Inkubation beobachtet. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit anderen Studien, die auf Proteinebene nach NaCl induzierter Hyperosmolarität (475 mosm/kg H<sub>2</sub>O) eine vierfache Hochregulation von SGK1 in Zellen des innermedullären Sammelrohrs von Ratten feststellen konnten [28]. Wie bei CLC-K1 zeigte sich auch für SGK1 eine zeitliche Verzögerung der Maxima in der Hochregulation der Proteinkonzentration gegenüber der mRNA Expression. Dies spricht ebenfalls für eine Neusynthese nach Stimulation. Durch eine andere Studie, welche die osmolaritätsabhängige Hochregulation von SGK1 ebenfalls auf die gesteigerte Transkription des SGK1 Gens zurückführt, wird dies bestätigt [9].

Die parallele Hochregulation von CLC-K1, Barttin und SGK1 lässt auf einen möglichen regulatorischen Effekt von SGK1 auf die Transkription von CLC-K1 schließen, welcher durch SGK1 spezifisches Gene-Silencing untersucht wurde. Der Einsatz SGK1 spezifischer siRNA unter basalen Inkubationsbedingungen bewirkte eine signifikante Herabregulation der SGK1 mRNA- und Proteinexpression. CLC-K1 und Barttin hingegen wurden unter basalen Inkubationsbedingungen durch den Einsatz der SGK1 spezifischen siRNA nicht beeinflusst, was die Spezifität der verwendeten siRNA unterstreicht. Zellen, die mit SGK1 spezifischer siRNA vorbehandelt wurden, zeigten unter hyperosmolaren Inkubationsbedingungen keine signifikante Hochregulation der SGK1 mRNA mehr. Auch signifikante Hochregulationen der mRNA von CLC-K1 und Barttin waren signifikant reduziert. Diese Ergebnisse zeigen erstmalig eine funktionelle Abhängigkeit der CLC-K1 und Barttin Transkription von SGK1 unter hyperosmolaren Bedingungen. Somit konnte gezeigt werden, dass SGK1 nicht nur, wie bisher bekannt, wichtig für die Regulation des epithelialen Natriumkanals ENaC [17;29;174] und des außermedullären Kaliumkanals ROMK [131;194] ist, sondern auch entscheidend für die Regulation des nierenspezifischen Chloridkanals CLC-K1 und seiner Untereinheit Barttin. Natriumionen, Kaliumionen und Chlorid sind von entscheidender Bedeutung für die Osmolarität der Zellen und für deren Volumenhomöostase. Mit seinem Potential als Partnerion für Natrium- oder Kaliumionen zu wirken, spielt Chlorid eine wichtige Rolle um Schwankungen in der intrazellulären Ionenkonzentration elektroneutral auszugleichen. Mit SGK1 als Gen, welches durch Veränderungen des Zellvolumens reguliert und insbesondere induziert wird, wenn die Zelle schrumpft [176] und den hier beschriebenen Regulationen von CLC-K1 und Barttin, kann eine neue mechanistische Verknüpfung zwischen Veränderungen des intrazellulären Volumens, detektiert durch SGK1, und der Expression von CLC-K1 und Barttin gebildet werden. Bisher ist noch nicht bekannt, ob SGK1 seinen hyperosmolaritätsinduzierten Effekt auf CLC-K1 und Barttin gleichermaßen ausübt, oder ob von einem der beiden Partner der Effekt auf den anderen weitergeleitet wird. Da die Induktion der Barttin mRNA und des Proteins zeitlich vor der von CLC-K1 stattfindet, könnte der Effekt von Barttin auf CLC-K1 übertragen werden. Dafür könnte SGK1 mit dem PY-Motiv an der zytoplasmatischen C-terminalen Seite von Barttin [46] interagieren, was im

Weiteren über einen noch unbekanntem Mechanismus die CLC-K1 Expression induzieren könnte. Da in der Niere aufgrund der Konzentrierung des Urins, besonders in der inneren Medulla, enorme Schwankungen in der Osmolarität auftreten, wurden alle in DCT Zellen gewonnenen Ergebnisse in Zellen des innermedullären Sammelrohrs (IMCD) wiederholt und verifiziert. Zudem wurden die in vitro Daten mittels eines in vivo Versuchs auf ihre physiologische Relevanz untersucht. Die Mäuse aus dem Dehydratationsversuch mit 36h Wasserentzug zeigten signifikante Anstiege in ihrer Serumosmolarität. Zudem war eine signifikante Hochregulation der CLC-K1 und Barttin mRNA in der inneren Medulla der Mausnieren messbar. Diese Hochregulation verlief parallel zur signifikanten Hochregulation von SGK1. Somit kann man aus den Daten des Dehydratationsversuchs und der in vitro Versuche sagen, dass gesteigerte Osmolarität und die daraus resultierende Schrumpfung der Zellen, sei es durch Wasserentzug oder Erhöhung der Osmolarität des Kulturmediums, ein klares Signal zur Induktion von SGK1, CLC-K1 und Barttin ist.

Zur Untersuchung, inwieweit erhöhte Osmolarität SGK1 und über diese CLC-K1 und Barttin induziert, wurden verschiedene Kinase Signalwege betrachtet. Andere Studien zeigten bereits, dass Kinase Signalwege an der Gentranskription nach hyperosmolarer Inkubation beteiligt sind [124]. Bekanntermaßen führt hohe Osmolarität zu einem Anstieg der intrazellulären Ionenstärke und in Folge zu Brüchen des DNA Doppelstrangs [94]. Um dies zu verhindern werden verschiedene Schutzmechanismen, unter anderem auch Kinase Signalwege, initiiert [43]. Wurde der p38 MAPK Signalweg in vitro inhibiert, so wurde die durch NaCl oder Mannitol induzierte Hochregulation von SGK1 signifikant reduziert, was die Befunde anderer Arbeiten bestätigt [28]. Ebenso wie SGK1 wurde auch die osmolaritätsgetriebene Hochregulation von CLC-K1 und Barttin durch Inhibition des p38 MAPK Signalwegs verhindert. Die Inhibition anderer Kinase Signalwege, wie des MEK1 Signalwegs, hatte keinen Effekt auf die Induktion der SGK1 durch Hyperosmolarität, wohl aber auf CLC-K1 und Barttin. Somit werden für die Induktion von CLC-K1 und Barttin durch Hyperosmolarität im Gegensatz zu SGK1 verschiedene Kinase Signalwege benötigt um im Falle plötzlicher Zellvolumenänderungen die Aktivität beider Gene garantieren zu können. Zellschrumpfung nach NaCl induzierter Hyperosmolarität verläuft proportional zur Stärke der Osmolarität und ist ein guter Sensor für die Tonizität [32]. Da bisher

keine membranassoziierten Sensoren für Tonizität in Säugerzellen bekannt sind, müssen andere Faktoren bei der Handhabung vorhandener Hyperosmolarität eine Rolle spielen. Neben der bereits gefundenen Rolle der p38 MAPK Signalkaskade mit Einfluss auf SGK1, könnte eine Regulation der Transkription ebenfalls eine Rolle spielen. NaCl aktiviert bekanntermaßen die Transkription tonizitätsabhängiger Gene, welche für Proteine zur Aufnahme und Synthese von organischen Osmolyten kodieren [31;32]. Die Akkumulierung organischer Osmolyte zur Wiedererlangung des physiologischen Zellvolumens benötigt Stunden bis Tage und ist somit nicht zur schnellen Reaktion auf plötzlichen Wasserefflux geeignet. Inorganische Osmolyte wie Chlorid hingegen, können durch schnellen Influx innerhalb von Minuten agieren. Ob die nach hyperosmolarer Inkubation beobachtete Hochregulation von CLC-K1 und Barttin nur durch ein verändertes Zellvolumen verursacht ist, ist bislang unerforscht. Die gesteigerte Anwesenheit von NaCl könnte ebenfalls zu den beobachteten Hochregulationen von SGK1 und hierrüber zu einer Induktion von CLC-K1 und Barttin führen. Da durch Mannitol oder Raffinose induzierte Hyperosmolarität ebenfalls eine Hochregulation von CLC-K1 und Barttin auftritt, wird die Vermutung allerdings nicht durch unsere Daten gestützt. Da Mannitol und Raffinose die Zellmembran nicht wie Na<sup>+</sup> oder Cl<sup>-</sup> relativ einfach passieren können, der beobachtete Effekt bezüglich der Hochregulationen aber vergleichbar ist, kann vermutet werden, dass der intrazelluläre Gehalt von Mannitol oder Raffinose für den beobachteten Effekt nicht von großer Relevanz sein kann. Zusammenfassend kann man auf Grund der gesammelten Daten sagen, dass die SGK1 abhängige Regulation der CLC-K1 und Barttin Expression nach hyperosmolarer Inkubation hauptsächlich durch das Schrumpfen der Zellen und dadurch bedingte Veränderungen in der Zellstruktur bewirkt wird und zumindest nicht vorrangig durch in der Zelle befindliche gelöste Stoffe. Das genspezifische Silencing von SGK1 durch Einsatz der SGK1-siRNA bewies, dass die unter hyperosmolaren Inkubationsbedingungen beobachtete Hochregulation von CLC-K1 und Barttin in Abhängigkeit von SGK1 reguliert wird. Die Inhibition des p38 MAPK Signalwegs zeigte, dass SGK1 wie auch CLC-K1 und Barttin für die osmolaritätsgetriebene Geninduktion von einem funktionell aktiven MAPK Signalweg abhängig sind. Die Übereinstimmungen zwischen den in vitro und den in vivo Daten bestätigt die physiologische Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse. Somit wurde erstmalig gezeigt, dass Veränderungen

im intrazellulären Volumen, die durch Hyperosmolarität ausgelöst werden, zu Hochregulation von SGK1 mit daraus resultierendem Anstieg der CLC-K1 und Barttin Expression führen [11].

