

Identifizierung und Charakterisierung
niedermolekularer Verbindungen zur Hemmung der
Umverteilung von Aquaporin-2 in renalen Hauptzellen

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

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

vorgelegt von

Jana Bogum
aus Altdöbern

2012

Die vorliegende Arbeit wurde im November 2008 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter der Leitung von PD Dr. Enno Klußmann begonnen und im März 2012 am Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin (MDC) abgeschlossen.

1. Gutachter: PD Dr. Enno Klußmann
 2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig
- Disputationstermin: 15. August 2012

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, im Mai 2012

Jana Bogum

Inhaltsverzeichnis

I. Begriffe und Abkürzungen	7
1. Einleitung	10
1.1 Die Niere – Funktion und Aufbau	10
1.2 Wasserrückresorption und Aquaporin-2	11
1.3 Einfluss von post-translationalen Modifikationen auf die AQP2-Lokalisation	13
1.4 Interaktion von AQP2 mit Transportproteinen und Zytoskelett	15
1.5 Direkte Interaktionspartner von AQP2.....	17
1.6 Bekannte Mechanismen zur Kontrolle der AQP2-Umverteilung	18
1.6.1 Stimulatorische Einflüsse auf die AQP2-Translokation	18
1.6.2 Hemmung der AVP-induzierten Umverteilung von AQP2	22
1.8 Pathophysiologie der AVP-vermittelten AQP2-Umverteilung.....	23
1.9 Zielstellung der Arbeit.....	27
2. Materialien und Methoden	28
2.1 Materialien.....	28
2.1.1 Geräte und Software.....	28
2.1.2 Chemikalien.....	29
2.1.3 Substanzen und Fluoreszenzfarbstoffe.....	29
2.1.4 Puffer und Lösungen	30
2.1.5 Zelllinien	30
2.1.6 Antikörper	31
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Transfektion von HEK293-Zellen mit AQP2-Plasmid-DNA	32
2.2.2 Präparation von primären innermedullären Sammelrohrzellen (IMCD-Zellen).....	32
2.2.3 Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der AQP2- Umverteilung.....	33
2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Mikroskopie.....	34
2.2.5 Analyse der Kolokalisation von AQP2 mit Golgi-Markerproteinen.....	34
2.2.5 Intrazelluläre pH-Wert-Messung.....	35
2.2.7 Western Blot.....	36
2.2.8 cAMP-Radioimmunoassay (cAMP-RIA)	36
2.2.9 PKA-Aktivitätsbestimmung	37
2.2.10 Zellvitalitätsbestimmung mit dem MTT-Test	38
2.2.11 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	39
2.2.12 LC-MS.....	39
2.2.13 ¹ H- bzw. ¹³ C-NMR-Spektroskopie.....	40
2.2.14 Dünnschicht-Chromatographie (DC)	40
2.2.15 Säulen-Chromatographie (SC)	40
2.2.16 Statistik.....	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Entwicklung und Durchführung eines zellbasierten Hochdurchsatzverfahrens.....	42
3.1.1 Etablierung eines Zellsystems	42
3.1.1.1 HEK293-Zellen	42
3.1.1.2 MCD4-Zellen	43
3.1.2 Identifizierung von Inhibitoren der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung.....	45
3.2 4-Acetyldiphyllin.....	49
3.2.1 Toxizitätsbestimmung	49
3.2.2 Quantifizierung der Hemmung von cAMP-abhängiger AQP2-Umverteilung.....	50
3.2.3 Analyse des Wirkmechanismus von 4-Acetyldiphyllin	52

3.2.3.1 4-Acetyldiphyllin und Bafilomycin A1 erhöhen die pH-Werte intrazellulärer Vesikel.....	53
3.2.3.2 4-Acetyldiphyllin hemmt die S256-Phosphorylierung von AQP2 ohne die cAMP-Synthese oder PKA-Aktivität zu beeinflussen	54
3.2.3.3 Kolokalisationsstudien von AQP2 mit Golgi-Markerproteinen.....	58
3.2.3.4 4AD hat keinen Effekt auf die S261-Phosphorylierung von AQP2.....	59
3.3 Triazolpropenon	61
3.3.1 Toxizitätsbestimmung	61
3.3.2 Quantifizierung der Hemmung von cAMP-abhängiger AQP2-Umverteilung.....	62
3.3.2 Kommerziell erhältliche Derivate des Triazolpropenons.....	64
3.3.2.1 Toxizitätsbestimmung	64
3.3.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	64
3.3.3 Synthese weiterer Derivate der Triazolpropenon-Leitstruktur.....	65
3.3.3.1 Synthese von (2E)-3-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)prop-2-en-1-on (JB01)	69
3.3.3.2 Synthese von 1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethan-1-on (JB02)	69
3.3.3.3 Synthese von 3-(4-chloro-2-hydroxyphenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)prop-2-en-1-on (JB03).....	70
3.3.3.4 Synthese von 1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-pyrazol-1-yl)ethan-1-on (JB04) 71	
3.3.3.5 Synthese von 3-(4-chloro-2-hydroxyphenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-pyrazol-1-yl)prop-2-en-1-on (JB05).....	71
3.3.5 Biologische Testung der dargestellten Derivate.....	72
3.3.5.1 Toxizitätsbestimmung	72
3.3.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	73
3.3.6 Testung eines humanmedizinisch genutzten Azolantimykotikums	74
3.3.6.1 Toxizitätsbestimmung für Fluconazol.....	74
3.3.6.2 Fluconazol induziert die AQP2-Umverteilung in MCD4-Zellen.....	75
4. Diskussion	77
4.1 Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von Hemmstoffen der AQP2-Umverteilung	77
4.2 Charakterisierung von 4-Acetyldiphyllin als Inhibitor der AQP2-Umverteilung.....	78
4.3 Testung und Charakterisierung von Triazolpropenonen	81
5. Ausblick.....	86
6. Zusammenfassung.....	88
7. Abstract	90
8. Poster	92
9. Publikationen	92
10. Danksagung.....	93
11. Referenzen.....	94
12. Anhang	104
A	104
B	104
C	105
D	116
E	117
F	118

G	119
H	120

I. Begriffe und Abkürzungen

4AD	4-Acetyldiphyllin
AC	Adenylylcyclase
ADH	Adiuretin, Antidiuretisches Hormon, Arginin-Vasopressin
AKAP	Proteinkinase-A-Ankerprotein
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AQP2	Aquaporin-2 Wasserkanal
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin, Antidiuretisches Hormon, Adiuretin, ADH
Baf A1	Bafilomycin A1
BSA	bovines Serumalbumin
C	katalytische Untereinheit der Proteinkinase A
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CDI	Diabetes insipidus centralis
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
DTT	Dithiothreitol, Reduktionsmittel im Lysepuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	endothelialer Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Epac	<i>exchange protein activated by cAMP</i>
ERGIC	Endoplasmatisches Retikulum Golgi-Intermediärkompartiment
EtOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum
FSK	Forskolin
G-CK	Golgi-Apparat Casein-Kinase
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat

H89	N-[2-[[3-(4-Bromphenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-isoquinolinsulfonamid-dihydrat-dihydrochlorid
HCl	Salzsäure
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
LC-ESI-MS	Flüssigchromatographie-Elektronenspray-Massenspektrometrie
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaOH	Natronlauge, Natriumhydroxid
NDI	nephrogener Diabetes insipidus
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernzresonanzspektroskopie
NO	Stickstoffmonoxid
NPA-Motiv	Asparagin-Prolin-Alanin-Motiv in der AQP2-Proteinsequenz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDE	Phosphodiesterase
PGE	Prostaglandin
Phalloidin	Toxin des Knollenblätterpilzes
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PP	Proteinphosphatase
pS256-AQP2	an Serin-Rest 256 phosphoryliertes AQP2
pS261-AQP2	am C-terminalen Serin-Rest 261 phosphoryliertes AQP2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLB	Standardlysepuffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TP	Triazolpropenon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC-Phalloidin	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat-markiertes Phalloidin

UTP	Uridintriphosphat
V-ATPase	vakuoläre ATPase, ATP-abhängige Protonenpumpe
V2R	Vasopressin-V2-Rezeptor
δ_6 -DMSO	deuteriertes DMSO

1. Einleitung

1.1 Die Niere – Funktion und Aufbau

Die paarig angelegten Nieren sind von einer Hülle umgeben und lassen sich in Nierenrinde, Nierenmark und Nierenbecken untergliedern [1]. Die funktionelle Einheit der Niere, ein Nephron, besteht aus dem Glomerulus (Nierenkörperchen) und dem daran angeschlossenen Tubulussystem (Abb. 1). In den Glomeruli wird kontinuierlich Primärharn von makroskopischen Blutbestandteilen, wie Erythrozyten und Serumalbumin, abgeschieden.

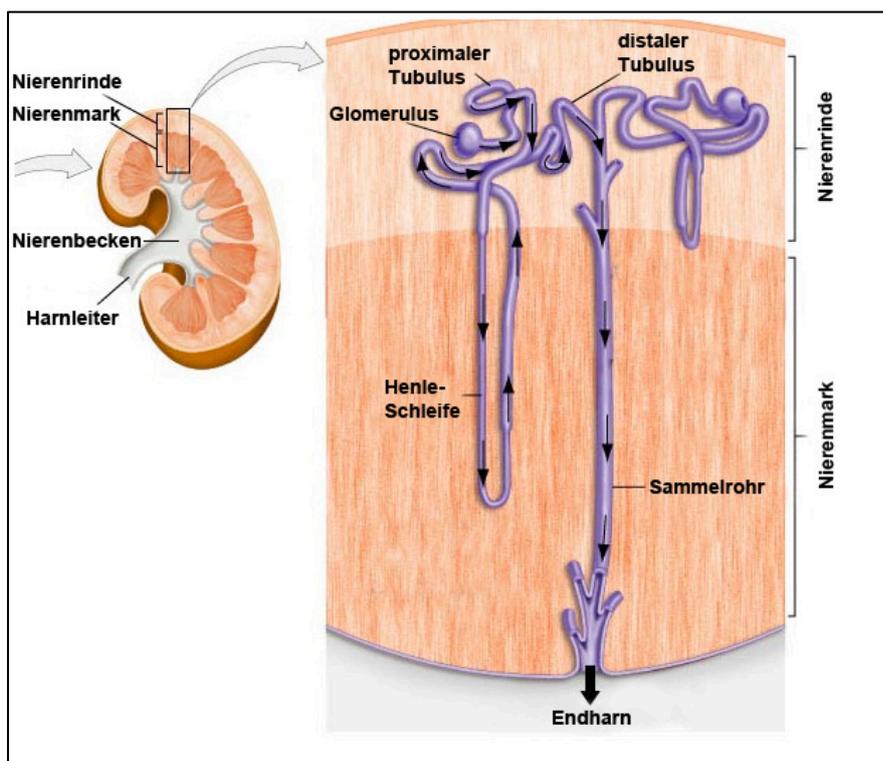


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Niere.

Links ist ein Längsschnitt durch die Niere gezeigt, rechts eine segmentale Vergrößerung mit Nierenrinde und Nierenmark. (adaptiert nach BIOS 100, Fall 2004; M. Muller, Dep. of Biological Sciences, University of Illinois, Chicago; USA)

Im angeschlossenen Tubulus werden Wasser und Elektrolyte rückresorbiert und andere Bestandteile, wie Protonen und Bikarbonat, sezerniert. Die über eine Millionen Nephrone münden in Sammelrohre, die den Endharn ins Nierenbecken leiten. Der Endharn wird über den Harnleiter (Ureter) in die Harnblase geleitet und ausgeschieden. So erhalten die Nieren das Säure-Base-Gleichgewicht und die Elektrolyt- und Wasserhomöostase.

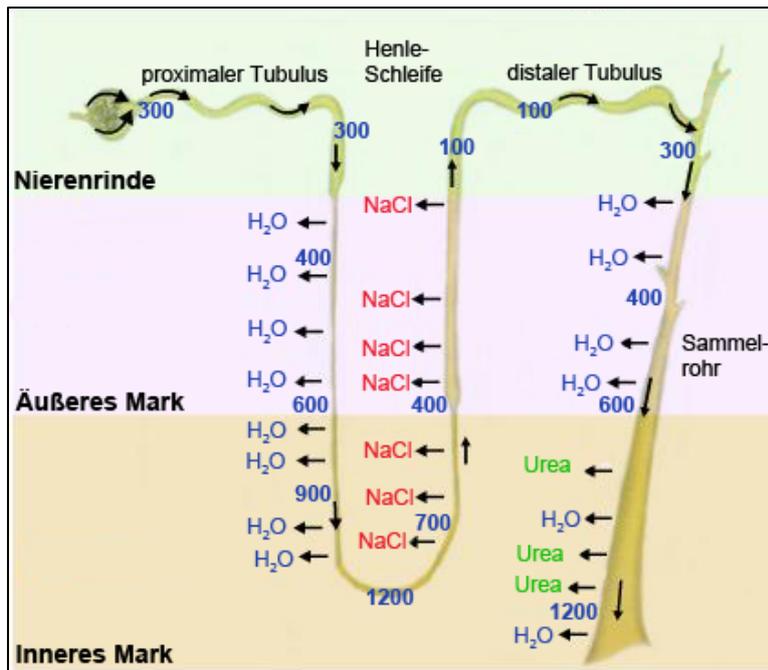


Abb. 2: Schematische Darstellung der Resorptionsvorgänge im Nephron.

Die Produktion von konzentriertem Harn ist mit Veränderungen der Harnosmolalität (blau, Angabe in mosm/L; adaptiert nach „Osmoregulation and Excretion in Animals“, TutorVista) über das gesamte Tubulussystem assoziiert.

Der Tubulusapparat ist in proximalen Tubulus, distalen Tubulus und Sammelrohr unterteilt. Absteigender proximaler Tubulus und aufsteigender distaler Tubulus bilden aufgrund ihrer Anordnung die sogenannte Henle-Schleife (Abb. 1 und 2).

Im proximalen Tubulus einschließlich des absteigenden Astes der Henle-Schleife wird der größte Teil an Wasser (etwa 90%) rückresorbiert [2]. Dem hyperosmolaren Primärharn werden im absteigenden Bereich der Henle-Schleife und im distalen Tubulus weitere Elektrolyte entzogen. Das Sammelrohr ist luminal wasserundurchlässig, kann aber durch den Einbau von Aquaporin-2-Wasserkanälen, dem Harn noch etwa 10% Wasser entziehen, was einer Gesamtkapazität von bis zu 20 Litern am Tag entspricht. Dadurch wird die finale Osmolalität des Endharnes bestimmt.

1.2 Wasserrückresorption und Aquaporin-2

Veränderungen der Blutosmolalität werden von Osmorezeptoren des Hypothalamus anhand von Na^+ -Ionen-Konzentrationen wahrgenommen [3]. Bei Hypernatriämie oder Hypovolämie wird über die hypothalamisch-hypophysäre Achse Antidiuretisches Hormon (ADH, Adiuretin), im Folgenden als Arginin-Vasopressin (AVP) bezeichnet, in die Blutbahn ausgeschüttet [4, 1]. AVP bindet an den Vasopressin-V2-Rezeptor (V2R) auf Hauptzellen des Sammelrohres. Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors führt zur Stimulation

von Adenylylcyclasen (AC) und der Bildung des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Der Botenstoff cAMP bindet an die regulatorischen Untereinheiten von cAMP-abhängiger Proteinkinase A (PKA). Die gebundenen katalytischen Untereinheiten (C) dissoziieren nach Konformationsänderung von den regulatorischen Untereinheiten (R). Die intrazellulär auf Vesikeln lokalisierten Aquaporin-2-(AQP2)-Wasserkanäle werden C-terminal durch PKA phosphoryliert und translozieren dann in die Plasmamembran der Hauptzellen (Abb. 3). Wassermoleküle aus dem Primärharn diffundieren entlang eines osmotischen Gradienten in die Zellen (Abb. 2) [2, 5] und werden durch konstitutiv exprimierte Aquaporin-3 (AQP3) und Aquaporin-4 (AQP4) ins Blut abgegeben (Abb. 3). Nach Wiederherstellung der physiologischen Na^+ -Ionen-Konzentration sinkt der AVP-Blutspiegel ab, AQP2 internalisiert und das Sammelrohr wird wasserundurchlässig.

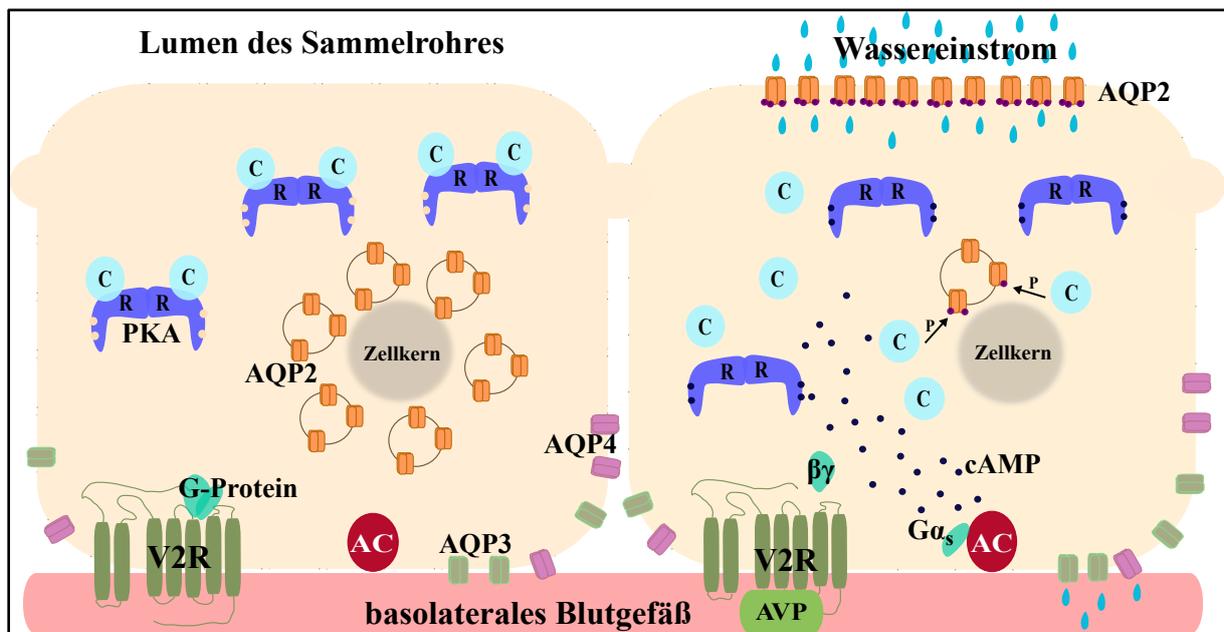


Abb. 3: Übersicht zur AVP-vermittelten AQP2-Umverteilung in renalen Hauptzellen.

Aus vier identischen AQP2-Proteinen formiert sich ein Homotetramer, in dem mindestens drei der vier Einheiten an S256 phosphoryliert sein müssen, um eine Translokation in die Plasmamembran zu ermöglichen [6]. Die Kanalpore wird von je einem NPA-Motiv (Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin) in der ersten intrazellulären Schleife (NPA1, Aminosäuren 68-70) und der dritten extrazellulären Schleife (NPA2, Aminosäuren 184-186) der AQP2-Sequenz geformt (Abb. 4 und 5). Der Kanalporendurchmesser entspricht mit 2.8 Å etwa der Größe eines Wassermoleküls und limitiert damit die Kapazität des Kanals für den Durchtritt eines einzelnen Wassermoleküls je Zeiteinheit [7].

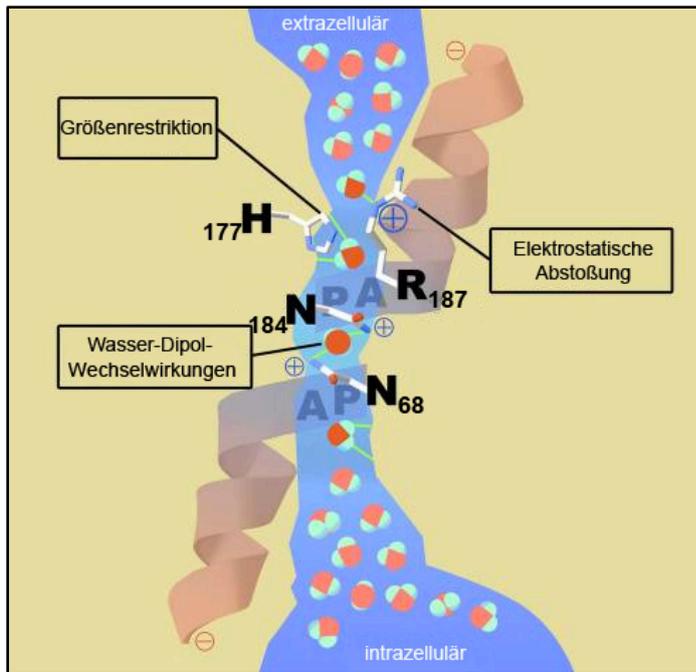


Abb. 4: Schematische Darstellung des Wassertransportes durch eine AQP2-Kanalpore.
(adaptiert nach D. Kozono *et al.*; J Clin Invest.; 2002 Jun; 109(11):1395-9)

Der Transport von Wassermolekülen wird durch Wechselwirkungen mit verschiedenen Aminosäuren im Bereich der Kanalpore bestimmt. Der Histidin-Rest H177 verengt den Bereich vor der Kanalpore auf etwa 8 Å. Der Arginin-Rest R187 (Abb. 4) vermittelt über seine positive Partialladung die elektrostatische Abstoßung von Hydronium-Ionen (H_3O^+) und anderen positiv-geladenen Ionen. Durch Wasser-Dipol-Wechselwirkungen innerhalb der Kanalpore wird das Wassermolekül räumlich ausgerichtet um passieren zu können. Mutationen im Bereich der Kanalpore z. B. R187C oder N68S sind als genetische Ursachen für nephrogenen Diabetes insipidus (NDI) beschrieben worden [8-10]. Aufgrund von Proteinfaltungsdefekten der AQP2-Kanalpore werden nicht-funktionelle AQP2-Proteine synthetisiert und die Betroffenen leiden unter Harnkonzentrierungsstörungen.

1.3 Einfluss von post-translationalen Modifikationen auf die AQP2-Lokalisation

Aktivierte PKA phosphoryliert AQP2 am C-terminalen Serin-Rest 256 (S256) [11, 12]. Dies ist der zentrale Stimulus für die Umverteilung von AQP2 in die luminale Plasmamembran und die anschließende Feinregulation der Blutosmolalität.

Die AQP2-Proteinsequenz enthält zahlreiche Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen, darunter PKA, PKG, PKC, Caseinkinase II [13]. Im C-Terminus von AQP2 sind neben S256 drei Phosphorylierungsstellen enthalten: die Serin-Reste 261, 264 und 269 (Abb. 5). Die PKA-abhängige Phosphorylierung von AQP2 an S256 löst nach gegenwärtigem Erkenntnisstand nicht nur die Umverteilung und Plasmamembran-Lokalisation von AQP2

aus, sondern ist auch an der Regulation der Phosphorylierungen an S264 und S269 beteiligt. Die Kinasen, die S264 und S269 phosphorylieren sind bisher nicht bekannt und die Bedeutung dieser Phosphorylierungen kann gegenwärtig nicht hinreichend belegt werden. Phosphorylierungsexperimente mit C-terminalen AQP2-Peptiden zeigten aber, dass PKA allein nicht in der Lage ist S261, S264 oder S269 zu phosphorylieren [14]. Die Phosphorylierung an S269 nimmt stark nach Stimulation mit Wirkstoffen, die den cAMP-Spiegel steigern, zu. An S269 phosphoryliertes AQP2 wurde überwiegend in der Plasmamembran nachgewiesen [15]. Die Phosphorylierung an S261 (pS261) kann durch verschiedene Kinasen einschließlich p38-Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) und Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK) 1 und 5 ausgeführt werden [16, 17]. Diese Phosphorylierung ist mit der intrazellulären Lokalisation von AQP2 assoziiert und nimmt nach V2R-Stimulation ab. Der AVP-abhängige Abfall an pS261 ist mit verringertem proteasomalen Abbau und einer Zunahme an AQP2-Gesamtprotein assoziiert [16].

Das Übertragen von Ubiquitin auf Proteine kann vielfältige nachgeschaltete Effekte vermitteln, wie Endozytose, Abbau und veränderte Interaktion mit anderen Bindungspartnern und Proteinen [18]. Die Ubiquitinierung von AQP2 am C-terminalen Lysinrest K270 (Abb. 5) beeinflusst ebenfalls die AQP2-Lokalisation. Die Mono-Ubiquitinierung stellt sich als ein primäres Signal für die Internalisierung und den Transport von AQP2 zurück in Endosomen dar, geht offenbar der Phosphorylierung an S261 voraus und kann damit die intrazelluläre Lokalisation von AQP2 regeln [19, 20].

AQP2 weist eine N-Glykosylierungsstelle am Asparagin-Rest (N123) in der zweiten extrazellulären Schleife auf. Western-Blot-Untersuchungen haben unglykosylierte, mannosereiche und komplex glykosylierte Formen von AQP2 nachgewiesen [16]. Allerdings ist in Abhängigkeit von der genutzten Zelllinie und den eingesetzten AQP2-Antikörpern in einigen Fällen lediglich die unglykosylierte Form von AQP2 dargestellt worden [6]. Die Rolle dieser N-Glykosylierung für die AQP2-Umverteilung und Lokalisation ist nicht abschließend bewertbar. Nach Behandlung von AQP2-exprimierenden Zellen mit Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung [21], oder nach Expression von einer AQP2-Mutante, N123Q-AQP2, die nicht glykosyliert werden kann [22], war keinerlei Translokation von AQP2 in die Plasmamembran zu beobachten. In einer anderen Studie an LLC-PK1-Zellen konnte, obwohl eine Glykosylierung nicht nachweisbar war, die Translokation von AQP2 in die Plasmamembran induziert werden [11]. Damit lässt sich gegenwärtig keine klare Bewertung der AQP2-Glykosylierung vornehmen.

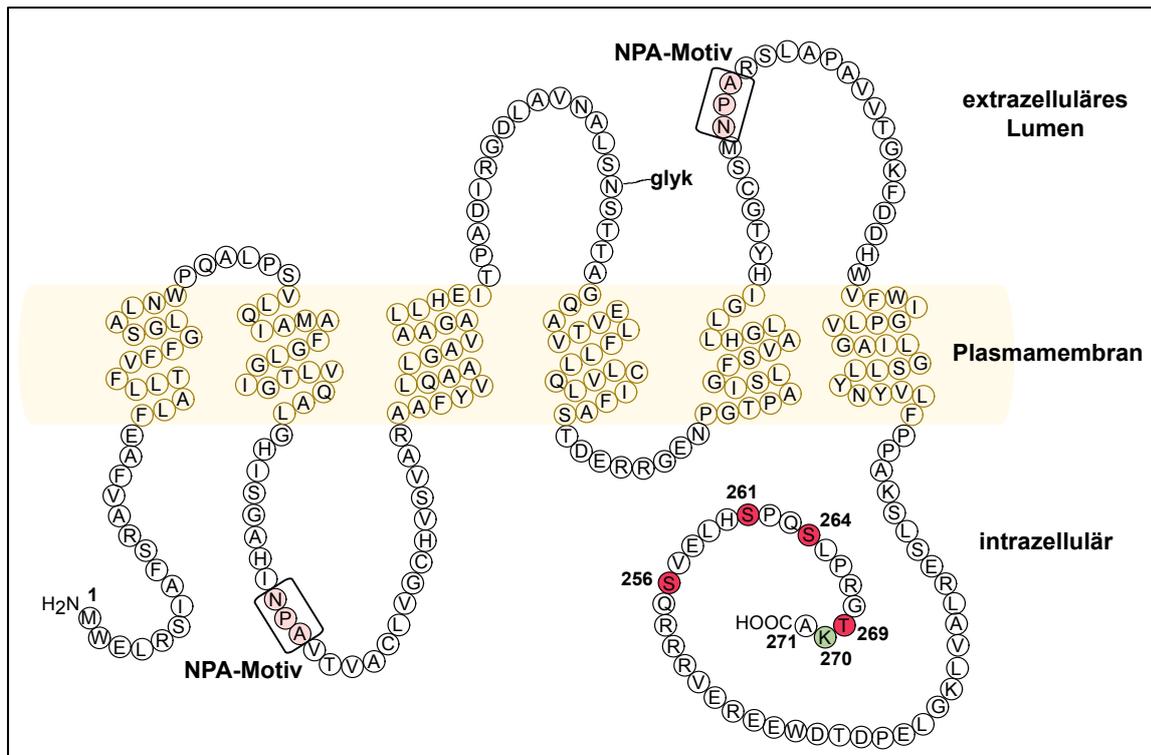


Abb. 5: AQP2-Proteinsequenz (human).

Die C-terminalen Konsensusstellen für Serin-/Threoninkinasen (rot) und der C-terminale Lysinrest K270 (grün) sind dargestellt. Die NPA-Motive sind blass rot dargestellt (adaptiert nach D. Bichet, Am J Med.; 1998 Nov; 105(5):431-42).

1.4 Interaktion von AQP2 mit Transportproteinen und Zytoskelett

Nach Absinken des intrazellulären cAMP-Spiegels z. B. durch inhibitorische Phosphorylierung der Adenylylcyclase [23] oder Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen wird AQP2 internalisiert und in Endosomen transportiert um erneut in die Plasmamembran zu gelangen (*Recycling*) oder aber proteasomal bzw. lysosomal abgebaut zu werden. Für die *Recycling*-Maschinerie ist die Aufrechterhaltung eines niedrigen endosomalen und intravesikulären pH-Wertes von großer Bedeutung [24]. Vakuoläre H⁺-ATPasen (V-ATPasen) pumpen konstitutiv Protonen in diese Kompartimente und ermöglichen dadurch das Schwellen von Vesikeln und ihren Transport zur Plasmamembran mit anschließender Fusion [25, 26]. Gustafson *et al.* haben die Bedeutung der Vesikelazidität für das konstitutive *Recycling* von AQP2 in polarisierten Nierenzellen des Schweines (LLC-PK₁-Zellen) gezeigt. Das konstitutive *Recycling* von AQP2 wurde durch Verringerung der Inkubationstemperatur (20°C) und auch die Behandlung der Zellen mit Bafilomycin A1, einem spezifischen V-ATPasen-Hemmer, blockiert [24].

Es wurden bisher verschiedene Proteine identifiziert, die eine Rolle bei der Regulation der AQP2-Lokalisation spielen. Procino *et al.* [27] oder auch Liebenhoff und Kollegen [28]

liefern Hinweise, dass eine Reihe von SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Proteinen darunter Vesikel-assoziiertes Membranprotein 2 (VAMP2) für die Fusion von AQP2-haltigen Vesikeln mit der Plasmamembran wichtig ist [29, 30]. Weitere Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine, wie Dynein und Dynactin sind auf AQP2-haltigen Vesikeln nachgewiesen worden [31, 32]. Das Motorprotein Myosin Vb und sein vesikulärer Rezeptor Rab11, die beim Protein-*Recycling* eine Rolle spielen, sind auch für die Translokation von AQP2 von Bedeutung [33]. Myosin Vb kolokalisiert mit AQP2 auf Vesikeln in renalen Hauptzellen und in histologischen Schnitten von Rattennieren. Die Expression von dominant-negativen Formen von Myosin Vb oder Rab11-FIP2 (Rab11 *family interacting protein 2*) verhinderte die cAMP-abhängige AQP2-Umverteilung in einer Sammelrohr-Zelllinie des Kaninchens (CD8-Zellen). Die kleine GTPase RhoA reguliert die AQP2-Lokalisation. PKA hemmt RhoA durch Phosphorylierung. Dadurch kommt es zur teilweisen Depolymerisation des Aktin-Zytoskelettes und der Translokation von AQP2 in die Plasmamembran [34]. Auch das Ezrin-Radixin-Moesin-(ERM)-Protein Moesin reguliert das Aktin-Zytoskelett durch Verknüpfung von Aktin-Filamenten mit der Plasmamembran und ermöglicht damit den Transport von AQP2-haltigen Vesikeln in die Plasmamembran [35]. Tropomyosin-5b (Tm5b) stellt einen negativen Regulator der AQP2-Tanslokation dar. Noda *et al.* konnten zeigen, dass die Interaktion von AQP2 mit G-Aktin (globuläres Monomer) nach cAMP-Anstieg und AQP2-Phosphorylierung abnimmt. Damit steigt die Affinität von AQP2 für Tm5b und die Bindung von Tm5b an F-Aktin (filamentöses Aktin) nimmt ab, was die Destabilisierung der Aktinpolymere als Voraussetzung der AQP2-Umverteilung zur Folge hat [36].

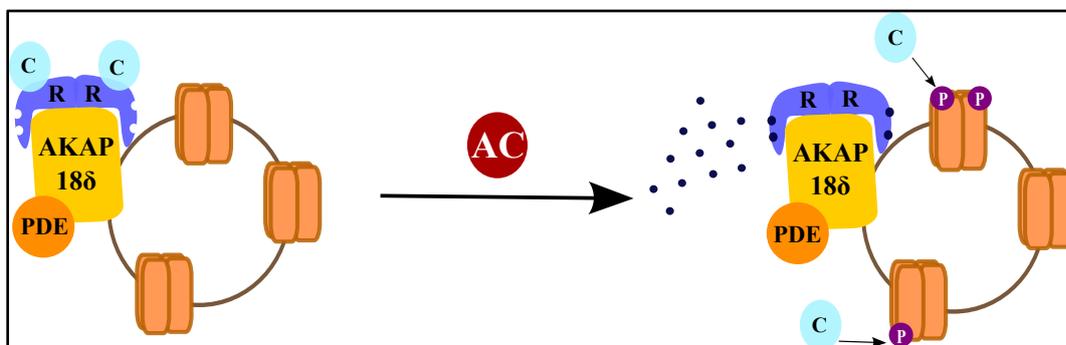


Abb. 6: AQP2-haltiges Vesikel mit assoziiertem AKAP-PKA-PDE-Komplex.

Die Interaktion von PKA mit Proteinkinase-A-Ankerproteinen (AKAP) ist Voraussetzung für die AVP-abhängige AQP2-Umverteilung (Abb. 6). PKA wird von AKAP an AQP2-haltige Vesikel gebunden. AKAP18δ kolokalisiert mit AQP2 auf den Vesikeln und bildet damit die Grundlage für einen Komplex aus PKA und auch Phosphodiesterase 4D (PDE4D) und

ermöglicht sowohl die Phosphorylierung von AQP2 durch PKA, als auch den lokalen Abbau von cAMP durch PDE [37, 38].

1.5 Direkte Interaktionspartner von AQP2

Bisher sind nur wenige Proteine bekannt, die direkt mit AQP2 interagieren. Das Myelin- und Lymphozyten-assoziierte Protein (MAL) ist membran-assoziiert und spielt eine Rolle bei der apikalen Sortierung von Proteinen. MAL verringert die Internalisierung von AQP2 und steigert damit die Menge von AQP2 in der Plasmamembran. Es wurde in Gegenwart von MAL eine Zunahme an S256-phosphoryliertem AQP2, sowie reduzierte AQP2-Internalisierung nachgewiesen [39]. *Lysosomal trafficking-regulator-protein 5* (LIP5) wurde aufgrund seiner Wechselwirkung mit S256A-AQP2, einer Mutation die eine nicht-phosphorylierbare Form von AQP2 darstellt, identifiziert [40]. Allerdings war die Bindung von LIP5 an AQP2 unabhängig vom Phosphorylierungsstatus oder einer Ubiquitinierung an K270. Die Unterdrückung der LIP5-Proteinexpression führte zu einer Reduktion des lysosomalen Abbaus von AQP2 und zeigt damit eine mögliche Funktion von LIP5 auf. Die direkte Interaktion von AQP2 mit Ubiquitin wurde bereits unter post-translationalen Modifikationen besprochen. Noda *et al.* haben mit *signal-induced proliferation-associated protein 1* (SPA-1) ein weiteres direkt mit AQP2 interagierendes Protein identifiziert [41]. Bei SPA-1 handelt es sich um ein GTPase-aktivierendes Protein, das für die AQP2-Translokation erforderlich zu sein scheint. In Mäusen, die kein SPA-1 exprimieren, war die Umverteilung von AQP2 in die Plasmamembran vermindert. Des Weiteren wurde eine Interaktion von AQP2 mit Hitzeschockprotein 70 (Hsc70), einem Bestandteil des Endozytose-Apparates, der Clathrin-vermittelte Endozytose reguliert, nachgewiesen [42]. In Experimenten mit einer AQP2-exprimierenden Zelllinie des Schweines (LLC-AQP2) nahm die Bindung von Hsc70 an AQP2 nach Stimulation der AQP2-Umverteilung mit AVP zu. Die Expression einer inaktiven Hsc70-Proteinvariante verursachte die Anreicherung von AQP2 in der Plasmamembran bei gleichzeitig erniedrigter AQP2-Endozytose. Diese Beobachtungen weisen daraufhin, dass Hsc70 bei der Endozytose von AQP2 eine Rolle spielt.

allerdings nicht klar, ob cGMP Proteinkinase G (PKG) aktiviert, welche AQP2 phosphoryliert und die Translokation verursacht oder ob andere Mechanismen eine Rolle spielen, die zur Aktivierung von PKA führen können. Eine physiologische Relevanz wird kontrovers diskutiert, da überwiegend nur in Zellmodellen eine Induktion der AQP2-Umverteilung gezeigt werden konnte und es in Tiermodellen auch zum gegenteiligen diuretischen Effekt gekommen ist [49, 50]. Zur Aktivierung des cGMP-Signalweges und der Stimulation der AQP2-Umverteilung *in vitro* wurden neben atrialem natriuretischem Peptid (ANP), Stickstoffmonoxid [51] und NO-Donoren wie L-Arginin und Nitruressid-Natrium auch die bei erektiler Dysfunktion und pulmonaler Hypertonie wirkungsvollen Phosphodiesterase-5-Hemmer (Sildenafil) [52] eingesetzt.

Lokal sind erhöhte Ca^{2+} -Ionen-Konzentrationen für die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran sehr wichtig [53, 54]. Die Rolle von Calcium-Ionen für die AQP2-Translokation ist dagegen noch immer nicht klar. AVP verursacht neben der Erhöhung des cAMP-Spiegels auch vorübergehend eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen-Konzentration und anhaltende Calciumoszillationen [55-57]. Es wurde auch beobachtet, dass der Einsatz von Calcium-Komplexbildnern die Wasserpermeabilität des Sammelrohres hemmt. Des Weiteren störten Calmodulin- und Ryanodin-Blocker die AVP-vermittelte AQP2-Umverteilung [58]. Allerdings konnte auch nachgewiesen werden, dass ein Anstieg an cAMP hinreichend für die Translokation von AQP2 ist ohne zusätzlich erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Ionenwerte zu erfordern [59]. Der cAMP-Effektor Epac 2 scheint auch zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Kanälen zu führen [60]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung von Epac mit einem Epac-selektiven cAMP-Analogen neben der Mobilisierung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen auch die Umverteilung von AQP2 stimulieren kann [61].

In *Brattleboro*-Ratten, die keinerlei endogene AVP-Produktion zeigen, wurde unter hyperglykämischen Bedingungen (Diabetes mellitus) oder nach Zufuhr von 0.5% NaCl im Trinkwasser und damit assoziierter Hyperosmolalität eine erhöhte AQP2-Expression nachgewiesen [62]. Dieser AVP-unabhängige Mechanismus könnte auf die Aktivität des Hormons Sekretin zurückzuführen sein. Bei erhöhten Blutglukosewerten sorgt Sekretin für eine verstärkte Freisetzung von Insulin. Außerdem kontrolliert Sekretin den pH-Wert des Zwölffingerdarmes durch Freisetzung von Magensäure und Bikarbonat. Sekretin war in der Lage in normalen Mäusen AQP2-Umverteilung und AQP2-Expression zu stimulieren [63]. Auf welche Weise die Zunahme der AQP2-Proteinbiosynthese durch Sekretin beeinflusst wird, ist gegenwärtig noch offen.

Es sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden, die zu verstärkter Proteinbiosynthese von AQP2 führen [2]. Das AQP2-Gen verfügt über einen cAMP-sensitiven Promotor. Die Bindung von cAMP an den AQP2-Promotor ermöglicht vermehrte Transkription des AQP2-Gens und damit erhöhte AQP2-Expression [64]. Bei Hypertonizität des Blutes wird der Transkriptionsfaktor TonEBP (*tonicity-responsive enhancer binding protein, oder auch NFAT5 nuclear factor of activated T cells 5*) verstärkt in den Zellkern transportiert und führt dort zur gesteigerten Transkription verschiedener Gene zum Schutz der Zellen vor hypertonischem Stress. In immortalisierten Hauptzellen des Maus-Sammelrohres konnten nach Hemmung der TonEBP-Aktivität durch Verringerung der TonEBP-Proteinsynthese mit TonEBP-siRNA oder einer inhibitorischen TonEBP-Variante stark reduzierte Mengen an AQP2-mRNA und AQP2-Protein festgestellt werden. Etwa 500 Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt des AQP2-Gens befindet sich ein sogenanntes TonE *enhancer element*. Die Mutation dieser TonEBP-Bindungsstelle verhinderte die Zunahme der AQP2-Expression unter hypertonschen Bedingungen [65]. Außerdem kommt es infolge von Hypertonizität zum Anstieg der Ca^{2+} -Ionen-Konzentration und der Aktivierung der Proteinphosphatase Calcineurin. Calcineurin dephosphoryliert NFATc (*nuclear factor of activated T cells c*). Der somit aktive NFATc kann dann an seine Bindungsstelle auf dem AQP2-Gen in der Nähe der Promotor-Region binden und die Transkription von AQP2 steigern [66].

Calcineurin, auch als Proteinphosphatase 2B (PP2B) bezeichnet, wurde in einem endosomalen Komplex mit AQP2 und PKA nachgewiesen. PP2B konnte AQP2 an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle dephosphorylieren [67]. Mäuse, denen eine Isoform der Calcineurin A-Untereinheit fehlt, wiesen allerdings AVP-Resistenz, d. h. gestörte AQP2-Umverteilung und verringerte AQP2-Phosphorylierung an S256 auf [68]. Dies deutet daraufhin, dass die Calcineurin-Aktivität für die AVP-vermittelte AQP2-Tanslokation in die Plasmamembran notwendig ist.

