

5. Abstract

The study presented here shows that in the continuous presence of DBcAMP (500 μ M), the levels of AQP2 mRNA (Fig. 3C) and protein (Fig. 2B) in primary cultured IMCD cells were similarly affected by osmolality and solute composition. AQP2 expression of IMCD cells kept in medium elevated to 600 mosmol/l by equimolar addition of sodium and urea (600N, control) dropped drastically when cells were instead exposed for 6 days to hypoosmolality (medium with 300 mosmol/l, 300N). Moreover, AQP2 expression was cut by half when cells were cultured in medium elevated to 600 mosmol/l solely by sorbitol compared with controls. A further elevation of medium osmolality to 900 mosmol/l by sorbitol resulted in a similarly faint AQP2 expression as observed for cells grown in 300N medium, whereas equimolar sodium and urea brought about 80 % of control levels (Figs. 2 and 3). The CMV promoter-governed AQP2 expression in WT-10 cells (Deen et al., 1997) was unaltered comparing cells grown in 300N or 600N medium, suggesting that osmolality and solute composition act on AQP2 transcription rather than affecting AQP2 mRNA or protein stability (Fig. 4). The short-term regulation of AQP2, i.e. the AVP-induced translocation of AQP2 from intracellular stores to the plasma membrane, appeared unaffected by osmolality and solute composition in IMCD cells (Fig. 8) as well as in WT-10 cells (Fig. 5). Addition of DBcAMP to the cell culture medium increased the phosphorylation of the transcription factor CREB dose-dependently (Fig. 10). AQP2 expression increased with DBcAMP concentrations up to 500 μ M (Fig. 9). Osmolality and solute composition did not influence CREB phosphorylation (Fig. 11), indicating that the effect of osmolality and solute composition was not exerted on AQP2 transcription by altered CREB phosphorylation. A further investigation of the role of different solutes in the regulation of AQP2 protein expression established that elevated urea alone (and thus osmolality) was not sufficient to keep up a robust AQP2 expression (Fig. 12), whereas elevation of tonicity by sodium did so in a concentration-dependent manner (Fig. 13). Thus, sodium-derived tonicity appeared to be the main signal required for upheld AQP2 expression. The promoting effect of elevated tonicity on AQP2 expression was slightly enhanced in the presence of urea (Fig. 12 and 14). The effects of hypo- and hypertonicity on AQP2 expression were reversible (Fig. 15). In response to hypertonicity, AQP2 expression increased to 50 % of controls within 2 days (Fig. 15 D), whereas hypotonicity reduced AQP2 expression to one-half within \sim 18 h (Fig. 15 C). In contrast, AQP2 expression increased more quickly in response to DBcAMP addition (to \sim 50 % within 24 h), but decreased more slowly upon DBcAMP withdrawal (to \sim 50 % within 72 h; Fig. 16). A potential binding-site for the transcription factor tonicity-responsive element binding protein (TonEBP), a tonicity-responsive-element (TonE), was located within the 5'-regulatory

region of the human, murine and rat AQP2 gene, with its position relative to the transcription initiation site being conserved amongst species (Fig. 17). Western blot experiments revealed that the expression of TonEBP is altered by osmolality and solute composition in IMCD cells (Fig. 18). Moreover, TonEBP abundance was mainly confined to the nuclei in IMCD cells kept in 600N medium, but appeared in the cytosol upon hypotonic challenge (Figs. 19 and 20). *Vice versa*, hypertonicity, but not urea-derived hyperosmolality, triggered a translocation of TonEBP from the cytosol to the nucleus of IMCD cells (Fig. 21). In addition, compounds implicated in interfering with the expression of TonE-regulated genes have been tested for their influence on the hypertonicity-elicited increase in AQP2 expression. Proteasome inhibition as well as treatment with rottlerin, a PKC δ inhibitor reported to inhibit TonEBP action in a PKC δ -independent fashion, abolished the increase in AQP2 expression expected with the onset of hypertonicity (Figs. 22, 23 and 24). Members of the mitogen-activated-protein kinase superfamily have been reported to be involved in signalling upon hypo- and hypertonic stress. Inhibition of ERK activation or p38 reduced the detrimental effect of hypotonicity on AQP2 expression and enhanced the promoting effect of hypertonicity (Figs. 26, 27 and 28). In the course of this work it was attempted to prove a direct involvement of TonEBP in the transcriptional regulation of AQP2 by introduction of a truncated, dominant-negative form of TonEBP (DN-TonEBP) fused to GFP (data not shown) into IMCD cells, which was expected to attenuate the hypertonic induction of AQP2 expression. A human myc-TonEBP construct (a kind gift of A. Rao and C. Lopez-Rodriguez) was used as template for PCR-amplification of native TonEBP and the truncated form. Unfortunately, IMCD cells proved highly resistant to the introduction of either the empty GFP-N1 vector, or vectors containing the DN-TonEBP construct or native TonEBP.