### **5.3. Regulation von CLC-K1 und Barttin durch TonEBP unter hyperosmolaren Bedingungen**

TonEBP wird ebenfalls durch Hyperosmolarität auf mRNA und Proteinebene hochreguliert. Auch hier ist es die Hyperosmolarität an sich, welche die Hochregulation bewirkt, da die Regulation nicht nur durch NaCl, sondern auch durch Mannitol und Raffinose bewirkt wird. Harnstoff zeigt auch bei der TonEBP mRNA Regulation aufgrund seiner Membrangängigkeit keinen induzierenden Effekt. Der beobachtete induzierende Effekt von NaCl auf TonEBP ist in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten, die einen 2,3-fachen Anstieg der mRNA Expression und einen dreifachen Anstieg der Proteinmenge nach Erhöhung der Osmolarität des Kulturmediums von 300 auf 500 mosm/kg H<sub>2</sub>O zeigten [23]. Auch der stimulierende Effekt von Mannitol auf TonEBP wurde in früheren Arbeiten dargestellt [53] und wurde hier bestätigt. Werden Zellen einer erhöhten extrazellulären Osmolarität ausgesetzt, so kommt es durch Wasserefflux zu einer Erhöhung der innerzellulären Osmolyte und dadurch zu Zellschrumpfung. Der Grad der Zellschrumpfung hängt dabei von der Membranimpermeabilität der extrazellulär vorliegenden Osmolyte ab [71]. Da Harnstoff in der Lage ist die Zellmembran, ähnlich wie Wasser, frei zu passieren, führt Harnstoff induzierte Hyperosmolarität nicht zu osmotischem Stress und somit auch nicht zur Hochregulation von CLC-K1, Barttin, TonEBP oder SGK1. Auch für TonEBP und die von ihm abhängigen osmoprotektiven Gene AR, BGT1 und SMIT war nach der hyperosmolaren Inkubation eine Verzögerung zwischen der Hochregulation der mRNA- und Protein-Expression zu erkennen, was für eine Neusynthese der Proteine spricht. Um unter hyperosmolarer Inkubation die geladenen Ionen wie z.B. Natrium, Chlorid und Kalium, welche die intrazelluläre Ionenstärke auf ein für die Zelle toxisches Maß erhöhen können, zu eliminieren, müssen die Zellen nichtionische Osmolyte aktivieren [22;66] und mit diesen die ionischen Osmolyte ersetzen. Durch TonEBP werden AR, BGT1 und SMIT reguliert, die für die Bereitstellung der nichtionischen Osmolyte in der Zelle zuständig sind. Unter Hyperosmolarität, induziert durch NaCl, Mannitol oder Raffinose, erklärt dies die

beobachtete Hochregulation von AR, BGT1 und SMIT, was durch Daten anderer Arbeitsgruppen verifiziert wurde [88;107;119;137]. Im Weiteren konnte in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Gruppen [53] gezeigt werden, dass die Inhibition des p38 MAPK Signalwegs zur Verhinderung der durch Hyperosmolarität induzierten Hochregulation von TonEBP und den von ihm abhängigen osmoregulatorischen Genen führt. Dies besagt, dass TonEBP unter hyperosmolaren Bedingungen von einem funktionellen p38 MAPK Signalweg abhängig ist. Bekanntermaßen [124] sind p38 MAPK Signalwege in IMCD Zellen an der Gentranskription nach hyperosmolarer Inkubation beteiligt, um vor den Effekten der Apoptose zu schützen [43]. Die Inhibition anderer Signalwege, wie die des MEK1/2 Signalwegs, bewirkte hingegen keine Reduktion der durch Hyperosmolarität induzierten Hochregulation von TonEBP. Diese Ergebnisse stehen in gewissem Maße im Kontrast zu den Daten anderer Arbeitsgruppen [53;161], die für TonEBP eine Abhängigkeit für den p38 MAPK- und ERK-Signalweg beschreiben, wobei ERK ein downstream Target des MEK1/2 Signalwegs ist. Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte, dass an der transkriptionellen Regulation von TonEBP und den Zielgenen unter osmotischem Stress ein EGFR-Ras-MAPK Signalweg beteiligt ist. Übereinstimmend mit unseren Daten war durch Inhibition von ERK1/2 durch UO126 keine Reduktion der durch Hyperosmolarität induzierten Induktion von AR zu erreichen [95]. Zur Untersuchung der Regulation von TonEBP auf die osmoprotektiven Gene AR, BGT1 und SMIT, wurden Versuche mit TonEBP spezifischer siRNA durchgeführt. Unter isoosmotischen Kontrollbedingungen führte die Transfektion mit der TonEBP spezifischen siRNA nur zur signifikanten Herabregulation von TonEBP, nicht aber von AR, BGT1 oder SMIT, was die Spezifität der siRNA bestätigte. Zellvitalitätsassays bestätigten zudem, dass die siRNA keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen ausübte. Transfektion mit der TonEBP spezifischen siRNA bei gleichzeitiger hyperosmolarer Inkubation bewirkte ebenfalls eine signifikante Herabregulation von TonEBP, zudem aber auch eine signifikante Herabregulation von AR, BGT1 und SMIT. Diese Ergebnisse beweisen eine direkte Abhängigkeit der mRNA Transkription von AR, BGT1 und SMIT von TonEBP unter Hyperosmolarität. Neben den osmoprotektiven Genen wurde auch für CLC-K1 und Barttin mRNA eine signifikante Herabregulation nach Transfektion der Zellen mit der TonEBP spezifischen siRNA unter hyperosmolaren Inkubationsbedingungen beobachtet.

Somit ist ebenfalls eine funktionelle Abhängigkeit von CLC-K1 und Barttin von TonEBP unter Hyperosmolarität anzunehmen. CLC-K1 und Barttin zählen darum unter hyperosmolaren Bedingungen auch zu den Downstream-targets von TonEBP. Bestätigt wird diese Vermutung zudem durch die Ergebnisse der Genomatrix Promotoruntersuchung, bei der zwei mögliche Bindungsstellen von TonEBP im potentiellen CLC-K1 Promotor gefunden wurden, von denen mindestens eine sich als wirkliche Bindungsstelle, bewiesen durch den EMSA, bestätigt hat. Der EMSA mit den Oligos der Bindungsstelle 2 zeigte spezifische Banden, die durch ein abgeschwächtes Signal in der kalten Verdrängung und eine höher liegende Bande im Supershift mit dem NFAT5 Antikörper bestätigt wurden. Der neu gefundene regulatorische Effekt von TonEBP auf CLC-K1 und Barttin, sowie der bereits weiter oben beschriebene gefundene Effekt der Regulation durch SGK1 brachte die Frage auf, ob die TonEBP Aktivierung nach hyperosmolarer Inkubation mit der von SGK1 verknüpft ist. Transfektion der Zellen mit TonEBP spezifischer siRNA unter gleichzeitiger hyperosmolarer Stimulation, führte neben der Herabregulation von TonEBP, CLC-K1, Barttin und den osmoprotektiven Genen ebenfalls zu einer signifikanten Herabregulation von SGK1. Im Gegenzug dazu führte Transfektion der Zellen mit SGK1 spezifischer siRNA unter Hyperosmolarität nur zu bereits beschriebenen Herabregulation von SGK1, CLC-K1 und Barttin [11], nicht aber von TonEBP. Auch die von TonEBP abhängigen osmoprotektiven Gene AR, BGT1 und SMIT wurden nicht beeinflusst. Es wurde somit erstmalig gezeigt, dass auch SGK1 ein Downstream-Target von TonEBP ist, seinerseits aber keine Einflussnahme auf TonEBP nachzuweisen ist. Die Interaktion der TonEBP Zielgene und SGK1 wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, die entdeckten, dass SMIT-regulierte Ströme durch Koexpression mit SGK1 hochreguliert werden und dass SGK1 SMIT Protein in der Plasmamembran stabilisiert [53;85]. Die Akkumulierung der nichtionischen Osmolyte, welche durch die osmoprotektiven Gene bereitgestellt werden, tritt erst in der chronischen Phase der Erholung des Zellvolumens auf. Das Schrumpfen der Zellen findet aber innerhalb von Minuten statt, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass die beobachtete Induktion von SGK1 nur von TonEBP abhängig ist. Die gewonnenen Daten zeigen erstmalig, dass durch Hyperosmolarität induzierter TonEBP nicht nur die Induktion der osmoprotektiven Gene bewirkt, sondern auch SGK1, CLC-K1 und Barttin hochreguliert. Zudem sind alle diese Gene unter