Kürzlich ist die Arzneistoffklasse der Statine bzw. HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren in den Fokus der AQP2-Forschung gerückt. Statine hemmen durch Besetzen der Enzym-Bindungsstellen für Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A die Umsetzung zu Mevalonat und damit die Cholesterolsynthese (Cholesterolsyntheseenzym-Hemmer, CSE-Hemmer) [69].

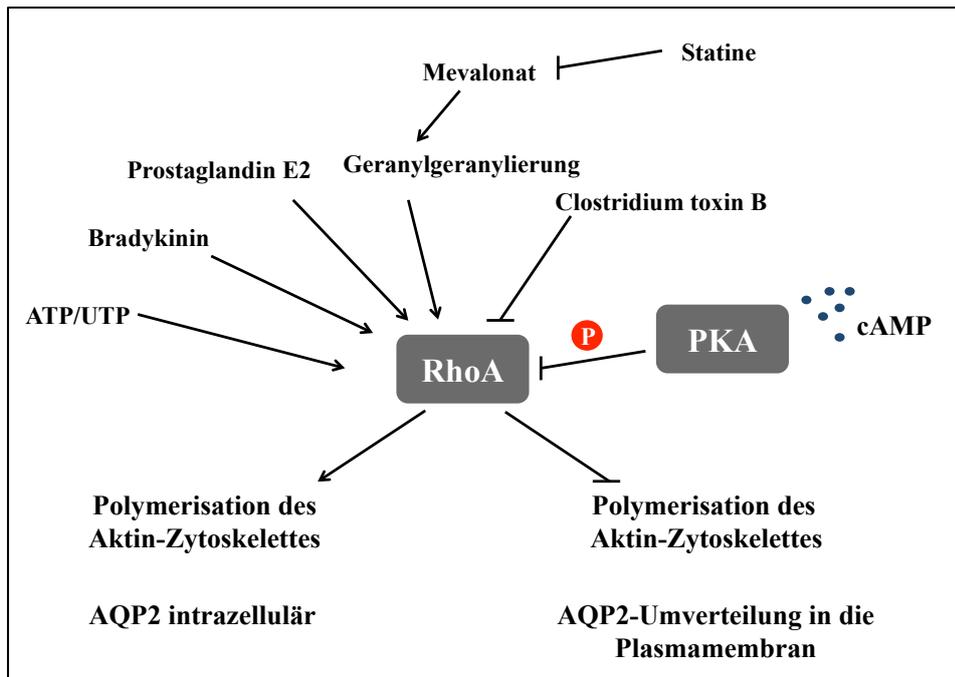


Abb. 8: Die Regulation von RhoA/Aktin-Zytoskelett und der Effekt auf die AQP2-Umverteilung.

In Zell- und Tiermodellen konnte für die Prodrugs Lovastatin und Simvastatin, sowie für das in seiner aktiven Form applizierte Fluvastatin eine Induktion der AQP2-Umverteilung und Harnkonzentrierung festgestellt werden [70-72]. Nähere Untersuchungen haben ergeben, dass dieser Effekt cAMP-unabhängig ist und im Zusammenhang mit der Depolymerisation des Aktin-Zytoskelettes steht (Abb. 8). Rho-GTPasen kontrollieren neben vielfältigen zellulären Prozessen die Polymerisation von globulärem G-Aktin zu fibrillärem F-Aktin [73]. RhoA wird nach Phosphorylierung durch PKA inaktiviert und es kommt zur Depolymerisation des Aktin-Zytoskelettes [34]. Damit geht die Umverteilung von AQP2 mit der PKA-abhängigen pS256-AQP2-Phosphorylierung und der Depolymerisation des Aktin-Zytoskelettes durch RhoA-Inhibition einher. Nach Statin-Behandlung konnte konzentrationsabhängig eine erniedrigte RhoA-Aktivität nachgewiesen werden, die aber nicht in Zusammenhang mit erhöhter RhoA-Phosphorylierung steht [70]. Konstitutiv aktives RhoA erfordert post-translationale Prenylierung, also die kovalente Anheftung von hydrophoben Prenyl-Gruppen [74]. Statine hemmen die Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonat, welches die biosynthetische Vorstufe der Isoprenoide bzw. Prenyle (Geranylpyrophosphat GPP, Farnesylpyrophosphat FPP, Geranylgeranylpyrophosphat GGPP) darstellt. Daher führen Statine zur reduzierten Biosynthese von aktivem RhoA und der messbar verringerten RhoA-Aktivität in Statin-behandelten Zellen. Zusätzlich zur Hemmung der RhoA-Prenylierung ist auch die Aktivierung von endothelialer NO-Synthase durch Statine nachgewiesen worden [75].

1.6.2 Hemmung der AVP-induzierten Umverteilung von AQP2

Es sind verschiedene Stimuli beschrieben worden, die zu einem Absinken des AVP-Spiegels und Internalisierung von AQP2 führen können (Abb. 7).

Prostaglandin E2 antagonisiert auf komplexe Weise die AQP2-Umverteilung. In Abwesenheit von AVP kann über E-Prostanoid-Rezeptor 4 (EP4) die Aktivierung von Adenylylcyclasen und die Umverteilung von AQP2 stimuliert werden [76]. Über EP1- und EP3-Rezeptoren sind allerdings inhibitorische Effekte durch Prostaglandin E2 zu erwarten [77]. EP1-Rezeptoren sind G_q -gekoppelt und vermitteln so über erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen und Aktivierung von Proteinkinase C eine Hemmung der AQP2-Umverteilung. EP3-Rezeptoren verhindern durch G_i -Kopplung die Produktion von cAMP. Außerdem aktiviert Prostaglandin E2 über EP3-Rezeptoren RhoA, was zur Polymerisation von Aktin und gehemmter AQP2-Translokation führt [34, 78, 79]. Der Entzündungsmediator Bradykinin stimuliert einerseits die Produktion verschiedener Prostaglandine [80], kann andererseits durch Bindung an den G_q -gekoppelten Bradykinin-2-Rezeptor PKC aktivieren [81]. Auch Bradykinin selbst kann unabhängig von Prostaglandin E2 eine Aktivierung von RhoA vermitteln und somit die AQP2-Umverteilung hemmen [82].

Sowohl Acetylcholin, sein Analogon Carbachol und auch der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) hemmen die AVP-vermittelte Wasserrückresorption durch Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der PKC [83, 84]. Phorbolster als direkte Aktivatoren der PKC werden häufig in Zellexperimenten genutzt, um die AQP2-Translokation zu inhibieren [85]. Es ist auch bekannt, dass extrazelluläre Purine wie Adenosintriphosphat (ATP) oder Uridintriphosphat (UTP) durch Bindung an purinerge Rezeptoren auf renalen Hauptzellen zum Anstieg von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen-Konzentrationen führen und so PKC aktivieren [86, 87].

Der Einsatz verschiedener α_2 -Adrenozeptor-Inhibitoren lieferte Hinweise darauf, dass Dopamin auch über α_2 -Adrenozeptoren des Nierenmarkes die AVP-vermittelte Wasserrückresorption hemmen kann [88]. Der genaue Mechanismus ist aber unklar. Endothelin-1 beeinflusst ebenfalls die AQP2-Translokation. Dabei scheint über Endothelin-B-Rezeptoren und deren G_i - bzw. G_q -Kopplung eine Hemmung der AVP-vermittelten AQP2-Umverteilung erklärbar [89, 90], während Endothelin-A-Rezeptoren diese Hemmung eher zu antagonisieren scheinen [91].

Neben den Einflüssen intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen können auch extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen durch Aktivierung von Calcium-Rezeptoren die Wasserpermeabilität im Sammelrohr kontrollieren. Sowohl bei Hyperkalzämie [92] in Ratten, als auch nach Stimulation von Präparationen

innermedullärer Sammelrohrbereiche der Ratte oder AQP2-exprimierender Kaninchen-Sammelrohrzellen (CD8-Zellen) mit Calcium-Rezeptoragonisten [93, 94] war die cAMP-vermittelte AQP2-Translokation und Wasserrückresorption gehemmt.

1.8 Pathophysiologie der AVP-vermittelten AQP2-Umverteilung

Störungen des Wasserhaushaltes insbesondere durch exzessive auf AQP2 zurückzuführende Wasserretention sind bei chronischer Herzinsuffizienz oder Leberzirrhose (Ödeme, Aszites) charakterisiert worden [95]. Mechanistisch lässt es sich so erklären, dass der größte Teil des Wassers in venösen Blutgefäßen der Körperperipherie verteilt ist, durch arterielle Unterfüllung wird aber eine Hypovolämie von den Barorezeptoren herznaher Gefäße und den Volumensensoren der Nieren registriert [1]. Dadurch kommt es zu gesteigerter AVP-Freisetzung und starker Wasserrückresorption. Die weitere Verdünnung des Blutes verursacht dann häufig eine Hyponatriämie, die lebensbedrohlich werden kann. Die verstärkte Volumenlast in den Blutgefäßen führt zur weiteren Verschlechterung der Herzinsuffizienz. Dieser „circulus vitiosus“ ist therapeutisch schwer zu durchbrechen. In entsprechenden Tiermodellen für chronische Herzinsuffizienz konnten erhöhte AQP2-Proteinmengen und eine überwiegende Plasmamembran-Lokalisation nachgewiesen werden [96]. Allgemeine Aussagen zu Proteinmenge und AQP2-Lokalisation bei Leberzirrhose sind aus verschiedenen Tiermodellen nicht abzuleiten, hier waren sowohl erhöhte, unveränderte als auch erniedrigte AQP2-Plasmamembran-Lokalisation zu beobachten [97-99]. Mittel der Wahl zur Behandlung von Aszites oder zur Senkung der Volumenlast des Herzens sind Diuretika, die zur Ausscheidung von Wasser führen, aber begleitend auch mit Elektrolytungleichgewichten einhergehen [100].

Unter Harnkonzentrierungsstörungen werden verschiedene Syndrome zusammengefasst [101]. Das Schwartz-Bartter-Syndrom (Syndrom inadäquater ADH-Sekretion) ist durch unverhältnismäßig hohe AVP-Sekretion, AQP2-Plasmamembran-Lokalisation und damit exzessive Wasserretention gekennzeichnet. Ursächlich dafür sind meist Störungen in den für die AVP-Sekretion verantwortlichen hypothalamisch-hypophysären Hirnregionen, wie z. B. nach Infektionen und durch Neoplasien. Zur Behandlung sekundärer Hyponatriämie steht seit einiger Zeit der spezifische V2-Rezeptorantagonist Samsca® (Tolvaptan) zur Verfügung. Vor allem bei Patienten mit euvolämischer und hypervolämischer Hyponatriämie erwies sich Tolvaptan als effektiv und konnte zur Erhöhung der Serum-Natriumspiegel beitragen [102, 103].

Beim Krankheitsbild des Diabetes insipidus ist die AVP-abhängige Wasserrückresorption eingeschränkt, charakteristisch ist die Produktion und Ausscheidung großer Mengen hypotonen Urins (Polyurie) und ein verstärktes Durstgefühl bzw. erhöhte Trinkmenge (Polydipsie) [104]. Es sind zwei Formen zu unterscheiden: Diabetes insipidus centralis (CDI) mit unzureichender AVP-Sekretion und Diabetes insipidus renalis (nephrogener Diabetes insipidus, NDI) mit AVP-Resistenz des Sammelrohres. Die klinische Symptomatik ist allerdings gleich: erhöhte Serum-Osmolalität und Serum-Natriumspiegel gegenüber erniedrigter Natriumkonzentrationen im Urin und geringer Harn-Osmolalität.

Diabetes insipidus centralis hat in etwa 1/3 der Fälle idiopatische Ursachen, während in den überwiegenden Fällen nach Schädel-Hirn-Traumata, Tumoren oder Infektionen ähnlich dem Schwartz-Bartter-Syndrom eine sekundär verminderte AVP-Sekretion auftritt [105].

Bei Diabetes insipidus renalis verursachen meist erbliche Defekte des V2-Rezeptors (X-chromosomal) bzw. von AQP2 (autosomal-rezessiv oder autosomal-dominant) trotz normaler AVP-Sekretion eine unzureichende AQP2-Lokalisation in der Plasmamembran der Hauptzellen und damit verringerte Wasserrückresorption [106]. Die Betroffenen verlieren bis zu 20 Liter Urin am Tag. Bisher charakterisierte Mutationen sind anhand der humanen AQP2-Proteinsequenz dargestellt (Abb. 9). Etwa 10% der Fälle von NDI werden durch Mutationen an AQP2 bestimmt. Nur die wenigsten Mutationen, z. B. im NPA-Motiv zur Bildung der Kanalpore, führen zur Synthese nicht-funktioneller AQP2-Kanäle. Meist kommt es infolge von Faltungsdefekten zu eingeschränktem Transport eigentlich voll funktionstüchtiger AQP2-Proteine. Diese Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) retiniert und schnell abgebaut [107]. Andere Mutationen, wie die an Leucin-Rest 22 (L22V) haben keinerlei Einfluss auf Kanalfunktion oder den Transport von AQP2 zur Plasmamembran [108].

Bei Patienten mit CDI wird das AVP-Analogon Desmopressin als Nasenspray, Tablette oder subkutane Injektion eingesetzt [109]. Damit kann der ursächliche Mangel an verfügbarem AVP behoben werden, allerdings steht die Aufklärung und mögliche Behebung der eigentlichen Ursache, sofern nicht-idiopatisch, im Vordergrund.

Die Therapie von NDI gestaltet sich ungleich schwieriger, da hier gegenwärtig keinerlei Optionen, die über bloße Behandlung der Symptomatik hinausgehen, zur Verfügung stehen. In erster Linie muss durch erhöhte Flüssigkeitszufuhr einer Dehydrierung entgegengewirkt werden. Der zunächst paradox erscheinende Einsatz von Thiazid-Diuretika hat Erfolge bei der Harnkonzentrierung durch vermehrte Ausscheidung von Natrium erzielt [110].

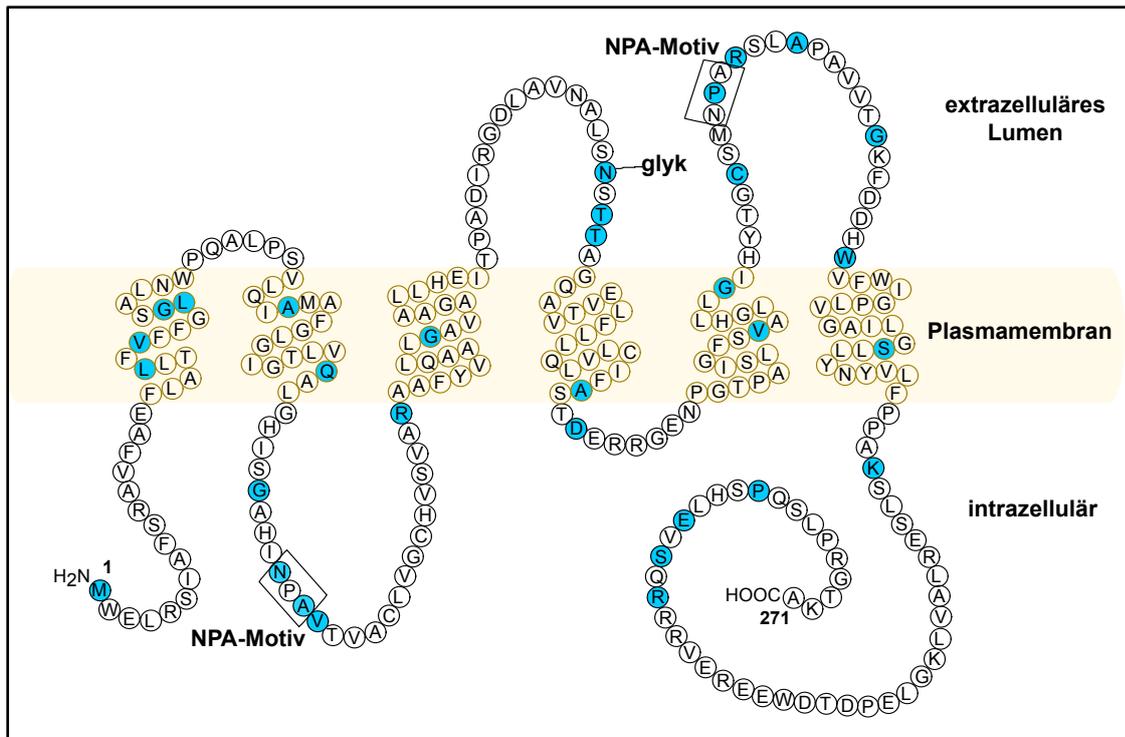


Abb. 9: Bekannte Mutationen in der Proteinsequenz von humanem AQP2.

Nachgewiesene, angeborene Punktmutationen, die zu nephrogenem Diabetes insipidus führen können, sind blau dargestellt (adaptiert nach D. Bichet, Am J Med.; 1998 Nov; 105(5):431-42).

Aus den verschiedenen, bisher überwiegend an Zellmodellen experimentell belegten, stimulatorischen Einflüssen auf die AQP2-Umverteilung sind Arzneistoffe postuliert worden, die einen Einsatz bei Therapie von Diabetes insipidus finden könnten. Insbesondere der Effekt von HMG-CoA-Reduktasehemmern (Statine) wurde näher untersucht. Aus den Untersuchungen zu Lovastatin, Fluvastatin und Simvastatin geht hervor, dass relativ hohe Konzentrationen (100 bis 200 μ M) notwendig sind, um die AQP2-Umverteilung in die Plasmamembran zu verursachen [70]. Die Relevanz einer Indikationserweiterung auf die Anwendung bei Diabetes insipidus ist durch Abwägung der für Statine bekannten unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wie Myalgien bis hin zu lebensbedrohlichen Myopathien (Rhabdomyolyse) zu beurteilen.

Neben den eher seltenen genetisch-bedingten Störungen der AQP2-abhängigen Wasserrückresorption können Defekte der Harnkonzentrierung auch begleitend zur Therapie psychomotorischer Erkrankungen mit Lithium-Psychopharmaka auftreten. Etwa 10 bis 20%, teilweise bis zu 40% der Patienten entwickeln nephrogenen Diabetes insipidus [111]. In Ratten konnte eine Lithium-induzierte Reduktion der AQP2-Expression vermutlich durch gehemmte cAMP-Produktion nachgewiesen werden. Abhängig von der Expositionsdauer ist in späteren Stadien ein irreversibler Verlust renaler Hauptzellen im Tiermodell beschrieben worden [112]. Auch unter Hypokaliämie oder Hyperkalzämie (siehe oben) sind Polyurie und

verringerte AQP2-Expression beobachtet worden [113, 114]. Während Ungleichgewichte der Elektrolytzusammensetzung relativ gut durch z. B. Supplementierung von Kalium zu beheben sind, wurde bei Lithium-verursachten Beeinträchtigungen der Wasserrückresorption in einigen Fällen erst Wochen bis Jahre nach Therapieende eine Remission beobachtet [111].

1.9 Zielstellung der Arbeit

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen lässt sich ein Bild davon entwickeln, wie AQP2 reguliert wird. Wir haben bisher aber nur eine unzureichende Vorstellung von den komplexen molekularen Mechanismen derer die Kontrolle von AQP2 unterliegen

AQP2 ist für die Aufrechterhaltung der Wasserhomöostase unerlässlich. Defekte in der AVP-induzierten AQP2-Umverteilung, wie bei nephrogenem Diabetes insipidus, führen dazu, dass die Betroffenen große Mengen an Flüssigkeit in Form von hypotonem Urin verlieren. Bei kardiovaskulären Erkrankungen wie chronischer Herzinsuffizienz, wäre es wünschenswert gezielt Wasser aus dem Körper zu verdrängen um die Volumenlast des Herzens zu reduzieren. Für diese und einige andere Erkrankungen, die mit einem gestörten Wasserhaushalt einhergehen, gibt es gegenwärtig nur wenige Behandlungsoptionen. Detaillierte Kenntnisse der genauen molekularen Mechanismen der AQP2-Umverteilung, auch als Beispiel für cAMP-abhängige Exozytose, sind daher von großer Bedeutung um neue pharmakologische Angriffspunkte zu finden. Die vorliegende Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten.

Es sollte ein zellbasiertes Hochdurchsatzverfahren zur Durchmusterung großer Substanzbibliotheken entwickelt werden, um Hemmstoffe der cAMP-abhängigen Umverteilung von Aquaporin-2 in renalen Hauptzellen zu identifizieren. Für die identifizierten Inhibitoren sollten deren zelluläre Zielstrukturen und molekulare Wirkmechanismen analysiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Software

Gerät	Art	Anbieter
1092	Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
1470 Wizard Gamma counter	Festszintillationszähler	PerkinElmer Wallac Inc., Turku, Finnland
3017	Horizontalschüttler	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
4000QTRAP®	Massenspektrometer	AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt
763 Multi calimatic	pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co.KG, Berlin
alpha RVC	Vakuum-Rotationskonzentrator	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
ArrayScan V ^{II} HCS reader microscope	Automatisches Mikroskop	Cellomics, Thermo Fischer Inc., Pittsburgh, PA; USA
Axiovert 25	Inverses Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Bruker AV 300	NMR-Spektroskop	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Duomax 1030	Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Easyspence	Dispenser	BioTek, Bad Friedrichshall
ECx405 Select CW	Mikroplatten-Waschgerät	BioTek, Bad Friedrichshall
ED124S	Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
EnSpire® 2300	Mikroplatten-Lesegerät	PerkinElmer, Rodgau
Fireboy eco	Sicherheitsbrenner	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Freedom EVO	Pipettier-Robotersystem	Tecan Group Ltd., Männedorf; Schweiz
KS 15 A control	Kompaktschüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
LSM 510 META	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
LumiImager™ F1	Gel-Dokumentationssystem	Roche Diagnostics, Mannheim
MicoFill	Dispenser	BioTek, Bad Friedrichshall
MicoFlo	Dispenser	BioTek, Bad Friedrichshall
Mikro 20	Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
MiniProtean®	Polyacrylamidgel-Elektrophoresezelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MiniStar Silverline	Mikrozentrifuge	VWR International GmbH, Dresden
MS 3 basic	Kleinschüttler	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
PerfectBlue Mini L	Agarosegel-Elektrophoresekammer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetboy acu	Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald

PowerPac 3000	Spannungsquelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RCT standard	Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
RM 5	Rollenschüttler	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Mergentheim
Rotator PTR-35	Rotationsschüttler	Grant Instruments, Hillsborough, NJ; USA
Safe 2020	Sterilbank	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
SBC 52	Waage	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Sonopuls HD 2070	Ultraschall-Homogenisator	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin
Thermomixer comfort	Thermoschüttler 1.5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Trans Blot SD	<i>Semi-dry</i> Western Blot Modul	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
UFLC System	LC-Anlage	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
Universal 320 R	Kühlzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Vacusaft	Absaugsystem	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald

Software	Anbieter
CytoCellMemTrans V3	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA; USA
Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA; USA
Illustrator CS5	Adobe Systems Inc., San Jose, CA; USA
ImageJ	NIH; rsbweb.nih.gov/ij
Inkscape	Inkscape.org
LumiAnalyst 3.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Marvin Sketch	ChemAxon Kft., Budapest, Ungarn
Photoshop CS5	Adobe Systems Inc., San Jose, CA; USA
Pipeline Pilot	Accelrys Inc., San Diego, CA; USA
Powerpoint 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA; USA
Prism5	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA; USA
Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA; USA

2.1.2 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden, falls nicht anders ausgewiesen, von Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) oder Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) bezogen.

2.1.3 Substanzen und Fluoreszenzfarbstoffe

Substanz	Stammlösung	Anbieter
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	622.22 mM in DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
4-Acetyldiphyllin (4AD)	10 mM in DMSO	ChemDiv, San Diego, CA, USA
4-Ethoxydiphyllin	10 mM in DMSO	InterBioScreen Ltd., Moskau, Russland

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	5 µg/ml in Wasser	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Applied Science, Mannheim)
Arginin-Vasopressin (AVP)	100 µM in DPBS	M. Beyermann, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin
Bafilomycin A1	100 µM in DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
ChemBioNet Bibliothek CBB1	je 10 mM in DMSO	ChemDiv, San Diego, CA, USA
Diphyllin	10 mM in DMSO	InterBioScreen Ltd., Moskau, Russland
Fluconazol	10 mM in Wasser	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
Forskolin (FSK)	10 mM in Ethanol	BIOLOG Life Sciences Institute, Bremen
H89	10 mM in DMSO	BIOLOG Life Sciences Institute, Bremen
LysoTracker [®] RED DND-99	10 mM in Wasser	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
TP_1	9 mM in DMSO	InterBioScreen Ltd., Moskau, Russland
TP_2	10 mM in DMSO	ChemDiv, San Diego, CA, USA
TP_3	10 mM in DMSO	ChemDiv, San Diego, CA, USA
Triazolpropenon (TP)	10 mM in DMSO	ChemDiv, San Diego, CA, USA
TRITC-Phalloidin	50 µg/ml in Wasser	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

Die Identität der Substanzen wurde nach Wareneingang und Ansetzen der Stammlösungen durch LC-MS überprüft und bestätigt.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Art	Zusammensetzung
Blockpuffer	TBS-T + 1% BSA
Blockpuffer (IF)	DPBS + 0.14% Fischhaut-Gelatine
DPBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
Fix-Puffer (IF)	2.5% PFA, 100 mM Natriumcacodylat, 100 mM Sucrose, pH 7.6
Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% Natriumdodecylsulfat
Lysepuffer	SLB, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM PMSF, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 50 mM NaF, phosphoSTOP Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Applied Science, Mannheim)
Probenpuffer 4x	10 ml: 0.8 g Natriumdodecylsulfat, 4 ml Glycerin, 0.308 g Dithiothreitol (DTT), 0.04 g Bromphenolblau, 5 ml Tris-HCl pH 6.8
Sammelgelpuffer	0.75 M Tris-HCl, pH 8.8
SLB	10 mM K ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, pH 7.4
TBS-T	10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1.3 mM Natriumdodecylsulfat, 20% (v/v) Methanol
Trenngelpuffer	0.625 M Tris-HCl, pH 6.8
Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 1.14% (v/v) Eisessig

Die Puffer und Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser hergestellt.

2.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Medium	Bezugsquelle
HEK293 [115] Humane embryonale Nierenzellen	DMEM 10% fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml bzw. 100 µg/ml)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig
MCD4 [116] Maussammelrohrzellen mit	DMEM/F-12 (1:1) 5% fetales Kälberserum	G. Valenti, Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale,

stabiler Expression von humanem AQP2	1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml bzw. 100 µg/ml) 5 µM Dexamethason	Bari; Italien
--------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------	---------------

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Spezies und Verwendung	Anbieter
58K	Maus, 1 : 100 (IF)	Abcam plc, Cambridge, UK
AQP2 C-17	Ziege, 1 : 500, 1 : 100 (IF)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
AQP2 H27	Kaninchen, 1 : 600 (IF)	Hausintern [117]
AQP2 pS256	Kaninchen, 1 : 250	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
AQP2 pS261	Kaninchen, 1 : 500	Abcam plc, Cambridge, UK
ERGIC-53/p58	Kaninchen, 1 : 500 (IF)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
pan-Cadherin	Kaninchen, 1 : 2000	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
α-Tubulin (DM1A)	Maus, 1 : 1000	Merck KGaA, Darmstadt

Sämtliche Sekundärantikörper, mit Meerrettichperoxidase-gekoppelt oder mit Fluorophor-gekoppelt, wurden von Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, UK bezogen.

Sekundärantikörper	Spezies und Verdünnung
anti-Maus IgG POD (Peroxidase)	Esel, 1 : 20 000
anti-Kaninchen F(ab) ₂ -IgG POD	Esel, 1 : 20 000
anti-Ziege IgG POD	Esel, 1 : 20 000
anti-Ziege F(ab) ₂ -IgG Cy2	Esel, 1 : 600
anti-Kaninchen F(ab) ₂ -IgG Cy3-	Esel, 1 : 600
anti-Maus F(ab) ₂ -IgG Cy3	Ziege, 1 : 600
anti-Kaninchen F(ab) ₂ -IgG Cy5	Ziege, 1 : 600

2.2 Methoden

2.2.1 Transfektion von HEK293-Zellen mit AQP2-Plasmid-DNA

HEK293-Zellen wurden in Zellkultur-Schalen (Durchmesser 35 mm) auf mit Poly-L-Lysinbromid-beschichteten Deckgläschen (12 mm) ausgesät. Bei etwa 80% Konfluenz wurden die Zellen durch Lipofektion (2 µg DNA/Schale; liposomale Einbettung der Plasmid-DNA zur Überwindung von Plasma- und Kernmembran; Lipfectamine™ 2000, Life Technologies GmbH, Darmstadt) mit AQP2-Plasmid-DNA (Abb. 10) transfiziert. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte nach einem Mediumwechsel 24 Stunden später.

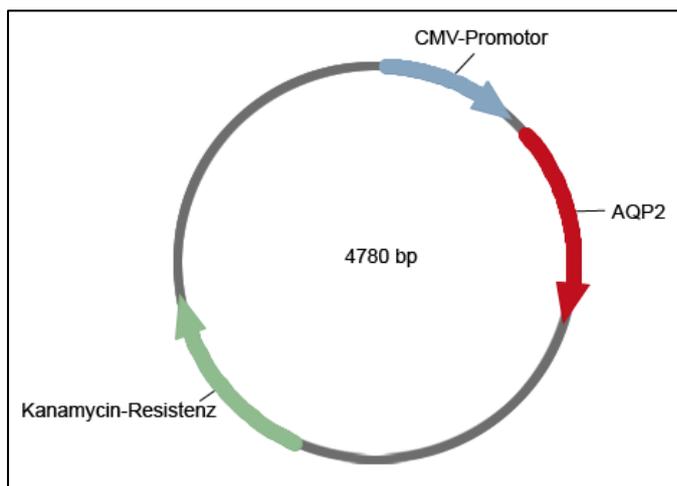


Abb. 10: Vektorkarte des Plasmids für die Expression von wildtypischem AQP2 der Ratte.

2.2.2 Präparation von primären innermedullären Sammelrohrzellen (IMCD-Zellen)

Puffer /Lösungen	Zusammensetzung	Anbieter der Zusätze
DPBS-GN	DPBS 50 µg/ml Gentamicin 20 U/ml Nystatin	Life Technologies GmbH, Darmstadt Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Enzymlösung	1 mg/ml Hyaluronidase 2.2 mg/ml Collagenase, CLS II, Typ II in DPBS-GN	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Biochrom AG, Berlin
IMCD-Medium	DMEM mit GlutaMAX #21885 1% nichtessentielle Aminosäuren 1% Ultrosor G 3.5 mg/ml Glukose 5.84 mg/ml NaCl 6 mg/ml Harnstoff 50 µg/ml Gentamicin	Life Technologies GmbH, Darmstadt Biochrom AG, Berlin CytoGen GmbH, Sinn Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Beschichtung	Typ IV Maus-Collagen 2 µg/cm ² in 0.1% Essigsäure	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

10 bis 12 Wochen alte Ratten (Wistar Han, Charles River Laboratories, Germany GmbH, Sulzfeld) wurden mit CO₂ betäubt, dekapitiert und entblutet. Die Nieren wurden entnommen

und in 4°C-kaltes DPBS-GN überführt. Die inneren Medullae wurden in der Sterilbank präpariert und in einer Gewebekulturschale mit wenig DPBS-GN auf Eis gesammelt. Anschließend erfolgte die Grobzerkleinerung mit einer Rasierklinge, um eine große Oberfläche für den folgenden Enzymverdau zu schaffen [117, 16]. Die Gewebesuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit der Enzymlösung überführt und bei 220 U/min im Wasserbad bei 37°C für 1.5 bis 2 h geschüttelt. Nach dem Verdau wurde die Zellsuspension intensiv mit einer Pasteurpipette homogenisiert. Die Enzymlösung wurde dann durch Zentrifugieren (5 min bei 300xg, 16°C) und zweimaligem Waschen mit DPBS-GN entfernt. Das Zellpellet wurde anschließend in IMCD-Medium aufgenommen, gut resuspendiert und auf Typ-VI-Collagen-beschichtete Schalen- bzw. Zellkulturplatten verteilt. Der Zusatz von dbcAMP ist notwendig um eine stabile Expression von AQP2 zu gewährleisten. Ein Mediumwechsel wurde am ersten Tag und an mindestens jedem zweiten bis dritten Tag durchgeführt. Die Zellen wurden eine Woche nach der Präparation verwendet. Am Tag vor dem Experiment erfolgte der Wechsel auf dbcAMP-freies Medium unter Zusatz von 50 µM Indomethacin, um die basalen cAMP-Spiegel zu senken.

2.2.3 Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der AQP2-Umverteilung

MCD4-Zellen wurden in 384-well-Zellkulturplatten (Corning #3985) ausgesät. Bei etwa 70% Konfluenz erfolgte am nächsten Tag der Transfer der Substanzbibliothek (für 17700 Substanzen auf insgesamt 50 384-well-Zellkulturplatten aus der ChemBioNet-Bibliothek; Plattennr. 69-115, 1001, 1002 [118] (JP. von Kries, FMP) mit einem Robotersystem (freedom EVO, Tecan Group Ltd, Männedorf; Schweiz) auf die Zellplatten in einer Endkonzentration von 40 µM. Die letzten beiden Reihen jeder Platte wurden ausgelassen. In die letzte Reihe 24 wurde H89 (30 µM) als Positivkontrolle pipettiert. Nach Inkubation im Brutschrank (100 min, 37°C) wurde FSK (10 µM) in jedes well transferiert (MicroFlo Dispenser, BioTek, Bad Friedrichshall) und weitere 20 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden maschinell mit DPBS gewaschen (ELx405 Select CW, Biotek, Bad Friedrichshall) und mit Fix-Puffer (15 min, 23°C; Easyspence Dispenser) fixiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0.1% Triton X-100 in DPBS (5 min, 23°C; MicroFill Dispenser). AQP2 (H27 [117], Cy5-gekoppelter anti-Kaninchen-Sekundäntikörper), F-Aktin (TRITC-Phalloidin, 1 : 800) [34] und die Zellkerne (5 ng/ml; DAPI) wurden detektiert und die Bilder am automatischen Mikroskop (10fache Vergrößerung, ArrayScan V^{TI} HCS reader microscope, Cellomics, Thermo Fischer Inc., Pittsburgh, PA; USA) aufgenommen. Die Lokalisation von AQP2 wurde mit der CytoCellMemTransV3-Software (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham,

MA; USA) beurteilt und als Verhältnis von AQP2-Fluoreszenzintensität in der Plasmamembran (F-Aktin-Kolokalisation) zu intrazellulärer AQP2-Fluoreszenzintensität dargestellt [37]. Als oberer Grenzwert für Inhibitoren der AQP2-Umverteilung wurde ein Wert von 1.2 angesetzt. Die erhaltenen Daten wurden mit der Pipeline Pilot Software (Accelrys, Inc., San Diego, CA; USA) verarbeitet um alle Bildinformationen mit den dazugehörigen Substanzinformationen zu verknüpfen. Es wurden 3 Bildbereiche je *well* mit insgesamt mindestens 250 Zellen aufgenommen. *Wells*, in denen weniger als 100 Zellen erkannt wurden, sind nicht in die Bewertung der AQP2-Lokalisation miteinbezogen worden, da hier von toxischen Effekten der jeweiligen Testsubstanz auf die Zellen auszugehen war.

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Mikroskopie

Farbstoff	Einstellungen
DAPI	364 nm, 2% Laserintensität, Filter BP 385-470, Lochblende 135 μm
Cy3	543 nm, 10% Laserintensität, Filter LP 560, Lochblende 182 μm

MCD4-Zellen oder primäre IMCD-Zellen wurden in Zellkulturschalen auf Deckgläschen (12 mm) ausgesät [117, 38]. Nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Testsubstanzen wurde mit DPBS gewaschen und mit Fix-Puffer (15 min, 23°C) fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit 0.1% Triton X-100 in DPBS (5 min, 23°C). Unspezifische Antikörperbindung wurde durch Inkubation mit Blockpuffer (20 min, 37°C) gehemmt. Primär- als auch Sekundärantikörper wurden in Blocklösung angesetzt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Zwischen der Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern wurden die Zellen bzw. Deckgläschen dreimal für 10 Minuten mit DPBS auf einem Schüttler gewaschen. AQP2 wurde mit spezifischen primären Antikörpern (H27) und Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen Sekundärantikörpern [16] oder C-17 und Cy2-gekoppeltem anti-Ziege-Sekundärantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (5 ng/ml) angefärbt. Nach abschließendem Waschen wurden die Deckgläschen mit Immu-Mount (Shandon, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA; USA) auf Objektträger fixiert und über Nacht bei 4°C ausgehärtet. Bilder wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena; B. Wiesner, FMP) bei 100facher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv (Plan-Neofluar 100x/1.3 Oil) aufgenommen.

2.2.5 Analyse der Kolokalisation von AQP2 mit Golgi-Markerproteinen

Farbstoff	Einstellungen
DAPI	364 nm, 2% Laserintensität, Filter BP 385-470, Lochblende 135 μm
Cy2	488 nm, 5% Laserintensität, Filter BP 505-530, Lochblende 166 μm
Cy3	543 nm, 13% Laserintensität, Filter LP 560, Lochblende 182 μm
Cy5	633 nm, 15% Laserintensität, Filter 644-719, Lochblende 213 μm

Primäre IMCD-Zellen wurden auf Deckgläschen (12 mm) in Zellkulturschalen ausgesät und mit 4AD (4 oder 0.4 μM , 30 min, 37°C) behandelt. Auf die Fixierung und Permeabilisierung folgte die Färbung von Zellkernen (DAPI) und AQP2 (H27) [117], Cy5-gekoppelte anti-Kaninchen-Sekundärantikörper) gemeinsam mit dem Golgi-Protein 58K (Formimidotransferase-Cyclodeaminase FTCD, Cy3-gekoppelter anti-Maus-Sekundärantikörper) oder AQP2 (C-17, Cy2-gekoppelte anti-Ziege Sekundärantikörper) gemeinsam mit einem Protein des endoplasmatischen Retikulum Golgi-Intermediärkompartimentes (ERGIC-53/p58, Cy3-gekoppelte anti-Kaninchen-Sekundärantikörper). Die Fluoreszenzsignale wurden am LSM aufgenommen und mithilfe des Kolokalisationsanalyse-Moduls der ImageJ-Software (P. Bourdoncle, Institut Jacques Monod, Service Imagerie, Paris) ausgewertet. Es wurde eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale von AQP2 und dem Golgi-Protein 58K bzw. eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale von AQP2 mit den Signalen für ERGIC-53/p58 erzeugt. Eine Zunahme der aus räumlicher Überlagerung resultierenden Fluoreszenzsignalintensität von mehr als 50% wurde als Kolokalisation bewertet und je Zelle angegeben.

2.2.5 Intrazelluläre pH-Wert-Messung

MCD4-Zellen wurden auf 30 mm-Deckgläschen in Zellkulturschalen ausgesät und mit dem schwach basischen Farbstoff LysoTracker[®] Red DND-99 (75 nM, 30 min, 37°C; Life Technologies GmbH, Darmstadt) allein oder simultan mit 4AD (4 oder 0.4 μM , 30 min, 37°C), Bafilomycin A1 (0.25 oder 0.125 μM , 30 min, 37°C) oder FSK (10 μM , 20 min, 37°C) inkubiert. In den letzten 5 Minuten der jeweiligen Inkubation wurden die Zellkerne mit 5 μM Hoechst 33258 gefärbt. Die Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen und das Deckgläschen mit den Zellen in einer Küvette in Gegenwart der jeweiligen Testsubstanz am LSM vermessen. Saure vesikuläre Kompartimente waren nach Inkorporation des basischen Farbstoffes als rote Fluoreszenzsignale (bei 543 nm) erkennbar. Je saurer ein Kompartiment, desto mehr akkumuliert der Farbstoff, wird protoniert und kann nicht mehr aus dem Kompartiment diffundieren [119]. Durch eine Verschiebung des intravesikulären pH-Wertes in neutrale Bereiche wird die Protonierung und Retention des Farbstoffes stark eingeschränkt und ein schwächeres Fluoreszenzsignal wird detektiert. Das Fluoreszenzemissionsspektrum des Farbstoffes wird nicht durch den pH-Wert beeinflusst [119]. Die detektierte Fluoreszenzintensität korreliert daher direkt mit der Menge des inkorporierten Farbstoffes. Die mittlere Fluoreszenzintensität des inkorporierten Farbstoffes wurde für > 30 Zellen je Bedingung mit der ImageJ-Software bestimmt.

2.2.7 Western Blot

Zur Analyse zellulärer Proteine wurden Zelllysate gewonnen, am Ultraschall-Homogenisator mit 6 Impulsen (65% Amplitude) zerkleinert und nach Zentrifugation (22500xg, 4°C, 10 min) wurden Zelltrümmer abgetrennt. Die Proben wurden unter Zusatz von Probenpuffer 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Die Proteine wurden in einem 12% Polyacrylamid-Gel (*SDS-PAGE*) elektrophoretisch nach Größen aufgetrennt und anschließend auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF, Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.) mittels *Semidry-blot* transferiert [38]. Zum Nachweis der Proteingrößen wurde ein Proteinmarker mit vorgefärbten Standardproteinen (Precision Plus Protein Standards, Dual Color, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) genutzt. AQP2 wurde mit polyklonalen Ziegenantikörpern gegen den C-Terminus von AQP2 (C-17) und sekundären anti-Ziege-Meerrettichperoxidase-(POD)-gekoppelten Antikörpern detektiert. An S261 phosphoryliertes AQP2 wurde mit phospho-spezifischen polyklonalen Kaninchenantikörpern und an S256 phosphoryliertes AQP2 wurde mit phospho-spezifischen polyklonalen Kaninchenantikörpern und den entsprechenden Sekundärantikörpern nachgewiesen [16]. Als Ladekontrolle für jede Probe diente α -Tubulin. Die Proteinmengen wurden densitometrisch nach Lumineszenzreaktion mit *Lumi-Light* Western Blotting Substrate (LumiAnalyst 3.0 software, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bestimmt.