The results of this study, in conjunction with evidence accumulated in the literature, emphasize that the “classical signalling cascade” (V_2R stimulation by AVP, cAMP formation, increased PKA activity, Ser-133 phosphorylation of CREB and activation of the CRE-element in the AQP2 promoter) is not the sole pathway determining AQP2 expression. It is illustrated that AQP2 expression was strongly regulated by tonicity in IMCD cells, i.e. elevated tonicity was found to be a prerequisite for DBcAMP to elicit a high-level AQP2 expression. Moreover, it is shown that the presence of urea enhanced the beneficial effect of hypertonicity on the cAMP-dependent AQP2 expression. This study strongly suggests by several lines of evidence that the effect of tonicity is exerted at the level of transcription *via* activation of the TonE/TonEBP pathway. It is proposed that the activity of the TonE/TonEBP pathway may set the margin for the effect of the classical AVP-triggered pathway on AQP2 expression *in vivo*.

5.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in mit DBcAMP (500 μ M) dauerstimulierten, primär kultivierten IMCD Zellen aus der Rattenniere die Expression von AQP2 mRNA (Fig. 3C) und Protein (Fig. 2B) gleichartig durch die Osmolalität und die stoffliche Zusammensetzung des Kulturmediums beeinflusst wurde. Während IMCD Zellen eine starke AQP2 Expression in Medium dessen Osmolalität durch equimolare Zugabe von Natriumchlorid und Harnstoff auf 600 mosmol/l erhöht wurde (600N, Kontrolle) aufwiesen, fiel die AQP2 Expression drastisch ab wenn IMCD Zellen für 6 Tage hypoosmolarem Medium (300 mosmol/l, 300N) ausgesetzt wurden. Eine Erhöhung der Medienosmolalität durch Zugabe von Sorbitol auf 600 mosmol/l führte zu einer Halbierung der AQP2 Expression verglichen mit Kontrollzellen. Eine weitere Erhöhung der Medienosmolalität auf 900 mosmol/l durch Sorbitol führte zu einer sehr schwachen, der von in 300N Medium kultivierten Zellen entsprechenden AQP2 Expression. Wurde die Medienosmolalität durch equimolare Zugabe von Natriumchlorid und Harnstoff auf 900 mosmol/l erhöht, erreichten IMCD Zellen etwa 80 % der AQP2 Expression von Kontrollzellen (Figs. 2 and 3). Die Medienosmolalität hatte keinen Einfluß auf die konstitutive AQP2 Expression von WT-10 Zellen, deren AQP2 Expression durch einen viralen Promoter gesteuert wird (Deen et al., 1997; Fig. 4). Daher ist anzunehmen, dass in IMCD Zellen nicht die AQP2 mRNA -oder Proteininstabilität, sondern die AQP2 Transkription durch die Osmolalität beeinflusst wurde. Die Kurzzeitregulation von AQP2, d.h. die AVP-induzierte Translokation von AQP2 an die Plasmamembran, wurde weder in IMCD (Fig. 8) noch in WT-10 Zellen (Fig. 5) durch Veränderungen der Medienzusammensetzung beeinträchtigt. Durch steigende Konzentrationen von DBcAMP nahm die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB in IMCD Zellen, die in 600N Medium (Kontrolle) kultiviert wurden, dosisabhängig zu (Fig. 10). Bis zu einer DBcAMP Konzentration von 500 μ M nahm auch die AQP2 Expression zu, wurde aber bei höheren Konzentrationen schwächer (Fig. 9). Da die Osmolalität und stoffliche Zusammensetzung des Kulturmediums die AQP2 Expression auf Ebene der Transkription beeinflusste (Figs. 3 und 4), ohne die Phosphorylierung von CREB zu verändern (Fig. 11), wirken Änderungen in der Medienosmolalität sehr wahrscheinlich über einen cAMP-unabhängigen Signalweg. Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der effektiven Osmolalität (Tonizität) durch membranimpermeable Osmolyte, nicht aber eine Erhöhung der Medienosmolalität durch das membranpermeable Osmolyt Harnstoff, eine Voraussetzung für eine starke AQP2 Expression darstellt (Fig. 12 und 13). Dennoch wurde der stimulierende Einfluß von erhöhter Tonizität auf die AQP2 Expression durch die Anwesenheit von Harnstoff verstärkt (Figs.12 und 14). Die Effekte von Hypo- und