hyperosmolaren Bedingungen auf einen funktionell aktiven p38 MAPK Signalweg angewiesen. Die aus den Tierversuchen gewonnenen Daten bestätigen die in vitro Ergebnisse und festigen deren physiologische Relevanz [10].

#### **5.4. Regulation von CLC-K1 und Barttin durch klassische Aktivatoren von SGK1**

Das Mineralokortikoid Aldosteron gehört zu den Steroidhormonen und besitzt bedeutende Funktionen für die Regulation des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Base Haushalt. Als sogenanntes „Dursthormon“ spielt es eine entscheidende Rolle unter Flüssigkeitsmangel. Diese Funktion macht es wiederum zum potentiellen Kandidaten für eine eventuelle Verknüpfung mit der Hochregulation von CLC-K1 unter Hyperosmolarität, die möglicherweise über SGK1 abläuft.

Die Ergebnisse des Aldosteron RIAs von Rattenurinen unter Hochsalz- bzw. Niedrigsalzdiät zeigen eine physiologische Rückkopplung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems der Tiere entsprechend der publizierten Datenlage. Unter Niedrigsalzdiät steigt die Aldosteronkonzentration in beiden Gruppen (DSS/ DSR) signifikant an, um die Na<sup>+</sup> Rückresorption über ENaC, seinerseits reguliert durch SGK1, zu verstärken und den Elektrolytverlust möglichst gering zu halten. In den Gruppen mit Hochsalzfütterung war dagegen die Aldosteronkonzentration in beiden Gruppen (DSS/ DSR) signifikant verringert, da keine verstärkte Na<sup>+</sup> Rückresorption notwendig war, sondern eher eine verstärkte Ausscheidung von Nöten wäre. Die Resistenz, bzw. Sensitivität der Ratten auf Salz war hierbei für die Aldosteronkonzentrationen nicht von Bedeutung. Auf Zellkulturebene war neben dem für SGK1 bekannten Effekt der Hochregulation durch Stimulation mit Aldosteron, auch für CLC-K1 eine Hochregulation nach Inkubation der Zellen mit Aldosteron erkennbar. Ob dieser stimulierende Effekt direkt vom Aldosteron auf CLC-K1 ausgeübt wird oder über das hochregulierte SGK1, gemäß der zuvor beschriebenen (Abschnitt 5.2) Regulation, an CLC-K1 vermittelt wird, kann nicht eindeutig geklärt werden. Es lässt sich aber vermuten, dass der Effekt von Aldosteron auch direkt auf CLC-K1 vermittelt wird, da keine Stimulation von Barttin erkennbar war, welches bei indirekter Stimulation durch SGK1 gemäß der bereits beschriebenen Ergebnisse ebenfalls hochreguliert werden sollte. Der Rückgang des induzierenden Effekts von Aldosteron bei zusätzlicher Gabe des

Aldosteronantagonisten Spironolacton lässt jedoch vermuten, dass der stimulatorische Effekt direkt von Aldosteron ausgehen könnte.

## 6. Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine Regulation von SGK1 auf CLC-K1 und seine Untereinheit Barttin unter hyperosmolaren Bedingungen bewiesen werden. Ob der beobachtete regulatorische Effekt von SGK1 auf CLC-K1 und Barttin gleichermaßen ausgeübt wird oder von einem der Beiden auf den Anderen weitergegeben wird bleibt bislang ungeklärt. Die beschriebene zeitliche Verschiebung der Hochregulation von CLC-K1 und Barttin lässt die Vermutung aufkommen, dass die Regulation über Barttin auf CLC-K1 weitergegeben wird. Dies könnte über Phosphorylierung des im Barttin befindlichen PY-Motivs und daraus eventuell resultierender struktureller Änderungen des Barttin und CLC-K1 Proteins ablaufen. Zur Klärung dieser Frage könnte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot oder durch Massenspektroskopie untersucht werden, ob das PY-Motiv im Barttin wirklich als Ort der Phosphorylierung durch SGK1 dient.

Die Promotoranalyse für CLC-K1 brachte zwei potentielle Bindungsstellen für TonEBP hervor, von denen zumindest eine funktionell zu sein scheint. Sind beide gefundenen Bindungsstellen funktionell und werden beide benötigt? Weitere Untersuchungen könnten die zweite potentielle Bindungsstelle definitiv bestätigen oder als nichtfunktionell beschreiben.

CLC-K2 mit seiner 80%igen Homologie auf Aminosäureebene zu CLC-K1 könnte ähnlichen Regulationen wie CLC-K1 unterworfen sein und eventuell unter hyperosmolarem Stress in analoger Weise reguliert werden. Untersuchungen, ähnlich denen wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, könnten hierzu durchgeführt werden und die Rolle von CLC-K2 unter Hyperosmolarität weiter definieren.

Der an der Hochregulation von CLC-K1 und Barttin unter Hyperosmolarität beteiligte p38 MAPK Signalweg scheint laut unseren Daten nicht alleinig für die Regulationen zuständig zu sein. Die Suche nach weiteren involvierten Signalwegen könnte Klarheit über mögliche Vernetzungen unterschiedlicher Signalwege geben.

## 7. Zusammenfassung

Die Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2 bzw. ihre humanen Orthologe CLCKA und CLCKB finden sich zusammen mit ihrer funktionellen Untereinheit Barttin ausschließlich in der Niere und im Innenohr. CLC-K1 ist hierbei überwiegend für die Aufrechterhaltung des kortikomedullären osmotischen Gradienten sowie für den Urin-Konzentrierungsmechanismus verantwortlich. Die Konsequenz seines Ausfalls konnte in Form eines Diabetes insipidus im Mausmodell charakterisiert werden. CLC-K2 ist eine wichtige Determinante der Chloridreabsorption im Tubulus und eine Mutation in seinem Gen wurde als Bartter Syndrom III klassifiziert, welches unter anderem mit gestörter Salzurückresorption definiert ist. Trotz ihrer wichtigen Rollen in der Chloridreabsorption war bisher nur wenig über ihre physiologische Regulation bekannt. Für die beschriebene Hochregulation von CLC-K1 unter Dehydratation in vivo oder Hyperosmolarität in vitro ist bislang kein regulatorischer Mechanismus gefunden worden. Mit den Ergebnissen dieser Dissertation konnten zwei Proteine als wichtige Determinanten der CLC-K1 Regulation unter Hyperosmolarität, sei es durch Dehydratation in vivo oder durch Erhöhung der Mediumosmolarität in vitro bestimmt werden.

Die beobachtete Hochregulation CLC-K1 und Barttin Expression unter hyperosmolarer Inkubation von Zellen des distalen Tubulus, ging einher mit der Hochregulation von SGK1, welches bekannterweise durch Zellschrumpfung hochreguliert wird. Der Knockdown von SGK1 mittels siRNA, sowie die Inhibition des p38 MAPK Signalwegs durch den Inhibitor SB203580, hob die Induktion von SGK1 sowie auch die von CLC-K1 und Barttin unter Hyperosmolarität auf. Somit konnte erstmalig eine Abhängigkeit der Hochregulation von CLC-K1 und Barttin unter Hyperosmolarität von SGK1, sowie auch einem funktionellen p38 MAPK Signalweg gezeigt werden. Die physiologische Relevanz der in vitro Daten wurde zudem im Tiermodell durch Wasserentzug verifiziert. Die Regulation von CLC-K1 und Barttin durch SGK1 könnte eventuell über Phosphorylierung des PY-Motivs von Barttin verursacht sein.