2.2.8 cAMP-Radioimmunoassay (cAMP-RIA)

Primäre IMCD-Zellen wurden in 24-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und mit verschiedenen Testsubstanzen behandelt. Dem Medium wurde 250 μ M 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) zur Hemmung des cAMP-Abbaus zugesetzt. Die Zellen wurden dann in 750 μ l Lysepuffer (0.1% Trifluoressigsäure, 0.005% Triton X-100) 30 Minuten bei 4°C lysiert. Die Lysate wurden in Reaktionsgefäßen gesammelt und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Am Rotations-Vakuum-Konzentrator (alpha RVC; Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) wurden die Proben getrocknet und anschließend in RIA-Puffer (100 mM Natriumacetat, 0.1% BSA und 0.1% Triton X-100, pH 6) 20 Minuten bei 4°C rekonstituiert. Nach Zentrifugation (23000xg, 15 min, 4°C) wurde in Verdünnungen der Proben (1 : 40) der Gehalt an cAMP bestimmt. Zunächst wurde sowohl in den Proben als auch in den Messstandards das cAMP zur Verbesserung der Messsensitivität acetyliert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit radioaktiv-markiertem [¹²⁵I]-cAMP-Tyrosylmethylester (10000 *counts per minute*, spezifische Aktivität 81.4 TBq/mmol; IBL International GmbH, Hamburg) und einem anti-cAMP-succinimidyl-Proteinkonjugat-Kaninchenantikörper [120]

(20 h, 4°C, unter Schütteln). Zur Kalibrierung der Messung wurden cAMP-Standards gewählt, die ein Signal von 0.2 bis 146 fmoles cAMP je Inkubat ergeben. Dem Ansatz wurde dann eine anti-Kaninchenantikörper Sepharosesuspension (40 min, 4°C; IBL International GmbH, Hamburg) zugesetzt, um die Antikörper-cAMP-Komplexe zu präzipitieren (Abb. 11). Am Festszintillationszähler (1470 Wizard Gamma counter, PerkinElmer Wallac Inc., Turku; Finnland) wurde der Gehalt an radioaktivem cAMP gemessen und mit den erhaltenen Standards korreliert.

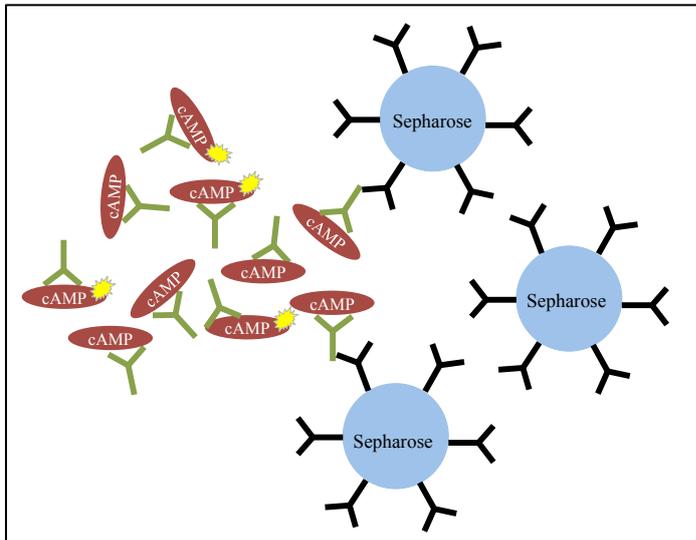


Abb. 11: Versuchsprinzip des cAMP-Radioimmunoassays.

Präzipitation von neu-synthetisiertem cAMP und radioaktiv-markiertem cAMP (gelbe Markierung) mit primären anti-cAMP Kaninchenantikörpern (grün) und sekundärer anti-Kaninchenantikörper-Sepharosesuspension.

2.2.9 PKA-Aktivitätsbestimmung

MCD4-Zellen wurden in 6-well-Zellkulturplatten mit 4AD (4 oder 0.4 μM) allein für 30 Minuten behandelt oder nach 10 Minuten erfolgte die Zugabe von 10 μM FSK für weitere 20 Minuten. Als Kontrolle dienten unbehandelte oder nur mit FSK behandelte Zellen. Die Zellen wurden auf Eis in Lysepuffer lysiert und das Lysat durch Zentrifugation (18000xg, 1 min) von Zelltrümmern geklärt. Die PKA-Aktivität in den Proben wurde mithilfe eines Kinase-Kit (PepTag® Non-radioactive cAMP-dependent protein kinase assay, Promega GmbH, Mannheim) bestimmt. In zwei Ansätzen je Probe wurde nach Herstellervorgaben zum einen die PKA-Aktivität nach Vorinkubation und zum anderen die Aktivität in den Lysaten nach Zusatz von 1 μM cAMP geprüft. Das im Inkubationsansatz enthaltene fluorophor-gekoppelte PKA-Substrat-Peptid wurde phosphoryliert und der Ansatz im 0.8% Agarose-Gel vom nicht-phosphorylierten Peptid-Anteil elektrophoretisch getrennt (Abb. 12) und am LumiImager bei 570 nm detektiert.

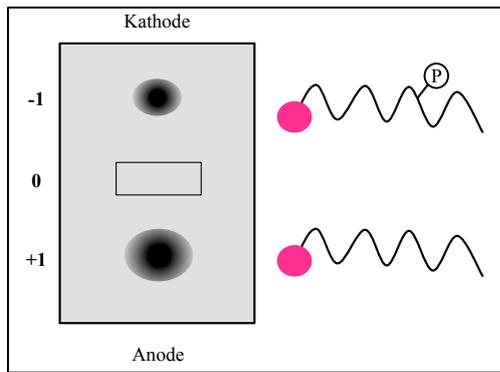


Abb. 12: Auftrennung des PKA-Substrat im horizontalen Agarose-Gel.

Phosphoryliertes, negativ-geladenes Peptidsubstrat wandert zur Kathode, nicht-phosphoryliertes, positiv-geladenes Peptidsubstrat wandert zur Anode.

2.2.10 Zellvitalitätsbestimmung mit dem MTT-Test

MCD4-Zellen oder primäre IMCD-Zellen wurden in 96-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und über 24 Stunden mit verschiedenen Testsubstanzen (1 mM, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M und 5 nM) behandelt. Es erfolgte dann die Inkubation mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-haltigem Medium (0.1 mg/ml MTT, 4 h, 37°C). Das entstandene wasserunlösliche blaue Formazan (Abb. 13) wurde in einem Lysepuffer (20% Natriumdodecylsulfat, 1.25% Essigsäure in DMSO) aufgenommen und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Nach Korrektur gegen den Leerwert wurde der Wert für unbehandelte Zellen als 100% Vitalität festgesetzt und die Substanzwerte darauf bezogen. Die Substanzkonzentrationen wurden logarithmisch aufgetragen und die LC_{50} -Werte, die Substanzkonzentration, bei der noch 50% der Zellen leben bzw. metabolisch aktiv sind, mittels nicht-linearer Regression (Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) berechnet. Es wurden drei unabhängige Versuche mit Dreifachbestimmungen je Substanzkonzentration durchgeführt.

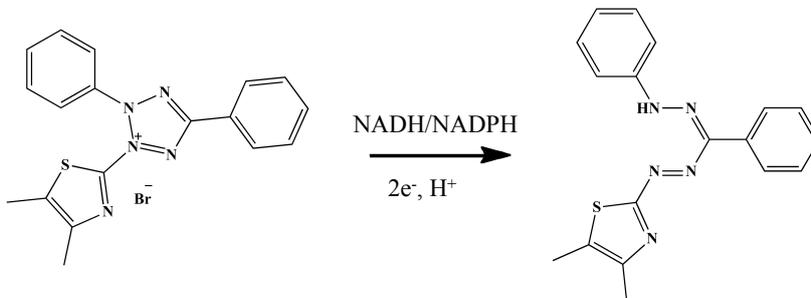


Abb. 13: Reduktive Konversion eines Tetrazolium-Salzes zu Formazan.

2.2.11 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Primäre IMCD-Zellen wurden in 6-*well*-Zellkulturplatten mit Testsubstanzen (30 min, 37°C) allein oder in Kombination mit 10 µM FSK (Substanz 10 min, dann mit FSK 20 min, 37°C) inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen bzw. nur mit FSK (10 µM, 20 min, 37°C) behandelte Zellen. Exponierte Zelloberflächenproteine wurden mit Sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)-ethyl-1,3-dithiopropionat (EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin, 1 mg/ml in Medium; 1 h, 4°C unter horizontalem Schütteln) biotinyliert [16]. Überschüssiges, nicht-gebundenes Biotin wurde mit Ammoniumchlorid-Puffer entfernt (50 mM NH₄Cl in DPBS, 10 min, 4°C unter Schütteln). Biotinylierte Proteine wurden aus dem gewonnenen Zelllysat über Nacht mit Streptavidin-Agarose-Suspension (80 µl Suspension/Probe; Life Technologies GmbH, Darmstadt) präzipitiert (Abb. 14). Nach Waschen der Präzipitate mit Lysepuffer und Aufkochen in Probenpuffer (70°C, 10 min) wurden die Proteine im 10% Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt. AQP2 (C-17) und Cadherin (Membranprotein, Ladekontrolle) wurden dann mittels Western Blot detektiert und densitometrisch quantifiziert (LumiAnalyst 3.0 software, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

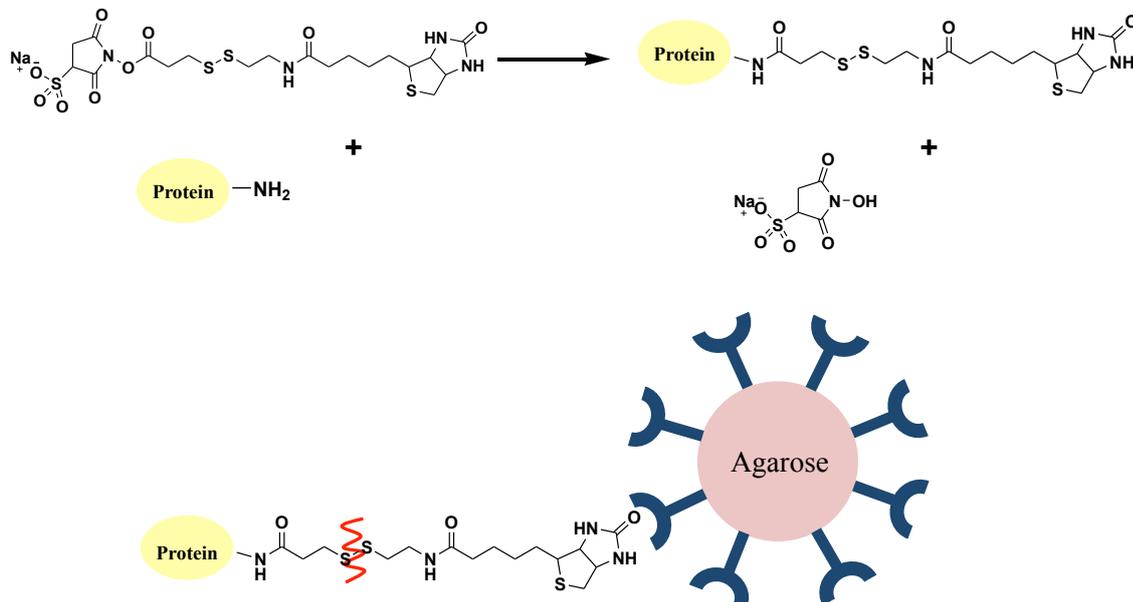


Abb. 14: Prinzip der Biotinylierung.

Im ersten Schritt erfolgt die Verknüpfung von Proteinen mit Disulfid-Linker-gekoppeltem Biotin unter Abspaltung von Succinimid und Ausbildung einer kovalenten Amid-Bindung. Nach Präzipitation mit Streptavidin-beschichteter Agarose wird durch Aufkochen mit DTT der Disulfid-Linker abgespalten und die erhaltenen Proteine im Western Blot aufgearbeitet.

2.2.12 LC-MS

Alle Massenspektren wurden mithilfe eines 4000QTRAP[®] (Triple Quadrupole/Linear Ion trap-Massenspektrometer; AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt) verbunden mit einem

UFLC System (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) aufgenommen. Die Ionisation der Proben in Acetonitril wurde als Elektrosprayionisation (ESI) durchgeführt. Die Werte sind als Atommasse-Einheit m/z (Masse-zu-Ladungs-Verhältnis) dargestellt.

Das Messsystem bestand aus einem *Shimadzu LC-20*-System (Degasys DG-2410, Autosampler SIL-20A, Controller CBM-20A) mit einem DAD-UV-Detektor (SPD-M20A). Die Messläufe wurden auf analytischen Nucleodur-Säulen (100-5 C18 ec, 100 Å, 5 µm, 250 x 4 mm; Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die Injektionsvolumina lagen zwischen 5 und 20 µl mit Probekonzentrationen von etwa 50 µM. Als Laufmittel-Gradient wurde Acetonitril/0.1% TFA (v/v) von 5 bis zu 95% innerhalb von 11 Minuten in H₂O/0.1% TFA genutzt.

2.2.13 ¹H- bzw. ¹³C-NMR-Spektroskopie

1D-NMR-Spektren wurden am *Bruker AV 300* (¹H: 300 Mhz, ¹³C: 75 Mhz) aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm und die Kopplungskonstante J in Hz dargestellt. Das Spektroskop wurde gegen Tetramethylsilan (TMS) normalisiert. Alle Messung wurden in deuteriertem Dimethylsulfoxid (δ₆-DMSO) durchgeführt.

2.2.14 Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Die DC-Platten bestanden aus Silika-Gel-60-beschichteter Aluminiumfolie (mit Fluoreszenz-Indikator F254). Zur Detektion der aufgetrennten Proben wurde ein UV-Kabinett (254 nm; Lamag UV-Cabinet II, Wiehl; Schweiz) genutzt.

2.2.15 Säulen-Chromatographie (SC)

Die präparative Säulen-Chromatographie erfolgte in einer Glas-Säule mit Silika-Gel (Porengröße 60 Å, Partikelgröße 30-60 µm). Das Silika-Gel wurde mit dem entsprechenden Lösungsmittelgemisch äquilibriert. Fast vollständig bis zur Trockene eingeeengte Reaktionsgemische wurden im geeigneten Lösungsmittel (Auswahl nach dünn-schicht-chromatographischen Voruntersuchungen) aufgenommen und aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden in Reagenzgläsern gesammelt und ihre Zusammensetzung mittels Dünnschicht-Chromatographie bewertet. Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden anschließend aufgearbeitet.

2.2.16 Statistik

Die statistische Datenanalyse wurde mit Prism5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) unter Nutzung des t-Test bzw. eines one-way ANOVA mit Bonferonni-*posthoc*-Testung durchgeführt. Werte für $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant erachtet. Alle Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Durchführung eines zellbasierten Hochdurchsatzverfahrens

3.1.1 Etablierung eines Zellsystems

3.1.1.1 HEK293-Zellen

Zunächst wurde die Eignung von HEK293-Zellen als Zellsystem geprüft. Die Zellen wurden transient mit Plasmid-DNA, die für murines AQP2 kodiert, transfiziert (siehe Abb. 10). Anschließend wurden AQP2-Expression und AQP2-Umverteilung mithilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. Die cAMP-abhängige AQP2-Umverteilung wurde, wie in allen folgenden Experimenten, mit Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylylcyclase stimuliert (10 μ M, 20 min bei 37°C) [43].

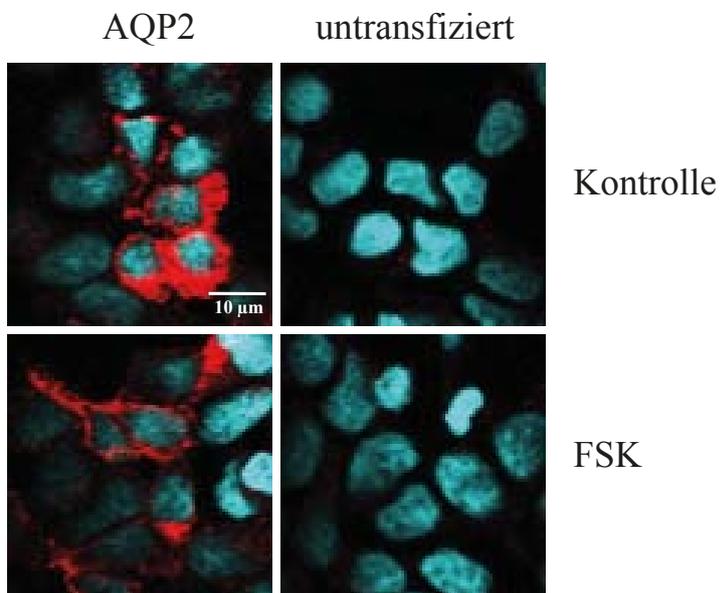


Abb. 15: Die AQP2-Lokalisation in HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen wurden mit AQP2-DNA transfiziert oder blieben untransfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Stimulation mit FSK (10 μ M, 20 min). Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach Fixierung der Zellen mit PFA und Permeabilisierung mit Trion-X 100 wurde AQP2 mit spezifischem primären Antikörpern (H27) und Cy3-gekoppelten Kaninchen-Sekundärantikörpern detektiert (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am LSM (100fache Vergrößerung). Es sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

In Kontrollzellen war kein AQP2 nachweisbar. In unbehandelten, AQP2-transfizierten HEK293-Zellen konnte AQP2 perinukleär nachgewiesen werden, während AQP2 nach Behandlung mit FSK in der Plasmamembran detektiert wurde (Abb. 15). Die Lokalisation von AQP2 in unbehandelten HEK293-Zellen war schwer von der Lokalisation in FSK-

behandelten Zellen zu unterscheiden. Daher erwies sich dieses Zellsystem als ungeeignet, für die automatische Immunfluoreszenzmikroskopie im Hochdurchsatzverfahren eingesetzt zu werden.

3.1.1.2 MCD4-Zellen

Ein weiteres Zellsystem stellt eine renale Sammelrohrzelllinie der Maus dar, die stabil humanes AQP2 exprimiert (MCD4-Zellen [116]; G. Valenti, Bari, Italien). Die Eignung dieser Zelllinie für Hochdurchsatzverfahren wurde analog der von HEK293-Zellen bestimmt.

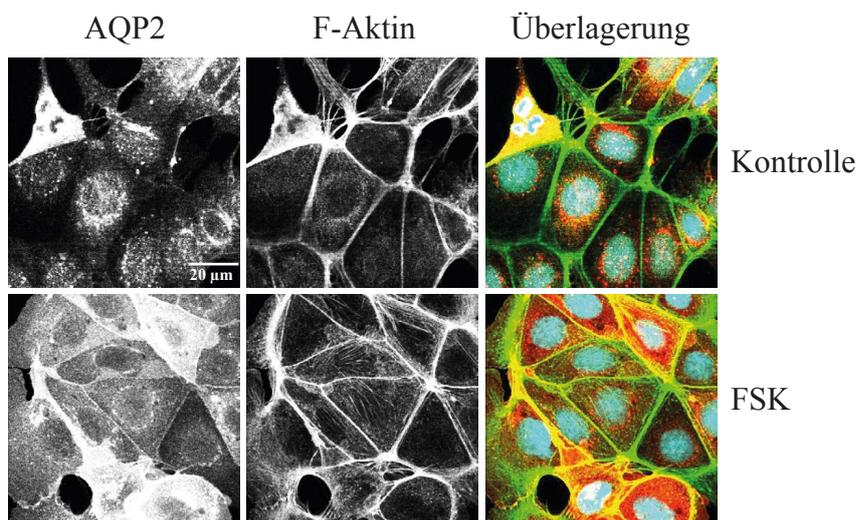


Abb. 16: Die AQP2-Lokalisation in MCD4-Zellen.

MCD4-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit FSK (10 µM, 20 min, 37°C) stimuliert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde AQP2 in Rot (H27, Cy5-gekoppelter Kaninchen-Antikörper) detektiert. F-Aktin ist mit TRITC-Phalloidin (grün) und die Zellkerne mit DAPI angefärbt worden. Bilder wurden am LSM (100fache Vergrößerung) aufgenommen. Es sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Unbehandelte MCD4-Zellen zeigten eine perinukleäre zytosolische Lokalisation von AQP2, wohingegen nach Stimulation der Zellen mit FSK eine Umverteilung von AQP2 in die Plasmamembran der Zellen zu beobachten war (Abb. 16). Die Unterscheidung der AQP2-Lokalisation in unbehandelten und mit FSK-behandelten Zellen war sehr gut vorzunehmen.

Zur Auswertung des Hochdurchsatzverfahrens war es notwendig, die Plasmamembran der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Diese Färbung ermöglicht den Vergleich und die Beurteilung von Zytosol- oder Plasmamembran-Lokalisation von AQP2. Es wurden Farbstoffe getestet, die sich von außen an die Zelloberfläche anheften (CellMask™ plasma membrane stain, Life Technologies GmbH, Darmstadt) und Antikörper, die Plasmamembranbestandteile wie Cadherin detektieren. Der Plasmamembran-Farbstoff CellMask™ war ungeeignet, da nicht, wie erwartet, die Plasmamembran, sondern

perinukleäre Organellen angefärbt wurden (siehe Anhang A). Die Immunfluoreszenzfärbung von Cadherin mit Antikörpern konnte aufgrund schwacher Intensität am automatischen Mikroskop bei 10facher Vergrößerung nur unzureichend detektiert werden. Daraufhin wurde Fluoreszenzfarbstoff-markiertes Phalloidin auf seine Eignung hin untersucht. Phalloidin ist ein cyclopeptidisches Toxin aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) mit hoher Bindungsaffinität zu Aktin-Filamenten [121]. Abhängig von der zweidimensionalen Wachstumsdichte der Zellen waren Stressfaser (geringe Zelldichte, siehe Anhang A) oder intensive Färbung im Bereich der Plasmamembran (Konfluenz, 100% Zelldichte; Abb. 16 und 17) zu erkennen. TRITC-Phalloidin wurde dann als Plasmamembranmarker im Hochdurchsatzverfahren eingesetzt.

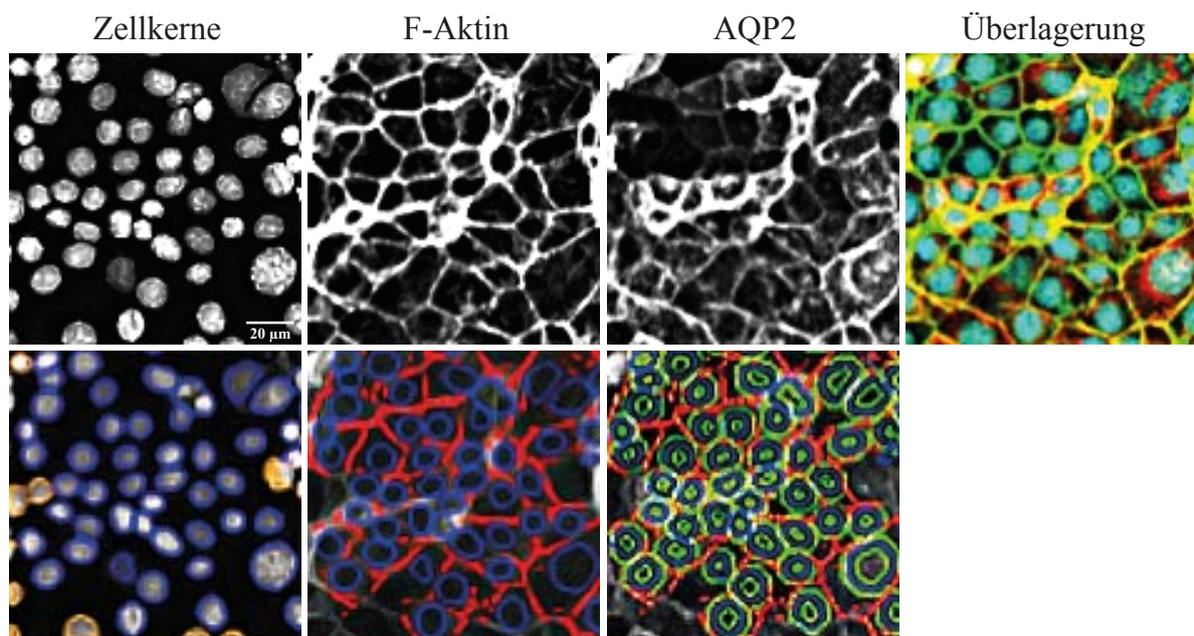


Abb. 17: Die Etablierung von Objektmasken am automatischen Mikroskop.

MCD4-Zellen wurden in 384-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und am folgenden Tag mit FSK (10 µM, 20 min) stimuliert oder blieben unbehandelt. AQP2 wurde mithilfe der Immunfluoreszenz-Färbung (rot; H27, Cy5-gekoppelter Kaninchen-Antikörper) detektiert. F-Aktin als Plasmamembran-Marker (grün; TRITC-Phalloidin) und die Zellkerne (blau; DAPI) wurden angefärbt. Bilder wurden am automatischen Mikroskop (10fache Vergrößerung) aufgenommen. An einem repräsentativen Bild für FSK-behandelte Zellen sind die verschiedenen Färbungen und die Überlagerung der Farben (obere Reihe) gezeigt. Die Objektmasken (untere Reihe) wurden mithilfe der Färbungen berechnet; Zellkerne (blaue Umrandung), Plasmamembran (F-Aktin, rote Fasern) und zytosolischer Raum (grüne Kreise) wurden markiert.

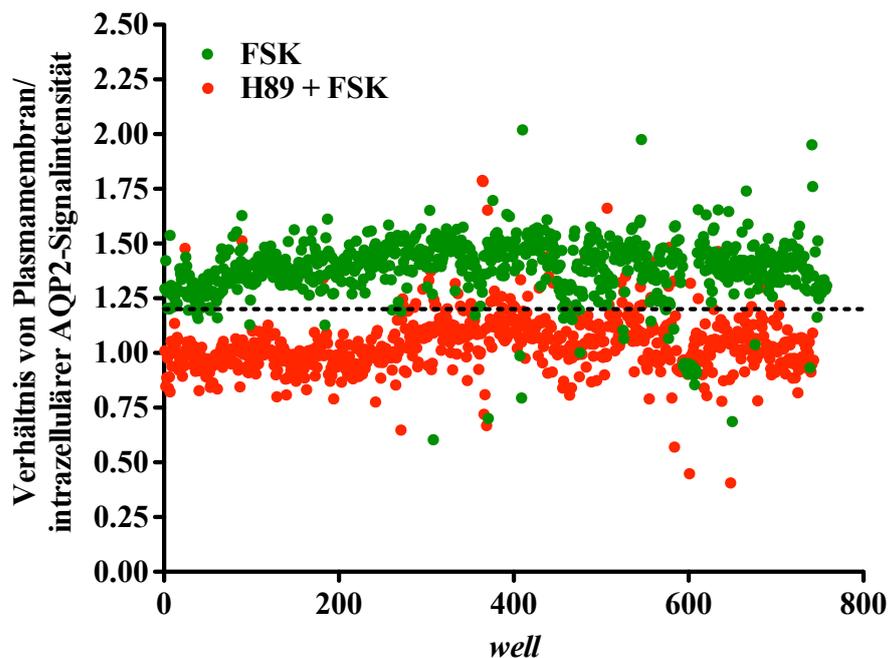
Anhand der Färbungen für AQP2, F-Aktin und die Zellkerne wurden Objektmasken erstellt. Für F-Aktin- und Zellkernfärbungen wurde die Objekterkennung in der CytoCellMemTransV3-Software (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA; USA) optimiert. Zur Berechnung des Verhältnisses von Plasmamembran zu intrazellulärer AQP2-Fluoreszenzsignalintensität war neben einer Plasmamembranmarkierung die Definition eines

zytosolischen Bereiches als Referenz für die intrazelluläre AQP2-Signalintensität notwendig. Dies wurde mithilfe der Färbungen der Zellkerne und von F-Aktin realisiert (Abb. 17).

3.1.2 Identifizierung von Inhibitoren der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung

Zur Durchmusterung der ChemBioNet-Substanzbibliothek (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), JP v. Kries) wurden MCD4-Zellen in 384-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und mit 17700 verschiedenen Substanzen (40 μ M je Substanz und *well*, 100 min) inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit H89 (30 μ M, 100 min), einem etablierten Hemmer der cAMP-abhängigen Umverteilung von AQP2, der unter anderem auch PKA inhibiert, behandelt [122]. Anschließend wurde FSK (10 μ M, 20 min) auf die Zellen gegeben, um eine Umverteilung von AQP2 in die Plasmamembran hervorzurufen. Die Lokalisation von AQP2 und F-Aktin als Plasmamembranmarker wurde anschließend mittels automatischer Immunfluoreszenzmikroskopie bewertet. Das automatische Mikroskop fokussierte zunächst auf die Zellebene (Zellkernfärbung, DAPI) und anschließend wurden die Fluoreszenzsignale für AQP2 und F-Aktin aufgenommen. In der Auswertung wurde das Verhältnis von AQP2-Signalintensität in der Plasmamembran (Überlagerung mit F-Aktin) und intrazellulärer AQP2-Signalintensität (zytosolischer Raum) gebildet (Abb. 17).

A



B

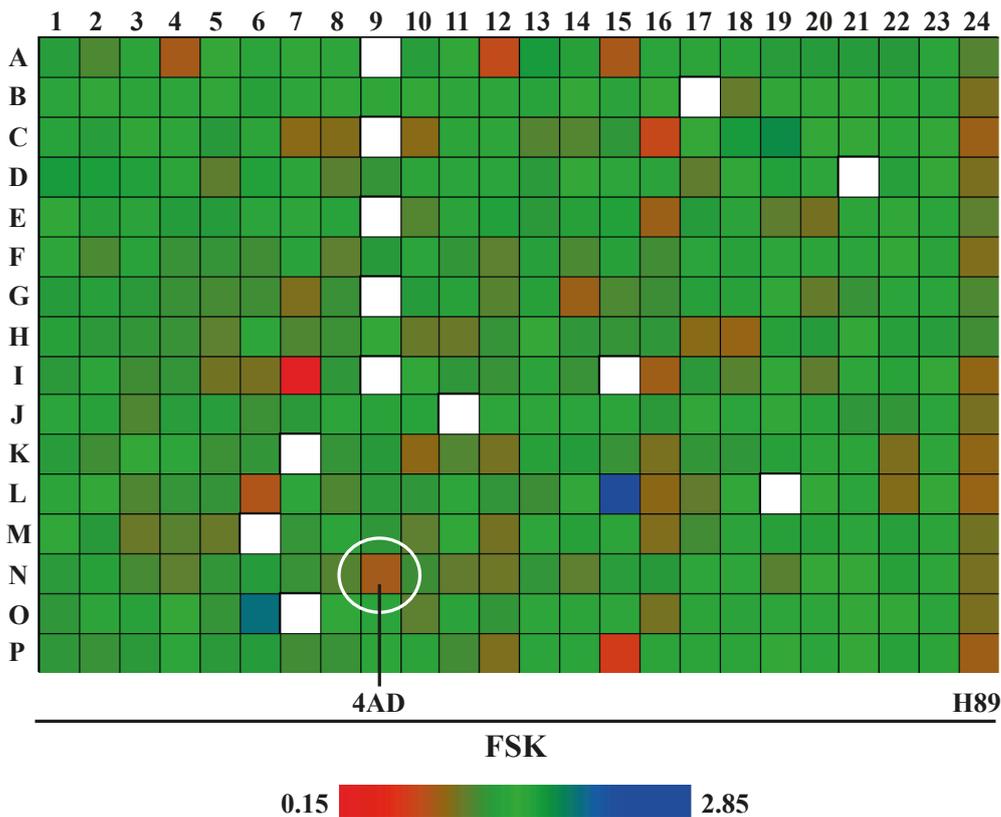
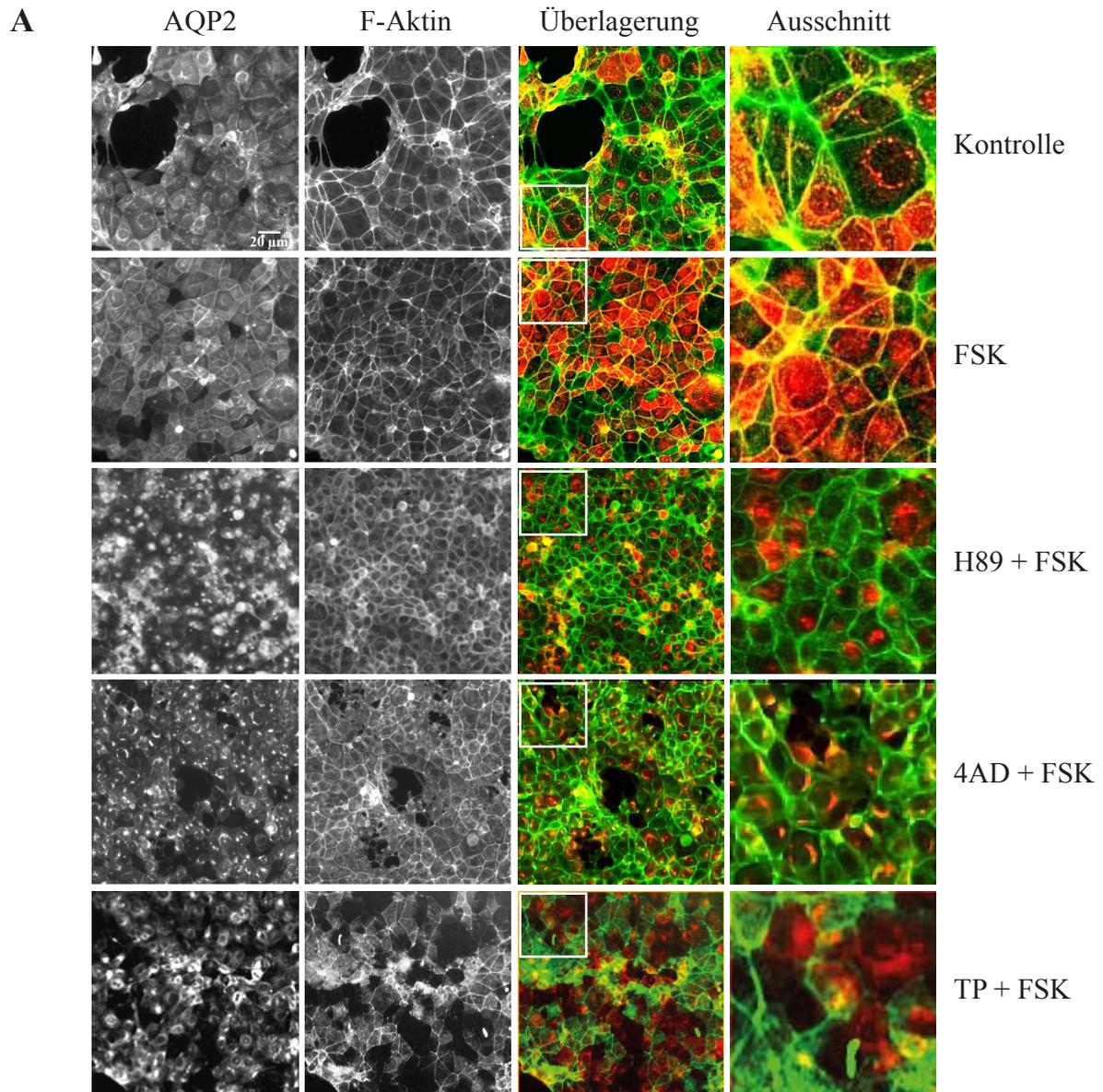


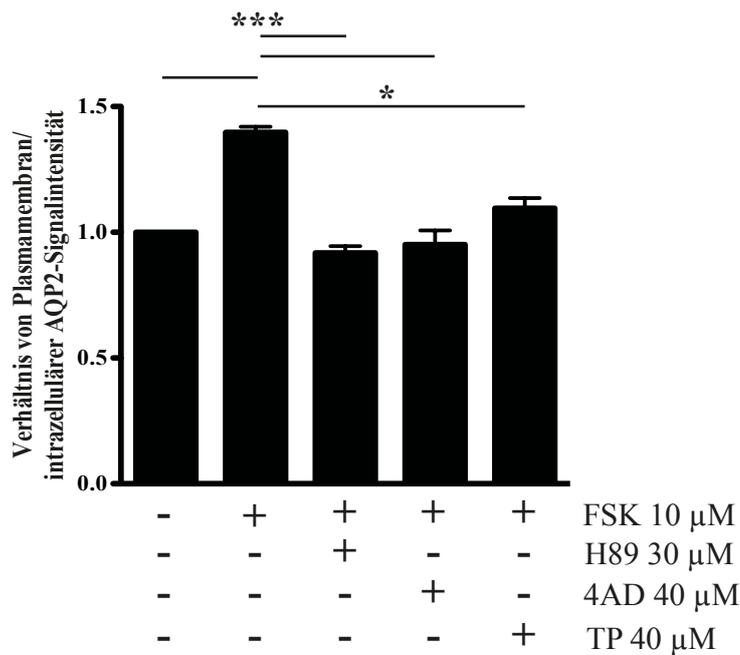
Abb. 18: Darstellung der Kontrollwerte des Screenings und der Farbkarte einer Screening-Platte

(A) Das Verhältnis von Plasmamembran/intrazellulärer AQP2-Fluoreszenzsignalintensität ist für FSK-stimulierte MCD4-Zellen (10 μ M, 20 min; Mittelwert 1.41; Negativkontrolle, grün) und mit H89 (30 μ M, 100 min) und FSK stimulierte Zellen angegeben (Mittelwert 0.91; Positivkontrolle, rot). Die gestrichelte Linie zeigt den oberen Grenzwert von 1.2 für Hemmstoffe der AQP2-Umverteilung. (B) Die repräsentative Farbkarte von Platte 115 zeigt die Verteilung von niedrigen Werten (rot) und hohen Werten (grün bzw. blau) für das Verhältnis von Plasmamembran zu intrazellulärer AQP2-Signalintensität. In Reihe 23 befinden sich FSK-stimulierte MCD4-Zellen (Negativkontrolle, grüne Farbgebung) und in Reihe 24 ist die Positivkontrolle (H89- und FSK-behandelte Zellen, rote Farbgebung) dargestellt. Für die weißen Felder bzw. *wells* war die Berechnung des Wertes nicht möglich.

Werte < 1 bedeuten, dass nur wenig AQP2 in der Plasmamembran zu detektieren ist, wohingegen bei Werten > 1 AQP2 überwiegend in der Plasmamembran nachzuweisen ist. Nach dem primären *Screening* wurden die die AQP2-Lokalisation für die Kontrollen berechnet und dargestellt (Abb. 18A). Als oberer Grenzwert für die zu identifizierten Hemmstoffe der AQP2-Umverteilung wurde ein Wert von 1.2 festgelegt. In der Farbrepräsentation der Werte für das Verhältnis von Plasmamembran zu intrazellulärer AQP2-Signalintensität (Abb. 18B, Platte 115) sind einige *wells* weiß dargestellt. Die Überprüfung der dazugehörigen Mikroskop-Bilder hat ergeben, dass in diesen *wells* keine Zellen zu erkennen waren. Dies deutet auf Schädigung der Zellen durch die entsprechenden Testsubstanzen und ein Herauswaschen der Zellen während des Hochdurchsatzverfahrens hin.

In Reihe 9 der Platte 115 war jedes zweite *well* im oberen Bereich der Platte weiß. Dies unterstreicht, dass strukturell sehr ähnlichen Verbindungen, die sich in den Bibliotheksplatten in jedem zweiten *well* befunden haben, hinsichtlich der hervorgerufenen toxischen Effekte auf MCD4-Zellen vergleichbar sind.



B**Abb. 19: Die Auswertung des primären Substanz-Screenings.**

(A) MCD4-Zellen wurden in 384-well-Zellkulturplatten mit Substanzen der ChemBioNet-Substanzbibliothek inkubiert (4AD oder TP, 40 μ M, 100 min, 37°C). Als Kontrollzellen wurden mit H89 (30 μ M, 100 min) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit FSK (10 μ M, 20 min, 37°C) stimuliert. AQP2 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung (H27, Cy5-gekoppelter Kaninchen-Sekundärantikörper; rot) detektiert. F-Aktin (TRITC-Phalloidin; grün) und die Zellkerne (DAPI; blau) wurden angefärbt. Die Bilder wurden am automatischen Mikroskop aufgenommen (10fache Vergrößerung). (B) Die Quantifizierung der AQP2-Lokalisation über das Verhältnis von Plasmamembran zu intrazellulärer AQP2-Signalintensität. Statistisch signifikante Unterschiede zu FSK-stimulierten Zellen sind angegeben. (mean \pm SEM, *P < 0.05, ***P < 0.001)

In unbehandelten MCD4-Zellen war AQP2 überwiegend perinukleär lokalisiert, während AQP2 in FSK-behandelten Zellen in der Plasmamembran zu detektieren war. Das Verhältnis von Plasmamembran zu intrazellulärer AQP2-Fluoreszenzsignalintensität nach FSK-Behandlung lag bei $1,4 \pm 0,1$. H89 verhinderte die FSK-induzierte Umverteilung von AQP2, verdeutlicht durch einen Wert von $0,91 \pm 0,1$ (Abb. 19). Für 83 verschiedene Verbindungen der ChemBioNet-Substanzbibliothek konnte die Hemmung der FSK-induzierten AQP2-Umverteilung im primären *Screening* nachgewiesen werden (siehe Anhang C). Für zwei dieser Verbindungen sind Bilder und die Quantifizierung dargestellt. Bei 17 Substanzen konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der AQP2-Umverteilung (40, 4 und 0.4 μ M) nachgewiesen werden. 14 der 17 Substanzen waren kommerziell erhältlich (ChemDiv, San Diego, CA, USA) und wurden an primären Sammelrohrzellen der Ratte (IMCD-Zellen) getestet. Fünf Verbindungen hemmten auch in primären IMCD-Zellen die cAMP-abhängige AQP2-Umverteilung (Tab. 1).

getestete Substanzen	primäre Treffer	Validierung in MCD4-Zellen	sekundäre Treffer in IMCD-Zellen
17700	83	17	5

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse.

Zwei der wirksamsten Substanzen, 4-Acetyldiphyllin (4AD) und ein Triazolpropenon (TP), wurden zur näheren Charakterisierung ihrer molekularen Wirkmechanismen und Zielstrukturen ausgewählt.

3.2 4-Acetyldiphyllin

Mithilfe strukturbasierter Datenbankrecherche wurde nach bekannten Wirkprinzipien, Anwendungen und Patentierung der Verbindung und strukturverwandter Analoga gesucht.