Hypertonizität auf die AQP2 Expression waren reversibel (Fig. 15). Während Hypotonizität (600N zu 300N Medium) innerhalb von ~18 h zu einer Halbierung der AQP2 Expression führte (Fig. 15 C), stieg die AQP2 Expression in IMCD Zellen die hypertone Medium ausgesetzt wurden (300N zu 600N Medium) erst innerhalb von 48 h auf 50 % des Niveaus von Kontrollzellen (kultiviert in 600N) an. Ausgelöst durch DBcAMP Entzug trat eine Halbierung der AQP2 Expression in IMCD Zellen (kultiviert in 600N Medium) erst nach 72 h auf (Fig. 16 C). Durch den kontinuierlichen Zusatz von 500 μ M DBcAMP erreichten IMCD Zellen, die zuvor für 96 h in 600N Medium ohne DBcAMP kultiviert worden waren, schon nach 24 h das AQP2 Expressionsniveau von Kontrollzellen (Fig. 16 D). Innerhalb der regulatorischen Region des AQP2 Genes von Mensch, Maus und Ratte wurde jeweils eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor tonicity-responsive element binding protein (TonEBP), ein tonicity-responsive element (TonE) lokalisiert, dessen Position in Bezug zum Transkriptionsstart innerhalb der Spezies konserviert ist (Fig. 17). Die Expression von TonEBP in IMCD Zellen wurde durch die Medienzusammensetzung beeinflusst (Fig. 18). In Kontrollzellen war TonEBP zum Großteil im Kern lokalisiert und trat nach Behandlung mit hypotonem Medium verstärkt im Cytosol auf (Figs. 19 und 20). Vice versa, löste Hypertonizität, nicht aber eine Erhöhung der Osmolalität durch Harnstoff, eine Verlagerung von TonEBP vom Cytosol in den Zellkern aus (Fig. 21). Der durch Hypertonizität ausgelöste Anstieg der AQP2 Expression konnte durch pharmakologische Inhibition des Proteasoms mit MG-132, sowie durch den PKC δ Inhibitor Rottlerin inhibiert werden (Figs. 22, 23 und 24). Es ist bekannt, dass beide Substanzen die Expression von TonE-regulierten Genen beeinträchtigen. Weiterhin ist beschrieben, dass Mitglieder der mitogen-activated protein kinase (MAPK) Familie an durch hyper- und hypotonen Stress ausgelöstem Signalling beteiligt sind. Hemmung der ERK Aktivierung durch PD98059 sowie Inhibition von p38 mittels SB203580 verminderte die durch Hypotonizität ausgelöste Reduktion der AQP2 Expression und verstärkte den durch Hypertonizität bedingten Anstieg der AQP2 Expression in IMCD Zellen (Figs. 26, 27 und 28). Weiterhin wurde versucht eine direkte Beteiligung von TonEBP an der Regulation von AQP2 durch Transfektion von IMCD Zellen mit einer GFP markierten, verkürzten, dominant negativen Form von TonEBP (DN-TonEBP) nachzuweisen, welche den durch Hypertonizität ausgelösten Anstieg der AQP2 Expression abschwächen sollte. Leider waren die primär kultivierten IMCD Zellen weder mit dem leeren pEGFP-N1 Vector noch mit den Vektoren die entweder DN-TonEBP oder TonEBP enthalten, transfizierbar (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, zusammen mit Belegen aus der Literatur, verdeutlichen dass die „klassische“ Signalkaskade (V_2 R Stimulation durch AVP, Bildung von cAMP, erhöhte PKA Aktivität, Ser-133 Phosphorylierung von CREB und Aktivierung des CRE- Elements

innerhalb des AQP2 Promoters) nicht allein die AQP2 Expression bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Tonizität eine Voraussetzung für eine durch DBcAMP induzierte, starke AQP2 Expression ist. Durch Anwesenheit von Harnstoff wird der begünstigende Effekt von erhöhter Tonizität auf die DBcAMP induzierte AQP2 Expression verstärkt. Diese Studie weist durch mehrere Belege darauf hin, dass der Effekt der Tonizität auf Ebene der Transkription und sehr wahrscheinlich über die Aktivierung des TonE/TonEBP Signalweges erfolgt. Es wird vorgeschlagen, dass die Aktivität des TonE/TonEBP Signalweges den stimulatorischen Effekt der klassischen, durch AVP ausgelösten Signalkaskade auf die AQP2 Expression *in vivo* bestimmt.