Die ebenfalls beobachtete parallel zu CLC-K1 und Barttin verlaufende Hochregulation von TonEBP, sowie der von ihm abhängigen osmoprotektiven Gene unter Hyperosmolarität, wurde auf ähnliche Weise untersucht. Durch genspezifischen TonEBP Knockdown konnte eine Abhängigkeit der hyperosmolaritätsinduzierten Hochregulation von CLC-K1 und Barttin von TonEBP

gezeigt werden. Über eine Genomatix Analyse wurden theoretische Bindungsstellen für TonEBP im möglichen Promotor von CLC-K1 gefunden, die über weitere Verfahren (EMSA) als funktionelle Bindungsstellen bestätigt wurden. Es konnte somit auch erstmalig für CLC-K1 und Barttin eine Abhängigkeit von TonEBP unter Hyperosmolarität gezeigt werden.

Die in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse charakterisieren neue Grundlagen der CLC-K1 und Barttin Regulation unter Variation der Osmolarität und stellen damit eine fundierte Basis für weiterführende Untersuchungen dar.

## 8. Abkürzungen

Abkürzung	
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
AP 2/3	Aktivatorprotein 2/3
APS	Ammoniumpersulfat
AQP	Aquaporin
AR	Aldose Reduktase
ATL	Aufsteigender dünner Ast
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BGT1	Betain/ GABA Transporter 1
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaR	Calcium Sensing Rezeptor
CCD	Kortikales Sammelrohr
CD	Sammelrohr
cDNA	Komplementäre DNA
CFTR	Cystis Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CK1	Casein Kinase 1
CLC-K1/2	Chloridkanal K1/2
CNT	Verbindungstubulus
CT-Wert	Cycle Treshold Wert
DAB	Diaminobenzidin
DCA	Desoxycholsäure
DCT	Distaler konvoluter Tubulus
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DSR	Dahl salzresistent

---

DSS	Dahl salzsensitiv
DTL	Absteigender dünner Ast
E-Box	Enhancer-Box
ECL-Reagenz	Elektrochemilumineszenz Reagenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ENaC	Epithelialer Na <sup>+</sup> Kanal
FCS	Fetales Kälberserum
GA-Element	GA reiche Sequenz im eukaryotischen Promotor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTC	Guanidinisothiocyanat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HS	Hochsalz
HSF	Hitzeschock Faktor
HSP70	Hitzeschockprotein 70
IMCD	Innermedulläres Sammelrohr
KCNQ	Kaliumkanal Q
kDa	Kilodalton
KKLF	Kidney Enriched Krüppel Like Factor
LS	Niedrigsalz
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAZI	Myc assoziiertes Zinkfingerprotein
MCD	Medulläres Sammelrohr
MEK 1/ 2	MAP-Kinase Kinase 1/ 2
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOCK	Transfektionsreagenz
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NCC	Na <sup>+</sup> / Cl <sup>-</sup> Cotransporter
Nedd 4-2	Neural Precursors Cell Expressed developmentally Downregulated 4-2
NE-PER	Nuclear And Cytoplasmatic Extraction Reagent

---

---

NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-IL6	Nuclear factor- Interleukin 6
NFκB	Nuclear factor κB
NIH	National Institute of Health
NKCC2	Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> 2Cl <sup>-</sup> Cotransporter
NLS	Kern Lokalisations Signal
Non si	Unspezifische siRNA
OD	Optische Dichte
ORE	Osmotic Response Element
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD98059	MEK1 Inhibitor
PDK1	PIP3 Abhängige Kinase 1
PH-Domäne	Pleckstrin Homology Domäne
PI3 Kinase	Phosphatidylinositol-3 kinase
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PIP2	Phosphatidylinositol Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol Triphosphat
PNK-Puffer	T4-Polynucleotid Kinase
PT	Proximaler Tubulus
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
RHR	Rel Homologie Region
RIA	Radioimmuno Assay
RISC-Komplex	RNA Induced Silencing Komplex
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROMK	Renal Outermedullary K <sup>+</sup> channel
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SB203580	MAPK Inhibitor
SCN5A	Natriumkanal 5A
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGK1/2/3	Serum und Glucocortikoid induzierbare kinase 1/2/3
SGLT 1/2	Sodium-Glucose Linked transporter

---

---

siRNA	Small Interfering RNA
SMIT	Sodium Myoinositol Transporter
TAL	Dicker aufsteigender Ast
TATA-Box	AT reicher Abschnitt im eukaryotischen Promotor
TBS-T	Tris-gepufferte salzlösung + Tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris/ EDTA Puffer
TGF $\beta$	Tumor Wachstumsfaktor $\beta$
TonE	Tonicity Responsive Enhancer
TonEBP	Tonicity Responsive Enhancer Binding Protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UO126	MEK1/2 Inhibitor
UT-A	Harnstoff Transporter A
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett
z.B.	Zum Beispiel

---

## 9. Literaturverzeichnis

1. Academic.kellog.edu. Nierenanatomie. 2009.  
Ref Type: Generic
2. Accardi A, Miller C: Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature* 427:803-807, 2004
3. Adachi S, Uchida S, Ito H *et al.*: Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J Biol Chem* 269:17677-17683, 1994
4. Akizuki N, Uchida S, Sasaki S, Marumo F: Impaired solute accumulation in inner medulla of Clcnk1<sup>-/-</sup> mice kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F79-F87, 2001
5. Ando M, Takeuchi S: mRNA encoding 'ClC-K1, a kidney Cl<sup>-</sup>- channel' is expressed in marginal cells of the stria vascularis of rat cochlea: its possible contribution to Cl<sup>-</sup> currents. *Neurosci Lett* 284:171-174, 2000
6. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE *et al.*: *Current protocols in molecular biology*. 87 A.D.
7. Bachmann S, Bostanjoglo M, Schmitt R, Ellison DH: Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron - distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat Embryol (Berl)* 200:447-468, 1999
8. Bachmann S, Velazquez H, Obermuller N *et al.*: Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter by rabbit distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 96:2510-2514, 1995
9. Bell LM, Leong ML, Kim B *et al.*: Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 275:25262-25272, 2000
10. Bergler, T., Jeblick, R., Jung, B., Reinhold, S. W., Banas, B., and Krämer, B. K. High Osmolality induced CLC-K1 expression depends on transcription factor TonEBP (under revision). 2009.  
Ref Type: Unpublished Work
11. Bergler T, Stoelcker B, Jeblick R *et al.*: High osmolality induces the kidney-specific chloride channel CLC-K1 by a serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 MAPK pathway. *Kidney Int* 74:1170-1177, 2008
12. Betz H, Kuhse J, Schmieden V *et al.*: Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Ann N Y Acad Sci* 868:667-676, 1999
13. Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K *et al.*: The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* 142:1587-1594, 2001

14. Biondi RM, Kieloch A, Currie RA *et al.*: The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J* 20:4380-4390, 2001
15. Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ *et al.*: Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 29:310-314, 2001
16. Boehmer C, Wilhelm V, Palmada M *et al.*: Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovasc Res* 57:1079-1084, 2003
17. Bohmer C, Wagner CA, Beck S *et al.*: The shrinkage-activated Na(+) conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. *Cell Physiol Biochem* 10:187-194, 2000
18. Bourgeois S, Rossignol P, Grelac F *et al.*: Differentiated thick ascending limb (TAL) cultured cells derived from SV40 transgenic mice express functional apical NHE2 isoform: effect of nitric oxide. *Pflugers Arch* 446:672-683, 2003
19. Bradbury NA: Intracellular CFTR: localization and function. *Physiol Rev* 79:S175-S191, 1999
20. Brandt S, Jentsch TJ: CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett* 377:15-20, 1995
21. Brennan FE, Fuller PJ: Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 166:129-136, 2000
22. Burg MB, Kwon ED, Kultz D: Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* 59:437-455, 1997
23. Cai Q, Ferraris JD, Burg MB: High NaCl increases TonEBP/OREBP mRNA and protein by stabilizing its mRNA. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F803-F807, 2005
24. Casamayor A, Torrance PD, Kobayashi T *et al.*: Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol* 9:186-197, 1999
25. Castrop H, Kramer BK, Riegger GA *et al.*: Overexpression of chloride channel CLC-K2 mRNA in the renal medulla of Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 18:1289-1295, 2000
26. Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A *et al.*: Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet* 12:248-253, 1996
27. Chebib M, Johnston GA: The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:937-940, 1999