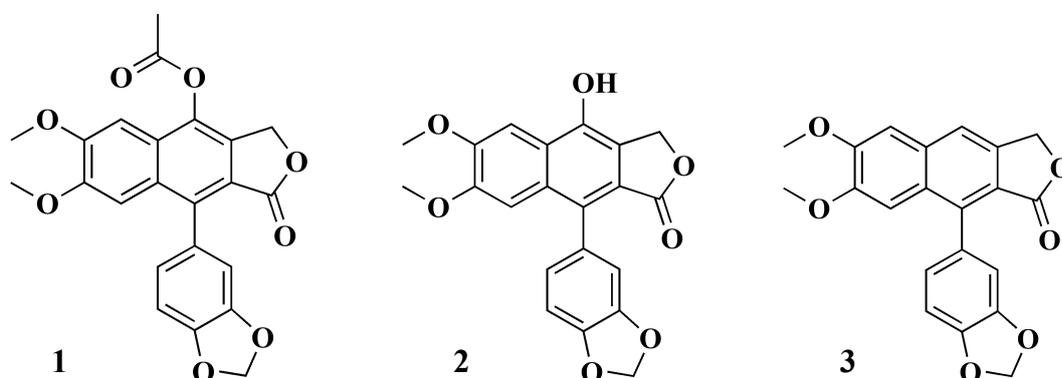


Abb. 20: Strukturformeln von 4-Acetyldiphyllin 1, Diphyllin 2 und Justicidin B 3.

Chemisch ist 4-Acetyldiphyllin (4AD) **1** ein Arylnaphthalin-Lignan mit großer struktureller Ähnlichkeit zu Justicidin B **3** und Diphyllin **2** (Abb. 20). In einem Patent aus dem Jahr 1984 wird die Anwendung von Justicidin-Analoga für verschiedene insektizide und antivirale Zubereitungen geschützt [123]. Ein weiteres Patent aus dem Jahr 2001 bezieht sich auf antivirale Justicidin- und Helioxanthin-Derivate, zur Anwendung bei Hepatitiden [124].

3.2.1 Toxizitätsbestimmung

MCD4-Zellen und primäre innermedulläre Sammelrohrzellen der Ratte (IMCD-Zellen) wurden mit 4AD in verschiedenen Konzentrationen (1 mM bis 5 nM) für 24 Stunden behandelt. Nach reduktiver Konversion des gelben MTT in violette Formazan durch metabolisch-aktive, lebende Zellen erfolgte die photometrische Bestimmung. Für MCD4-

Zellen wurde ein LC_{50} -Wert von $15 \mu\text{M}$ und für IMCD-Zellen ein Wert von $137 \mu\text{M}$ festgestellt (Abb. 21).

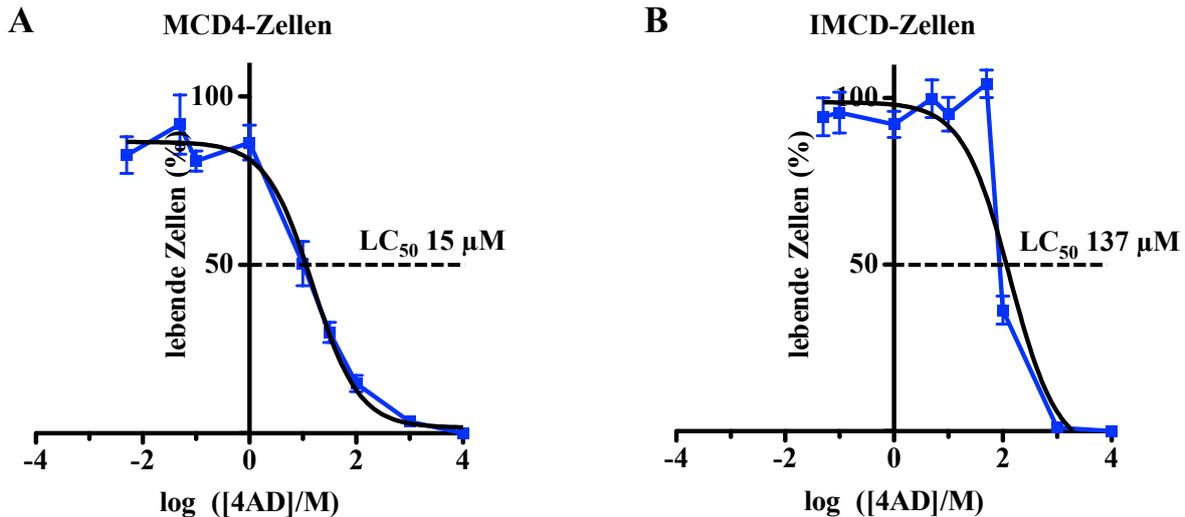


Abb. 21: Die Bestimmung der Toxizität von 4AD.

MCD4-Zellen (A) und primäre IMCD-Zellen (B) wurden mit 4AD in verschiedenen Konzentrationen (1 mM bis 5 nM) für 24 Stunden behandelt. Die Aktivität lebender, metabolisch-aktiver Zellen in Abhängigkeit von den eingesetzten Substanzkonzentrationen wurde mithilfe des MTT-Tests vermessen. (n = 3, Triplikate je Konzentration)

3.2.2 Quantifizierung der Hemmung von cAMP-abhängiger AQP2-Umverteilung

Zur Quantifizierung des Effekts von 4AD auf die cAMP-abhängige AQP2-Umverteilung wurden Zelloberflächenbiotinylierungsstudien durchgeführt. Primäre IMCD-Zellen wurden mit 4AD in verschiedenen Konzentrationen 4AD (40, 4, 0.4, 0.04 μM , 30 min, 37°C) mit oder ohne FSK-Stimulation (10 μM , 20 min, 37°C) behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte oder mit FSK stimulierte Zellen. Membranständige Zelloberflächenproteine wurden daraufhin biotinyliert und nach Lyse und Aufschluss der Zellen erfolgte die Anreicherung biotinylierter Proteine mit Streptavidin-Agarose. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und AQP2 und Cadherin (Membranprotein, Ladekontrolle) detektiert. Die quantitative Bestimmung des membranumverteilten AQP2 erfolgte densitometrisch. In unbehandelten Zellen waren geringe Mengen AQP2 in der Plasmamembran zu detektieren, während nach Stimulation der AQP2-Umverteilung in die Plasmamembran mit FSK die 2fache Zunahme der AQP2-Menge in der Plasmamembran nachweisbar war (Abb. 22). Für 4AD konnte eine Hemmung der FSK-stimulierten AQP2-Umverteilung über einen Konzentrationsbereich von 40 bis 0.4 μM gezeigt werden.

Kommerziell erhältliche Derivate von 4AD, 4-Ethoxydiphyllin und Diphyllin 2, wurden ebenfalls getestet. In vorläufigen Experimenten hemmten beide Verbindungen die FSK-induzierte Umverteilung von AQP2.

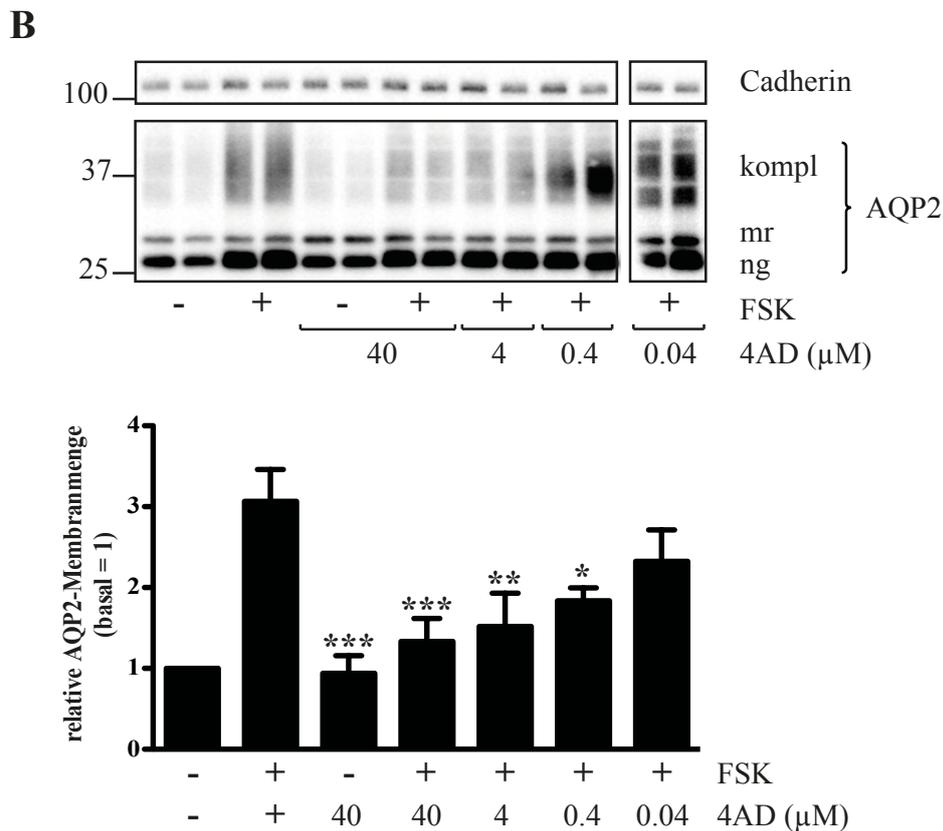
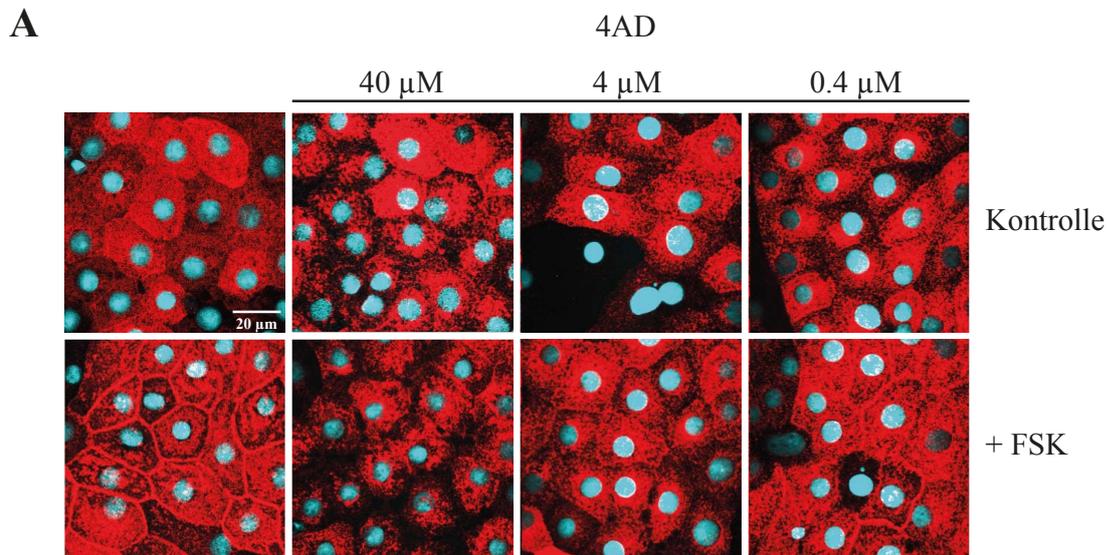


Abb. 22: Die Hemmung der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung durch 4AD.

(A) Primäre IMCD-Zellen wurden mit 4AD (40, 4, 0.4 oder 0.04 μM , 30 min) allein oder mit FSK (10 μM , 20 min) stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit FSK stimulierte Zellen. Die AQP2-Lokalisation wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Zellkerne sind in Blau (DAPI) und AQP2 (H27, Cy3-gekoppelter Kaninchen-Sekundärantikörper) ist rot in repräsentativen Bildern aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. (B) Zur Quantifizierung des Effekts von 4AD wurden Zelloberflächenbiotinylierungen durchgeführt. IMCD-Zellen wurden, wie angegeben, behandelt, die Zelloberflächenproteine wurden biotinyliert und aus Lysaten präzipitiert. Im Western Blot wurden AQP2 (C-17) und als Ladekontrolle Cadherin detektiert. Signifikante Unterschiede zu FSK-stimulierten Zellen sind angegeben. kompl, komplex-glykosyliertes AQP2; mr, mannosereiches AQP2; ng, nicht-glykosyliertes AQP2 (n = 3, mean \pm SEM, *P < 0.05, **P < 0.01 und ***P < 0.001)

3.2.3 Analyse des Wirkmechanismus von 4-Acetydiphyllin

Als Wirkmechanismus von Diphyllin **2** wurde die hochspezifische Hemmung von vakuolären H^+ -ATPasen (V-ATPasen) publiziert [125]. Um den Effekt von 4AD zunächst mit einem etablierten Hemmer dieser Protonenpumpe zu vergleichen, wurde Bafilomycin A1 **4** (Baf A1) [126] eingesetzt. Die Umverteilung von AQP2 wurde in Gegenwart von Baf A1 in primären IMCD-Zellen untersucht. Baf A1 war, wie erwartet, in der Lage, die FSK-induzierte AQP2-Umverteilung in primären IMCD-Zellen zu hemmen (Abb. 23B) [24].

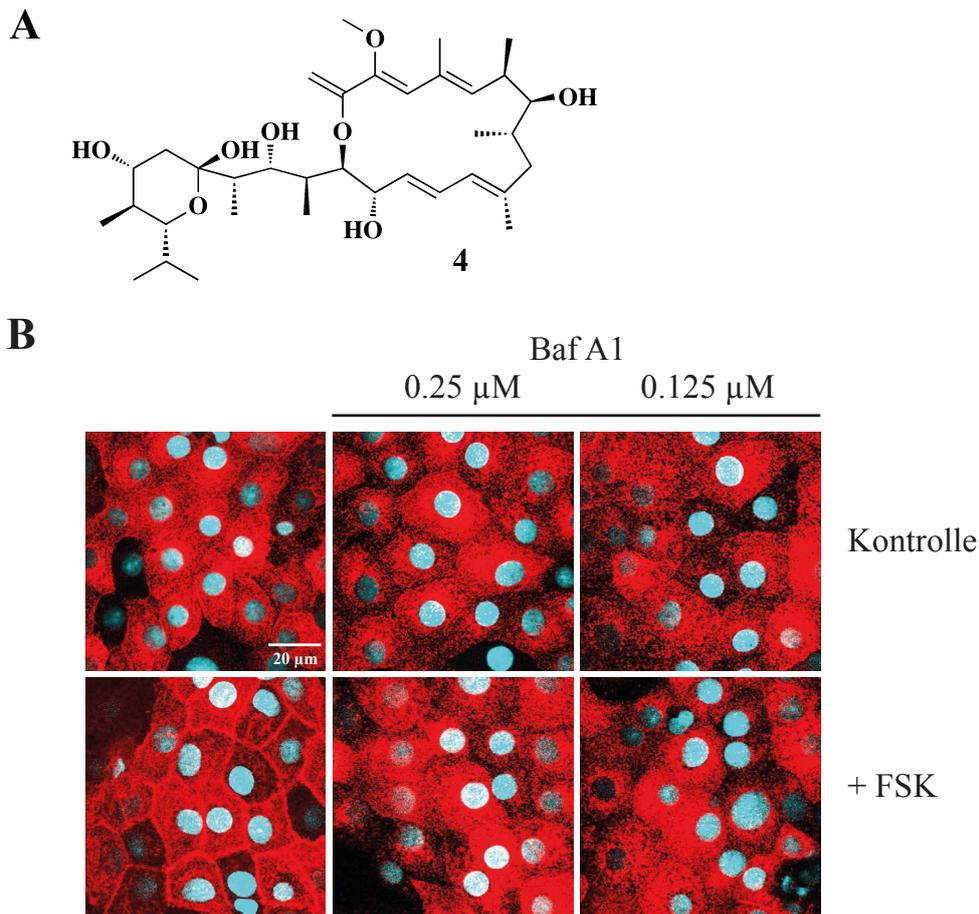
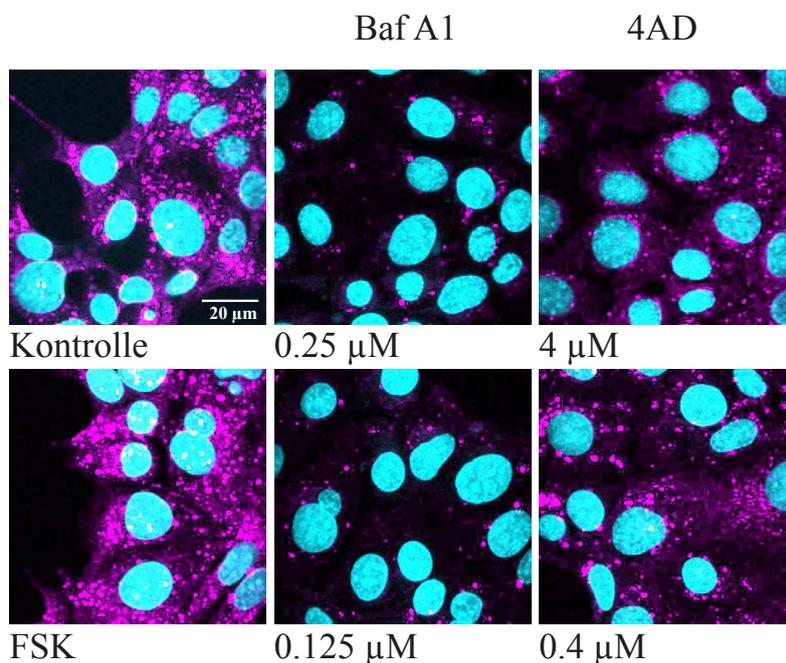


Abb. 23: Der V-ATPasen-Inhibitor Bafilomycin A1 (Baf A1) hemmt die AQP2-Umverteilung.

(A) Strukturformel von Baf A1 **4**. (B) Die Zellen wurden mit Baf A1 (0.25 oder 0.125 μ M, 30 min) mit oder ohne Zusatz von FSK (10 μ M, 20 min) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte bzw. FSK-stimulierte Zellen. Die AQP2-Lokalisation wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt und AQP2 wurde mit spezifischen primären Antikörpern (H27) und Cy3-gekoppelter Kaninchen-Sekundärantikörpern (rot) detektiert. Die Bilder wurden am LSM (100fache Vergrößerung) aufgenommen. Es sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

3.2.3.1 4-Acetyldiphyllin und Bafilomycin A1 erhöhen die pH-Werte intrazellulärer Vesikel

Zum Nachweis, dass 4AD auch in den für die Hemmung der AQP2-Umverteilung gewählten Konzentrationen V-ATPasen inhibiert, wurden pH-Wertänderungen in lebenden Zellen untersucht. Der schwach basische Farbstoff LysoTracker[®] Red DND-99 akkumuliert in sauren intrazellulären Kompartimenten und wurde eingesetzt, um pH-Wertänderungen in lebenden Zellen darzustellen. MCD4-Zellen wurden mit LysoTracker[®] Red DND-99 (75 nM, 30 min, 37°C) mit oder ohne 4AD bzw. Baf A1 inkubiert und in einer Küvette direkt im Anschluss am Mikroskop vermessen. LysoTracker[®] färbte saure Kompartimente in unbehandelten Zellen oder nach Stimulation mit 10 μ M FSK, was durch viele sphärische Fluoreszenzsignale zu detektieren war (Abb. 24A). Nach Behandlung mit 4AD (4 und 0.4 μ M, 30 min) oder Baf A1 (0.125 und 0.25 μ M, 30min) war anhand der signifikanten Abnahme der Fluoreszenzsignale eine Verschiebung der intravesikulären, sauren pH-Wertes in neutrale bis basische pH-Bereiche erkennbar. Zur Quantifizierung der Substanzeffekte wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der sauren Vesikel je μ m² bestimmt (Abb. 24B).



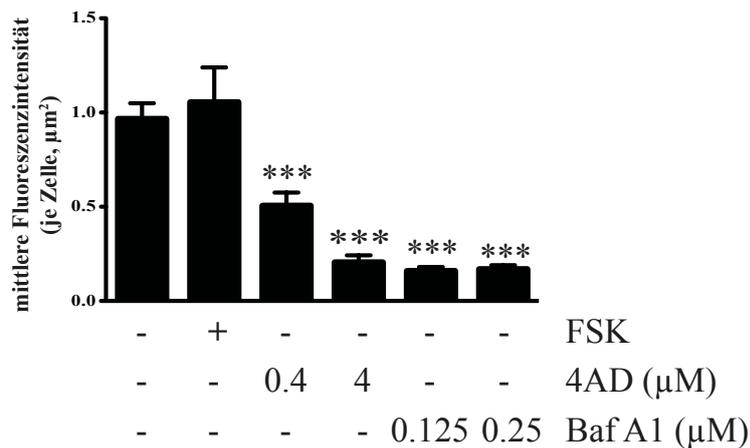


Abb. 24: Intravesikuläre pH-Werte wurden durch 4AD und Baf A1 angehoben.

(A) MCD4-Zellen wurden mit Baf A1 (0.25 oder 0.125 µM, 30 min) oder 4AD (4 oder 0.4 µM, 30 min) behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen und mit FSK (10 µM, 20 min) stimulierte Zellen. Die Färbung saurer Kompartimente mit LysoTracker® Red DND-99 (75 nM, 30 min; magenta) und der Zellkerne mit Hoechst 33258 (5 µM, 5 min; blau) erfolgte simultan. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend am LSM (100fache Vergrößerung) vermessen. Es sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten abgebildet. (B) Zur Quantifizierung der pH-Wertänderungen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der sauren Vesikel je Zelle bestimmt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollbedingungen (unbehandelten Zellen und FSK-stimulierten Zellen) sind ausgewiesen. (n = 3, > 30 Zellen je Bedingung, mean ± SEM, ***P < 0.001)

3.2.3.2 4-Acetyldiphyllin hemmt die S256-Phosphorylierung von AQP2 ohne die cAMP-Synthese oder PKA-Aktivität zu beeinflussen

Die AVP-vermittelte Aktivierung der PKA und daraus resultierende PKA-katalysierte AQP2-Phosphorylierung an S256 initiiert die AQP2-Umverteilung in die Plasmamembran [11]. Daher wurde im Folgenden die Phosphorylierung von AQP2 an S256 (pS256-AQP2) untersucht. Mögliche Einflüsse von 4AD auf die AQP2-Gesamtproteinmenge und PKA-abhängige Phosphorylierung an S256 (pS256-AQP2) wurden mittels Western Blot in Lysaten primärer IMCD-Zellen getestet. Die Zellen wurden wie in Abb. 25 ausgewiesen behandelt. Die Zunahme an Gesamt-AQP2 nach Stimulation der Zellen mit FSK (Abb. 25A) wurde durch 4AD nicht beeinträchtigt. Allerdings, war die PKA-vermittelte Zunahme von pS256-AQP2 durch 4AD gehemmt (Abb. 25B). Für 4AD-behandelte Zellen war die Menge an pS256-AQP2 nicht von unbehandelten Kontrollzellen oder FSK-stimulierten Zellen zu unterscheiden.

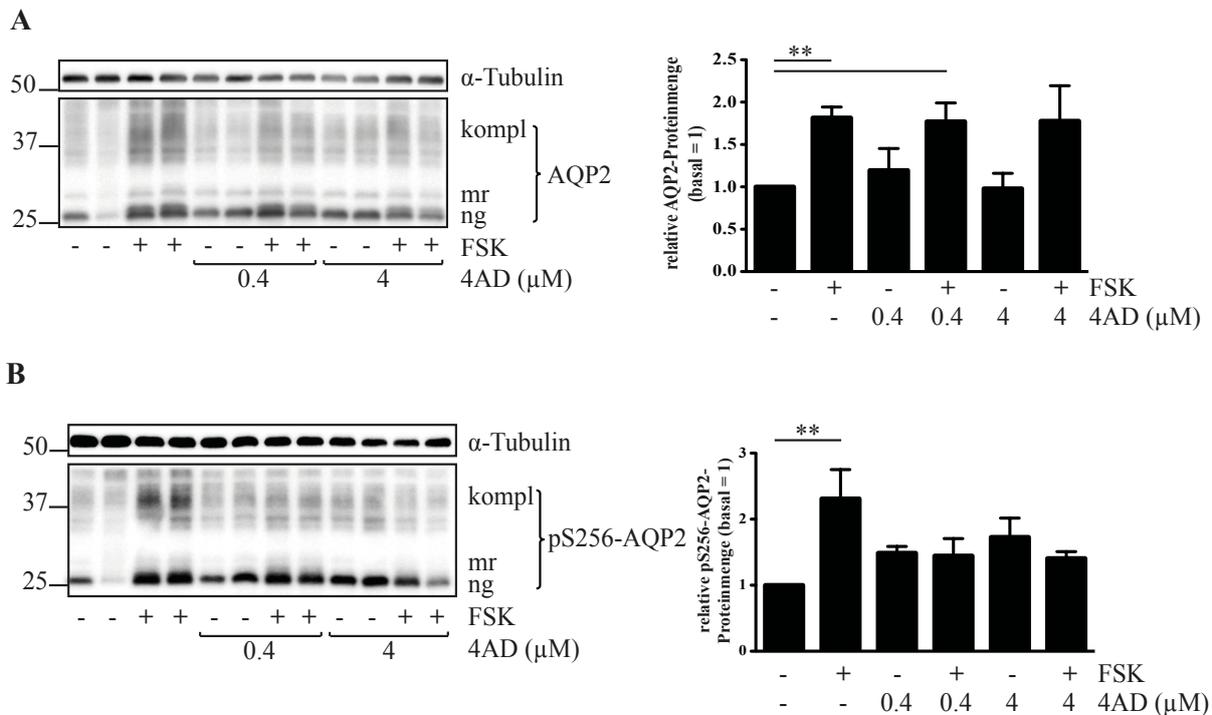


Abb. 25: 4AD hemmte die FSK-induzierte Zunahme an pS256-AQP2.

Primäre IMCD-Zellen wurden mit 4AD (4 oder 0.4 μM, 30 min) allein oder mit FSK (10 μM, 20 min) stimuliert. Als Kontrollen dienten unbehandelte oder mit FSK-stimulierte Zellen. In Zelllysaten wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot die Proteinmengen an Gesamt-AQP2 (A), an S256 phosphoryliertem AQP2 (pS256-AQP2) (B) bestimmt. Als Ladekontrolle diente α-Tubulin. Signifikante Unterschiede zu unbehandelten Kontrollzellen sind in der densitometrischen Auswertung dargestellt. (n = 3, mean ± SEM, **P < 0.01)

Voraussetzung für die Phosphorylierung von AQP2 an S256 ist die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA. Die mögliche Hemmung der Adenylylcyclase-vermittelten cAMP-Synthese durch 4AD wurde in einem cAMP-Radioimmunoassay (cAMP-RIA) untersucht. Dafür wurden primäre IMCD-Zellen mit 4AD (40, 4 und 0.4 μM) allein oder in Kombination mit 0.1 μM AVP oder 10 bzw. 30 μM FSK stimuliert. Phosphodiesterasen und damit der Abbau von neu-synthetisiertem cAMP wurden mit IBMX (250 μM, 30 min) gehemmt. Die Menge cAMP wurde mithilfe des cAMP-RIA (siehe Abb. 11; cAMP-RIA, J. Furkert, FMP) bestimmt. 4AD war in Konzentrationen bis zu 40 μM nicht in der Lage die Synthese von cAMP zu hemmen (Abb. 26).

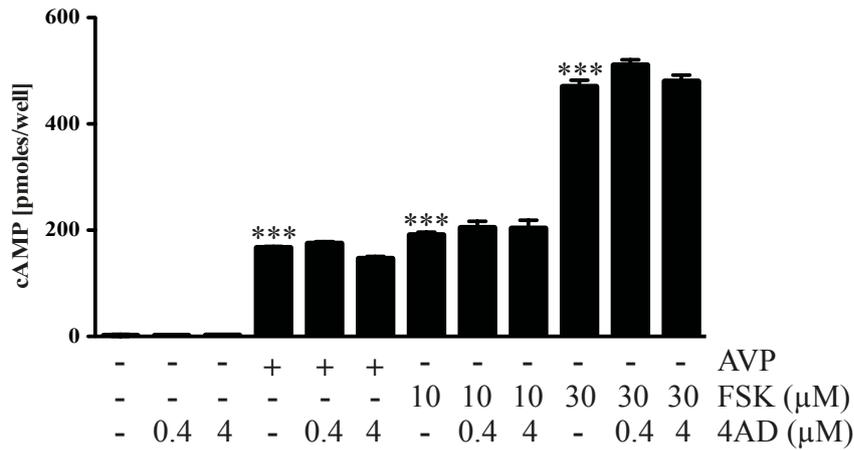


Abb. 26: 4AD hat keinen Einfluss auf die AVP- bzw. FSK-stimulierte cAMP-Synthese.

Primäre IMCD-Zellen wurden mit 4AD (4 oder 0.4 μM) allein oder in Kombination mit AVP (0.1 μM) oder FSK (10 oder 30 μM) behandelt. Phosphodiesterasen wurden mit IBMX gehemmt. Die Menge an cAMP wurde im Radioimmunoassay bestimmt. Signifikanzen gegenüber unbehandelten Kontrollzellen sind angegeben. (n = 3, mean ± SEM, ***P < 0.001)

Auch die Induktion von Phosphodiesterase-vermittelter cAMP-Hydrolyse durch 4AD konnte nicht nachgewiesen werden, da der nicht-selektive PDE-Hemmer IBMX die Wirksamkeit von 4AD nicht aufheben konnte. In primären IMCD-Zellen war nach Behandlung mit 4AD in Gegenwart von 250 μM IBMX eine Hemmung der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung zu beobachten (Abb. 27).

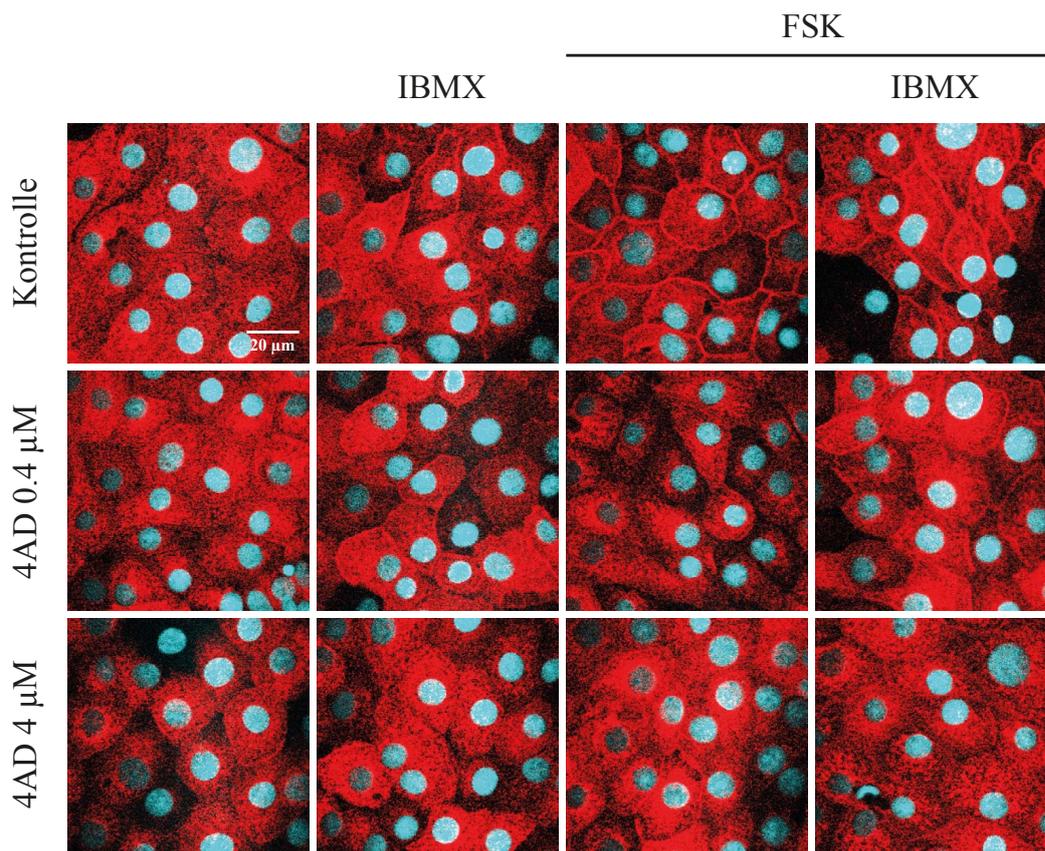


Abb. 27: Der Effekt von 4AD ist unabhängig von Phosphodiesterase-vermittelter cAMP-Hydrolyse.

Primäre IMCD-Zellen wurden mit 4AD (4 oder 0.4 μM) allein oder in Kombination mit FSK (10 oder 30 μM) stimuliert. Als Kontrollen dienten unbehandelte oder mit FSK stimulierte Zellen. Phosphodiesterasen wurden mit IBMX (250 μM) gehemmt. AQP2 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen primären Antikörpern (H27) und Cy3-gekoppelten Kaninchen-Sekundäntikörpern (rot) detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Bilder wurden am LSM (100fache Vergrößerung) aufgenommen. Es sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Da die cAMP-Synthese unbeeinflusst war und auch der verstärkte Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob 4AD die Aktivität der PKA inhibiert und so die FSK-induzierte Zunahme an pS256-AQP2 hemmt. Zur Bestimmung der PKA-Aktivität wurden MCD4-Zellen mit 4AD (4 oder 0.4 μM , 30 min) allein oder in Kombination mit FSK (10 μM , 20 min) stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte und FSK-stimulierte Zellen. In den Lysaten wurde die PKA-Aktivität mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten PKA-Substratpeptides (Promega) bestimmt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung des Ansatzes in ungeladenes, nicht-phosphoryliertes PKA-Substrat und in geladenes, phosphoryliertes PKA-Substrat (Abb. 3). Die Menge an phosphoryliertem im Verhältnis zu nicht-phosphoryliertem PKA-Substrat wurde als PKA-Aktivität graphisch dargestellt. 4AD war nicht in der Lage die Zunahme der PKA-Aktivität nach Stimulation der Zellen mit FSK zu hemmen. In Gegenwart von 4AD war auch keinerlei Inhibition der maximal erreichbaren PKA-Aktivität nach Zusatz von 1 μM cAMP im Inkubationsansatz nachweisbar (Abb. 28).

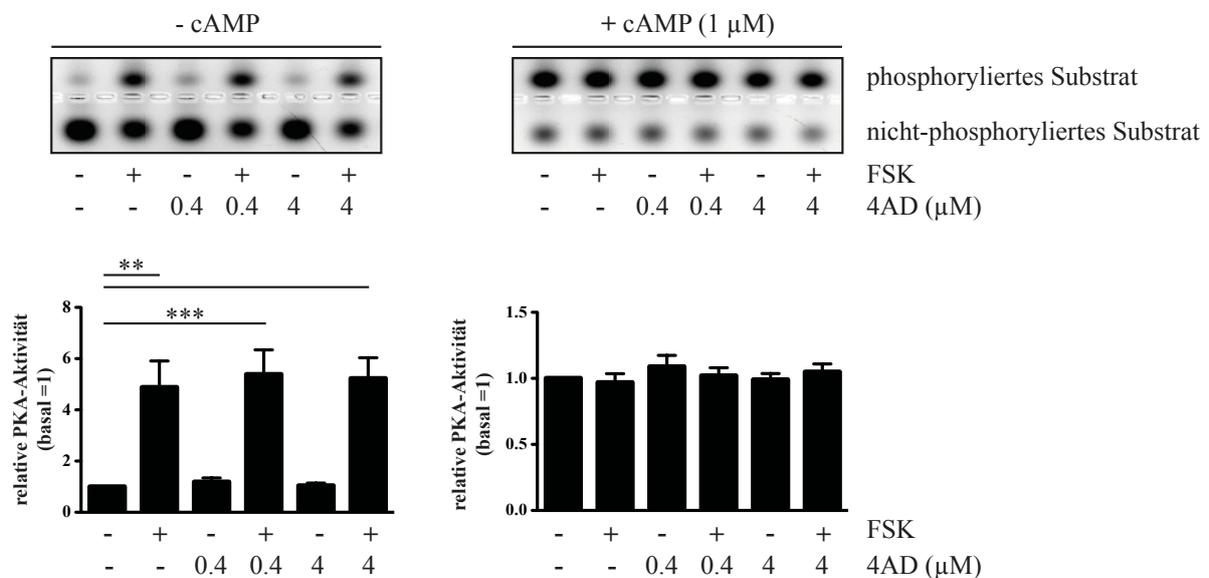


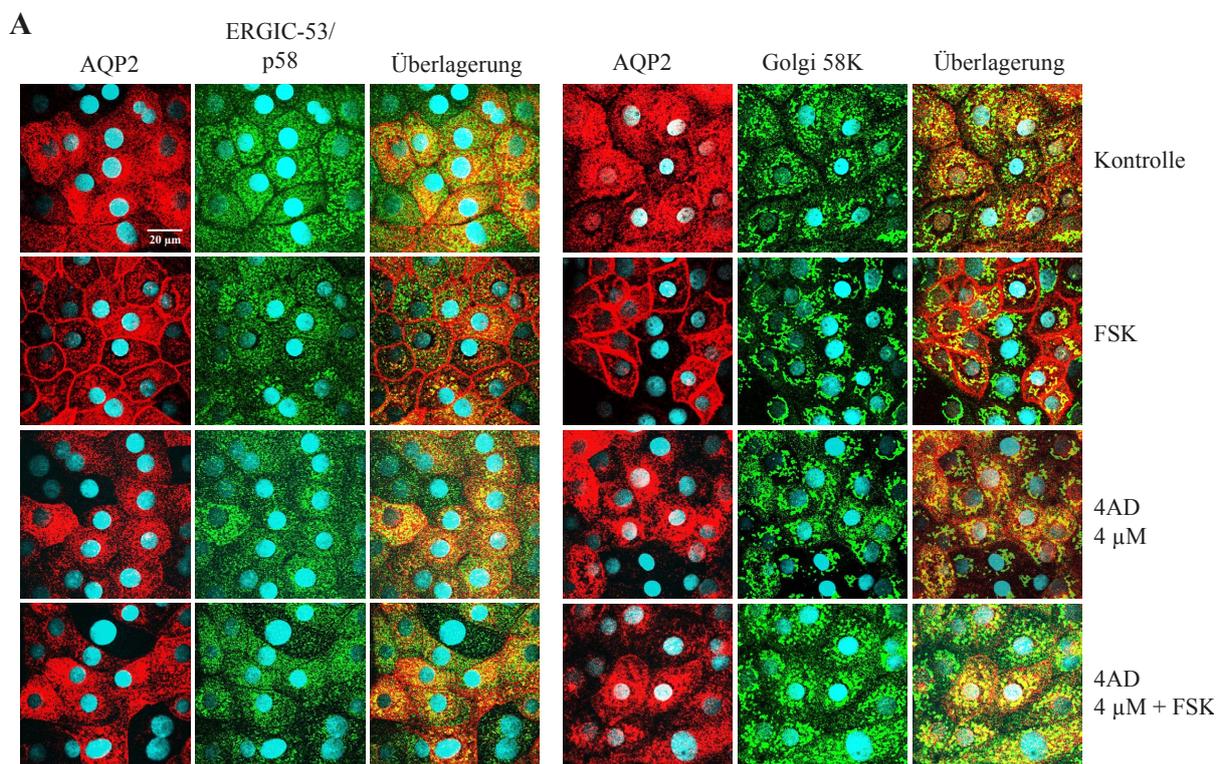
Abb. 28: Die PKA-Aktivität wird durch 4AD nicht beeinflusst.

MCD4-Zellen wurden mit 4AD (4 oder 0.4 μM , 30 min) allein oder mit FSK (10 μM , 20 min) stimuliert. Als Kontrollen dienten unbehandelte oder mit FSK-stimulierte Zellen. Die PKA-Aktivität wurde im Zelllysate ohne oder mit Zusatz von cAMP ermittelt. Die Auftrennung des PKA-Substratpeptides in phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes Substrat erfolgte im Agarose-Gel. Die

Menge an phosphoryliertem Substrat im Verhältnis zur Menge an nicht-phosphoryliertem Substrat wurde bestimmt und als PKA-Aktivität dargestellt. Signifikante Unterschiede zu unbehandelten Kontrollzellen sind angegeben. (n = 3, mean ± SEM **P < 0.01, ***P < 0.001)

3.2.3.3 Kolokalisationsstudien von AQP2 mit Golgi-Markerproteinen

Die Auswertung der Immunfluoreszenzmikroskopie lieferte Hinweise darauf, dass AQP2 nach 4AD-Behandlung im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Abb. 22A). Um dies zu überprüfen, wurden Kolokalisationsexperimente mit Golgi-Markerproteinen durchgeführt. Primäre IMCD-Zellen wurden mit 4AD (4 oder 0.4 µM, 30 min, 37°C) allein oder in Kombination mit FSK (10 µM, 20 min, 37°C) behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte und FSK-behandelte Zellen. Anschließend wurde AQP2 zum einen gemeinsam mit ERGIC-53/p58, einem Protein des endoplasmatischen Retikulum Golgi-Intermediärkompartimentes (ERGIC) detektiert (Abb. 29A, linksseitig). Zum anderen wurde AQP2 gemeinsam mit 58K, dem Enzym Formiminotransferase-Cyclodeaminase (FTCD) als Protein des gesamten Golgi-Apparates mittels Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert (Abb. 29A, rechtsseitig). In unbehandelten Zellen war der größte Anteil AQP2 mit den Markerproteinen kolokalisiert (Abb. 29A und B). Nach Stimulation mit FSK und Umverteilung von AQP2 in die Plasmamembran konnte eine Verringerung der Kolokalisation von AQP2 mit 58K und ERGIC-53/p58 nachgewiesen werden. In Gegenwart von 4AD war AQP2 mit ERGIC-53/p58 und dem gesamten Golgi-Apparat kolokalisiert, wobei die Übereinstimmung mit dem Golgi-Apparat größer war, als mit ERGIC-53/p58 (Abb. 29B).



B

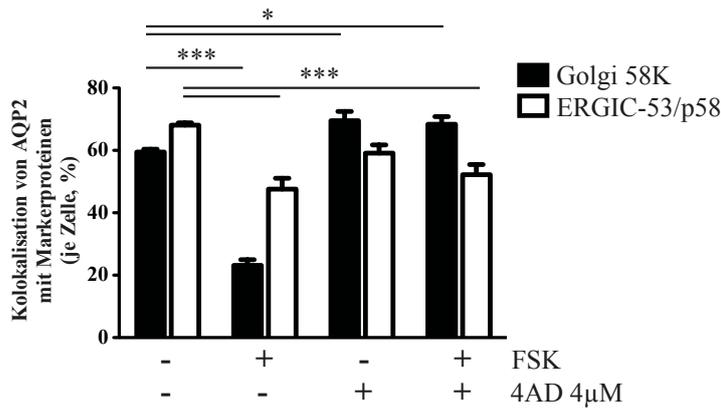


Abb. 29: AQP2 kolokalisiert mit Golgi-Markerproteinen in Gegenwart von 4AD.