28. Chen S, McCormick JA, Prabaker K *et al.*: Sgk1 mediates osmotic induction of NPR-A gene in rat inner medullary collecting duct cells. *Hypertension* 43:866-871, 2004
29. Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L *et al.*: Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2514-2519, 1999
30. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
31. Cohen DM: Mitogen-activated protein kinase cascades and the signaling of hyperosmotic stress to immediate early genes. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 117:291-299, 1997
32. Cohen DM: Signalling and gene regulation by urea and NaCl in the renal medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:69-73, 1999
33. Cowling RT, Birnboim HC: Expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) mRNA is up-regulated by GM-CSF and other proinflammatory mediators in human granulocytes. *J Leukoc Biol* 67:240-248, 2000
34. Dahl SC, Handler JS, Kwon HM: Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor TonEBP. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C248-C253, 2001
35. Dai F, Yu L, He H *et al.*: Cloning and mapping of a novel human serum/glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGKL, to chromosome 8q12.3-q13.1. *Genomics* 62:95-97, 1999
36. Dawson DC, Smith SS, Mansoura MK: CFTR: mechanism of anion conduction. *Physiol Rev* 79:S47-S75, 1999
37. Debonneville C, Flores SY, Kamynina E *et al.*: Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J* 20:7052-7059, 2001
38. Delmolino LM, Castellot JJ, Jr.: Heparin suppresses sgk, an early response gene in proliferating vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 173:371-379, 1997
39. Desai BN, Myers BR, Schreiber SL: FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4319-4324, 2002
40. Devuyst O: Salt wasting and blood pressure. *Nat Genet* 40:495-496, 2008
41. Di CC, Nie Z, Szaszi K *et al.*: Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C850-C865, 2002

42. Diakov A, Korbmacher C: A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit. *J Biol Chem* 279:38134-38142, 2004
43. Dmitrieva N, Kultz D, Michea L *et al.*: Protection of renal inner medullary epithelial cells from apoptosis by hypertonic stress-induced p53 activation. *J Biol Chem* 275:18243-18247, 2000
44. Dmitrieva NI, Cai Q, Burg MB: Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2317-2322, 2004
45. Dmitrieva NI, Michea LF, Rocha GM, Burg MB: Cell cycle delay and apoptosis in response to osmotic stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130:411-420, 2001
46. Estevez R, Boettger T, Stein V *et al.*: Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel [beta]-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* 414:558-561, 2001
47. Fejes-Toth G, Frindt G, Naray-Fejes-Toth A, Palmer LG: Epithelial Na<sup>+</sup> channel activation and processing in mice lacking SGK1. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F1298-F1305, 2008
48. Ferraris JD, Williams CK, Jung KY *et al.*: ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element. The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J Biol Chem* 271:18318-18321, 1996
49. Ferraris JD, Williams CK, Ohtaka A, Garcia-Perez A: Functional consensus for mammalian osmotic response elements. *Am J Physiol* 276:C667-C673, 1999
50. Firestone GL, Giampaolo JR, O'Keeffe BA: Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell Physiol Biochem* 13:1-12, 2003
51. Flores SY, Loffing-Cueni D, Kamynina E *et al.*: Aldosterone-induced serum and glucocorticoid-induced kinase 1 expression is accompanied by Nedd4-2 phosphorylation and increased Na<sup>+</sup> transport in cortical collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* 16:2279-2287, 2005
52. Frey HH: [Diuretics]. *Tierarztl Prax* 18:329-337, 1990
53. Gallazzini M, Karim Z, Bichara M: Regulation of ROMK (Kir 1.1) channel expression in kidney thick ascending limb by hypertonicity: role of TonEBP and MAPK pathways. *Nephron Physiol* 104:126-135, 2006
54. Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M *et al.*: Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2749-2753, 1993

55. Garcia-Perez A, Burg MB: Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev* 71:1081-1115, 1991
56. Gesek FA, Friedman PA: Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 90:429-438, 1992
57. Gesek FA, Friedman PA: Sodium entry mechanisms in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol* 268:F89-F98, 1995
58. Ghosh G, van DG, Ghosh S, Sigler PB: Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* 373:303-310, 1995
59. Go WY, Liu X, Roti MA *et al.*: NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10673-10678, 2004
60. Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S *et al.*: Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 14:1283-1300, 2000
61. Graef IA, Gastier JM, Francke U, Crabtree GR: Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5740-5745, 2001
62. Greger R: Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci* 319:51-62, 2000
63. Guyton, A. C. Hall J. E. Textbook of medical physiology ; W.B. Saunders Company. 1996.  
Ref Type: Generic
64. Haas M, Forbush B, III: The Na-K-Cl cotransporters. *J Bioenerg Biomembr* 30:161-172, 1998
65. Han KH, Woo SK, Kim WY *et al.*: Maturation of TonEBP expression in developing rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F878-F885, 2004
66. Handler JS, Kwon HM: Transcriptional regulation by changes in tonicity. *Kidney Int* 60:408-411, 2001
67. Hasler U, Jeon US, Kim JA *et al.*: Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol* 17:1521-1531, 2006
68. Henke G, Setiawan I, Bohmer C, Lang F: Activation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by the serum and glucocorticoid-dependent kinase isoforms. *Kidney Blood Press Res* 25:370-374, 2002

69. Hertweck M, Gobel C, Baumeister R: C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev Cell* 6:577-588, 2004
70. Hinchcliff KW, Mitten LA: Furosemide, bumetanide, and ethacrynic acid. *Vet Clin North Am Equine Pract* 9:511-522, 1993
71. Ho SN: Intracellular water homeostasis and the mammalian cellular osmotic stress response. *J Cell Physiol* 206:9-15, 2006
72. Huber SM, Friedrich B, Klingel K *et al.*: Protein and mRNA expression of serum and glucocorticoid-dependent kinase 1 in metanephrogenesis. *Dev Dyn* 221:464-469, 2001
73. Itani OA, Liu KZ, Cornish KL *et al.*: Glucocorticoids stimulate human sgk1 gene expression by activation of a GRE in its 5'-flanking region. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E971-E979, 2002
74. Ito T, Fujio Y, Hirata M *et al.*: Expression of taurine transporter is regulated through the TonE (tonicity-responsive element)/TonEBP (TonE-binding protein) pathway and contributes to cytoprotection in HepG2 cells. *Biochem J* 382:177-182, 2004
75. Jeck N, Waldegger P, Doroszewicz J *et al.*: A common sequence variation of the CLCNKB gene strongly activates CIC-Kb chloride channel activity. *Kidney Int* 65:190-197, 2004
76. Jeck N, Waldegger S, Lampert A *et al.*: Activating mutation of the renal epithelial chloride channel CIC-Kb predisposing to hypertension. *Hypertension* 43:1175-1181, 2004
77. Jentsch TJ, Gunther W, Pusch M, Schwappach B: Properties of voltage-gated chloride channels of the CIC gene family. *J Physiol* 482:19S-25S, 1995
78. Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G: Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes. *Nature* 348:510-514, 1990
79. Jeon US, Kim JA, Sheen MR, Kwon HM: How tonicity regulates genes: story of TonEBP transcriptional activator. *Acta Physiol (Oxf)* 187:241-247, 2006
80. Kasono K, Saito T, Saito T *et al.*: Hypertonicity regulates the aquaporin-2 promoter independently of arginine vasopressin. *Nephrol Dial Transplant* 20:509-515, 2005
81. Kawasaki M, Uchida S, Monkawa T *et al.*: Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* 12:597-604, 1994
82. Kere J: Kidney kinetics and chloride ion pumps. *Nat Genet* 21:67-68, 1999

83. Kieferle S, Fong P, Bens M *et al.*: Two highly homologous members of the CIC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6943-6947, 1994
84. King LS, Kozono D, Agre P: From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:687-698, 2004
85. Klaus F, Palmada M, Lindner R *et al.*: Up-regulation of hypertonicity-activated myo-inositol transporter SMIT1 by the cell volume-sensitive protein kinase SGK1. *J Physiol* 586:1539-1547, 2008
86. Klein JD, Le QD, Cole JM *et al.*: Impaired urine concentration and absence of tissue ACE: involvement of medullary transport proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F517-F524, 2002
87. Klingel K, Warntges S, Bock J *et al.*: Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G998-G1002, 2000
88. Ko BC, Ruepp B, Bohren KM *et al.*: Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J Biol Chem* 272:16431-16437, 1997
89. Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S *et al.*: Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 12:1327-1334, 2001
90. Kobayashi T, Cohen P: Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* 339 ( Pt 2):319-328, 1999
91. Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P: Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J* 344 Pt 1:189-197, 1999
92. Krämer BK, Bergler T, Stoelcker B, Waldegger S: Mechanisms of Disease: the kidney-specific chloride channels CICKA and CICKB, the Barttin subunit, and their clinical relevance. *Nat Clin Pract Nephrol* 4:38-46, 2008
93. Kriz W, Bankir L: A standard nomenclature for structure of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences(IUPS). *Anat Embryol (Berl)* 178:N1-N8, 1988
94. Kultz D, Chakravarty D: Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1999-2004, 2001
95. Kuper C, Steinert D, Fraek ML *et al.*: EGF receptor signaling is involved in expression of osmoprotective TonEBP target gene aldose reductase under hypertonic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F1100-F1108, 2009

96. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970
97. Lang F, Busch GL, Ritter M *et al.*: Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78:247-306, 1998
98. Lang F, Cohen P: Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001:re17, 2001
99. Lang F, Klingel K, Wagner CA *et al.*: Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8157-8162, 2000
100. Lang F, Vallon V, Knipper M, Wangemann P: Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1187-C1208, 2007
101. Lee E, Lein ES, Firestone GL: Tissue-specific expression of the transcriptionally regulated serum and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 103:177-181, 2001
102. Lee SD, Woo SK, Kwon HM: Dimerization is required for phosphorylation and DNA binding of TonEBP/NFAT5. *Biochem Biophys Res Commun* 294:968-975, 2002
103. Leong ML, Maiyar AC, Kim B *et al.*: Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 278:5871-5882, 2003
104. Liu W, Morimoto T, Kondo Y *et al.*: Analysis of NaCl transport in thin ascending limb of Henle's loop in CLC-K1 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F451-F457, 2002
105. Loffing J, Kaissling B: Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F628-F643, 2003
106. Loffing J, Zecevic M, Feraille E *et al.*: Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F675-F682, 2001
107. Lopez-Rodriguez C, Antos CL, Shelton JM *et al.*: Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2392-2397, 2004
108. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Jin L *et al.*: Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 15:47-58, 2001
109. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A: NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7214-7219, 1999

110. Lourdel S, Paulais M, Marvao P *et al.*: A chloride channel at the basolateral membrane of the distal-convoluted tubule: a candidate ClC-K channel. *J Gen Physiol* 121:287-300, 2003
111. Maiyar AC, Leong ML, Firestone GL: Importin-alpha mediates the regulated nuclear targeting of serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by recognition of a nuclear localization signal in the kinase central domain. *Mol Biol Cell* 14:1221-1239, 2003
112. Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y *et al.*: Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet* 21:95-98, 1999
113. McManus ML, Churchwell KB, Strange K: Regulation of cell volume in health and disease. *N Engl J Med* 333:1260-1266, 1995
114. Mejia R, Wade JB: Immunomorphometric study of rat renal inner medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F553-F557, 2002
115. Meng F, Yamagiwa Y, Taffetani S *et al.*: IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C971-C981, 2005
116. Michea L, Ferguson DR, Peters EM *et al.*: Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F209-F218, 2000
117. Miller C, White MM: A voltage-dependent chloride conductance channel from Torpedo electroplax membrane. *Ann N Y Acad Sci* 341:534-551, 1980
118. Miyakawa H, Rim JS, Handler JS, Kwon HM: Identification of the second tonicity-responsive enhancer for the betaine transporter (BGT1) gene. *Biochim Biophys Acta* 1446:359-364, 1999
119. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC *et al.*: Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2538-2542, 1999
120. Miyazaki H, Kaneko T, Uchida S *et al.*: Kidney-specific chloride channel, OmClC-K, predominantly expressed in the diluting segment of freshwater-adapted tilapia kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15782-15787, 2002
121. Mizuno H, Nishida E: The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors. *Genes Cells* 6:261-268, 2001
122. Muller E, Neuhofer W, Ohno A *et al.*: Heat shock proteins HSP25, HSP60, HSP72, HSP73 in isoosmotic cortex and hyperosmotic medulla of rat kidney. *Pflugers Arch* 431:608-617, 1996
123. Nagaki K, Yamamura H, Shimada S *et al.*: 14-3-3 Mediates phosphorylation-dependent inhibition of the interaction between the

- ubiquitin E3 ligase Nedd4-2 and epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* 45:6733-6740, 2006
124. Nahm O, Woo SK, Handler JS, Kwon HM: Involvement of multiple kinase pathways in stimulation of gene transcription by hypertonicity. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C49-C58, 2002
125. Nakayama Y, Peng T, Sands JM, Bagnasco SM: The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *J Biol Chem* 275:38275-38280, 2000
126. Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES *et al.*: sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 274:16973-16978, 1999
127. Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Volk KA, Stokes JB: SGK is a primary glucocorticoid-induced gene in the human. *J Steroid Biochem Mol Biol* 75:51-56, 2000
128. Nissant A, Lourdel S, Baillet S *et al.*: Heterogeneous distribution of chloride channels along the distal convoluted tubule probed by single-cell RT-PCR and patch clamp. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F1233-F1243, 2004
129. Nissant A, Paulais M, Lachheb S *et al.*: Similar chloride channels in the connecting tubule and cortical collecting duct of the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F1421-F1429, 2006
130. Obermuller N, Kunchaparty S, Ellison DH, Bachmann S: Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J Clin Invest* 98:635-640, 1996
131. Palmada M, Embark HM, Yun C *et al.*: Molecular requirements for the regulation of the renal outer medullary K(+) channel ROMK1 by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Biochem Biophys Res Commun* 311:629-634, 2003
132. Park J, Leong ML, Buse P *et al.*: Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* 18:3024-3033, 1999
133. Pizzonia JH, Gesek FA, Kennedy SM *et al.*: Immunomagnetic separation, primary culture, and characterization of cortical thick ascending limb plus distal convoluted tubule cells from mouse kidney. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A:409-416, 1991
134. Raciti D, Reggiani L, Geffers L *et al.*: Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping. *Genome Biol* 9:R84, 2008
135. Rai T, Uchida S, Sasaki S, Marumo F: Isolation and characterization of kidney-specific CLC-K2 chloride channel gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 261:432-438, 1999

136. Riccardi D, Park J, Lee WS *et al.*: Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:131-135, 1995
137. Rim JS, Atta MG, Dahl SC *et al.*: Transcription of the sodium/myo-inositol cotransporter gene is regulated by multiple tonicity-responsive enhancers spread over 50 kilobase pairs in the 5'-flanking region. *J Biol Chem* 273:20615-20621, 1998
138. Rossier BC, Canessa CM, Schild L, Horisberger JD: Epithelial sodium channels. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3:487-496, 1994
139. Saito-Ohara F, Uchida S, Takeuchi Y *et al.*: Assignment of the genes encoding the human chloride channels, CLCNKA and CLCNKB, to 1p36 and of CLCN3 to 4q32-q33 by in situ hybridization. *Genomics* 36:372-374, 1996
140. Sakamoto H, Kawasaki M, Uchida S *et al.*: Identification of a new outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channel that belongs to a subfamily of the ClC Cl<sup>-</sup> channels. *J Biol Chem* 271:10210-10216, 1996
141. Sands JM: Molecular approaches to urea transporters. *J Am Soc Nephrol* 13:2795-2806, 2002
142. Sands JM, Kokko JP: Current concepts of the countercurrent multiplication system. *Kidney Int Suppl* 57:S93-S99, 1996
143. Schlatter E, Greger R, Weidtko C: Effect of "high ceiling" diuretics on active salt transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. Correlation of chemical structure and inhibitory potency. *Pflugers Arch* 396:210-217, 1983
144. Scholl U, Hebeisen S, Janssen AG *et al.*: Barttin modulates trafficking and function of ClC-K channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11411-11416, 2006
145. Sheppard DN, Welsh MJ: Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79:S23-S45, 1999
146. Shigaev A, Asher C, Latter H *et al.*: Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na<sup>(+)</sup> channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F613-F619, 2000
147. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM *et al.*: Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79:407-414, 1994
148. Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA *et al.*: Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet* 17:171-178, 1997

149. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM *et al.*: Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 13:183-188, 1996
150. Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J *et al.*: Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Nat Genet* 14:152-156, 1996
151. Smardo FL, Jr., Burg MB, Garcia-Perez A: Kidney aldose reductase gene transcription is osmotically regulated. *Am J Physiol* 262:C776-C782, 1992
152. Snyder PM, Olson DR, Thomas BC: Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 277:5-8, 2002
153. Starremans PG, Kersten FF, Knoers NV *et al.*: Mutations in the human Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) identified in Bartter syndrome type I consistently result in nonfunctional transporters. *J Am Soc Nephrol* 14:1419-1426, 2003
154. Staub O, Gautschi I, Ishikawa T *et al.*: Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J* 16:6325-6336, 1997
155. Steinmeyer K, Ortland C, Jentsch TJ: Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354:301-304, 1991
156. Steinmeyer K, Schwappach B, Bens M *et al.*: Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem* 270:31172-31177, 1995
157. Stroud JC, Lopez-Rodriguez C, Rao A, Chen L: Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nat Struct Biol* 9:90-94, 2002
158. Takenaka M, Preston AS, Kwon HM, Handler JS: The tonicity-sensitive element that mediates increased transcription of the betaine transporter gene in response to hypertonic stress. *J Biol Chem* 269:29379-29381, 1994
159. Takeuchi Y, Uchida S, Marumo F, Sasaki S: Cloning, tissue distribution, and intrarenal localization of CIC chloride channels in human kidney. *Kidney Int* 48:1497-1503, 1995
160. Thiemann A, Grunder S, Pusch M, Jentsch TJ: A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356:57-60, 1992
161. Tian W, Zhang Z, Cohen DM: MAPK signaling and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F593-F604, 2000
162. Trama J, Lu Q, Hawley RG, Ho SN: The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol* 165:4884-4894, 2000