(A) Primäre IMCD-Zellen blieben unbehandelt, wurden mit FSK (10 µM, 20 min), mit 4AD (4 µM, 30 min) allein oder in Kombination mit FSK stimuliert. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurden AQP2 (H27 oder C-17, Cy3-gekoppelte Kaninchen- oder Cy2-gekoppelte Ziege-Sekundärantikörper; rot), endoplasmatisches Retikulum Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC-53/p58, Cy3-gekoppelten Kaninchen-Sekundärantikörpern; grün), gesamter Golgi-Apparat (58K, Cy3-gekoppelter Maus-Antikörper; grün) und Zellkerne (DAPI; blau) detektiert. Die Bilder wurden am LSM (100fache Vergrößerung) aufgenommen. (B) Die Kolokalisation von AQP2 mit Golgi-Markerproteinen wurde quantifiziert. Der prozentuale Anteil an räumlicher Überlagerung von AQP2 mit ERGIC-53/p58 oder 58K ist dargestellt. (n = 3, > 25 Zellen je Bedingung, mean ± SEM, *P < 0.05, **P < 0.01)

3.2.3.4 4AD hat keinen Effekt auf die S261-Phosphorylierung von AQP2

Da 4AD die FSK-induzierte Zunahme an pS256-AQP2 gehemmt hatte, war zu klären, ob auch die S261-Phosphorylierung von AQP2 (pS261-AQP2) beeinflusst ist. Hohe pS261-AQP2-Proteinmengen sind in ruhenden, unstimulierten Zellen nachweisbar und mit der intrazellulären, perinukleären Lokalisation von AQP2 assoziiert [16]. Mithilfe eines spezifischen Antikörpers wurde in Lysaten unbehandelten Kontrollzellen viel pS261-AQP2-Protein detektiert. Wie erwartet, war nach FSK-Stimulierung (10 µM, 20 min) eine signifikante Abnahme der an S261 phosphorylierten AQP2-Proteinmenge nachzuweisen [16]. Die Gegenwart von 4AD (0.4 oder 4 µM, 30 min) allein oder in Kombination mit FSK konnte dieses Phosphorylierungsmuster nicht beeinflussen (Abb. 30).

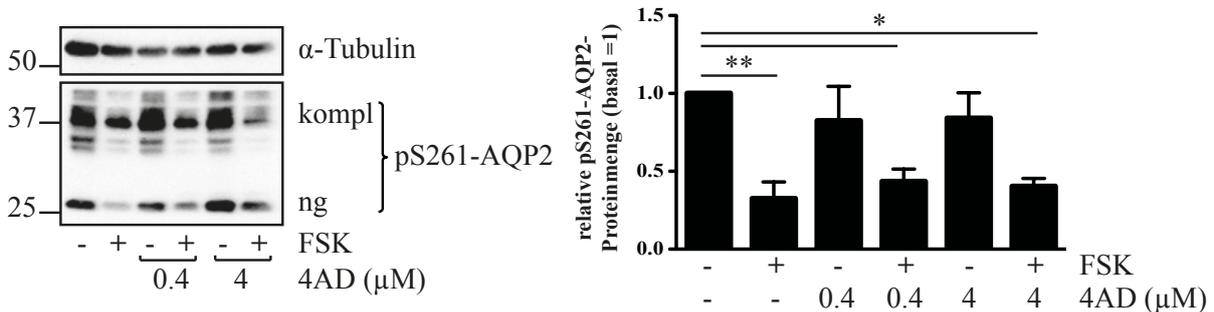


Abb. 30: 4AD verändert nicht pS261-AQP2.

Primäre IMCD-Zellen wurden mit 4AD (4 oder 0.4 μ M, 30 min) allein oder mit FSK (10 μ M, 20 min) stimuliert. Als Kontrollen dienten unbehandelte oder mit FSK-stimulierte Zellen. Im Western Blot wurde mit einem spezifischen Antikörper an S261-phosphoryliertes AQP2 (pS261-AQP2) bestimmt. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Signifikante Unterschiede zu unbehandelten Kontrollzellen sind in der densitometrischen Auswertung dargestellt. (n = 3, mean \pm SEM, *P < 0.05, **P < 0.01)

3.3 Triazolpropenon

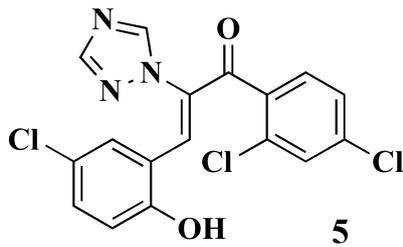


Abb. 31: Struktur des Triazolpropenons 5.

Beim zweiten näher untersuchten Hemmer der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung handelt es sich um ein Triazolpropenon 5 (TP). Die Anwendung verschiedener strukturell ähnlicher Di- und Triazolpropenon-Verbindungen zur Bekämpfung von Schadpilzen und nicht human-pathogenen Pilzen, wie *Albugo candida* (Weißer Rost) oder *Alternaria brassicola* (Schwärze, Schwarzfleckigkeit) bei einer Vielzahl von Nutz- und Kulturpflanzen, wie Getreide, ist bereits patentiert worden [127]. Eine mögliche Nutzung in der Humanmedizin wurde bisher auch für Strukturanaloga nicht beschrieben.

3.3.1 Toxizitätsbestimmung

Die Bestimmung des LC_{50} -Wertes für TP ergab in MCD4-Zellen einen Wert von $18.3 \mu\text{M}$ und für primäre IMCD-Zellen $34 \mu\text{M}$ nach 24stündiger Behandlung (Abb. 32).

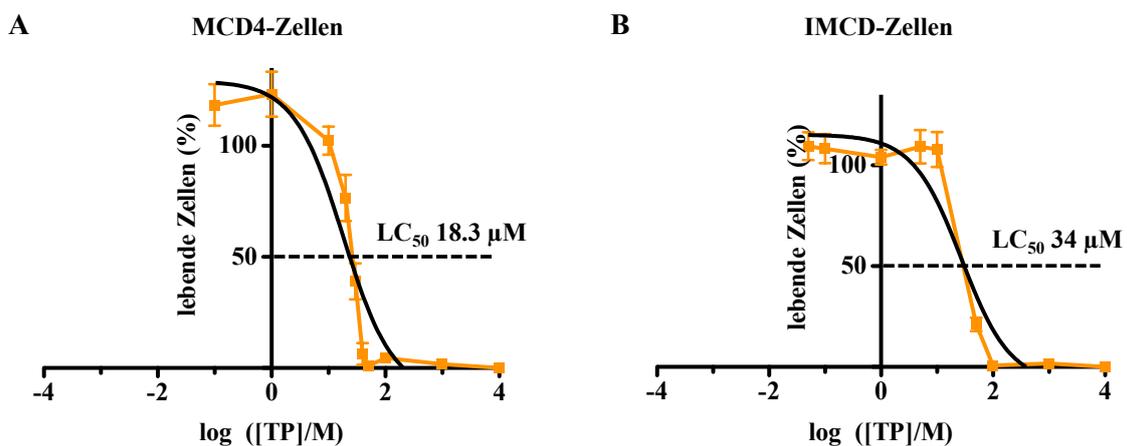
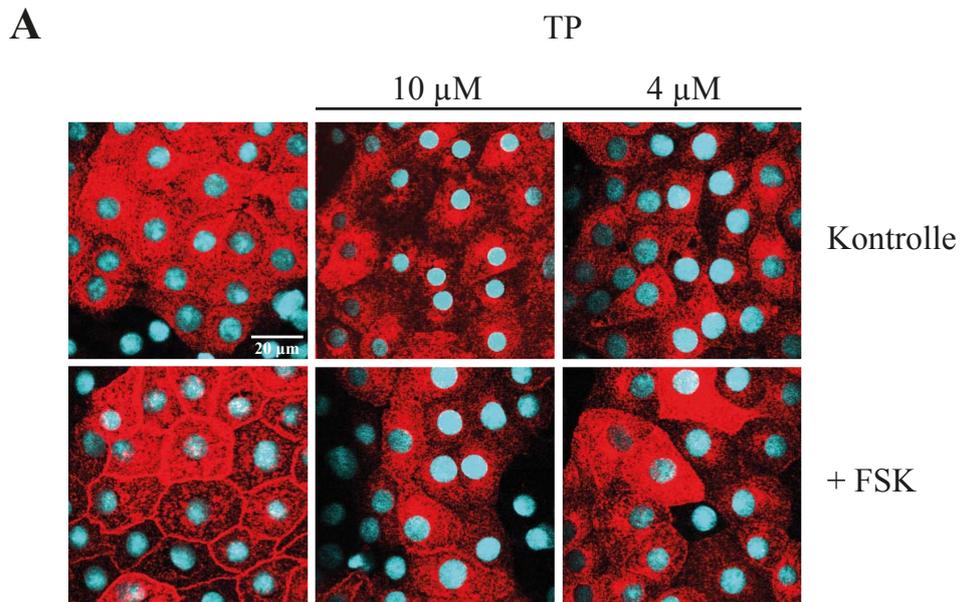


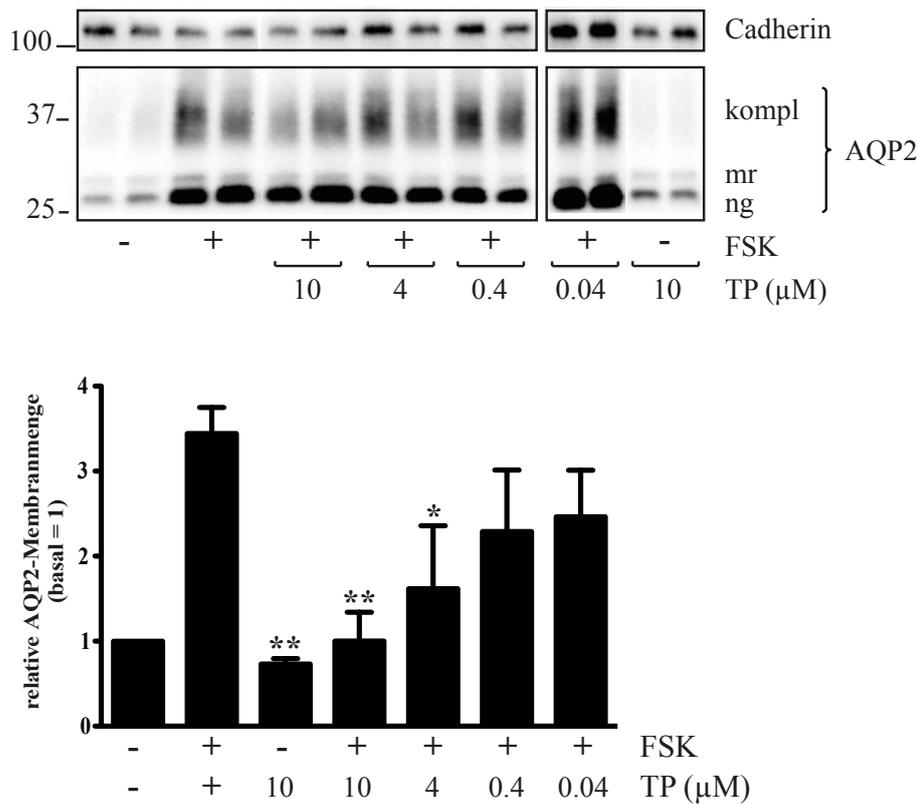
Abb. 32: Die Bestimmung der Toxizität von TP.

MCD4-Zellen (A) und primäre IMCD-Zellen (B) wurden mit TP in verschiedenen Konzentrationen (1 mM bis 5 nM) für 24 Stunden behandelt. Die Aktivität lebender, metabolisch-aktiver Zellen in Abhängigkeit von den eingesetzten Substanzkonzentrationen wurde mithilfe des MTT-Tests vermessen. (n = 3, Triplikate je Konzentration)

3.3.2 Quantifizierung der Hemmung von cAMP-abhängiger AQP2-Umverteilung

Zur Quantifizierung des Effektes von TP auf die AQP2-Umverteilung wurden primäre IMCD-Zellen mit TP (10, 4, 0.4 und 0.04 μM , 30 min) allein oder im Kombination mit FSK (10 μM , 20 min) behandelt und Zelloberflächenbiotinylierungsstudien durchgeführt. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden IMCD-Zellen mit TP (10 und 4 μM , 30 min) allein oder in Kombination mit FSK (10 μM , 20 min) inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte bzw. FSK-stimulierte Zellen.



B**Abb. 33: TP hemmt konzentrationsabhängig die FSK-induzierte AQP2-Umverteilung.**

(A) Primäre IMCD-Zellen blieben unbehandelt, wurden mit FSK (10 μM, 20 min) oder mit TP allein oder gemeinsam mit FSK stimuliert. Die AQP2-Lokalisation wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Bilder wurden am LSM (100fache Vergrößerung) aufgenommen. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt und AQP2 wurde mit spezifischen primären Antikörpern (H27) und Cy3-gekoppelten Kaninchen-Sekundärantikörpern (rot) detektiert. Es sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. (B) Zur Quantifizierung des Effektes von TP wurden Zelloberflächenbiotinylierungen in IMCD-Zellen durchgeführt. IMCD-Zellen wurden, wie angegeben, behandelt, die Zelloberflächenproteine wurden biotinyliert und aus Lysaten präzipitiert. Im Western Blot wurden AQP2 (C-17) und als Ladekontrolle Cadherin detektiert. Signifikante Unterschiede zu FSK-stimulierten Zellen sind angegeben. kompl, komplex-glykosyliertes AQP2; mr, mannosereiches AQP2; ng, nicht-glykosyliertes AQP2 (n = 3, mean ± SEM, *P < 0.05, **P < 0.01)

Morphologisch zeigten IMCD-Zellen keinerlei Auffälligkeiten, die auf toxische Effekte nach 30minütiger Behandlung mit TP (10 bzw. 4 μM) schließen ließen (Abb. 33A). TP hemmte die FSK-induzierte AQP2-Umverteilung in Konzentrationen von 10 bis 4 μM (Abb. 33B). Dieser Konzentrationsbereich lag dicht an den letalen Konzentrationen von TP (LC₅₀ 34 μM). Damit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Hemmung der AQP2-Umverteilung durch TP mit toxischen zellulären Prozessen überschneidet. Die Analyse des Wirkmechanismus dieses Triazolpropenons erschien somit wenig sinnvoll.

Im Weiteren wurde daher nach kommerziell erhältlichen, strukturell ähnlichen Derivaten von TP gesucht, die die FSK-induzierte AQP2-Umverteilung in geringeren Konzentrationen hemmen.

3.3.2 Kommerziell erhältliche Derivate des Triazolpropenons

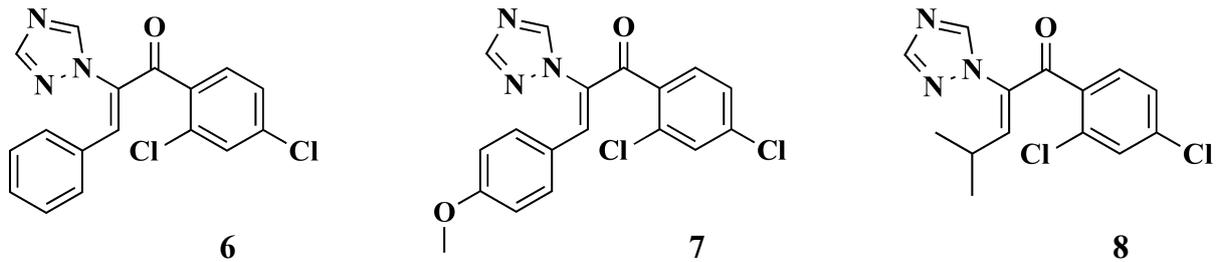


Abb. 34: Strukturformeln kommerzieller Derivate: 6 (TP₁), 7 (TP₂) und 8 (TP₃).

Es waren drei Verbindungen kommerziell erhältlich, die Modifikationen am Styryl-Rest des Triazolpropenons aufwiesen (Abb. 34).

3.3.2.1 Toxizitätsbestimmung

MCD4-Zellen wurden, wie bereits beschrieben, mit den kommerziellen Derivaten in verschiedenen Konzentrationen 24 h inkubiert und im Anschluss daran die Zell-Vitalität mit MTT bestimmt (Abb. 35). Für die einzelnen Derivate ergaben sich folgende LC₅₀-Werte: 38.4 µM (TP₁), 53.2 µM (TP₂) und 235.3 µM (TP₃). Der LC₅₀-Wert jedes einzelnen Derivates war damit höher als bei der Ausgangsverbindung TP (Abb. 32).

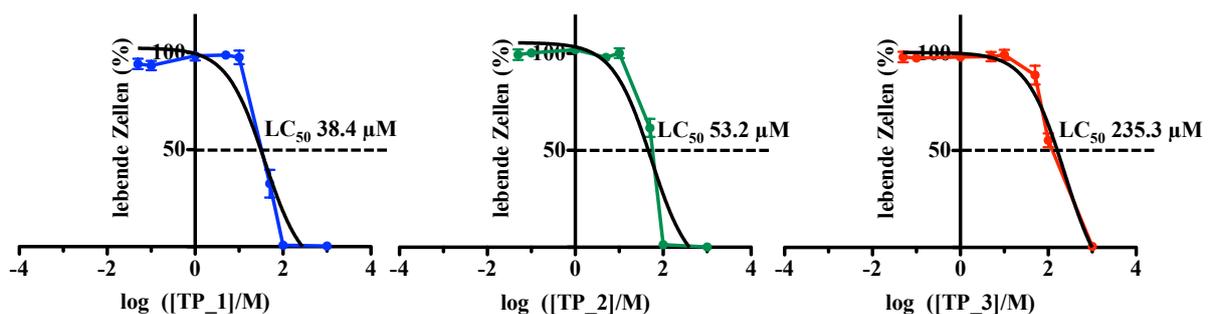


Abb. 35: Toxizitätsbestimmung für kommerzielle Derivate von TP.

MCD4-Zellen wurden mit TP₁, TP₂ oder TP₃ in verschiedenen Konzentrationen (1 mM bis 5 nM) für 24 Stunden behandelt. Die Aktivität lebender, metabolisch-aktiver Zellen wurde mittels MTT vermessen. (n = 3, Triplikate je Konzentration)

3.3.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Der Einfluss der kommerziellen Derivate von TP auf die cAMP-abhängige AQP2-Umverteilung wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. MCD4-Zellen wurden mit den drei Derivaten (40 µM, 30 min) allein oder in Kombination mit FSK (10 µM, 20 min) inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte bzw. mit FSK-stimulierte Zellen. Keines der Derivate war in der Lage die AQP2-Umverteilung zu hemmen (Abb. 36).

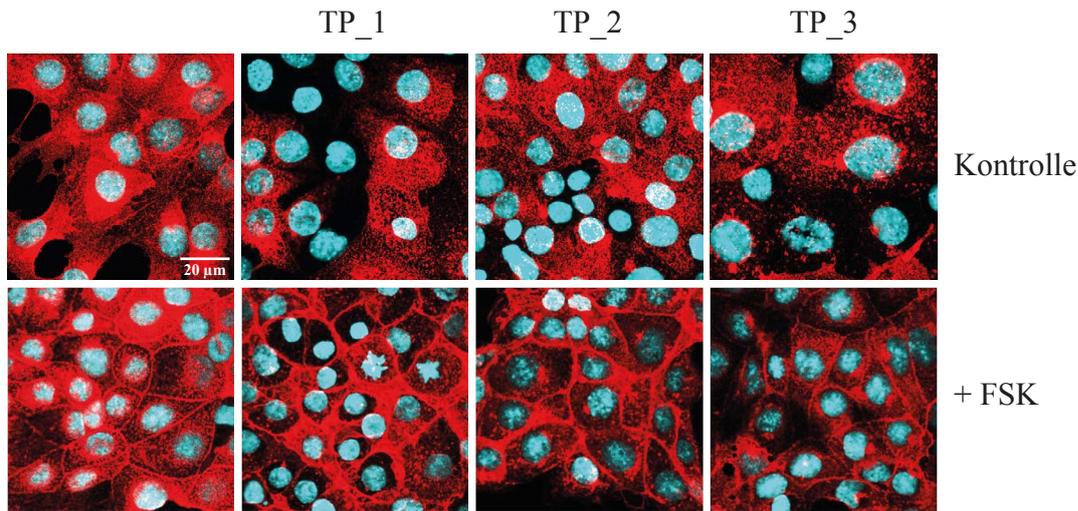


Abb. 36: Die Derivate TP_1, TP_2 und TP_3 hemmen nicht die AQP2-Umverteilung. MCD4-Zellen blieben unbehandelt, wurden mit FSK (10 µM, 20 min) stimuliert oder mit TP_1, TP_2 oder TP_3 (40 µM, 30 min) mit oder ohne FSK behandelt. Die AQP2-Lokalisation wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Zellkerne sind blau (DAPI) und AQP2 (H27, Cy3-gekoppelte Kaninchen-Sekundärantikörper) wurde rot dargestellt. Die Bilder wurden am LSM (100fache Vergrößerung) aufgenommen. Es sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen abgebildet.

3.3.3 Synthese weiterer Derivate der Triazolpropenon-Leitstruktur

Im Weiteren wurde ein Synthesekonzept erstellt, um besseren Aufschluss über die Struktur-Wirkungs-Toxizitätsbeziehungen zu erhalten. Die Erkenntnisse, die aus der Testung der kommerziellen Derivate gewonnen werden konnten, zeigten, dass Veränderungen am Styryl-Rest (Abb. 34) zum Wirkverlust der abgeleiteten Verbindungen führen. Durch gezielte Substitution der einzelnen Stickstoffe im Triazol-Ring sollte überprüft werden, welche Bedeutung der Ring und die einzelnen Stickstoffe für die Wirkung des Triazolpropenons haben.

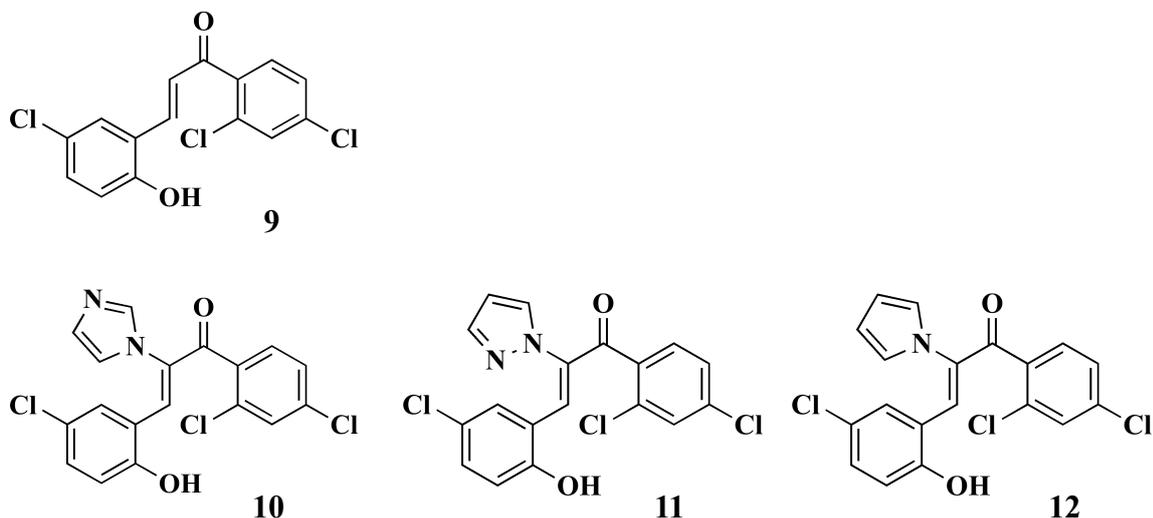


Abb. 37: Übersicht zur geplanten Synthese von Triazolpropenon-Derivaten.

Verbindung **9**, ein Chalcon ohne Triazol-Ring, wurde mittels Claisen-Schmidt-Aldol-Kondensation synthetisiert [121].

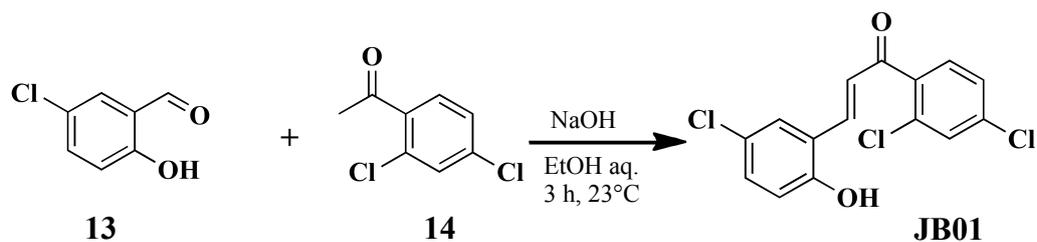
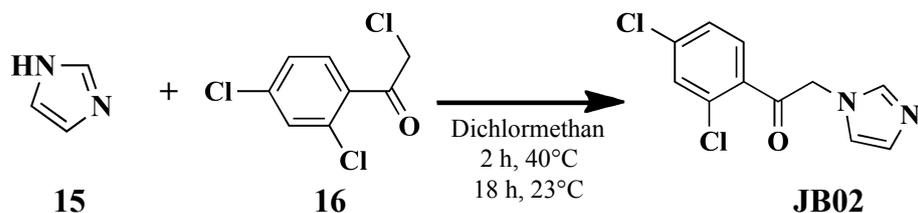


Abb. 38: Übersicht zur Synthese von Verbindung **9** (**JB01**).

Dafür wurden Dichloracetophenon **14** mit Chlorsalicylaldehyd **13** basenkatalysiert zum Chalcon **JB01** umgesetzt (Abb. 38).

A



B

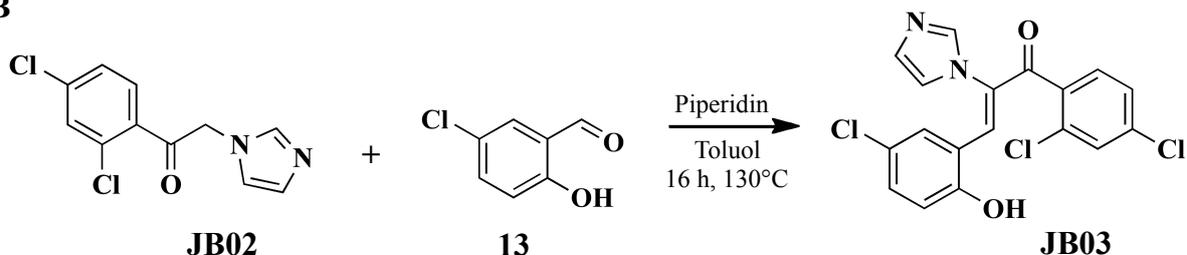
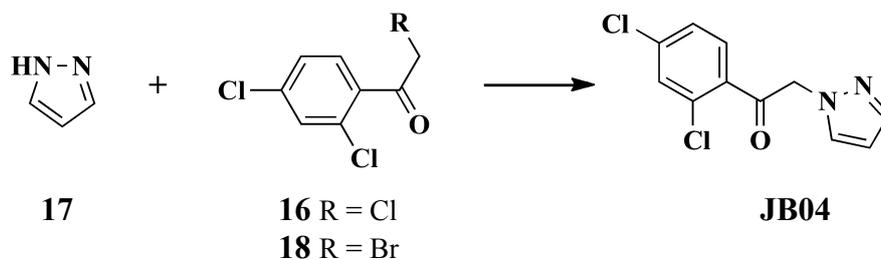


Abb. 39: Übersicht zur Synthese von (A) **JB02** und (B) Verbindung **10** (**JB03**).

Verbindungen **10** sollte in einer 2stufigen Synthese dargestellt werden (Abb. 39). Im ersten Schritt wurde Imidazol **15** mit Trichloracetophenon **16** in Dichlormethan zu **JB02** (Abb. 39A) umgesetzt [128].

JB02 wurde für die zweite Stufe der Synthese (Abb. 39B) mit Chlorsalicylaldehyd **13** und Piperidin in Toluol zum Produkt **JB03** umgesetzt [129].

Verbindung **11** sollte analog **JB03** in zwei Stufen dargestellt werden. Die Synthese nach Lennon *et al.* ergab für **JB02** eine geringe Ausbeute (8.3%) und aufgrund der geringeren Basizität von Pyrazol (pK_B 11.5 [130]) gegenüber Imidazol (pK_B 7 [131]) war eine noch geringere Ausbeute für **JB04** zu erwarten. Es wurden verschiedene Lösungsmittel und Basensysteme getestet, die aber nicht zum gewünschten Produkt führten (Tab. 2).



17	16	18	Base		LM	T	t	Ergebnis
3 äq	1 äq	-	0.07 äq TBAB	-	Toluol/ NaHCO ₃	23°C	24 h	Edukt, kein Produkt ^{a)}
3 äq	1 äq	-	0.07 äq TBAB	0.7 äq NaOH	Toluol/ NaHCO ₃	23°C	24 h	Edukt, kein Produkt ^{a)}
3 äq	1 äq	-	0.3 äq TBAB	0.7 äq NaOH	Toluol/ NaHCO ₃	80°C	24 h	Edukt, kein Produkt ^{a)}
1 äq	-	1.5 äq	0.01 äq TBAB	5 äq NaOH	Toluol/ H ₂ O	45°C	24 h	Edukt, kein Produkt ^{a)}
1 äq	-	1.5 äq	0.01 äq TBAB	5 äq NaOH	Toluol/ H ₂ O	80°C	2 h	Edukt, kein Produkt ^{a)}
2 äq	1 äq	-	-	-	-	90°C	30 min	Produkt, 54% Ausbeute ^{b)}

Tab. 2: Reaktionsbedingungen für die Synthese von JB04.

^{a)} nach Dünnschicht-Chromatographie und LC-MS-Daten. ^{b)} nach dünn-schicht-chromatographischer Auswertung, LC-MS-Spektren und ¹H-NMR nach säulen-chromatographischer Aufarbeitung.

Die Publikation von Perez *et al.* beschreibt ein lösungsmittelfreies Verfahren zur N-Alkylierung von Azolen unter Einsatz von Mikrowellen [132]. Zur Darstellung von **JB04** wurde diese Methode adaptiert und ohne Mikrowellen durchgeführt. Damit konnte **JB04** erfolgreich aus Pyrazol **17** und Trichloracetophenon **16** mit guter Ausbeute (54%) synthetisiert werden (Tab. 2).

Im Folgenden wurde **JB05** aus seiner Vorstufe **JB04** analog der Methode nach Zampieri *et al.* dargestellt (Abb. 40).

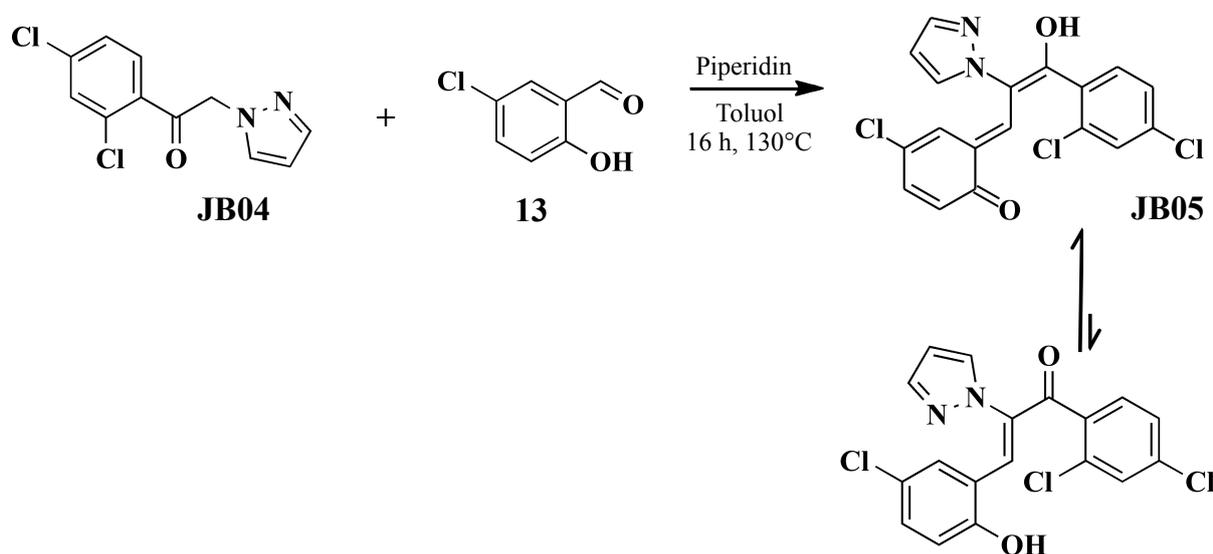
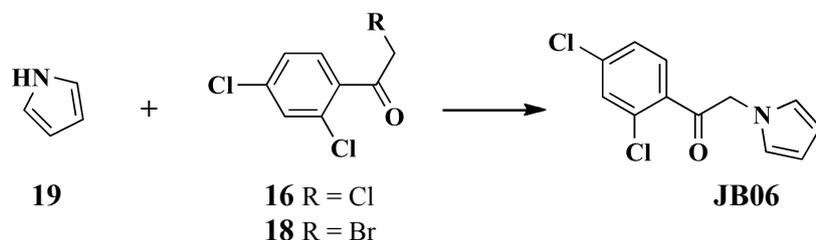


Abb. 40: Übersicht zur Synthese von JB05.

Es wurde die Vorstufe **JB04** mit Chlorsalicylaldehyd umgesetzt und das Produkt **JB05** in einer Ausbeute von 33% erhalten. Laut NMR-Daten lag **JB05** in der für unpolare Lösungsmittel bevorzugten Enol-Form vor.

Für die Darstellung von Verbindung **12** wurde im ersten Schritt Pyrrol **19** mit Trichloracetophenon **16** bzw. Bromdichloracetophenon **18** umgesetzt, um **JB06** zu erhalten.



19	16	18	Base		LM	T	t	Ergebnis
1 äq	1.2 äq	-	1.5 äq K ₂ CO ₃	3 äq [18] Krone-6	1,4- Dioxan	130°C	5 h	weder Edukt noch Produkt nachweisbar ^{a)}
1 äq	1.2 äq	-	1.2 äq K ₂ CO ₃	1.2 äq [18] Krone-6	1,4- Dioxan	130°C	1 h	weder Edukt noch Produkt nachweisbar ^{b)}
2 äq	1 äq	-	-	-	-	50°C	20 min	weder Edukt noch Produkt nachweisbar ^{a)}
1 äq	-	1 äq	0.24 äq K ₂ CO ₃	-	DMF	23°C	24 h	Edukt, kein Produkt ^{a)}
1 äq	-	1.2 äq	1.2 äq NaH	-	DMF	0°C	1 h	Edukt, kein Produkt ^{a)}
3 äq	-	1 äq	0.1 äq TBAB	0.7 äq NaOH	Toluol/ NaHCO ₃	40°C	24 h	Edukt, kein Produkt ^{a)}

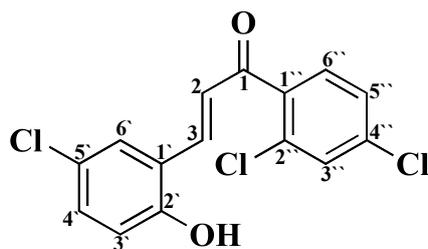
Tab. 3: Reaktionsbedingungen für die Synthese von JB06.

^{a)} nach Dünnschicht-Chromatographie und LC-MS-Daten. ^{b)} nach dünn-schicht-chromatographischer Auswertung, LC-MS-Spektren und ¹H-NMR nach säulen-chromatographischer Aufarbeitung und Trocknung.

Da Pyrrol eine sehr schwache Basizität aufweist (pK_B 13.6 [131]), war auch hier mit geringer Ausbeute zu rechnen. Verschiedenste Lösungsmittel, Basensysteme und Reaktionsbedingungen wurden getestet (Tab. 3). Der Austausch von Trichloracetophenon **16** gegen Bromdichloracetophenon **18** konnte die Umsetzung nicht verbessern. Auch die Anwendung einer lösungsmittelfreien Synthesevariante wie für **JB04** führte nicht zum Ergebnis. Entweder kam es unter den gewählten Bedingungen zu keinerlei Umsetzung der Edukte, oder das gewünschte, wohl labile Produkt war nicht zu detektieren.

Eine Darstellung von **JB06** bzw. Verbindung **12** war auf diesem Weg nicht möglich.

3.3.3.1 Synthese von (2E)-3-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)prop-2-en-1-on (JB01)



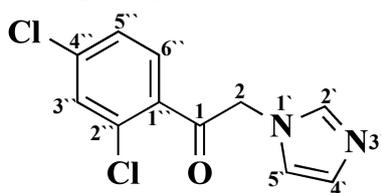
Ein 250 ml Rundkolben wurde mit einem Magnetrührer versehen und mit 5-Chlorsalicylaldehyd (1 g, 6.35 mmol), 130 ml wässrigem Ethanol und 2,4-Dichloracetophenon (1.2 g, 6.35 mmol) beladen. Nach vollständigem Lösen der Edukte wurde die Reaktionsmischung mit 52 ml wässriger NaOH (2.5 M) auf einen basischen pH-Wert eingestellt und gerührt (23°C, 3 h). Nach Neutralisation der Lösung mit HCl und Extraktion mit Chloroform (3x) wurden die vereinigten organischen Phasen getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und nach Einengen am Vakuumrotationsverdampfer ein gelber Feststoff erhalten. Die Rekristallisation in Chloroform/Hexan (3:7, über Nacht bei 4°C) und das Waschen des Feststoffes mit Hexan ergab das Produkt mit einer Ausbeute von 30.1% (0.982 g) als gelben Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, δ₆-DMSO): δ 6.93 (d, 3J = 8.8, 1H, 3'-H), 7.29 (d, 3J = 2.50, 1H, 2-H), 7.31 (m, 1H, 4'-H), 7.37 (s, 1H, 6'-H), 7.58 (d, 5J = 1.65, 1H, 6''-H), 7.60 (m, 1H, 5''-H), 7.76 (d, 5J = 1.65, 1H, 3''-H), 7.79 (d, 3J = 2.50, 1H, 3-H), 10.63 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (75 MHz, δ₆-DMSO): δ 117.95 (C-3'), 122.33 (C-1'), 123.25 (C-5'), 126.41 (C-2), 127.58 (C-5''), 128.18 (C-6'), 129.63 (C-3''), 130.68 (C-4'), 131.21 (C-4''), 131.91 (C-6''), 135.56 (C-1''), 137.46 (C-2''), 140.60 (C-3), 156.06 (C-2'), 192.37 (C-1)

LC-MS: berechnet 325.97 g/mol, erhalten 326.9 ([M+H]⁺) g/mol

3.3.3.2 Synthese von 1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethan-1-on (JB02)



Ein 50 ml Rundkolben wurde mit einem Magnetrührer versehen und mit Imidazol (0.91 g, 13.4 mmol) in 20 ml Dichlormethan beladen. Es erfolgte dann unter Rühren die tropfenweise Zugabe von 2,2',4'-Trichloracetophenon (1 g, 4.5 mmol in 15 ml Dichlormethan gelöst) mit einer Spritze über 30 Minuten. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 40°C und anschließend 18 h bei 23°C gerührt. Das Einengen der Produktmischung führte zu einem rotbraunen, öligen

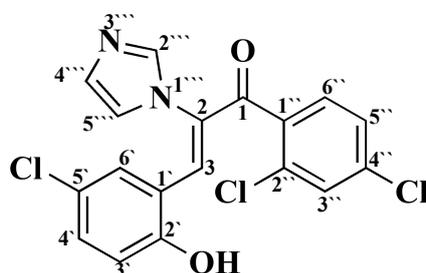
Rückstand, der in Methanol zur Rekrystallisation (über Nacht bei 4°C) aufgenommen wurde. Nach Filtrieren und Einengen am Vakuumrotationsverdampfer wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 8.3% (96 mg) erhalten. Die chemische Identität konnte anhand von LC-MS, ¹H-NMR und ¹³C-NMR bestätigt werden.

¹H-NMR (300 MHz, δ₆-DMSO): δ 5.60 (s, 1H, 2-H), 6.94 (s, 1H, 5'-H), 7.15 (s, 1H, 4'-H), 7.63 (s, 1H, 2'-H), 7.66 (dd, 1H, 4J = 8.3, 3J = 1.8, 5''-H), 7.83 (d, 1H, 3J = 1.8, 3''-H), 7.90 (d, 1H, 4J = 8.3, 6''-H)

¹³C-NMR (75 MHz): δ 54.71 (C-2), 120.65 (C-5'), 127.62 (C-4'), 128.01 (C-3''), 130.36 (C-5''), 131.20 (C-6''), 131.80 (C-4''), 134.05 (C-2''), 137.08 (C-1''), 138.18 (C-2''), 194.71 (C-1)

LC-MS: berechnet 254 g/mol, erhalten 254.8 ([M+H]⁺) g/mol

3.3.3.3 Synthese von 3-(4-chloro-2-hydroxyphenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)prop-2-en-1-on (JB03)



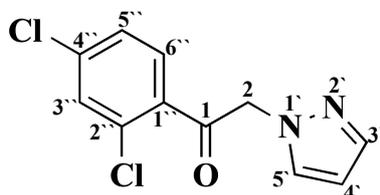
Ein 25 ml Rundkolben wurde mit einem Magnetrührer und einem Rückflusskühler versehen und mit **JB02** (0.09 g, 0.354 mmol) und 5-Chlorsalicylaldehyd (0.06 g, 0.354 mmol) in 10 ml Toluol bestückt. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von 70 µl Piperidin (0.708 mmol, ρ = 0.86 g/ml) und ein Farbumschlag zu gelb. Das Reaktionsgemisch wurde dann unter Rückfluss bei 130°C 16 h gerührt. Nach dem Abkühlen fiel ein gelboranger Feststoff aus. Das Gemisch wurde eingengt, in Chloroform aufgenommen und mit einer geringen Menge Essigsäure neutralisiert. Der Feststoff blieb aber unlöslich. Das Produktgemisch wurde mit Wasser (3x) gewaschen und die organische Phase mit dem gelborangen Feststoff eingengt. Das Trocknen mit Na₂SO₄ war nicht möglich. Nach dem Waschen des Rückstandes mit Diethylether und weiterem Einengen am Vakuumrotationsverdampfer wurde das Produkt als gelboranger Feststoff mit einer Ausbeute von 50.4% (0.07 g) erhalten. Die chemische Identität konnte anhand von LC-MS, ¹H-NMR und ¹³C-NMR bestätigt werden.