163. Turpaev K, Bouton C, Diet A *et al.*: Analysis of differentially expressed genes in nitric oxide-exposed human monocytic cells. *Free Radic Biol Med* 38:1392-1400, 2005
164. Uchida S: In vivo role of CLC chloride channels in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F802-F808, 2000
165. Uchida S, Garcia-Perez A, Murphy H, Burg M: Signal for induction of aldose reductase in renal medullary cells by high external NaCl. *Am J Physiol* 256:C614-C620, 1989
166. Uchida S, Rai T, Yatsushige H *et al.*: Isolation and characterization of kidney-specific CLC-K1 chloride channel gene promoter. *Am J Physiol* 274:F602-F610, 1998
167. Uchida S, Sasaki S, Furukawa T *et al.*: Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla [published erratum appears in *J Biol Chem* 1994 Jul 22;269(29):19192]. *J Biol Chem* 268:3821-3824, 1993
168. Uchida S, Sasaki S, Marumo F: Isolation of a novel zinc finger repressor that regulates the kidney-specific CLC-K1 promoter. *Kidney Int* 60:416-421, 2001
169. Uchida S, Sasaki S, Nitta K *et al.*: Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, CLC-K1. *J Clin Invest* 95:104-113, 1995
170. Uchida S, Tanaka Y, Ito H *et al.*: Transcriptional regulation of the CLC-K1 promoter by myc-associated zinc finger protein and kidney-enriched Kruppel-like factor, a novel zinc finger repressor. *Mol Cell Biol* 20:7319-7331, 2000
171. Vandewalle A, Cluzeaud F, Bens M *et al.*: Localization and induction by dehydration of CLC-K chloride channels in the rat kidney. *Am J Physiol* 272:F678-F688, 1997
172. Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P *et al.*: Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 13:2259-2266, 2002
173. Vitzthum H, Castrop H, Meier-Meitingner M *et al.*: Nephron specific regulation of chloride channel CLC-K2 mRNA in the rat. *Kidney Int* 61:547-554, 2002
174. Wagner CA, Ott M, Klingel K *et al.*: Effects of the serine/threonine kinase SGK1 on the epithelial Na(+) channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem* 11:209-218, 2001
175. Waldegger S, Barth P, Forrest JN, Jr. *et al.*: Cloning of sgk serine-threonine protein kinase from shark rectal gland - a gene induced by hypertonicity and secretagogues. *Pflugers Arch* 436:575-580, 1998

176. Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F: Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4440-4445, 1997
177. Waldegger S, Erdel M, Nagl UO *et al.*: Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. *Genomics* 51:299-302, 1998
178. Waldegger S, Jeck N, Barth P *et al.*: Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch* 444:411-418, 2002
179. Waldegger S, Jentsch TJ: From tonus to tonicity: physiology of ClC chloride channels. *J Am Soc Nephrol* 11:1331-1339, 2000
180. Waldegger S, Jentsch TJ: Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem* 275:24527-24533, 2000
181. Wang WH: Regulation of ROMK (Kir1.1) channels: new mechanisms and aspects. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F14-F19, 2006
182. Watanabe S, Fukumoto S, Chang H *et al.*: Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet* 360:692-694, 2002
183. Webster MK, Goya L, Ge Y *et al.*: Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* 13:2031-2040, 1993
184. Wolf K, Castrop H, Riegger GA *et al.*: Differential gene regulation of renal salt entry pathways by salt load in the distal nephron of the rat. *Pflugers Arch* 442:498-504, 2001
185. Wolf K, Meier-Meitingner M, Bergler T *et al.*: Parallel down-regulation of chloride channel ClC-K1 and barttin mRNA in the thin ascending limb of the rat nephron by furosemide. *Pflugers Arch* 446:665-671, 2003
186. Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM: Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F1006-F1012, 2000
187. Woo SK, Maouyo D, Handler JS, Kwon HM: Nuclear redistribution of tonicity-responsive enhancer binding protein requires proteasome activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C323-C330, 2000
188. Xu S, Wong CC, Tong EH *et al.*: Phosphorylation by casein kinase 1 regulates tonicity-induced osmotic response element-binding protein/tonicity enhancer-binding protein nucleocytoplasmic trafficking. *J Biol Chem* 283:17624-17634, 2008

189. Yamauchi A, Uchida S, Kwon HM *et al.*: Cloning of a Na(+)- and Cl(-)-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J Biol Chem* 267:649-652, 1992
190. Yamauchi A, Uchida S, Preston AS *et al.*: Hypertonicity stimulates transcription of gene for Na(+)-myo-inositol cotransporter in MDCK cells. *Am J Physiol* 264:F20-F23, 1993
191. Yancey PH, Clark ME, Hand SC *et al.*: Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217:1214-1222, 1982
192. Yoo D, Kim BY, Campo C *et al.*: Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. *J Biol Chem* 278:23066-23075, 2003
193. Yoshikawa M, Uchida S, Yamauchi A *et al.*: Localization of rat CLC-K2 chloride channel mRNA in the kidney. *Am J Physiol* 276:F552-F558, 1999
194. Yun CC, Palmada M, Embark HM *et al.*: The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K<sup>+</sup> channel ROMK1. *J Am Soc Nephrol* 13:2823-2830, 2002
195. Zhang D, Pan ZH, Awobuluyi M, Lipton SA: Structure and function of GABA(C) receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:121-132, 2001
196. Zhao B, Lehr R, Smallwood AM *et al.*: Crystal structure of the kinase domain of serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 in complex with AMP PNP. *Protein Sci* 16:2761-2769, 2007
197. Zhou R, Patel SV, Snyder PM: Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *J Biol Chem* 282:20207-20212, 2007

## 10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Nierenaufbau .....	8
Abbildung 2	Nephronstruktur .....	10
Abbildung 3	Elektrolytrückresorption .....	12
Abbildung 4	Rückresorption in TAL und DCT .....	13
Abbildung 5	Cl <sup>-</sup> Reabsorption durch CLC-K1 .....	16
Abbildung 6	Cl <sup>-</sup> Reabsorption durch CLC-K2 .....	16
Abbildung 7	TonEBP Struktur.....	21
Abbildung 8	Nierenphysiologie von TonEBP .....	22
Abbildung 9	Renin-Angiotensin-Aldosteron System .....	26
Abbildung 10	Tubuläre Verteilung von CLC-K1/2 und Barttin.....	28
Abbildung 11	SGK1 mRNA Expression nach Hyperosmolarität .....	48
Abbildung 12	SGK1 Proteinexpression nach Hyperosmolarität.....	49
Abbildung 13	CLC-K1 mRNA Expression nach Hyperosmolarität.....	50
Abbildung 14	Barttin mRNA Expression nach Hyperosmolarität .....	50
Abbildung 15	CLC-K1 und Barttin Proteinexpression nach Hyperosmolarität ..	51
Abbildung 16	CLC-K1 und Barttin relative Proteinexpression nach Hyperosmolarität .....	52
Abbildung 17	p38- und phospho p38 MAPK Protein Expression nach Hyperosmolarität .....	53
Abbildung 18	p38- und phospho p38 MAPK relative Protein Expression nach Hyperosmolarität .....	53
Abbildung 19	phospho p38 MAPK Protein Expression nach Hyperosmolarität	54
Abbildung 20	SGK1, CLC-K1 und Barttin mRNA Expression nach Hyperosmolarität + MAPK/MEK1/2 Inhibition .....	55
Abbildung 21	SGK1 mRNA Expression nach SGK1-siRNA .....	56
Abbildung 22	SGK1 Protein Expression nach SGK1-siRNA .....	56
Abbildung 23	SGK1 mRNA Expression nach SGK1-siRNA + Hyperosmolarität .....	57
Abbildung 24	CLC-K1 mRNA Expression nach SGK1-siRNA + Hyperosmolarität .....	58
Abbildung 25	Barttin mRNA Expression nach SGK1-siRNA + Hyperosmolarität .....	58