¹H-NMR (300 MHz, δ₆-DMSO): δ 6.02 (s, 1H, 4''-H), 6.91 (d, 3J = 8.8, 1H, 3'-H), 7.18 (s, 1H, 5''-H), 7.21 (s, 1H, 2''-H), 7.32 (d, 4J = 8.8, 1H, 4'-H), 7.60-7.72 (m, 3H, 3''-, 5''-, 6'-H), 7.75 (d, 4J = 8.2, 1H, 6''-H), 7.84 (s, 1H, 3-H), 10.80 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (75 MHz, δ₆-DMSO): δ 117.84 (C-3'), 119.42 (C-1'), 119.64 (C-3), 123.04 (C-5'), 127.29 (C-5''), 127.63 (C-6'), 129.52 (C-2), 129.65 (C-3''), 130.64 (C-4'), 131.10 (C-4''), 132.31 (C-2''), 132.90 (C-4''), 135.17 (C-3'''), 135.80 (C-6''), 135.97 (C-1''), 136.98 (C-2'')

LC-MS: berechnet 391.99 g/mol, erhalten 393.1 ([M+H]⁺) g/mol

3.3.3.4 Synthese von 1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-pyrazol-1-yl)ethan-1-on (JB04)



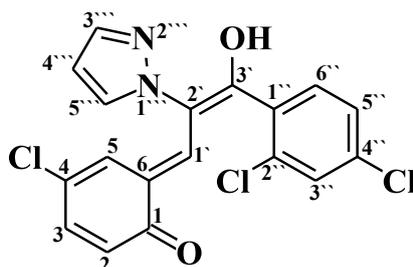
Ein 25 ml Rundkolben wurde mit Magnetrührer und Rückflusskühler versehen und mit Pyrazol (0.408 g, 6 mmol) und 2,2',4'-Trichloracetophenon (0.67 g, 3 mmol) bestückt. Die Edukte wurden lösungsmittelfrei 30 Minuten auf 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch in Ethylacetat aufgenommen und mit Ethylacetat/Hexan 1:1 säulenchromatographisch getrennt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 54% (0.43 g) erhalten. Die chemische Identität konnte anhand von LC-MS, ¹H-NMR und ¹³C-NMR bestätigt werden.

¹H-NMR (300 MHz, δ₆-DMSO): δ 5.67 (s, 2H, 2-H), 6.29 (s, 1H, 4'-H), 7.47 (s, 1H, 3'-H), 7.58 (dd, 1H, 3J = 8.4, 4J = 1.9, 5''-H), 7.72-7.76 (m, 2H, 3''-, 5'-H), 7.86 (d, 1H, 3J = 8.4, 6''-H)

¹³C-NMR (75 MHz, δ₆-DMSO): δ 59.66 (C-2), 105.76 (C-4'), 127.52 (C-5'), 130.30 (C-3''), 131.02 (C-5''), 131.53 (C-6''), 131.75 (C-4''), 134.26 (C-2''), 136.91 (C-1''), 139.34 (C-3'), 195.03 (C-1)

LC-MS: berechnet 254 g/mol, erhalten 255 ([M+H]⁺) g/mol

3.3.4.5 Synthese von 3-(4-chloro-2-hydroxyphenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-pyrazol-1-yl)prop-2-en-1-on (JB05)



Ein 50 ml Rundkolben wurde mit einem Magnetrührer und einem Rückflusskühler versehen und mit JB04 (0.2 g, 0.78 mmol) und 5-Chlorsalicylaldehyd (0.13 g, 0.86 mmol) in 20 ml

Toluol bestückt. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von 154.5 µl Piperidin (1.56 mmol, $\rho = 0.86 \text{ g/ml}$). Das Reaktionsgemisch wurde dann unter Rückfluss bei 130°C 16 h gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch eingengt, in Ethylacetat/Hexan (2:3) aufgenommen und säulen-chromatographisch aufgetrennt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 33% (0.305 g) erhalten. Die chemische Identität konnte anhand von LC-MS, $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ bestätigt werden.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, δ_6 -DMSO): δ 6.22 (s, 1H, 4''-H), 6.98 (d, 3J = 8.9, 1H, 2-H), 7.20 (s, 1H, 3''-H), 7.27 (dd, 4J = 8.7, 3J = 2.4, 1H, 6''-H), 7.40-7.50 (m, 3H, 3''-, 5''-, 5-H), 7.56 (s, 1H, 5''-H), 7.60 (s, 1H, 3''-H), 8.08 (d, 4J = 8.9, 1H, 3-H), 8.87 (s, 1H, 1'-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, δ_6 -DMSO): δ 95.78 (C-2''), 107.22 (C-4'''), 114.50 (C-2), 117.67 (C-3''), 119.82 (C-5), 121.27 (C-6), 123.64 (C-4''), 123.77 (C-1'), 125.59 (C-3'''), 126.84 (C-5'), 126.95 (C-3'), 127.76 (C-5'''), 128.94 (C-6''), 130.16 (C-2''), 130.74 (C-4), 136.02 (C-1'), 140.84 (C-3'''), 148.90 (C-3), 159.81 (C-3'), 190.10 (C-1)

LC-MS: berechnet 391.99 g/mol, erhalten 393.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) g/mol

3.3.5 Biologische Testung der dargestellten Derivate

3.3.5.1 Toxizitätsbestimmung

Die synthetisierten Verbindungen **JB01**, **JB03** und **JB05** wurden zunächst hinsichtlich ihrer Toxizität in MCD4-Zellen untersucht (Abb. 41). Es ergaben sich folgende LC_{50} -Werte: 17 µM (**JB01**), 22.3 µM (**JB03**) und 7 µM (**JB05**). Jede einzelne Verbindung hatte einen kleineren LC_{50} -Wert und höheres toxisches Potential als die Triazolpropenon-Leitstruktur (Abb. 32).

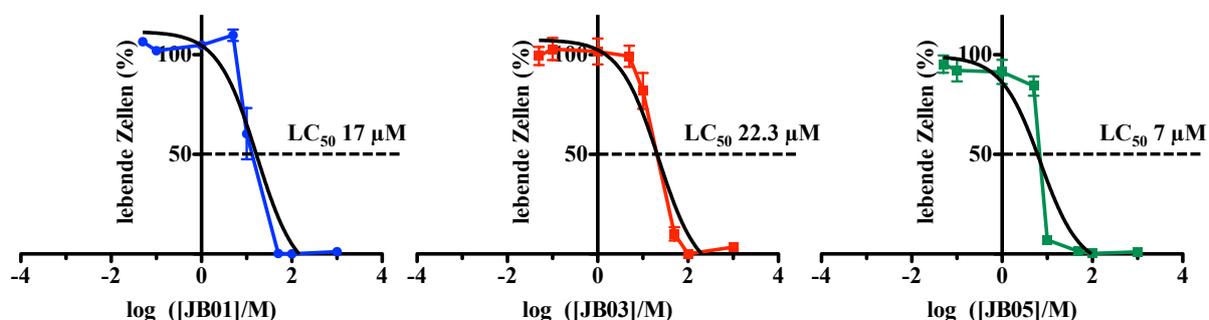


Abb. 41: Die Toxizitätsbestimmung für die synthetisierten Derivate.

MCD4-Zellen wurden mit JB01, JB03 und JB05 in verschiedenen Konzentrationen (1 mM bis 5 nM) für 24 Stunden behandelt. Die Aktivität lebender, metabolisch-aktiver Zellen wurde mittels MTT vermessen. (n = 3, Triplikate je Konzentration)

3.3.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

MCD4-Zellen wurden mit **JB01**, **JB03** und **JB05** (4 und 0.4 μM , 30 min) allein oder in Kombination mit 10 μM FSK (10 min Substanz allein + 20 min mit FSK) stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen bzw. FSK-stimulierte Zellen. Die AQP2-Lokalisation wurde immunfluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

In unbehandelte Zellen war AQP2 perinukleär lokalisiert, während nach Stimulation mit FSK eine Umverteilung von AQP2 in die Plasmamembran nachzuweisen war. Die Verbindungen **JB01**, **JB03** und **JB05** waren nicht in der Lage die FSK-induzierte AQP2-Umverteilung zu hemmen (Abb. 42).

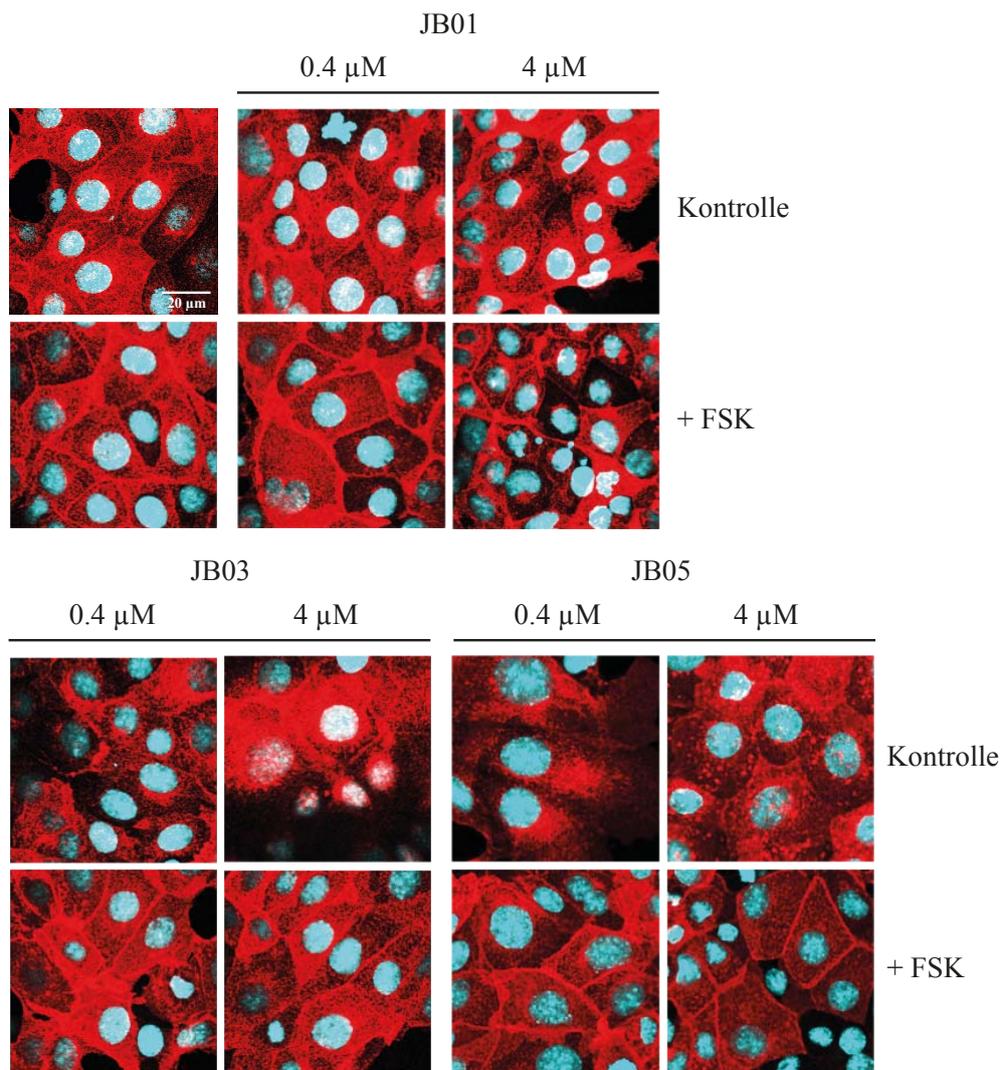


Abb. 42: Die synthetisierten Derivate JB01, JB03 und JB05 hemmen nicht die AQP2-Umverteilung.

MCD4-Zellen blieben unbehandelt, wurden mit FSK (10 μM , 20 min) stimuliert oder mit JB01, JB03 oder JB05 (0.4 oder 4 μM , 30 min) allein oder in Kombination mit FSK stimuliert. Die AQP2-Lokalisation wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. AQP2 wurde mit H27 und Cy3-gekoppelten Kaninchen-Sekundärantikörpern (rot) detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Bilder wurden am LSM (100fache Vergrößerung) aufgenommen. Es sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

3.3.6 Testung eines humanmedizinisch genutzten Azolantimykotikums

Für das fungizide Triazolpropenon war durch Literaturrecherche kein Wirkmechanismus zu ermitteln. Eine bedeutende antimykotische Arzneistoffgruppe mit Di- bzw. Triazolteil umfasst Hemmer des Enzyms 14α -Demethylase [69]. Der Einsatz dieser Verbindungen in Pilzen führt zur Störung der Zellwandbiosynthese durch Hemmung der Umsetzung von Lanosterol zu Ergosterol und zu fungistatischer bis fungizider Wirkung. Bekannte therapeutisch genutzte 14α -Demethylase-Inhibitoren sind die Arzneistoffe Fluconazol **20**, Ketoconazol **21** (Abb. 43) und Itraconazol. Strukturelle Ähnlichkeit zwischen den genannten Azolantimykotika und dem Triazolpropenon, abgesehen von den enthaltenen Di- bzw. Triazolteilen, besteht kaum.

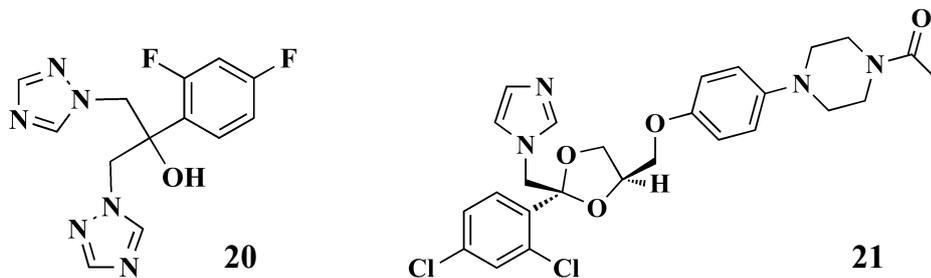


Abb. 43: Strukturen von Fluconazol **20** und Ketoconazol **21**.

Ob und inwiefern die Hemmung der Sterol-Biosynthese Einfluss auf die Lokalisation und Umverteilung von AQP2 hat, wurde mithilfe von Fluconazol als Vertreter der 14α -Demethylase-Inhibitoren getestet.

3.3.6.1 Toxizitätsbestimmung für Fluconazol

Zur Festlegung eines geeigneten Dosisbereiches wurde neben der Bestimmung der Toxizität in der Literatur nach den therapeutisch erreichten Konzentrationen in Blutplasma und verschiedenen Geweben gesucht.

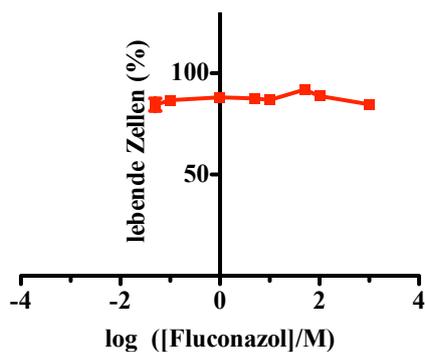


Abb. 44: Für Fluconazol war keinerlei Letalität festzustellen.

MCD4-Zellen wurden mit Fluconazol (1 mM bis 5 nM, 24 h) behandelt. Die metabolische Aktivität lebender Zellen wurden anschließend des MTT-Tests ausgewertet. (n = 3, Triplikate je Konzentration)

Es konnte in MCD4-Zellen im gewählten Dosisbereich von 1 mM bis 5 nM Fluconazol kein LC₅₀-Wert bestimmt werden (Abb. 44).

Die Plasmaspiegel für Fluconazol betragen nach Applikation von 150 mg (einmalig bei vaginaler Candidiasis) oder 400 mg (1x täglich bei Onychomykosen) im Mittel 2.61 µg/ml bzw. 6.72 µg/ml (entsprechend 8 bzw. 22 µM). Im Urin oder der Haut sind bis zu 10fach höhere Konzentrationen nachgewiesen worden (dailymed.nlm.nih.gov/dailymed, Diflucan, Pfizer, Roerig, Division of Pfizer Inc., NY; USA) [133, 134]. In Anlehnung an die für das Triazolpropenon in Zellexperimenten genutzten Konzentrationen wurden 10 und 40 µM Fluconazol eingesetzt.

3.3.6.2 Fluconazol induziert die AQP2-Umverteilung in MCD4-Zellen

MCD4-Zellen blieben unbehandelt, wurden mit FSK (10 µM, 20 min) oder Fluconazol (10 oder 40 µM, 30 min) allein oder in Kombination mit FSK stimuliert. Die AQP2-Lokalisation wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt

Fluconazol konnte die FSK-induzierte AQP2-Umverteilung in den gewählten Konzentrationen nicht hemmen. Allerdings konnte in Fluconazol-behandelten Zellen eine deutliche Anreicherung von AQP2 in der Plasmamembran festgestellt werden (Abb. 45). Dies deutet darauf hin, dass die Hemmung der 14α-Demethylase zur Umverteilung von AQP2 in die Plasmamembran führen kann.

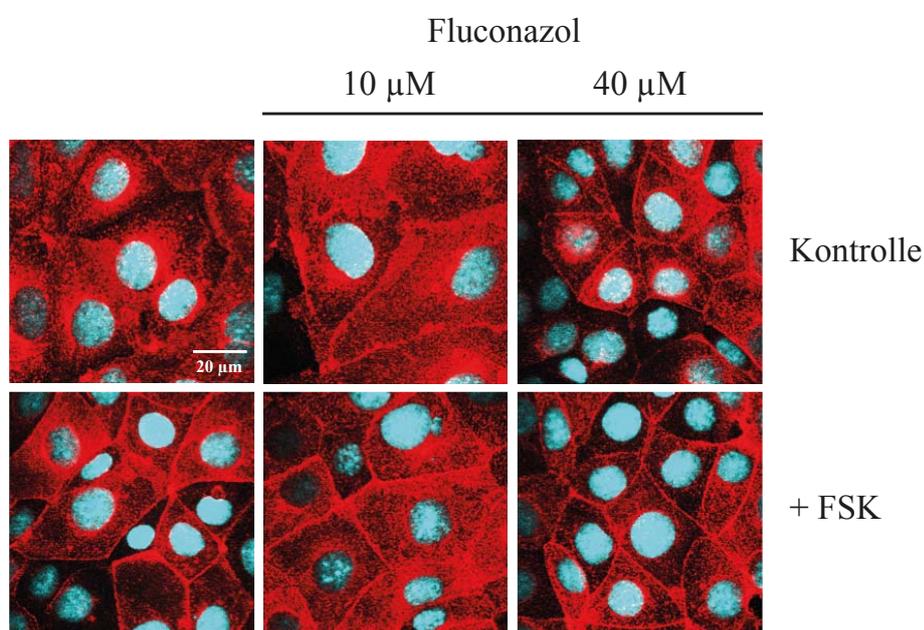


Abb. 45: Fluconazol induziert die Akkumulation von AQP2 in der Plasmamembran.

MCD4-Zellen wurden mit Fluconazol (10 oder 40 μM , 30 min) allein oder in Kombination mit FSK (10 μM , 20 min) stimuliert. Die AQP2-Lokalisation wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. AQP2 wurde mit spezifischen primären Antikörpern (H27) und Cy3-gekoppelten Kaninchen-Sekundärantikörpern (rot) detektiert. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt worden. Die Bilder wurden am LSM (100fache Vergrößerung) aufgenommen. Es sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

4. Diskussion

4.1 Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von Hemmstoffen der AQP2-Umverteilung

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein zellbasiertes Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung etabliert und durchgeführt werden. Dafür war es erforderlich ein geeignetes Zellsystem zu finden, in dem die Lokalisation von AQP2 in der 10fachen Vergrößerung am automatischen *Screening*-Mikroskop beurteilt werden konnte. Humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen), die AQP2 exprimieren, erwiesen sich als ungeeignet. Bereits bei einer 100fachen Vergrößerung am LSM (Abb. 15) war eine genaue Bestimmung der AQP2-Lokalisation (perinukleär, zytosolisch oder in der Plasmamembran) aufgrund des kleinen zytosolischen Bereiches der HEK293-Zellen nicht zuverlässig möglich. Eine Sammelrohrzelllinie der Maus (MCD4-Zellen), die stabil humanes AQP2 exprimiert, erfüllte dagegen die morphologischen Anforderungen um die AQP2-Lokalisation eindeutig zu definieren (Abb. 16). MCD4-Zellen sind etwa zwei- bis dreimal größer als HEK293-Zellen, im zytosolischen Bereich war die AQP2-Lokalisation sehr differenziert festzustellen. Zur vollautomatischen Bewertung der AQP2-Lokalisation im Hochdurchsatzverfahren musste eine Membranfärbung etabliert werden, die nach Abgleich mit dem Fluoreszenzsignal für AQP2 eine Berechnung der AQP2-Lokalisation erlaubt. Der Einsatz des Membranfarbstoffes CellMask™ war nicht möglich. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen gemäß dem Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung von AQP2 befand sich CellMask™ intrazellulär perinukleär lokalisiert ohne die Plasmamembran zu färben (Anhang A). Die Testung von TRITC-Phalloidin, welches hochaffin an F-Aktin bindet, ergab, dass die Färbung von F-Aktin in konfluenten Zellen als Membranmarker für das Hochdurchsatzverfahren genutzt werden konnte (Abb. 17 und Anhang A). Nach Durchführung des Hochdurchsatzverfahrens und weiterer Testung der identifizierten Substanzen, konnte für fünf chemisch diverse Verbindungen, sowohl im Testsystem MCD4-Zellen als auch in primären IMCD-Zellen die Hemmung der cAMP-abhängigen AQP2-Translokation in die Plasmamembran belegt werden (Tab. 1). Diese Verbindungen bildeten die Grundlage um in weiterführenden Untersuchungen der Wirkmechanismen einzelner Substanzen detaillierte Erkenntnisse über die cAMP-abhängige AQP2-Umverteilung zu gewinnen.

4.2 Charakterisierung von 4-Acetyldiphyllin als Inhibitor der AQP2-Umverteilung

4-Acetyldiphyllin (4AD) wurde als einer der wirksamsten Hemmer der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung identifiziert (Abb. 19). Um einen geeigneten Konzentrationsbereich für Untersuchungen zum Wirkmechanismus von 4AD festzulegen, wurden LC_{50} -Werte in MCD4- und primären IMCD-Zellen bestimmt (Abb. 21A und B) und zur Quantifizierung des Effektes von 4AD Immunfluoreszenzmikroskopie sowie Zelloberflächenbiotinylierungen durchgeführt (Abb. 22). In MCD4-Zellen wurde ein LC_{50} -Wert von 15 μ M und in primären IMCD-Zellen ein LC_{50} -Wert von 137 μ M ermittelt. Als Begründung für den etwa 10fach höheren LC_{50} -Wert in primären IMCD-Zellen verglichen mit MCD4-Zellen ist anzuführen, dass z. B. in Abhängigkeit von der Beschaffenheit und Durchlässigkeit der Plasmamembran, der Ausstattung der Plasmamembran mit bestimmten Transportproteinen oder auch der metabolischen Aktivität bestimmter Zellen bzw. Gewebe unterschiedlich hohe letale Konzentrationen exogener Noxen bestimmt werden.

Die Validierung und sekundäre Testung in primären IMCD-Zellen ergab eine Hemmung der AQP2-Umverteilung in Konzentrationen von 40 μ M bis 0.4 μ M 4AD (Abb. 22). Zur Aufklärung der zellulären Effekte von 4AD war es naheliegend, die einzelnen Schritte zur cAMP-abhängigen Translokation von AQP2 aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran zu untersuchen (Abb. 3). 4AD beeinflusste weder die Synthese von cAMP durch Adenylcyclasen (Abb. 26), noch die nachfolgende Aktivierung der PKA (Abb. 28). Eine Induktion der Phosphodiesterase-vermittelten cAMP-Hydrolyse durch 4AD scheint ebenfalls keine Rolle zu spielen. Der Einsatz des nicht-selektiven Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX hatte keinen Einfluss auf die Hemmung der AQP2-Umverteilung in 4AD-behandelten Zellen (Abb. 27). Allerdings blieb die Zunahme der PKA-abhängigen S256-Phosphorylierung von AQP2 (pS256-AQP2) in Zelllysaten nach Behandlung mit 4AD und Stimulation mit FSK aus (Abb. 25B). Für Diphyllin wurde als Wirkmechanismus die selektive Hemmung von vakuolären H^+ -ATPasen (V-ATPasen) publiziert [125]. Untersuchungen des pH-Wertes in sauren Kompartimenten (Abb. 24), wie Lysosomen, Endosomen und Transportvesikeln, wiesen für 4AD die Verschiebung des pH-Wertes in neutrale Bereiche nach. Diese Feststellung gilt auch für die Vergleichssubstanz Bafilomycin A1, einem etablierten V-ATPasenhemmer. Damit konnten für 4AD drei Effekte beobachtet werden: Die Inhibition der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung, einhergehend mit erhöhten intravesikulären V-ATPase-abhängigen pH-Werten und der Hemmung des Anstiegs der PKA-abhängigen pS256-AQP2.

Da die Aktivität der PKA nach 4AD-Behandlung unbeeinflusst war (Abb. 28), sind verschiedene Erklärungen denkbar. 4AD könnte die PKA-Aktivität auf lokaler Ebene einschränken und der Aktivierung durch FSK/cAMP entgegenwirken. PKA wird von AKAP an AQP2-haltigen Vesikeln verankert (Abb. 6), die Interaktion von PKA mit AKAP ist Voraussetzung für die AVP-vermittelte AQP2-Umverteilung [135, 5]. Sowohl AKAP18 δ als auch AKAP220 sind auf AQP2-haltigen Vesikeln nachgewiesen worden [37, 136]. Die globale Entkopplung der PKA von AKAP durch Peptide, die von den PKA-Bindedomänen von AKAP18 δ oder AKAP-Lbc abgeleitet wurden, hemmte die AVP-vermittelte AQP2-Umverteilung [135]. Vorläufige Ergebnisse aus Experimenten mit rekombinanter RII-Untereinheit der PKA und AKAP18 δ haben aber keinerlei Hinweis darauf ergeben, dass 4AD in Konzentrationen bis zu 200 μ M die PKA-AKAP-Interaktion unterbindet. Es ist eher unwahrscheinlich, dass 4AD selektiv den an AQP2-haltigen Vesikeln verankerten PKA-Pool hemmt. Die in dieser Arbeit angewandte Methode zur Bestimmung der PKA-Aktivität in Zellysaten kann jedoch keinen Aufschluss über lokale Veränderungen der PKA-Aktivität geben. Andererseits wäre es möglich, dass sich AQP2, zumindest der größte Proteinanteil, nicht in räumlicher Nähe zur PKA befindet und somit nicht phosphoryliert werden kann.

Kolokalisationsstudien mit Golgi-Markerproteinen (Abb. 29) zeigten, dass AQP2 nach Behandlung der Zellen mit 4AD ähnlich wie in unbehandelten Kontrollzellen im Golgi-Apparat lokalisiert ist. In ruhenden Kontrollzellen ist bereits ein kleiner Anteil an pS256-AQP2 nachweisbar [137], der nach Umverteilung von AQP2 unter dem Einfluss von PKA stark zunimmt (Abb. 25B). Dies ist mit einer geringeren Kolokalisation von AQP2 mit Golgi-Markerproteinen assoziiert (Abb. 29). Untersuchungen haben gezeigt, dass pS256-AQP2 beim Transit von AQP2 vom Endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat auch in Gegenwart des PKA-Inhibitors H89 zunimmt [138]. Die Aktivität einer Casein-Kinase-Typ II-ähnlichen Kinase (Golgi-Apparat Casein-Kinase, G-CK) im Golgi-Apparat, die ebenfalls PKA-Substrate erkennt und cAMP-unabhängig phosphorylieren kann, ist bekannt, aber bisher nicht gut charakterisiert worden [139]. Einige Substrate der G-CK wurden identifiziert, die von denen der Casein-Kinasen I und II abweichen, und diesen Kinasetypus als eigenständig abgrenzen. Es ist bisher neben der Lokalisation im Golgi-Apparat aber nur wenig über Regulierung und Funktion der G-CK bekannt. Mechanistisch lässt sich der Effekt von 4AD so erklären, dass die Hemmung der V-ATPasen den Transit von AQP2-haltigen Vesikeln, in die Zellperipherie verhindert. AQP2 akkumuliert im Golgi-Apparat und gerät damit in räumliche Nähe zur G-CK (Abb. 46). Diese These wird dadurch gestützt, dass in 4AD-behandelten gegenüber unbehandelten Zellen eine etwa 1.6fach erhöhte S256-Phosphorylierung von

AQP2 (Abb. 25B) festgestellt werden konnte. Es scheint, dass AQP2 im Golgi-Apparat nicht für PKA zugänglich ist bzw. AQP2-haltige Vesikel im Golgi-Apparat nicht mit PKA assoziiert sind, daher nimmt pS256-AQP2 in 4AD-behandelten Zellen nach Stimulation mit FSK nicht zu.

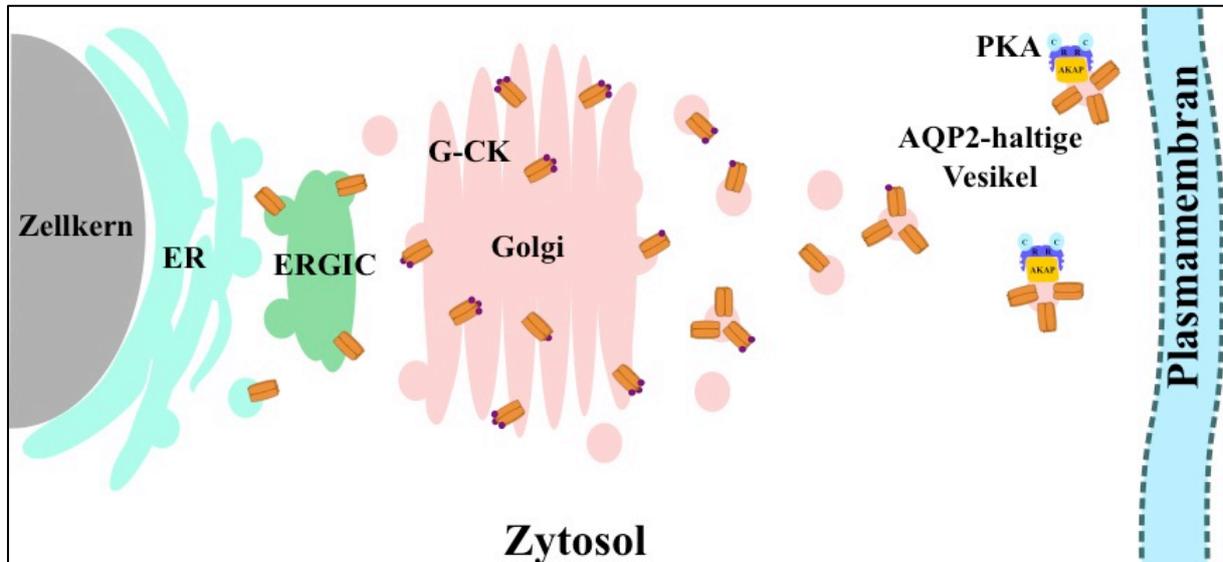


Abb. 46: Schematische Darstellung der AQP2-Lokalisation in ruhenden Hauptzellen.

In ruhenden Zellen befindet sich der größte Anteil AQP2 im Golgi-Apparat und scheint durch die Aktivität der G-CK an S256 phosphoryliert zu sein.

Die V-ATPasen-abhängige Azidifizierung von sekretorischen Vesikeln ist Voraussetzung für den Transport von neu-synthetisierten Proteinen und dem konstitutiven *Recycling* zwischen Plasmamembran und *trans*-Golgi-Netzwerk [140, 141]. Die Azidität in Lysosomen und damit auch die lysosomale Degradation von Protein und Proteinkomplexen ist von V-ATPasen abhängig [142]. Dieser Protonenpumpentyp kommt auch in der Plasmamembran von A-Typ-interkalierenden Zellen des Sammelrohrs vor. Bei Absinken des Blut-pH-Wertes (Azidose), durch z. B. erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen bei Hypoxie, akkumulieren V-ATPasen in der Plasmamembran der A-Typ-interkalierenden Zellen. Es kommt zu gesteigerter Protonensekretion in den Primärharn und zur Stabilisierung des systemischen Säure-Base-Gleichgewichtes [143]. Weiterhin, erfüllen V-ATPasen physiologisch wichtige Funktionen bei der Azidifizierung von sauren Lakunen für Osteoklasten-abhängige Knochenresorptionsvorgänge. Darauf bezugnehmend wurde die Anwendung von Diphyllin und struktureller Analoga zur Behandlung von Knochenresorptionsstörungen wie Osteopetrose (Marmorknochenkrankheit) vorgeschlagen [144, 125]. Seit kurzem ist die Inhibition von V-ATPasen als neues Therapiekonzept zur Behandlung von Krebserkrankungen im Gespräch [145]. Tumorzellen generieren über Protonenpumpen ein saures Umgebungsmilieu, dass z. B. für den Abbau von zellulären Barrieren und die Invasion

in den Blutkreislauf wichtig ist [146, 147]. In verschiedenen Krebszellmodellen konnten Zellproliferation gehemmt und Apoptose durch den Einsatz von V-ATPase-Inhibitoren induziert werden [148-150]. Die Anwendung von 4AD in der Therapie erscheint allerdings erst dann sinnvoll, wenn durch strukturelle Modifikationen der Leitstruktur Inhibitoren synthetisiert werden können, die spezifisch V-ATPasen in Tumorzellen hemmen oder gezielt in entarteten Zellpopulationen akkumulieren. Eine Zukunft dieser Verbindungen als Arzneistoffe ist aufgrund mangelnder Gewebsspezifität sehr fragwürdig, da schwerwiegende Beeinträchtigungen des Transportes wichtiger Plasmamembranproteine in Zellen oder der Urinazidifizierung durch Typ-A-interkalierende Zellen der Niere zu befürchten sind.

Bafilomycin A1 (Baf A1) wird weithin in der Molekularbiologie genutzt um endozytotische und exozytotische Transportprozesse zu untersuchen [24, 151]. Die Makrolid-Struktur von Baf A1 fungiert neben der in nanomolaren Konzentrationen hochspezifischen Hemmung von V-ATPasen als Ionophor für die Aufnahme von Kalium-Ionen in die Mitochondrien der Zellen [152]. Dieses strukturelle Merkmal ergänzt die vielversprechenden Effekte bei der Hemmung des Wachstums solider Tumoren durch Induktion von Apoptose [153], erschwert aber die Interpretation experimenteller Daten bei Anwendung von Baf A1 zur Untersuchung von intrazellulären Proteintransportprozessen aufgrund zusätzlicher Toxizität. Eine Funktion von 4AD als Ionophor ist basierend auf der Struktur nicht zu erwarten. Daher kann 4AD eine experimentelle Alternative zu Baf A1 sein.

4.3 Testung und Charakterisierung von Triazolpropenen

Für das Triazolpropenon (TP), einem weiteren Hemmer der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung, wurde in Immunfluoreszenzmikroskopie- und Zelloberflächenbiotinylierungsversuchen ein Wirkungsbereich von 10 bis 4 μM nachgewiesen (Abb. 33). Dieser Bereich der wirksamen Konzentrationen lag eng an den ermittelten LC_{50} -Werten (Abb. 32; LC_{50} 18.3 μM ; IMCD-Zellen LC_{50} 34 μM) Daher war nicht ausgeschlossen, dass sich zellulär letale Effekte von TP mit der Hemmung der AQP2-Umverteilung in diesen Substanzkonzentrationen überschneiden. Verlässliche Aussagen zu einem speziellen Mechanismus der Hemmung der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung waren somit nicht möglich. Im Weiteren wurden kommerziell erhältliche Strukturanaloga des Triazolpropenons (Abb. 34) getestet, um eine mögliche Trennung der toxischen Effekte von der Hemmung der AQP2-Umverteilung zu erreichen. Die Bestimmung der Toxizität der kommerziellen Derivate zeigte verbesserte LC_{50} -Werte (Abb. 35), aber keines der Derivate konnte die AQP2-Umverteilung hemmen (Abb. 36). Daraus ist zu schließen, dass Veränderungen am Styryl-Rest des Moleküls,

insbesondere die Substitution der Hydroxy-Gruppe zum Wirkverlust führen. Es ist vorstellbar, dass diese Hydroxy-Gruppe zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen mit dem Zielprotein notwendig ist und so direkt zur Wirkung beiträgt. Die Beteiligung einer intramolekularen Wasserstoffbrücken-Bindung zu einem der Triazol-Stickstoffe ist eher fraglich, da dies sterisch ungünstig erscheint.

Die kommerziell verfügbaren Derivate wiesen lediglich Modifikationen am Styryl-Rest der Leitstruktur auf. Es wurde daher ein Synthese-Konzept erarbeitet, um Derivate darzustellen, die Modifikationen des Triazols beinhalten (Abb. 37). Bei **JB01** handelt es sich strukturell um ein Chalcon; das Triazol ist gegen ein Proton ausgetauscht worden. Die Darstellung von **JB01** war durch klassische Claisen-Schmidt-Aldolkondensation eines Aldehyds mit einem Keton unter Basenkatalyse erfolgreich umsetzbar (Abb. 38) [121]. Für Chalcone sind vielfältige Wirkungen beschrieben, die von antioxidativen bis zytotoxischen Effekten reichen [154-156]. Dies ist mit der hohen Reaktivität des α,β -ungesättigten Propenons und der Ausbildung von kovalenten Bindungen zu Proteinen erklärbar. Die Arbeit von Karaman *et al.* weist gute antibakterielle und antimykotische Wirkung für eine Vielzahl von Chalconen nach. Diese Verbindungen tragen allerdings nur mono-substituierte Aryl-Reste [121]. Die Zytotoxizität für **JB01** war mit dem Triazolpropenon vergleichbar (Abb. 41, LC_{50} 17 μ M).

Die Verbindungen **JB03** und **JB05** wurden in einem 2stufigen Verfahren dargestellt (Abb. 39). Für die erste Stufe sollten nach Lennon *et al.* Imidazol **15** bzw. Pyrazol **17** zu **JB02** bzw. **JB04** umgesetzt werden [128]. Entgegen der publizierten hohen Ausbeute (58%) für **JB02** konnte nur eine geringe Ausbeute von 8.3% erzielt werden. Dies ist damit zu begründen, dass Lennon *et al.* in einem größeren Maßstab (27fach höhere Edukt-Einwaage) gearbeitet haben. Auch die Rekristallisation des Produktes aus Methanol kann als unvollständig angenommen werden. Trotz geringer Ausbeute der Vorstufe wurde **JB03** in ausreichender Menge (70 mg, 50.4%) nach dem Verfahren von Zampieri *et al.* (Abb. 38B) dargestellt [129].

Die Vorstufe, **JB04**, für Verbindung **JB05** war der Vorschrift von Lennon *et al.* nicht zu realisieren (Tab. 2). Grund hierfür ist die verglichen mit Imidazol (pK_B 7 [131]) geringere Basizität des Pyrazols (pK_B 11.5 [130]) und schwächere Elektrophilie für die N-Alkylierung mit Chloracetophenon **16**. Der Einsatz von Hilfsbasen in verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen oder der Austausch von Chloracetophenon **16** gegen die bromierte Verbindung **18** als leichtere Abgangsgruppe erbrachte keine Umsetzung zu **JB04** (Tab. 2). Neben dem Verfahren nach Lennon *et al.* in organischem Lösungsmittel ist ein lösungsmittelfreies Verfahren für die Synthese von **JB04** unter Einsatz von Mikrowellen beschrieben [132]. Perez *et al.* vergleichen in ihrer Studie die lösungsmittelfreie Umsetzung

mit und ohne Mikrowellen. In sehr kurzer Reaktionszeit werden die festen Edukte Pyrazol **17** und Chloracetophenon **16** verschmolzen und eine gute Ausbeute **JB04** erreicht (54%). Perez *et al.* stellten ebenfalls fest, dass bei der Vorgehensweise unter Einsatz von Lösungsmittel (Toluol) nur geringste Ausbeuten (gezeigt für Benzotriazol; 5%) zu erzielen waren. **JB05** wurde analog der Darstellung von **JB03** nach dem Verfahren von Zampieri *et al.* erfolgreich synthetisiert (305 mg, 33%). Die Toxizität nach Behandlung von MCD4-Zellen mit **JB03** oder **JB05** war mit der des Triazolpropenons vergleichbar, wobei **JB05** einen etwa 2fach kleineren LC₅₀-Wert aufwies (Abb. 41; LC₅₀ JB03 22.3 µM, JB05 7 µM).

Die Problematik einer sehr geringen Basizität für die N-Alkylierung wurde für die geplante Synthese der Verbindung **12** mit Pyrrol **19** (pK_B 13.6 [131]) noch deutlicher. Alle Versuche nach Lennon *et al.* oder auch Perez *et al.* eine Umsetzung zur Vorstufe **JB06** zu erreichen, blieben erfolglos (Tab. 3). Eine Darstellung der Verbindung **12** war nach der in dieser Arbeit gewählten Vorgehensweise aus den gegebenen Edukten nicht möglich.

Die erfolgreich synthetisierten Derivate **JB01**, **JB03** und **JB05** wurden in der Immunfluoreszenzmikroskopie in MCD4-Zellen getestet (Abb. 42). Es konnte keinerlei Hemmung der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung nachgewiesen werden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass auch Veränderungen am Triazol-Ring des Triazolpropenons, zum Wirkverlust der Verbindungen auf die AQP2-Umverteilung führen. Damit war eine Trennung von zytotoxischen Effekten und der Inhibition der AQP2-Translokation mittels neuer Derivate nicht zu erreichen. Ferner ist bestätigt worden, dass die im primären Hochdurchsatzverfahren festgestellte Hemmung der AQP2-Umverteilung in MCD4-Zellen (Abb. 19) auf toxische Effekte des Triazolpropenons zurückzuführen sein könnte. Die Charakterisierung der Wirkmechanismen, die Einfluss auf die cAMP-abhängige Umverteilung von AQP2 haben, war daher nicht möglich. Ein möglicher Nutzen der erstmals in dieser Arbeit aufgeführter Verbindungen **JB03** und **JB05** als Fungizide erscheint nachvollziehbar, da bereits Untersuchungen mit strukturell abgewandelten Substanzen vorliegen [127]. **JB03** und **JB05** müssen allerdings in zukünftigen Experimenten erst ihre Aktivität gegenüber z. B. *Candida albicans* unter Beweis stellen. Strukturell komplexer aufgebaute Verbindungen sind für die Anwendung zur Bekämpfung von Tuberkulose und Malaria im Gespräch [157, 129]. Der Wirkmechanismus dieser Substanzen soll auf der Hemmung eines Schlüsselenzyms der Sterol-Biosynthese, 14α-Demethylase, basieren [158]. Dadurch wird in Pilzen und Bakterien der Ergosterol- bzw. Sterol-abhängige Aufbau der Zellwand (Pilz) oder Plasmamembran (Eukaryoten) gestört. Sie werden durchlässig, was letztendlich zum Absterben des Organismus führt.

Eine Gruppe humanmedizinisch angewandter Hemmstoffe der 14 α -Demethylase stellen die Azolantimykotika dar [69, 159]. Wichtige Vertreter sind neben den topisch applizierten Clotrimazol oder Bifonazol die auch systemisch eingesetzten Wirkstoffe Fluconazol, Itraconazol oder Ketoconazol. Zur Abklärung eines möglichen Zusammenhangs von 14 α -Demethylase-Hemmung und AQP2-Umverteilung wurde als Vertreter der Azolantimykotika Fluconazol getestet. In MCD4-Zellen war für das gut wasserlösliche Azol im Bereich von 1 mM bis 5 nM kein LC₅₀-Wert bestimmbar und damit keine Letalität nachzuweisen (Abb. 44). Dies unterstreicht den bevorzugten Einsatz von Fluconazol verglichen mit dem lipophileren Ketoconazol (MCD4-Zellen, LC₅₀ 79 μ M, siehe Anhang B), da es weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen, wie Lebertoxizität verursacht [159]. In Anlehnung an die im Menschen erreichten Blutplasma-Spiegel wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Fluconazol durchgeführt. Bereits im Dosisbereich von einmalig 150 mg Fluconazol [134] (entsprechen etwa C_{max} von 10 μ M, 30 min; Abb. 45) war ein eindeutiger Effekt zu erkennen. Entgegen der Erwartung konnte Fluconazol die FSK-stimulierte AQP2-Umverteilung nicht hemmen, allerdings war die Umverteilung von AQP2 in Fluconazol-behandelten Zellen in Abwesenheit von FSK induziert worden. Diese Beobachtung kann mit der Stimulation der AQP2-Umverteilung durch Statine verglichen werden [70-72]. Statine führen durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zu verringerter Cholesterolsynthese (Abb. 47). Außerdem wird die Prenylierung von RhoA und somit die Aktivität der kleinen GTPase beeinträchtigt (siehe Einleitung, Abb. 11). Dies verursacht eine Depolymerisation des Aktin-Zytoskelettes und ermöglicht eine cAMP-unabhängige Umverteilung von AQP2 in die Plasmamembran.

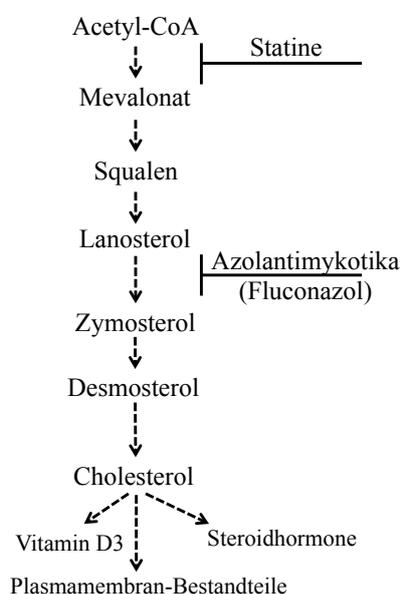


Abb. 47: Hemmung der Cholesterolsynthese durch Statine und Azolantimykotika.

Inwieweit die Statin-Effekte auch auf Fluconazol zutreffen, ist gegenwärtig spekulativ und muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Es ist davon auszugehen, dass ein Einfluss auf die RhoA-Aktivität durch gehemmte Prenylierung nicht vorliegt, da Azolantimykotika erst in einem nachgeschalteten Schritt in die Cholesterol-Biosynthese eingreifen (Abb. 47). Der Entzug von Cholesterol aus der Plasmamembran und den Membranen zellulärer Organellen mit Methyl- β -cyclodextrin führte zu einer phosphorylierungsunabhängigen Anreicherung von AQP2 in der Plasmamembran [160, 161]. Dies könnte auch für den Wirkmechanismus von Fluconazol eine Rolle spielen. Bei der Behandlung systemischer Mykosen mit Fluconazol sind unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) wie Diarrhoe, Übelkeit, Kopfschmerzen, Schwindel und vorübergehende Störungen des Geschmacksempfindens beschrieben worden (Diflucan[®], Pfizer, Roerig, Division of Pfizer Inc., NY; USA). Infolge von Fluconazol-Überdosierung kam es zu Halluzinationen mit paranoiden Verhaltensweisen. Es liegen bisher allerdings keine Berichte über Störungen der Nierenfunktion oder des Elektrolytgleichgewichtes im Blut vor. Nach den experimentellen Beobachtungen, die in dieser Arbeit gemacht wurden, wäre nach Applikation von Fluconazol in therapeutischen Dosen eine Steigerung der AQP2-vermittelten Wasserrückresorption zu erwarten. Es sind weitergehende Untersuchungen nötig um zu klären, ob die in Maus-Sammelrohrzellen beobachteten Effekte (Abb. 44) auch in Mäusen reproduziert werden können, oder ob möglicher Weise systemische Regulationsmechanismen die Fluconazol-induzierte Harnkonzentrierung und Wasserrückresorption antagonisieren.

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erfolgreich ein Hochdurchsatzverfahren etabliert und durchgeführt, um Inhibitoren der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung zu identifizieren. Die Anwendung des Hochdurchsatzverfahrens führte zur Identifikation von insgesamt fünf chemisch diversen Verbindungen, die sowohl in MCD4-Zellen, als auch in primären IMCD-Zellen die cAMP-abhängige Umverteilung von AQP2 hemmten (Tab. 1). Zwei dieser Substanzen sind hinsichtlich ihrer molekularen Wirkmechanismen und der hervorgerufenen zellulären Effekte untersucht worden. Drei weitere Hemmstoffe der AQP2-Translokation blieben jedoch bisher unberücksichtigt. Analog der in dieser Arbeit umgesetzten Vorgehensweise sind diese Verbindungen zukünftig zu charakterisieren. Das etablierte Hochdurchsatzverfahren könnte zukünftig dazu dienen, Substanzen zu identifizieren, die unabhängig von cAMP zur Umverteilung von AQP2 in die Plasmamembran von AQP2 führen. Neuartige Verbindung, die in der Lage sind die AQP2-Umverteilung auszulösen, können zur Entwicklung neuer Angriffspunkte und Therapiekonzepte bei gestörter Wasserrückresorption z. B. bei nephrogenem Diabetes insipidus beitragen.

Die Charakterisierung von 4-Acetyldiphyllin, einem V-ATPasen-Inhibitor lieferte neue Erkenntnisse zum Zusammenhang von pS256-AQP2 und AQP2-Lokalisation in ruhenden und FSK-stimulierten Zellen. Es bleiben jedoch noch einige Fragen zur genauen zellulären Dynamik offen. So ist z. B. zu klären, zu welchem Zeitpunkt der AQP2-Translokation von intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran eine Assoziation der AQP2-haltigen Vesikel mit dem AKAP-PKA-Komplex erfolgt. Die Fraktionierung zellulärer Kompartimente in Golgi-Apparat und freie AQP2-haltige Vesikel mittels Gradientenzentrifugation und anschließenden Western Blot-Untersuchungen wäre hier denkbar. Gegenwärtig haben wir nur eine Vorstellung von den Vorgängen in den Zellen zu bestimmten Zeitpunkten. Die Entwicklung von Verfahren, die Echtzeitmessungen in lebenden Zellen ermöglichen, wäre hier wünschenswert um den genauen zeitlichen Ablauf der AQP2-Phosphorylierung an S256 nachvollziehen zu können.

In dieser Arbeit war es in erster Linie wichtig den Effekt des V-ATPasen-Hemmers 4AD auf die AQP2-Umverteilung zu analysieren. Es ist aber noch offen, ob 4AD selektiv die AQP2-Translokation inhibiert oder auch andere *de novo*-synthetisierte Proteine auf dem Weg in die Plasmamembran im Golgi-Apparat retiniert werden. Alternativ zu Baf A1 könnte sich 4AD auch als molekulares *Tool* für die Untersuchung von endozytotischen und exozytotischen

Proteintransportvorgängen etablieren, da für 4AD gegenwärtig keine negativen Effekte auf die Zellvitalität in den angewandten Konzentrationen (Abb. 21) beobachtet wurden.

Genauere Untersuchungen des identifizierten Triazolpropenons (TP) belegten, dass sich der Konzentrationsbereich von TP zur Hemmung der AQP2-Umverteilung (Abb. 33) mit für Zellen letalen Konzentrationen (Abb. 32) überschneidet. Die Analyse kommerziell erhältlicher Derivate von TP und neu-synthetisierter Verbindungen zeigte, dass diese Substanzen die FSK-induzierte Umverteilung von AQP2 in MCD4-Zellen nicht hemmen konnten (Abb. 36 und 42). Mit TP strukturell vergleichbare Substanzen sind wegen ihrer fungiziden Wirkung zur Anwendung bei Nutz- und Kulturpflanzen, wie Getreide oder Obstbäumen, patentiert und beschrieben worden [127]. Strukturell komplexe Aryl-imidazole und Aryl-di-,triazol-carboxamidrazone sind für ihre antimykotische bzw. antibakterielle Wirksamkeit gegen klinisch relevante, humanpathogene *Candida ssp.* und *Mykobacter tuberculosis* bekannt [157, 129]. Es wäre daher interessant, die neu-synthetisierten Verbindungen **JB03** und **JB05** hinsichtlich einer möglichen fungiziden und antibakteriellen Wirkung zu untersuchen. Humanmedizinisch eingesetzte Antimykotika gegen *Candida*-Infektionen umfassen eine Reihe von Di- und Triazol-Antimykotika, die mechanistisch durch Hemmung des Enzyms 14 α -Demethylase die Zellwand bzw. Plasmamembran-Synthese stören. Fluconazol, wurde als Vertreter dieser Azolantimykotika getestet und erbrachte die Erkenntnis, dass der Eingriff in die Cholesterol-Biosynthese die Umverteilung von AQP2 in die Plasmamembran verursachen kann. Hier bleibt zukünftig aufzuklären, ob die als Wirkmechanismus beschriebene Hemmung des Enzyms 14 α -Demethylase ursächlich ist und/oder ob weitere pleiotrope Effekte vorliegen. Einflüsse von Fluconazol auf cAMP-Synthese, PKA-Aktivität, pS256-AQP2 oder pS261-AQP2, die Rho-GTPasen-vermittelte Polymerisation des Aktin-Zytoskelettes und die Zusammensetzung der Plasmamembran gilt es zu untersuchen. Nach Aufklärung des genauen Mechanismus von Fluconazol, der zur AQP2-Umverteilung führt, wäre auf dieser Basis die Entwicklung neuer Therapien von Harnkonzentrierungsstörungen denkbar.

6. Zusammenfassung

Die Wasserrückresorption in Hauptzellen des renalen Sammelrohrs wird vom Peptidhormon Arginin-Vasopressin (AVP) reguliert. AVP bindet an Vasopressin-V2-Rezeptoren auf der basolateralen Seite der Hauptzellen. Dies führt zum Anstieg intrazellulärer cAMP-Spiegel und der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Aquaporin-2-(AQP2)-Wasserkanäle werden von PKA am C-terminalen Serin-Rest S256 phosphoryliert und translozieren dann von intrazellulären Vesikeln in die luminal Plasmamembran. Es kommt zur Rückresorption von Wasser aus dem Primärharn.

In dieser Arbeit wird die erfolgreiche Etablierung eines neuen zellbasierten Hochdurchsatzverfahrens um neue Proteinen zu entdecken, die die Lokalisation von AQP2 kontrollieren, gezeigt. Als Modellsystem dienten Sammelrohrzellen der Maus, die stabil humanes AQP2 exprimieren (MCD4-Zellen). Diese Methode identifizierte 4-Acetyldiphyllin (4AD) als Inhibitor der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung in die Plasmamembran von MCD4- und primären innermedullären Sammelrohrzellen (IMCD-Zellen). Von 4AD ist bekannt, dass die Verbindung vakuoläre H^+ -ATPasen (V-ATPasen) inhibiert. 4AD verhinderte die cAMP-abhängige Zunahme der AQP2-Phosphorylierung an S256 in IMCD-Zellen ohne die cAMP-Synthese durch Adenylylcyclasen oder die Aktivität der PKA zu beeinflussen. Die Behandlung von MCD4-Zellen mit 4AD führte zum Anstieg der pH-Werte intrazellulärer Vesikel und der Akkumulation von AQP2 im Golgi-Apparat. Es kann daher die Notwendigkeit niedriger/azidischer intravesikulärer pH-Werte für die cAMP-abhängige Phosphorylierung von AQP2 durch PKA für die AQP2-Umverteilung in renalen Hauptzellen und den Transport von AQP2-haltigen Vesikeln aus dem Golgi-Apparat festgestellt werden. 4AD kann als molekulares Werkzeug zur Untersuchung von intrazellulären Proteintransportprozessen dienen und helfen Einsichten in die räumlichen und zeitlichen Abläufe der AQP2-Phosphorylierung an S256 zu gewinnen. Die mögliche Anwendung von 4AD bei Erkrankungen, die mit exzessiver Wasserretention, wie bei chronischer Herzinsuffizienz oder dem Schwarz-Bartter-Syndrom, assoziiert sind, muss zukünftig eingehend untersucht und bewertet werden.

Ein Triazolpropenon (TP) ist ebenfalls im genannten Hochdurchsatzverfahren als Hemmer der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung in MCD4- und primären IMCD-Zellen identifiziert worden. Nähere Untersuchungen offenbarten eine Überschneidung von zur Hemmung der AQP2-Translokation nötigen Konzentrationen mit den für Zellen letalen Konzentrationen von TP. Die Testung kommerziell erhältlicher und neu synthetisierter

Derivate von TP zeigte, dass keine dieser Verbindungen die FSK-stimulierte Umverteilung von AQP2 in MCD4-Zellen hemmen konnte. Die Reduktion der zellulären Letalität und gleichzeitige Erhaltung einer Hemmung der AQP2-Translokation war somit mit den in dieser Arbeit untersuchten Derivaten nicht möglich. Andere Di- und Triazol-Verbindungen werden zur Anwendung als Fungizide und antimikrobielle Zubereitungen bei Pflanzen genutzt. Komplexere Azol-Verbindungen sind zur Anwendung bei Tuberkulose oder Malaria im Gespräch. Der Wirkmechanismus dieser Azole könnte die Hemmung des Sterolbiosynthese-Enzyms 14 α -Demethylase sein, wie es für bereits therapeutisch genutzte Azolantimykotika bekannt ist. Fluconazol wurde als Vertreter dieser Arzneistoffklasse in MCD4-Zellen getestet, um eine mögliche Hemmung der AQP2-Umverteilung nachzuweisen. Überraschender Weise konnte Fluconazol die Forskolin-induzierte AQP2-Translokation nicht hemmen. Im Gegenteil verursachte Fluconazol in Abwesenheit von Forskolin die Anreicherung von AQP2 in der Plasmamembran. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die pharmakologische Inhibition der 14 α -Demethylase tatsächlich zur Umverteilung von AQP2 führt oder andere Effekte dazu beitragen.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit neue niedermolekulare Verbindungen zur Hemmung der cAMP-abhängigen AQP2-Umverteilung identifiziert, die zu detaillierterem Wissen darüber, wie die AQP2-Lokalisation reguliert wird, beitragen können. Von den Erkenntnissen dieser Arbeit kann die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung von Erkrankungen, die mit AQP2-abhängiger Wasserretention aber auch Störungen der Harnkonzentrierung assoziiert sind, beeinflusst werden.

7. Abstract

Urinary concentrating ability of renal collecting duct principal cells is regulated by arginine-vasopressin (AVP). AVP binds to vasopressin type 2 receptors (V2R) on the surface of the cells. This leads to elevation of cAMP and subsequent activation of protein kinase A (PKA). Aquaporin-2 (AQP2) water channels are phosphorylated by PKA at serine residue 256 (S256) and translocate from intracellular vesicles into the plasma membrane, thereby facilitating water reabsorption from primary urine. Only a few proteins and stimuli are known to drive the cAMP-dependent redistribution of AQP2.

This work shows the successful development of a novel cell-based high-throughput method to discover novel players involved in the control of the localization of AQP2. This approach identified the small-molecule 4-acetyldiphyllin (4AD) as an inhibitor of the cAMP-dependent AQP2 redistribution to the plasma membrane of MCD4 and primary inner medullary collecting duct (IMCD) cells. 4AD is a known inhibitor of vacuolar (V)-ATPase. 4AD prevented the cAMP-dependent increase of AQP2 phosphorylation at S256 in IMCD cells without affecting cAMP formation or PKA activity. 4AD treatment increased pH levels of intracellular vesicles and caused the accumulation of AQP2 in the Golgi compartment. Thus an acidic pH of intracellular vesicles is essential for the exit of AQP2-bearing vesicles from the Golgi and facilitates the cAMP-dependent and PKA-catalyzed phosphorylation of AQP2 at S256 and, thereby, its translocation to the plasma membrane of renal collecting duct cells. 4AD can serve as a molecular tool to study intracellular protein trafficking processes and provide insights into spatial and temporal AQP2 S256 phosphorylation dynamics. The treatment of diseases associated with excessive water retention, as chronic heart failure (CHF) or the syndrome of inappropriate ADH hypersecretion (SIADH) with 4AD has to be evaluated in the future.

A triazol propenone compound (TP) was also identified as inhibitor of the cAMP-dependent AQP2 redistribution in MCD4 and primary IMCD cells. Further analysis revealed an adverse overlap of TP concentrations blocking AQP2 translocation with lethal concentrations. The investigation of commercially available and newly synthesized TP derivatives showed, that none of these compounds was able to block forskolin-induced AQP2 translocation in MCD4 cells. The reduction of lethality in concert with preserved inhibition of the AQP2 translocation was not possible. Other di- and triazole compounds had been suggested to be utilized as fungicidal and antibacterial drugs for plants, more complex compounds were also considered as medication for tuberculosis and malaria patients. An assumed though not proven

mechanism of action of these compounds is the inhibition of the sterol biosynthesis enzyme 14α -demethylase. Therapeutically administered azole antimycotic drugs share this mechanism of action. Fluconazole as a member of this drug class was tested for its ability to block forskolin-induced AQP2 translocation in MCD4 cells. Surprisingly, fluconazole did not inhibit AQP2 redistribution, but induced AQP2 translocation in the absence of forskolin. Further investigations must analyze if the pharmacological inhibition of 14α -demethylase leads to AQP2 translocation or if other unrelated mechanisms promote the AQP2 redistribution into the plasma membrane.

Taken together, this work identified new small-molecule compounds that will yield mechanistic insights into the molecular mechanisms underlying the AQP2 redistribution and might pave the way to the development of new therapeutic approaches to treat diseases associated with AQP2-dependent water retention.

8. Poster

Bogum, J.; Tabor, V.; Niquet, S.; Rosenthal, W.; Klusmann, E.; Identification of small molecules inhibiting the aquaporin-2 redistribution in renal principal cells. 11th MDC/FMP PhD-Retreat; Kremen-Sommerfeld, 3.-5. September 2009

Bogum, J.; Tabor, V.; Furkert, J.; von Kries, JP; Rosenthal, W.; Klusmann, E.; Inhibition of the aquaporin-2 redistribution in renal principal cells by novel small molecules. 12th MDC/FMP/HSR PhD-Retreat; Rheinsberg; 9.-11. September 2010

Bogum, J.; Furkert, J.; Wiesner, B.; Neuenschwander, M.; von Kries, JP.; Valenti, G.; Rosenthal, W.; Klusmann, E. A possible role of intravesicular acidification for the cAMP-dependent aquaporin-2 redistribution. ÖPhG-DPhG Joint-Meeting, Innsbruck, Österreich, 21.-23. September 2011

9. Publikationen

Day JP, Lindsay B, Riddell T, Jiang Z, Allcock RW, Abraham A, Sookup S, Christian F, Bogum J, Martin EK, Rae RL, Anthony D, Rosair GM, Houslay DM, Huston E, Baillie GS, Klusmann E, Houslay MD, Adams DR. Elucidation of a structural basis for the inhibitor-driven, p62 (SQSTM1)-dependent intracellular redistribution of cAMP phosphodiesterase-4A4 (PDE4A4). *J Med Chem*. 2011 May 12; 54(9):3331-47. Epub 2011 Apr 13.

Bogum J, Furkert J, Neuenschwander M, von Kries JP, Wiesner B, Valenti G, Rosenthal W, Klusmann E. Selective inhibition of V-ATPase prevents phosphorylation of aquaporin-2 at Ser256 and its redistribution from intracellular vesicles to the plasma membrane of renal principal cells. *J Am Soc Nephrol*: in revision

10. Danksagung

Ich möchte mich bei PD Dr. Enno Klußmann und Prof. Dr. Walter Rosenthal für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung bei der Erarbeitung und die großartigen Arbeitsbedingungen bedanken.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Matthias F. Melzig für die Übernahme der Aufgabe als Zweitgutachter.

Bei Dr. Gisela Papsdorf, Andrea Geelhaar und Beate Eisermann möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung in der Zellkultur-Arbeit und bei den Immunfluoreszenz-Untersuchungen bedanken.

Herzlicher Dank auch an Christoph Erdmann, Dr. Martin Neuenschwander, Carola Seyffarth, Andreas Oder, Dr. Simone Gräber und Dr. Jens Peter von Kries aus der Screening Unit des FMP für die Hilfe bei der Entwicklung und Durchführung des Hochdurchsatzverfahrens, die Mitbenutzung der Geräte und Auswertung der gewonnenen Daten.

Vielen Dank an Dr. Jens Furkert für Hilfe beim cAMP-RIA und die vielen anregenden Diskussionen und Ideen zu dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an die Chemie-Abteilung mit Dr. Gesa Schäfer, Sylvia Niquet, Dr. Jelena Milic und Dr. Adeeb Eldahshan für die Hilfe beim präparativ-synthetischen Arbeiten und der Auswertung der Spektren.

Ein herzlicher Dank auch an die AG Wiesner Jenny Eichhorst, Anke Teichmann und Dr. Burkhard Wiesner für ihre Hilfe am LSM-UV und der Bildbearbeitung und die AG Schülein.

Ein ganz herzliches Dankeschön an die AG Rosenthal/Klußmann insbesondere Dr. Vedrana Tabor, Dörte Faust, Dr. Philipp Skroblin, Jessica Tröger und Dr. Marie Christine Moutty für die praktische und mentale Unterstützung.

11. Referenzen

1. Thews G, Mutschler E & Vaupel P (1999) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 5. Auflage edn. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
2. Boone M & Deen PM (2008) Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch* **456**, 1005-1024.
3. Bourque CW, Oliet SH & Richard D (1994) Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Frontiers in neuroendocrinology* **15**, 231-274.
4. Knepper MA (1997) Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am J Physiol* **272**, F3-12.
5. Nedvetsky PI, Tamma G, Beulshausen S, Valenti G, Rosenthal W & Klussmann E (2009) Regulation of aquaporin-2 trafficking. *Handb Exp Pharmacol*, 133-157.
6. Kamsteeg EJ, Heijnen I, van Os CH & Deen PM (2000) The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers. *J Cell Biol* **151**, 919-930.
7. Kozono D, Yasui M, King LS & Agre P (2002) Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest* **109**, 1395-1399.
8. de Mattia F, Savelkoul PJ, Kamsteeg EJ, Konings IB, van der Sluijs P, Mallmann R, Oksche A & Deen PM (2005) Lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation of aquaporin-2 mutant AQP2-R254L explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2872-2880.
9. Mulders SM, Knoers NV, Van Lieburg AF, Monnens LA, Leumann E, Wuhl E, Schober E, Rijss JP, Van Os CH & Deen PM (1997) New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels. *J Am Soc Nephrol* **8**, 242-248.
10. van Lieburg AF, Verdijk MA, Knoers VV, van Essen AJ, Proesmans W, Mallmann R, Monnens LA, van Oost BA, van Os CH & Deen PM (1994) Patients with autosomal nephrogenic diabetes insipidus homozygous for mutations in the aquaporin 2 water-channel gene. *Am J Hum Genet* **55**, 648-652.
11. Fushimi K, Sasaki S & Marumo F (1997) Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem* **272**, 14800-14804.
12. Kuwahara M, Asai T, Terada Y & Sasaki S (2005) The C-terminal tail of aquaporin-2 determines apical trafficking. *Kidney Int* **68**, 1999-2009.
13. Brown D (2003) The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F893-901.
14. Hoffert JD, Fenton RA, Moeller HB, Simons B, Tchapyjnikov D, McDill BW, Yu MJ, Pisitkun T, Chen F & Knepper MA (2008) Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. *J Biol Chem* **283**, 24617-24627.
15. Moeller HB, Knepper MA & Fenton RA (2009) Serine 269 phosphorylated aquaporin-2 is targeted to the apical membrane of collecting duct principal cells. *Kidney Int* **75**, 295-303.
16. Nedvetsky PI, Tabor V, Tamma G, Beulshausen S, Skroblin P, Kirschner A, Mutig K, Boltzen M, Petrucci O, Vossenkamper A, et al. (2010) Reciprocal regulation of aquaporin-2 abundance and degradation by protein kinase A and p38-MAP kinase. *J Am Soc Nephrol* **21**, 1645-1656.
17. Rinschen MM, Yu MJ, Wang G, Boja ES, Hoffert JD, Pisitkun T & Knepper MA (2010) Quantitative phosphoproteomic analysis reveals vasopressin V2-receptor-dependent signaling pathways in renal collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3882-3887.

18. Woelk T, Sigismund S, Penengo L & Polo S (2007) The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell division* **2**, 11.
19. Kamsteeg EJ, Hendriks G, Boone M, Konings IB, Oorschot V, van der Sluijs P, Klumperman J & Deen PM (2006) Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18344-18349.
20. Tamma G, Robben JH, Trimpert C, Boone M & Deen PM (2010) Regulation of AQP2 localization by Ser256 and S261 phosphorylation and ubiquitination. *Am J Physiol Cell Physiol*.
21. Baumgarten R, Van De Pol MH, Wetzels JF, Van Os CH & Deen PM (1998) Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells. *J Am Soc Nephrol* **9**, 1553-1559.
22. Hendriks G, Koudijs M, van Balkom BW, Oorschot V, Klumperman J, Deen PM & van der Sluijs P (2004) Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **279**, 2975-2983.
23. Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Weng G & Iyengar R (1997) Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14100-14104.
24. Gustafson CE, Katsura T, McKee M, Bouley R, Casanova JE & Brown D (2000) Recycling of AQP2 occurs through a temperature- and bafilomycin-sensitive trans-Golgi-associated compartment. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F317-326.
25. El Far O & Seagar M (2011) A role for V-ATPase subunits in synaptic vesicle fusion? *J Neurochem* **117**, 603-612.
26. Shin L, Basi N, Jeremic A, Lee JS, Cho WJ, Chen Z, Abu-Hamdah R, Oupicky D & Jena BP (2010) Involvement of vH(+)-ATPase in synaptic vesicle swelling. *J Neurosci Res* **88**, 95-101.
27. Procino G, Barbieri C, Tamma G, De Benedictis L, Pessin JE, Svelto M & Valenti G (2008) AQP2 exocytosis in the renal collecting duct -- involvement of SNARE isoforms and the regulatory role of Munc18b. *J Cell Sci* **121**, 2097-2106.
28. Liebenhoff U & Rosenthal W (1995) Identification of Rab3-, Rab5a- and synaptobrevin II-like proteins in a preparation of rat kidney vesicles containing the vasopressin-regulated water channel. *FEBS letters* **365**, 209-213.
29. Gouraud S, Laera A, Calamita G, Carmosino M, Procino G, Rossetto O, Mannucci R, Rosenthal W, Svelto M & Valenti G (2002) Functional involvement of VAMP/synaptobrevin-2 in cAMP-stimulated aquaporin 2 translocation in renal collecting duct cells. *J Cell Sci* **115**, 3667-3674.
30. Nielsen S, Marples D, Birn H, Mohtashami M, Dalby NO, Trimble M & Knepper M (1995) Expression of VAMP-2-like protein in kidney collecting duct intracellular vesicles. Colocalization with Aquaporin-2 water channels. *J Clin Invest* **96**, 1834-1844.
31. Marples D, Schroer TA, Ahrens N, Taylor A, Knepper MA & Nielsen S (1998) Dynein and dynactin colocalize with AQP2 water channels in intracellular vesicles from kidney collecting duct. *Am J Physiol* **274**, F384-394.
32. Vossenkamper A, Nedvetsky PI, Wiesner B, Furkert J, Rosenthal W & Klussmann E (2007) Microtubules are needed for the perinuclear positioning of aquaporin-2 after its endocytic retrieval in renal principal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1129-1138.

33. Nedvetsky PI, Stefan E, Frische S, Santamaria K, Wiesner B, Valenti G, Hammer JA, 3rd, Nielsen S, Goldenring JR, Rosenthal W, et al. (2007) A Role of myosin Vb and Rab11-FIP2 in the aquaporin-2 shuttle. *Traffic* **8**, 110-123.
34. Klussmann E, Tamma G, Lorenz D, Wiesner B, Maric K, Hofmann F, Aktories K, Valenti G & Rosenthal W (2001) An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J Biol Chem* **276**, 20451-20457.
35. Tamma G, Klussmann E, Oehlke J, Krause E, Rosenthal W, Svelto M & Valenti G (2005) Actin remodeling requires ERM function to facilitate AQP2 apical targeting. *J Cell Sci* **118**, 3623-3630.
36. Noda Y, Horikawa S, Kanda E, Yamashita M, Meng H, Eto K, Li Y, Kuwahara M, Hirai K, Pack C, et al. (2008) Reciprocal interaction with G-actin and tropomyosin is essential for aquaporin-2 trafficking. *J Cell Biol* **182**, 587-601.
37. Henn V, Edemir B, Stefan E, Wiesner B, Lorenz D, Theilig F, Schmitt R, Vossebein L, Tamma G, Beyermann M, et al. (2004) Identification of a novel A-kinase anchoring protein 18 isoform and evidence for its role in the vasopressin-induced aquaporin-2 shuttle in renal principal cells. *J Biol Chem* **279**, 26654-26665.
38. Stefan E, Wiesner B, Baillie GS, Mollajew R, Henn V, Lorenz D, Furkert J, Santamaria K, Nedvetsky P, Hundsrucker C, et al. (2007) Compartmentalization of cAMP-dependent signaling by phosphodiesterase-4D is involved in the regulation of vasopressin-mediated water reabsorption in renal principal cells. *J Am Soc Nephrol : JASN* **18**, 199-212.
39. Kamsteeg EJ, Duffield AS, Konings IB, Spencer J, Pagel P, Deen PM & Caplan MJ (2007) MAL decreases the internalization of the aquaporin-2 water channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16696-16701.
40. van Balkom BW, Boone M, Hendriks G, Kamsteeg EJ, Robben JH, Stronks HC, van der Voorde A, van Herp F, van der Sluijs P & Deen PM (2009) LIP5 interacts with aquaporin 2 and facilitates its lysosomal degradation. *J Am Soc Nephrol* **20**, 990-1001.
41. Noda Y, Horikawa S, Furukawa T, Hirai K, Katayama Y, Asai T, Kuwahara M, Katagiri K, Kinashi T, Hattori M, et al. (2004) Aquaporin-2 trafficking is regulated by PDZ-domain containing protein SPA-1. *FEBS Lett* **568**, 139-145.
42. Lu HA, Sun TX, Matsuzaki T, Yi XH, Eswara J, Bouley R, McKee M & Brown D (2007) Heat shock protein 70 interacts with aquaporin-2 and regulates its trafficking. *J Biol Chem* **282**, 28721-28732.
43. Daly JW (1984) Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* **17**, 81-89.
44. Hoffert JD, Chou CL, Fenton RA & Knepper MA (2005) Calmodulin is required for vasopressin-stimulated increase in cyclic AMP production in inner medullary collecting duct. *J Biol Chem* **280**, 13624-13630.
45. Strait KA, Stricklett PK, Chapman M & Kohan DE (2010) Characterization of vasopressin-responsive collecting duct adenylyl cyclases in the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**, F859-867.
46. Rieg T, Tang T, Murray F, Schroth J, Insel PA, Fenton RA, Hammond HK & Vallon V (2010) Adenylate cyclase 6 determines cAMP formation and aquaporin-2 phosphorylation and trafficking in inner medulla. *J Am Soc Nephrol* **21**, 2059-2068.
47. Roos KP, Strait KA, Raphael KL, Blount MA & Kohan DE (2012) Collecting duct-specific knockout of adenylyl cyclase type VI causes a urinary concentration defect in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **302**, F78-84.
48. Bouley R, Lu HA, Nunes P, Da Silva N, McLaughlin M, Chen Y & Brown D (2011) Calcitonin has a vasopressin-like effect on aquaporin-2 trafficking and urinary concentration. *J Am Soc Nephrol* **22**, 59-72.

49. Dillingham MA & Anderson RJ (1986) Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science* **231**, 1572-1573.
50. Nonoguchi H, Sands JM & Knepper MA (1988) Atrial natriuretic factor inhibits vasopressin-stimulated osmotic water permeability in rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* **82**, 1383-1390.
51. Bouley R, Breton S, Sun T, McLaughlin M, Nsumu NN, Lin HY, Ausiello DA & Brown D (2000) Nitric oxide and atrial natriuretic factor stimulate cGMP-dependent membrane insertion of aquaporin 2 in renal epithelial cells. *J Clin Invest* **106**, 1115-1126.
52. Bouley R, Pastor-Soler N, Cohen O, McLaughlin M, Breton S & Brown D (2005) Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra). *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F1103-1112.
53. Barclay JW, Morgan A & Burgoyne RD (2005) Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell calcium* **38**, 343-353.
54. Hay JC (2007) Calcium: a fundamental regulator of intracellular membrane fusion? *EMBO reports* **8**, 236-240.
55. Champigneulle A, Siga E, Vassent G & Imbert-Teboul M (1993) V2-like vasopressin receptor mobilizes intracellular Ca²⁺ in rat medullary collecting tubules. *Am J Physiol* **265**, F35-45.
56. Maeda Y, Han JS, Gibson CC & Knepper MA (1993) Vasopressin and oxytocin receptors coupled to Ca²⁺ mobilization in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* **265**, F15-25.
57. Yip KP & Sham JS (2011) Mechanisms of vasopressin-induced intracellular Ca²⁺ oscillations in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, F540-548.
58. Chou CL, Yip KP, Michea L, Kador K, Ferraris JD, Wade JB & Knepper MA (2000) Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct. Roles of ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores and calmodulin. *J Biol Chem* **275**, 36839-36846.
59. Lorenz D, Krylov A, Hahn D, Hagen V, Rosenthal W, Pohl P & Maric K (2003) Cyclic AMP is sufficient for triggering the exocytic recruitment of aquaporin-2 in renal epithelial cells. *EMBO Rep* **4**, 88-93.
60. Kang G, Joseph JW, Chepurny OG, Monaco M, Wheeler MB, Bos JL, Schwede F, Genieser HG & Holz GG (2003) Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **278**, 8279-8285.
61. Yip KP (2006) Epac-mediated Ca(2+) mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F882-890.
62. Li C, Wang W, Summer SN, Cadnapaphornchai MA, Falk S, Umenishi F & Schrier RW (2006) Hyperosmolality in vivo upregulates aquaporin 2 water channel and Na-K-2Cl co-transporter in Brattleboro rats. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1657-1664.
63. Chu JY, Chung SC, Lam AK, Tam S, Chung SK & Chow BK (2007) Phenotypes developed in secretin receptor-null mice indicated a role for secretin in regulating renal water reabsorption. *Mol Cell Biol* **27**, 2499-2511.
64. Matsumura Y, Uchida S, Rai T, Sasaki S & Marumo F (1997) Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. *J Am Soc Nephrol* **8**, 861-867.
65. Hasler U, Jeon US, Kim JA, Mordasini D, Kwon HM, Feraille E & Martin PY (2006) 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.

66. Li SZ, McDill BW, Kovach PA, Ding L, Go WY, Ho SN & Chen F (2007) Calcineurin-NFATc signaling pathway regulates AQP2 expression in response to calcium signals and osmotic stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1606-1616.
67. Jo I, Ward DT, Baum MA, Scott JD, Coghlan VM, Hammond TG & Harris HW (2001) AQP2 is a substrate for endogenous PP2B activity within an inner medullary AKAP-signaling complex. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F958-965.
68. Gooch JL, Guler RL, Barnes JL & Toro JJ (2006) Loss of calcineurin Aalpha results in altered trafficking of AQP2 and in nephrogenic diabetes insipidus. *J Cell Sci* **119**, 2468-2476.
69. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB & Starke K (2006) *Repetitorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
70. Li W, Zhang Y, Bouley R, Chen Y, Matsuzaki T, Nunes P, Hasler U, Brown D & Lu HA (2011) Simvastatin enhances aquaporin-2 surface expression and urinary concentration in vasopressin-deficient Brattleboro rats through modulation of Rho GTPase. *Am J Physiol Renal Physiol* **301**, F309-318.
71. Procino G, Barbieri C, Carosino M, Rizzo F, Valenti G & Svelto M (2010) Lovastatin-induced cholesterol depletion affects both apical sorting and endocytosis of aquaporin-2 in renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**, F266-278.
72. Procino G, Barbieri C, Carosino M, Tamma G, Milano S, De Benedictis L, Mola MG, Lazo-Fernandez Y, Valenti G & Svelto M (2011) Fluvastatin modulates renal water reabsorption in vivo through increased AQP2 availability at the apical plasma membrane of collecting duct cells. *Pflugers Arch* **462**, 753-766.
73. Etienne-Manneville S & Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
74. Wennerberg K & Der CJ (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**, 1301-1312.
75. Laufs U, La Fata V, Plutzky J & Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circul* **97**, 1129-1135.
76. Sakairi Y, Jacobson HR, Noland TD & Breyer MD (1995) Luminal prostaglandin E receptors regulate salt and water transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol* **269**, F257-265.
77. Hebert RL, Jacobson HR, Fredin D & Breyer MD (1993) Evidence that separate PGE2 receptors modulate water and sodium transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol* **265**, F643-650.
78. Tamma G, Klussmann E, Maric K, Aktories K, Svelto M, Rosenthal W & Valenti G (2001) Rho inhibits cAMP-induced translocation of aquaporin-2 into the apical membrane of renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F1092-1101.
79. Tamma G, Wiesner B, Furkert J, Hahm D, Oksche A, Schaefer M, Valenti G, Rosenthal W & Klussmann E (2003) The prostaglandin E2 analogue sulprostone antagonizes vasopressin-induced antidiuresis through activation of Rho. *J Cell Sci* **116**, 3285-3294.
80. Pang L & Knox AJ (1997) PGE2 release by bradykinin in human airway smooth muscle cells: involvement of cyclooxygenase-2 induction. *Am J Physiol* **273**, L1132-1140.
81. Prie D, Dussaule JC, Lelongt B, Geniteau-Legendre M, Chatelet F, Cassingena R, Vandewalle A & Ronco PM (1994) Principal cell-specific antigen and hormonal regulatory network in RC.SVtsA58 cell line. *Am J Physiol* **266**, C1628-1638.
82. Tamma G, Carosino M, Svelto M & Valenti G (2005) Bradykinin signaling counteracts cAMP-elicited aquaporin 2 translocation in renal cells. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2881-2889.

83. Breyer MD, Jacobson HR & Breyer JA (1988) Epidermal growth factor inhibits the hydroosmotic effect of vasopressin in the isolated perfused rabbit cortical collecting tubule. *J Clin Invest* **82**, 1313-1320.
84. Han JS, Maeda Y, Ecelbarger C & Knepper MA (1994) Vasopressin-independent regulation of collecting duct water permeability. *Am J Physiol* **266**, F139-146.
85. Boone M, Kortenoeven ML, Robben JH, Tamma G & Deen PM (2011) Counteracting vasopressin-mediated water reabsorption by ATP, dopamine, and phorbol esters: mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, F761-771.
86. Ecelbarger CA, Maeda Y, Gibson CC & Knepper MA (1994) Extracellular ATP increases intracellular calcium in rat terminal collecting duct via a nucleotide receptor. *Am J Physiol* **267**, F998-1006.
87. Kishore BK, Chou CL & Knepper MA (1995) Extracellular nucleotide receptor inhibits AVP-stimulated water permeability in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* **269**, F863-869.
88. Edwards RM & Brooks DP (2001) Dopamine inhibits vasopressin action in the rat inner medullary collecting duct via alpha(2)-adrenoceptors. *J J Pharmacol Exp Ther* **298**, 1001-1006.
89. Edwards RM, Stack EJ, Pullen M & Nambi P (1993) Endothelin inhibits vasopressin action in rat inner medullary collecting duct via the ETB receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **267**, 1028-1033.
90. Nadler SP, Zimpelmann JA & Hebert RL (1992) Endothelin inhibits vasopressin-stimulated water permeability in rat terminal inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* **90**, 1458-1466.
91. Ge Y, Stricklett PK, Hughes AK, Yanagisawa M & Kohan DE (2005) Collecting duct-specific knockout of the endothelin A receptor alters renal vasopressin responsiveness, but not sodium excretion or blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F692-698.
92. Sands JM, Flores FX, Kato A, Baum MA, Brown EM, Ward DT, Hebert SC & Harris HW (1998) Vasopressin-elicited water and urea permeabilities are altered in IMCD in hypercalcemic rats. *Am J Physiol* **274**, F978-985.
93. Procino G, Carmosino M, Tamma G, Gouraud S, Laera A, Riccardi D, Svelto M & Valenti G (2004) Extracellular calcium antagonizes forskolin-induced aquaporin 2 trafficking in collecting duct cells. *Kidney Int* **66**, 2245-2255.
94. Sands JM, Naruse M, Baum M, Jo I, Hebert SC, Brown EM & Harris HW (1997) Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* **99**, 1399-1405.
95. Nielsen S, Kwon TH, Frokiaer J & Agre P (2007) Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders. *J Intern Med* **261**, 53-64.
96. Nielsen S, Terris J, Andersen D, Ecelbarger C, Frokiaer J, Jonassen T, Marples D, Knepper MA & Petersen JS (1997) Congestive heart failure in rats is associated with increased expression and targeting of aquaporin-2 water channel in collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5450-5455.
97. Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, Sasaki S, Fushimi K, Marumo F & Sato C (1995) Increased gene expression of water channel in cirrhotic rat kidneys. *Hepat* **21**, 169-173.
98. Fernandez-Llama P, Jimenez W, Bosch-Marce M, Arroyo V, Nielsen S & Knepper MA (2000) Dysregulation of renal aquaporins and Na-Cl cotransporter in CCl4-induced cirrhosis. *Kidney Int* **58**, 216-228.