---

Abbildung 26	MTT Assay nach SGK1 siRNA .....	59
Abbildung 27	TonEBP mRNA Expression nach Hyperosmolarität .....	61
Abbildung 28	AR mRNA Expression nach Hyperosmolarität.....	62
Abbildung 29	SMIT mRNA Expression nach Hyperosmolarität .....	63
Abbildung 30	BGT1 mRNA Expression nach Hyperosmolarität .....	64
Abbildung 31	TonEBP Proteinexpression aus Kern und Zytosol nach Hyperosmolarität .....	65
Abbildung 32	AR Proteinexpression nach Hyperosmolarität .....	66
Abbildung 33	AR Proteinexpression aus Kern und Zytosol nach Hyperosmolarität .....	66
Abbildung 34	BGT1 Proteinexpression nach Hyperosmolarität.....	66
Abbildung 35	Konzentrationsabhängiger Effekt von SB203580 .....	67
Abbildung 36	TonEBP mRNA Expression nach Hyperosmolarität + MAPK/MEK1/2 Inhibition .....	68
Abbildung 37	.....	69
Abbildung 38	TonEBP mRNA Expression unter verschiedenen TonEBP siRNA Konzentrationen .....	70
Abbildung 39	TonEBP mRNA Expression unter TonEBP siRNA .....	71
Abbildung 40	TonEBP Proteinexpression unter TonEBP siRNA .....	71
Abbildung 41	TonEBP mRNA Expression nach Hyperosmolarität + TonEBP siRNA .....	72
Abbildung 42	AR, BGT1 und SMIT mRNA Expression nach Hyperosmolarität + TonEBP siRNA.....	73
Abbildung 43	SGK1, CLC-K1 und Barttin mRNA Expression nach Hyperosmolarität + TonEBP siRNA.....	74
Abbildung 44	SGK1, TonEBP, AR, BGT1 und SMIT mRNA Expression nach Hyperosmolarität + SGK1 siRNA.....	75
Abbildung 45	AR Proteinexpression nach Hyperosmolarität + TonEBP siRNA	76
Abbildung 46	EMSA mit Oligos der beiden TonEBP Bindungsstellen .....	77
Abbildung 47	EMSA mit TonEBP Bindungsstelle 2 .....	78
Abbildung 48	TonEBP, AR, BGT1 und SMIT mRNA Expression in dehydrierten Nieren.....	80
Abbildung 49	SGK1, CLC-K1 und Barttin mRNA Expression in dehydrierten und hydriertenNieren.....	80

---

Abbildung 50	SGK1 und CLC-K1 Proteinexpression in dehydrierten und hydrierten Nieren.....	81
Abbildung 51	TonEBP Proteinexpression in dehydrierten und hydrierten Nieren .....	81
Abbildung 52	TonEBP Verteilung in hydrierten und dehydrierten Nieren .....	82
Abbildung 53	CLC-K1 Verteilung in hydrierten und dehydrierten Nieren.....	82
Abbildung 54	Aldosteron RIA aus Rattenurin von Tieren nach Hoch- und Niedrigsalzfütterung .....	83
Abbildung 55	SGK1, CLC-K1, Barttin und ENaC mRNA Expression nach Aldosteroninkubation.....	84
Abbildung 56	SGK1 und CLC-K1 mRNA Expression nach Aldosteroninkubation + Spironolacton .....	85

## 11. Vorträge, Publikationen und Poster

### 11.1. Vortragsverzeichnis

*Regulation von CLC-K1/Barttin unter salzabhängiger Steigerung der Osmolalität ist abhängig von SGK1.* Bergler T, **Jeblick R**, Stoelcker B, Krämer BK. 31. Wissenschaftlicher Kongress der deutschen Hochdruckliga Bochum, 2007 → Gewinn: Young Investigator Award

*Die Expression von CLC-k1/Barttin unter hyperosmolarer Inkubation in distaler Tubuluszelllinie und in vivo ist abhängig von SGK1.* Bergler T, **Jeblick R**, Then C, Reinhold S, Stoelcker B, Krämer BK. 39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Tübingen 2008

*Die innermedulläre Expression von CLC-K1/Barttin unter hyperosmolaren Inkubationsbedingungen in vitro und in vivo wird vermittelt durch TonEBP.* Bergler T, **Jeblick R**, Then C, Stoelcker B, Banas B, Krämer B.K. 39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Tübingen 2008

### 11.2. Publikationsverzeichnis

Bergler T, Stoelcker B, **Jeblick R**, Reinhold SW, Wolf K, Riegger GA, Krämer BK.

*CLC-K1/barttin dependency on serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 in high osmolarity in tubular cells and in vivo.* Kidney Int. 2008 Nov;74(9):1170-7.

Bergler T, **Jeblick R**, Jung B, Reinhold SW, Banas B, Krämer BK  
*High osmolality induced CLC-K1 expression depends on transkription factor TonEBP.* ( Bergler T and Jeblick R equally contributed) Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2010 (in Revision F-00640-2009)

Then C, Bergler B, **Jeblick R**, Jung B, Banas B, Krämer BK

*High osmotic stress promotes the upregulation and phosphorylation of zonula occludens-1. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2010 (eingereicht F-00031-2010)*

### 11.3. Posterbeiträge

*Regulation von CLC-K1/ Barttin unter Steigerung der Osmolarität ist abhängig von der serum- und glukokortikoid induzierbaren Kinase SGK1.*

Bergler T, Stoelcker B, **Jeblick R**, Reinhold SW, Krämer BK. 38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, München, 2007

*Upregulation of CLC-K1 and barttin by high osmolarity in epithelial kidney cells and in vivo is dependent on serum- and glucocorticoid inducible kinase 1.*

Bergler T, **Jeblick R**, Krämer BK. 1<sup>st</sup> International Symposium of the Collaborative Research Centre Sonderforschungsbereich 699; Molecular determinants of kidney function, Regensburg, 2007

*Upregulation of CLC-K1 and Barttin by High Osmolarity in Epithelial Kidney Cells Is Dependent on Serum- and Glucocorticoid Inducible Kinase 1.*

Bergler T, **Jeblick R**, Stoelcker B, Reinhold SW, Krämer BK. ASN Renal Week, San Francisco, 2007

*Effect of Loop Diuretics on the Tight Junction Formation in Cultured Renal Tubular Cells and in Rats in Vivo.*

Bergler T, Stoelcker B, Hoffmann U, **Jeblick R**, Krämer BK. ASN Renal Week, San Francisco, 2007

*Die Aktivierung innermedullärer tight-junction Moleküle unter hyperosmolarer Inkubation in vitro und in vivo. Bergler T, Then C, **Jeblick R**, Stoelcker B, Banas B, Krämer BK. 39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Tübingen 2008*

*Die Induktion von CLC-K1 unter hyperosmolaren Bedingungen wird durch TonEBP vermittelt.* Bergler T, **Jeblick R**, Banas B, Krämer BK.

1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Göttingen  
2009

## 12. Danksagung

Abschließen möchte ich mich bei allen bedanken, denen Dank gebührt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Krämer für die Überlassung des spannenden Themas, die freundliche Aufnahme in die nephrologische Arbeitsgruppe, fortlaufende Betreuung und für die Ermöglichung der Teilnahme an internationalen Kongressen zum fachlichen Gedankenaustausch.

Herrn Prof. Dr. Armin Kurz möchte ich herzlich für die biologische Betreuung und Begutachtung dieser Dissertation danken.

Herrn Prof. Dr. G. Riegger danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation in seinem Labor.

Herrn Prof. Dr. B. Banas danke ich für die Bemühungen bezüglich der Gastwissenschaftsstelle.

Mein Größter Dank bezüglich Ideenfindung, Projektplanung und bester Betreuung bei allen Problemen und Fragen, sowie für das Lektorat dieser Arbeit gilt Dr. Tobias Bergler.

Für hervorragende technische Assistenz und Hilfe bei methodischen Problemen danke ich Alexandra Wilhelm und Stefanie Ellmann.

Für die Klärung zahlreicher methodischer Probleme und Fragen danke ich herzlichst Dr. Benjamin Stoelcker, Brigitte Ruhland und Nico Jentsch.

Für die Hilfe beim RIA danke ich Gabriela Pietrcyk, Dr. Klaus Stark für die Genomatixanalyse und Barbara Spangler für die Hilfe beim EMSA.

Dem SFB699 danke ich für die freundliche Aufnahme und die Möglichkeit des Gedankenaustauschs mit anderen Arbeitsgruppen.

### **13. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

-----  
Roland Jeblick