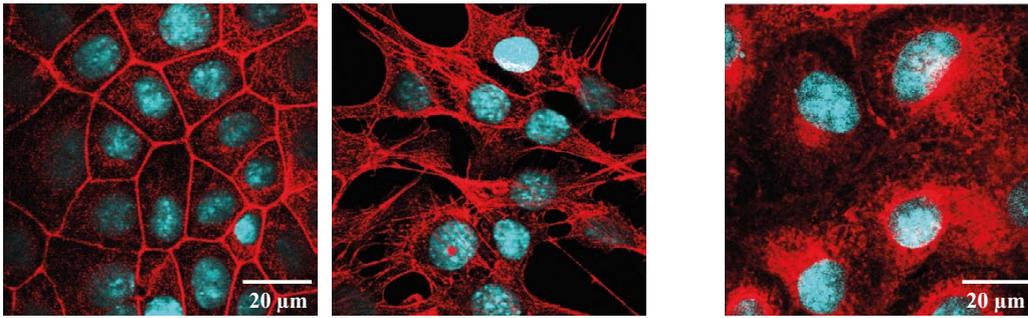
99. Jonassen TE, Nielsen S, Christensen S & Petersen JS (1998) Decreased vasopressin-mediated renal water reabsorption in rats with compensated liver cirrhosis. *Am J Physiol* **275**, F216-225.
100. Moore KP & Aithal GP (2006) Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. *Gut* **55 Suppl 6**, vi1-12.
101. Loh JA & Verbalis JG (2008) Disorders of water and salt metabolism associated with pituitary disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**, 213-234, x.
102. Manning M, Misicka A, Olma A, Bankowski K, Stoev S, Chini B, Durroux T, Mouillac B, Corbani M & Guillon G (2012) Oxytocin and Vasopressin Agonists and Antagonists as Research Tools and Potential Therapeutics. *J Neuroendocrinol*.
103. Verbalis JG, Goldsmith SR, Greenberg A, Schrier RW & Sterns RH (2007) Hyponatremia treatment guidelines 2007: expert panel recommendations. *Am J Med* **120**, S1-21.
104. Robben JH, Knoers NV & Deen PM (2006) Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F257-270.
105. Richards GE, Thomsett MJ, Boston BA, DiMeglio LA, Shulman DI & Draznin M (2011) Natural history of idiopathic diabetes insipidus. *J Pediatr* **159**, 566-570.
106. Fujiwara TM & Bichet DG (2005) Molecular biology of hereditary diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2836-2846.
107. Deen PM, Croes H, van Aubel RA, Ginsel LA & van Os CH (1995) Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J Clin Invest* **95**, 2291-2296.
108. Bichet DG, Oksche A & Rosenthal W (1997) Congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **8**, 1951-1958.
109. Lam KS, Wat MS, Choi KL, Ip TP, Pang RW & Kumana CR (1996) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, long-term efficacy and safety of oral 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in adult patients with central diabetes insipidus. *Br J Clin Pharmacol* **42**, 379-385.
110. Kirchlechner V, Koller DY, Seidl R & Waldhauser F (1999) Treatment of nephrogenic diabetes insipidus with hydrochlorothiazide and amiloride. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* **80**, 548-552.
111. Stone KA (1999) Lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Board Fam Pract* **12**, 43-47.
112. Christensen BM, Marples D, Kim YH, Wang W, Frokiaer J & Nielsen S (2004) Changes in cellular composition of kidney collecting duct cells in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C952-964.
113. Earm JH, Christensen BM, Frokiaer J, Marples D, Han JS, Knepper MA & Nielsen S (1998) Decreased aquaporin-2 expression and apical plasma membrane delivery in kidney collecting ducts of polyuric hypercalcemic rats. *J Am Soc Nephrol* **9**, 2181-2193.
114. Marples D, Frokiaer J, Dorup J, Knepper MA & Nielsen S (1996) Hypokalemia-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex. *J Clin Invest* **97**, 1960-1968.
115. Graham FL, Smiley J, Russell WC & Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
116. Iolascon A, Aglio V, Tamma G, D'Apolito M, Addabbo F, Procino G, Simonetti MC, Montini G, Gesualdo L, Debler EW, et al. (2007) Characterization of two novel missense mutations in the AQP2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus. *Nephron Physiol* **105**, p33-41.

117. Maric K, Oksche A & Rosenthal W (1998) Aquaporin-2 expression in primary cultured rat inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol* **275**, F796-801.
118. Choi M, Eulenberg C, Rolle S, von Kries JP, Luft FC & Kettritz R (2010) The use of small molecule high-throughput screening to identify inhibitors of the proteinase 3-NB1 interaction. *Clin Exp Immunol* **161**, 389-396.
119. Lemieux B, Percival MD & Falgoutyret JP (2004) Quantitation of the lysosomotropic character of cationic amphiphilic drugs using the fluorescent basic amine Red DND-99. *Anal Biochem* **327**, 247-251.
120. Haas AK, Kleinau G, Hoyer I, Neumann S, Furkert J, Rutz C, Schulein R, Gershengorn MC & Krause G (2011) Mutations that silence constitutive signaling activity in the allosteric ligand-binding site of the thyrotropin receptor. *Cell Mol Life Sci* **68**, 159-167.
121. Karaman I, Gezezen H, Gurdere MB, Dingil A & Ceylan M (2010) Screening of biological activities of a series of chalcone derivatives against human pathogenic microorganisms. *Chemistry & biodiversity* **7**, 400-408.
122. Murray AJ (2008) Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science signaling* **1**, re4.
123. Patel NGW, Chia-Lin J. (1984) Justicidin insecticidal and antiviral compounds. USA Patent Application No. 4,486,445
124. Cheng Y-CC, Chen-Kung; Fu, Lei; Kuo, Yueh-Hsiung; Yeh, Sheau-Farn; Zhu, Juliang; Zhu, Yongliang (2001) Inhibitor and treatment of Hepatitis B virus and Flavivirus by Helioxanthin and its analogs. USA Patent Application No. US 6,306,899 B1.
125. Sorensen MG, Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Dziegiel MH & Karsdal MA (2007) Diphyllin, a novel and naturally potent V-ATPase inhibitor, abrogates acidification of the osteoclastic resorption lacunae and bone resorption. *J Bone Min Res* **22**, 1640-1648.
126. Bowman EJ, Siebers A & Altendorf K (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7972-7976.
127. Balasubramanyan S, Wokingham, Shepard, Margaret Claire; Worthington, Paul Anthony; Maidenhead, Berkshire (Großbritannien) (1977) Heterocyclische Verbindungen, Verfahren zur Herstellung derselben und die enthaltende fungizide Zusammensetzungen Deutschland Patent Application No. DT 2645617A1
128. Lennon IC & Ramsden JA (2005) An efficient catalytic asymmetric route to 1-aryl-2-imidazol-1-yl-ethanols. *Organic Process Research & Development* **9**, 110-112.
129. Zampieri D, Mamolo MG, Laurini E, Scialino G, Banfi E & Vio L (2008) Antifungal and antimycobacterial activity of 1-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-1H-imidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**, 4516-4522.
130. Schäfer K & Synowietz C (1967) *D'Ans - Lax Taschenbuch für Chemiker und Physiker*. Vol. Band 1: Makroskopische physikalisch-chemische Eigenschaften Berlin - Heidelberg - New York, Springer.
131. Fieser LF & Fieser M (1989) *Organische Chemie*. 2. Auflage edn. WILEY-VCH
132. Perez ER, Loupy A, Liagre M, Plepis AMD & Cordeiro PJ (2003) Clean and efficient microwave-solvent-free synthesis of 1-(2',4'-dichlorophenacyl) azoles. *Tetrahedron* **59**, 865-870.
133. Faergemann J (1999) Pharmacokinetics of fluconazole in skin and nails. *J Am Acad Dermatol* **40**, S14-20.
134. Houang ET, Chappatte O, Byrne D, Macrae PV & Thorpe JE (1990) Fluconazole levels in plasma and vaginal secretions of patients after a 150-milligram single oral dose and rate of eradication of infection in vaginal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 909-910.

135. Klussmann E, Maric K, Wiesner B, Beyermann M & Rosenthal W (1999) Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J Biol Chem* **274**, 4934-4938.
136. Okutsu R, Rai T, Kikuchi A, Ohno M, Uchida K, Sasaki S & Uchida S (2008) AKAP220 colocalizes with AQP2 in the inner medullary collecting ducts. *Kidney Int* **74**, 1429-1433.
137. Nishimoto G, Zelenina M, Li D, Yasui M, Aperia A, Nielsen S & Nairn AC (1999) Arginine vasopressin stimulates phosphorylation of aquaporin-2 in rat renal tissue. *Am J Physiol* **276**, F254-259.
138. Procino G, Carosino M, Marin O, Brunati AM, Contri A, Pinna LA, Mannucci R, Nielsen S, Kwon TH, Svelto M, et al. (2003) Ser-256 phosphorylation dynamics of Aquaporin 2 during maturation from the ER to the vesicular compartment in renal cells. *FASEB J* **17**, 1886-1888.
139. Lasa-Benito M, Marin O, Meggio F & Pinna LA (1996) Golgi apparatus mammary gland casein kinase: monitoring by a specific peptide substrate and definition of specificity determinants. *FEBS letters* **382**, 149-152.
140. Reaves B & Banting G (1994) Vacuolar ATPase inactivation blocks recycling to the trans-Golgi network from the plasma membrane. *FEBS letters* **345**, 61-66.
141. van Weert AW, Dunn KW, Gueze HJ, Maxfield FR & Stoorvogel W (1995) Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol* **130**, 821-834.
142. Mellman I, Fuchs R & Helenius A (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**, 663-700.
143. Brown D, Paunescu TG, Breton S & Marshansky V (2009) Regulation of the V-ATPase in kidney epithelial cells: dual role in acid-base homeostasis and vesicle trafficking. *J Exp Biol* **212**, 1762-1772.
144. Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M, Mattsson JP, Keeling DJ, Andersson AK, Wallbrandt P, Zecca L, et al. (2000) Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet* **25**, 343-346.
145. Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Rey JM & Garcia-Garcia A (2009) V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. *Cancer Treat Rev* **35**, 707-713.
146. Cardone RA, Casavola V & Reshkin SJ (2005) The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* **5**, 786-795.
147. McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA & Cala PM (2000) Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C676-688.
148. Aiko K, Tsujisawa T, Koseki T, Hashimoto S, Morimoto Y, Amagasa T & Nishihara T (2002) Involvement of cytochrome c and caspases in apoptotic cell death of human submandibular gland ductal cells induced by concanamycin A. *Cell Signal* **14**, 717-722.
149. De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M, Marino ML, Federici C, Perdicchio M, Matarrese P, Lugini L, et al. (2007) Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res* **67**, 5408-5417.
150. Morimura T, Fujita K, Akita M, Nagashima M & Satomi A (2008) The proton pump inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int* **24**, 1087-1094.

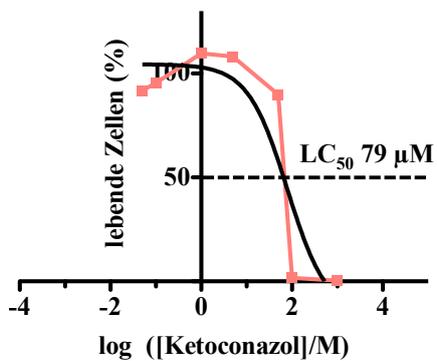
151. Hermosilla R, Oueslati M, Donalies U, Schonenberger E, Krause E, Oksche A, Rosenthal W & Schulein R (2004) Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway. *Traffic* **5**, 993-1005.
152. Teplova VV, Tonshin AA, Grigoriev PA, Saris NE & Salkinoja-Salonen MS (2007) Bafilomycin A1 is a potassium ionophore that impairs mitochondrial functions. *J Bioenerg Biomembr* **39**, 321-329.
153. Ohta T, Arakawa H, Futagami F, Fushida S, Kitagawa H, Kayahara M, Nagakawa T, Miwa K, Kurashima K, Numata M, et al. (1998) Bafilomycin A1 induces apoptosis in the human pancreatic cancer cell line Capan-1. *J Pathol* **185**, 324-330.
154. Anto RJ, Sukumaran K, Kuttan G, Rao MN, Subbaraju V & Kuttan R (1995) Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. *Cancer Lett* **97**, 33-37.
155. Mukherjee S, Kumar V, Prasad AK, Raj HG, Bracke ME, Olsen CE, Jain SC & Parmar VS (2001) Synthetic and biological activity evaluation studies on novel 1,3-diarylpropenones. *Bioorganic & medicinal chemistry* **9**, 337-345.
156. Zhai L, Chen M, Blom J, Theander TG, Christensen SB & Kharazmi A (1999) The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *J Antimicrob Chemother* **43**, 793-803.
157. Mamolo MG, Falagiani V, Zampieri D, Vio L, Banfi E & Scialino G (2003) Synthesis and antimycobacterial activity of (3,4-diaryl-3H-thiazol-2-ylidene)-hydrazide derivatives. *Farmaco* **58**, 631-637.
158. Bellamine A, Mangla AT, Nes WD & Waterman MR (1999) Characterization and catalytic properties of the sterol 14alpha-demethylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8937-8942.
159. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H & Schäfer-Korting M (2001) *Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage edn. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
160. Lu H, Sun TX, Bouley R, Blackburn K, McLaughlin M & Brown D (2004) Inhibition of endocytosis causes phosphorylation (S256)-independent plasma membrane accumulation of AQP2. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F233-243.
161. Russo LM, McKee M & Brown D (2006) Methyl-beta-cyclodextrin induces vasopressin-independent apical accumulation of aquaporin-2 in the isolated, perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F246-253.

Anhang A



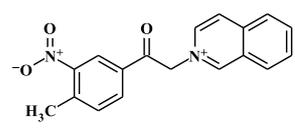
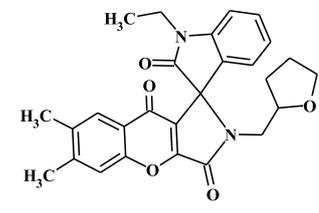
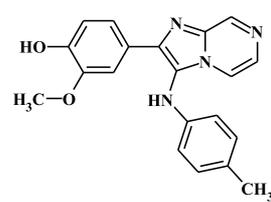
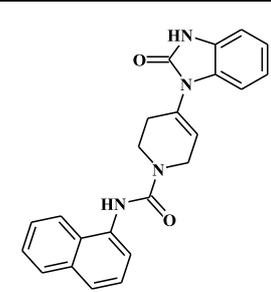
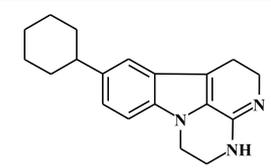
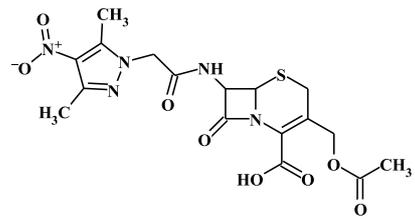
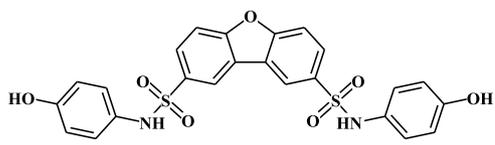
Links: MCD4-Zellen in verschiedener Dichte wurden fixiert und permeabilisiert. F-Aktin wurde mit TRITC-Phalloidin (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. **Rechts:** HK-2-Zellen (humane Nierenzellen) wurden mit CellMask™ (rot) gefärbt und anschließend fixiert und permeabilisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Bilder wurden am LSM (100fache Vergrößerung) aufgenommen.

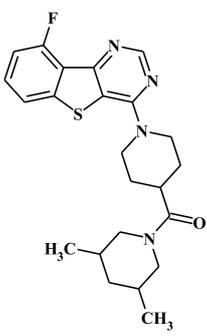
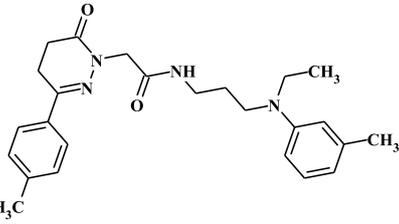
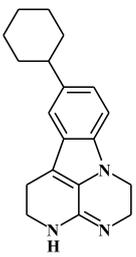
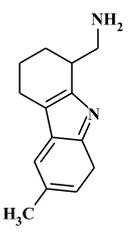
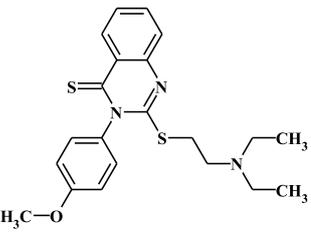
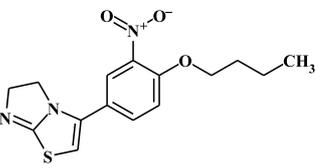
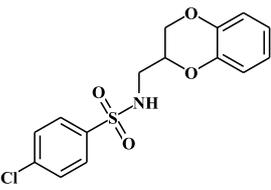
Anhang B

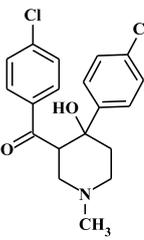
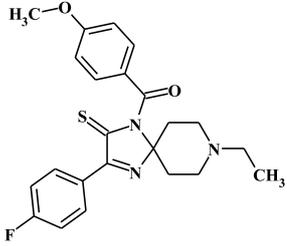
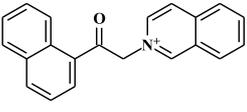
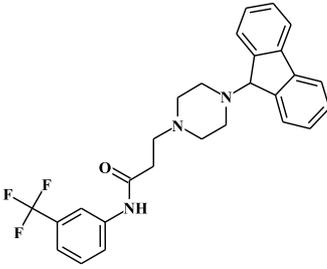
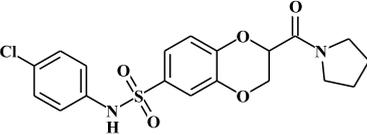
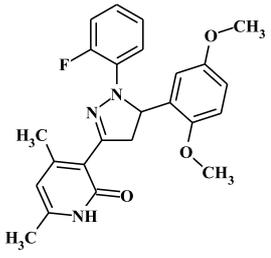
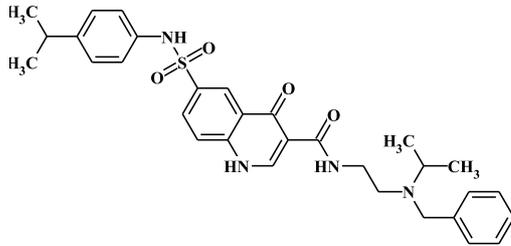


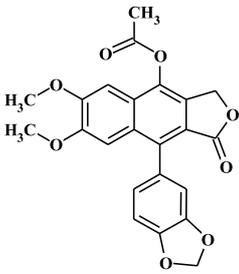
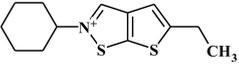
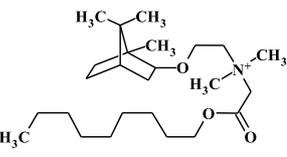
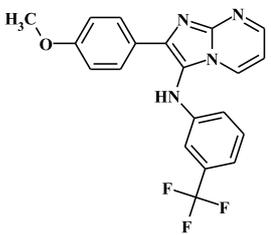
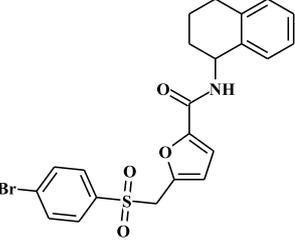
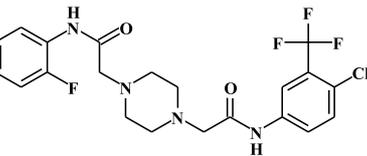
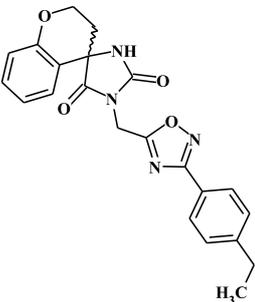
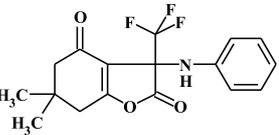
MCD4-Zellen wurden mit Ketoconazol in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Bestimmung der lebenden, metabolisch-aktiven Zellen erfolgte mit dem MTT-Test. (n=3, Triplikate je Konzentration)

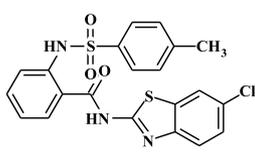
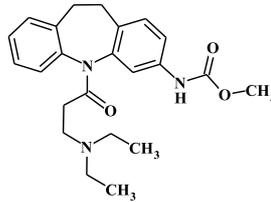
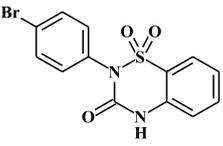
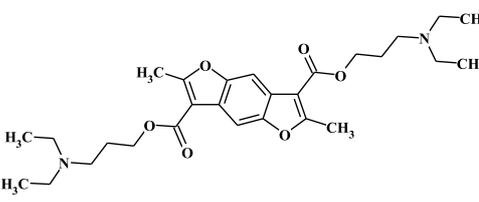
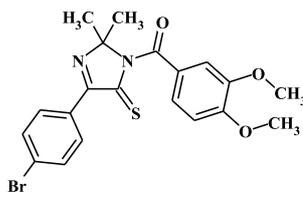
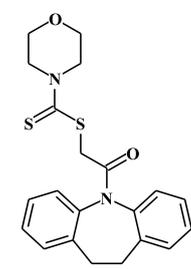
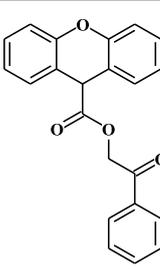
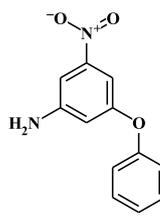
Anhang C

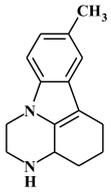
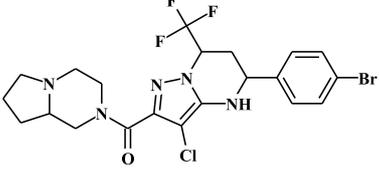
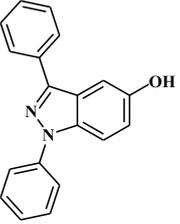
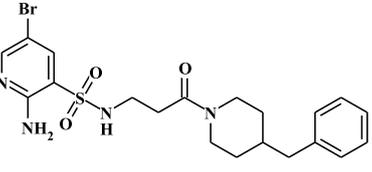
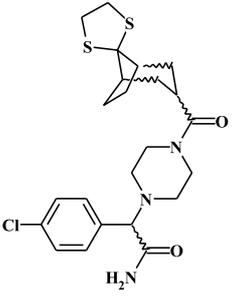
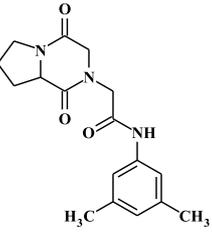
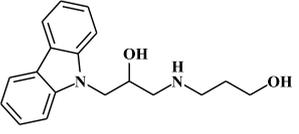
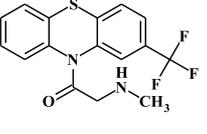
#	Struktur und Summenformel	Vh.	Platte	Well	MG	logP
25143	 <chem>Cc1ccc(cc1[N+](=O)[O-])C(=O)CN2c3ccccc3n2</chem> $C_{18}H_{15}N_2O_3$	0.23	72	G14	307.3	-0.51
38370	 <chem>Cc1ccc2c(c1)nc3c2c(=O)nc3C4CCOC4</chem> $C_{27}H_{26}N_2O_5$	0.54	110	B5	458.5	3.19
35963	 <chem>Cc1ccc(Nc2nc3cc(O)c(OC)cc3n2)cc1</chem> $C_{20}H_{18}N_4O_2$	0.57	103	K8	346.4	3.16
38587	 <chem>C1=CC=C2C=CC=CC2=C1NC(=O)N3CCNCC3</chem> $C_{23}H_{20}N_4O_2$	0.69	110	K18	384.4	3.24
29582	 <chem>C1=CC=C2C=CC=CC2=C1NC(=O)N3CCNCC3C4CCCCC4</chem> $C_{19}H_{23}N_3$	0.75	85	N5	293.4	3.62
38622	 <chem>CC(=O)OC1=CC=C(C=C1NC(=O)N2C=CN(C)C2=O)C(=O)N3C=NC(C)C3=O</chem> $C_{17}H_{19}N_5O_8S$	0.76	110	N20	453.4	-1.36
29577	 <chem>Oc1ccc(NS(=O)(=O)c2c3cc(O)ccc3oc2)cc1</chem> $C_{24}H_{18}N_2O_7S_2$	0.78	85	I5	510.5	3.52

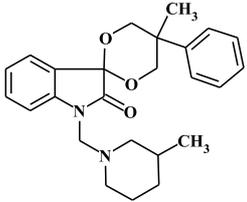
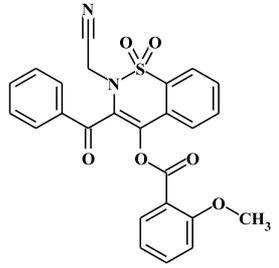
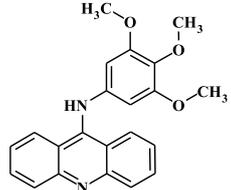
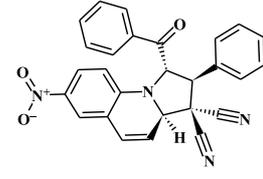
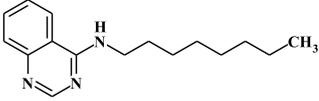
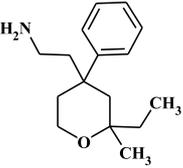
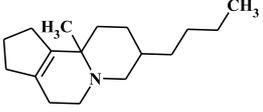
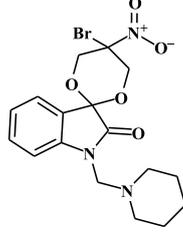
38256	 <chem>C23H27FN4OS</chem>	0.79	109	P19	426.6	4.55
39980	 <chem>C25H32N4O2</chem>	0.79	114	L17	420.5	3.47
38442	 <chem>C19H23N3</chem>	0.8	110	J9	293.4	3.62
23930	 <chem>C14H18N2</chem>	0.83	69	J4	214.31	1.22
29614	 <chem>C21H25N3OS2</chem>	0.83	85	N7	399.6	5.23
30666	 <chem>C15H17N3O3S</chem>	0.83	88	J7	319.4	3.07
40156	 <chem>C15H14ClNO4S</chem>	0.83	115	L6	339.8	2.78

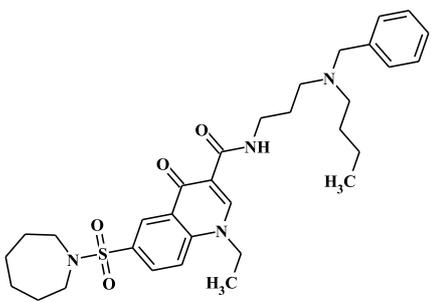
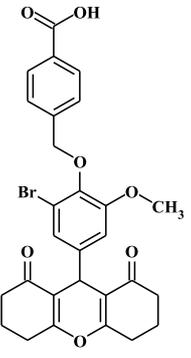
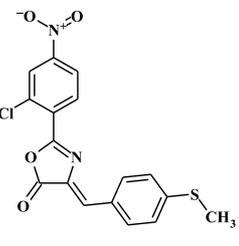
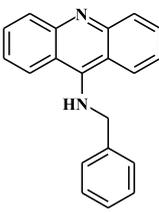
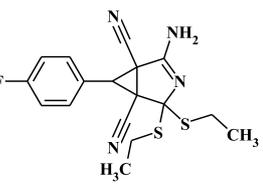
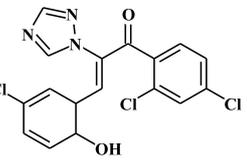
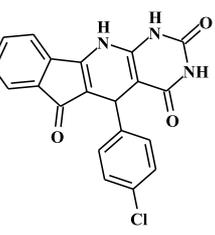
29789		$C_{19}H_{19}Cl_2NO_2$	0.84	85	M18	364.3	3.73
36555		$C_{23}H_{24}FN_3O_2S$	0.84	105	K1	425.5	4.99
24655		$C_{21}H_{16}NO$	0.86	71	O5	298.4	0.02
26406		$C_{27}H_{26}F_3N_3O$	0.86	76	F5	465.5	5.25
39421		$C_{19}H_{19}ClN_2O_5S$	0.86	113	M4	422.9	2.31
23915		$C_{24}H_{24}FN_3O_3$	0.88	69	K3	421.5	4.09
36404		$C_{31}H_{36}N_4O_4S$	0.88	104	D14	560.7	5.2

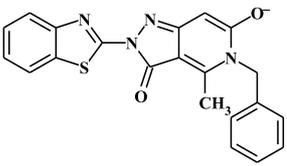
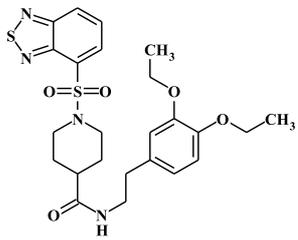
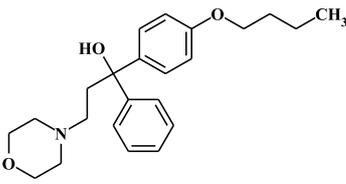
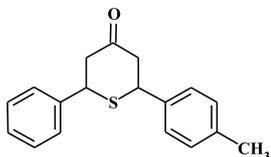
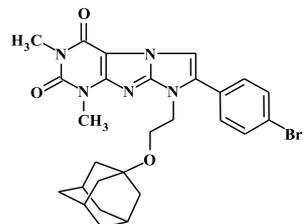
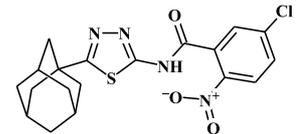
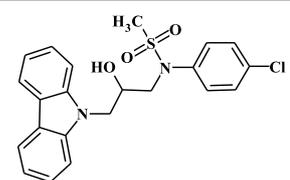
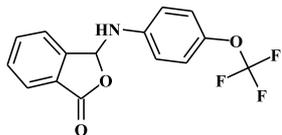
40206		$C_{23}H_{18}O_8$	0.88	115	N9	422.4	3.08
27311		$C_{13}H_{18}NS_2$	0.89	78	O17	252.4	1.6
26203		$C_{25}H_{48}NO_3$	0.9	75	K14	410.7	1.66
35904		$C_{20}H_{15}F_3N_4O$	0.9	103	P4	384.4	4.09
39341		$C_{22}H_{20}BrNO_4S$	0.9	112	M21	474.4	4.23
40279		$C_{21}H_{21}ClF_4N_4O_2$	0.91	115	G14	472.9	2.84
100358		$C_{22}H_{20}N_4O_4$	0.91	1002	K1	404.4	3.46
32287		$C_{17}H_{16}F_3NO_3$	0.92	92	O20	339.3	3.18

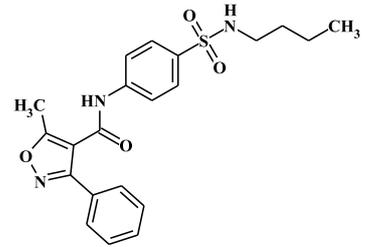
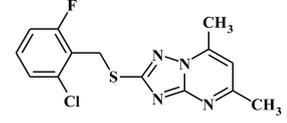
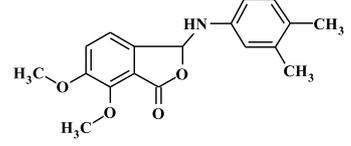
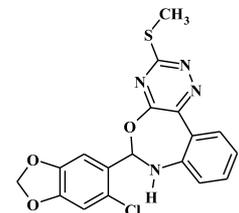
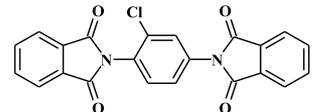
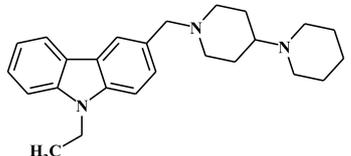
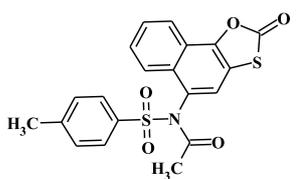
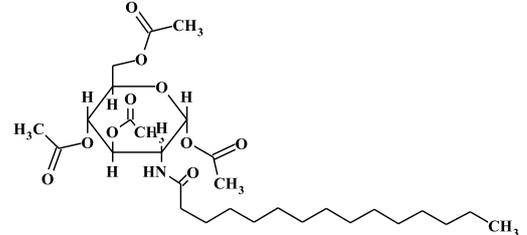
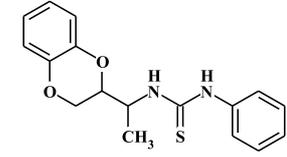
25950		$C_{21}H_{16}ClN_3O_3S_2$	0.94	74	N20	457.9	5.49
25460		$C_{23}H_{29}N_3O_3$	0.95	73	D12	395.5	4
39402		$C_{13}H_9BrN_2O_3S$	0.95	113	J3	353.2	3.51
32894		$C_{28}H_{40}N_2O_6$	0.97	94	N14	500.6	4.28
36496		$C_{20}H_{19}BrN_2O_3S$	0.97	104	P19	447.3	4.75
31304		$C_{21}H_{22}N_2O_2S_2$	0.98	90	H3	398.5	4.15
32445		$C_{22}H_{16}O_4$	0.98	93	M8	344.4	4.19
40328		$C_{12}H_{10}N_2O_3$	0.98	115	H17	230.2	2.58

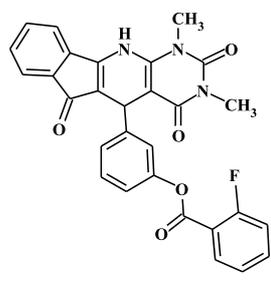
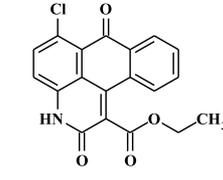
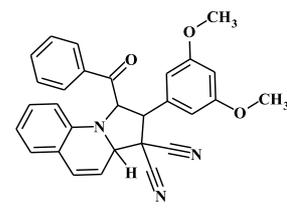
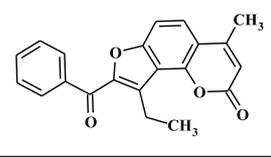
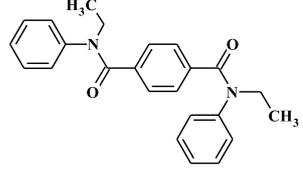
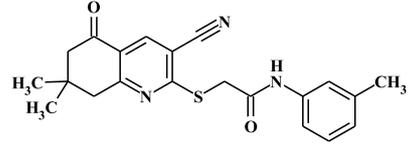
24239		$C_{15}H_{18}N_2$	0.99	70	O1	226.3	3.1
29082		$C_{21}H_{22}BrClF_3N_5O$	1	83	J18	532.8	4.02
32254		$C_{19}H_{14}N_2O$	1	92	N18	286.3	4.81
40412		$C_{20}H_{25}BrN_4O_3S$	1	115	L22	481.4	2.19
100398		$C_{23}H_{30}ClN_3O_2S_2$	1	1002	K11	480.1	3.22
27281		$C_{17}H_{21}N_3O_3$	1	78	A16	315.4	0.79
26160		$C_{18}H_{22}N_2O_2$	1	75	P11	298.4	1.69
26982		$C_{16}H_{13}F_3N_2OS$	1.01	77	F19	338.3	3.33

28922		$C_{25}H_{30}N_2O_3$	1.01	83	J8	406.5	4.81
31544		$C_{25}H_{18}N_2O_6S$	1.02	90	H18	474.5	3.27
25209		$C_{22}H_{20}N_2O_3$	1.02	72	I18	360.4	4.47
26652		$C_{27}H_{18}N_4O_3$	1.03	76	L20	446.5	5.03
26955		$C_{16}H_{23}N_3$	1.03	77	K17	257.4	4.59
29812		$C_{16}H_{25}NO$	1.03	85	D20	247.4	2.82
32573		$C_{17}H_{29}N$	1.03	93	M16	247.4	4.19
28980		$C_{17}H_{20}BrN_3O_5$	1.04	83	D12	426.3	3.42

36348		1.04	104	L10	580.8	4.62
	$C_{32}H_{44}N_4O_4S$					
24179		1.05	69	C20	553.4	4.56
	$C_{28}H_{25}BrO_7$					
25906		1.05	74	B18	374.8	5.01
	$C_{17}H_{11}ClN_2O_4S$					
29197		1.05	84	M3	284.4	4.7
	$C_{20}H_{16}N_2$					
32813		1.05	94	M9	360.5	3.11
	$C_{17}H_{17}FN_4S_2$					
33467		1.06	96	K6	394.6	4.58
	$C_{17}H_{10}Cl_3N_3O_2$					
29218		1.07	84	B5	377.8	2.14
	$C_{20}H_{12}ClN_3O_3$					

32522		$C_{21}H_{15}N_4O_2S$	1.07	93	J13	387.4	1.13
24051		$C_{24}H_{30}N_4O_5S_2$	1.08	69	C12	518.6	3.07
29238		$C_{23}H_{31}NO_3$	1.08	84	F6	369.5	3.8
29389		$C_{18}H_{18}OS$	1.09	84	M15	282.4	4.87
26355		$C_{27}H_{30}BrN_5O_3$	1.12	76	C2	552.5	3.46
28121		$C_{19}H_{19}ClN_4O_3S$	1.12	81	I2	418.9	4.79
26146		$C_{22}H_{21}ClN_2O_3S$	1.12	75	B11	428.9	3.69
28179		$C_{15}H_{10}F_3NO_3$	1.13	81	C6	309.2	4.56

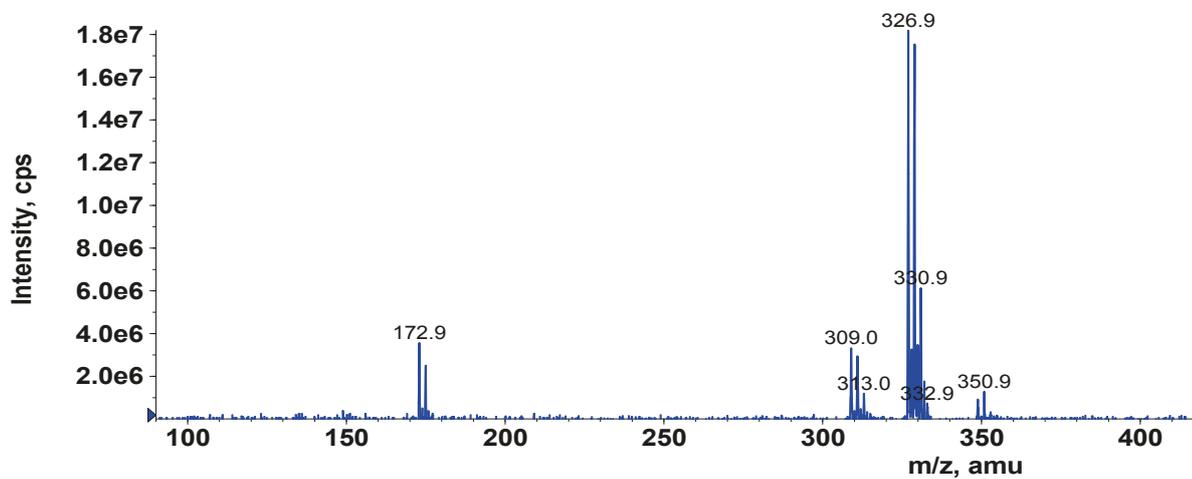
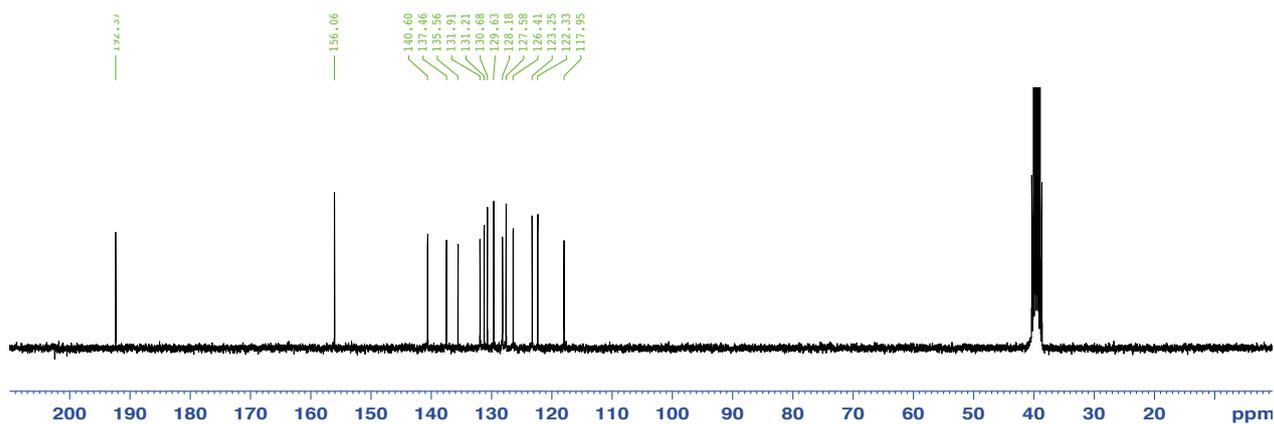
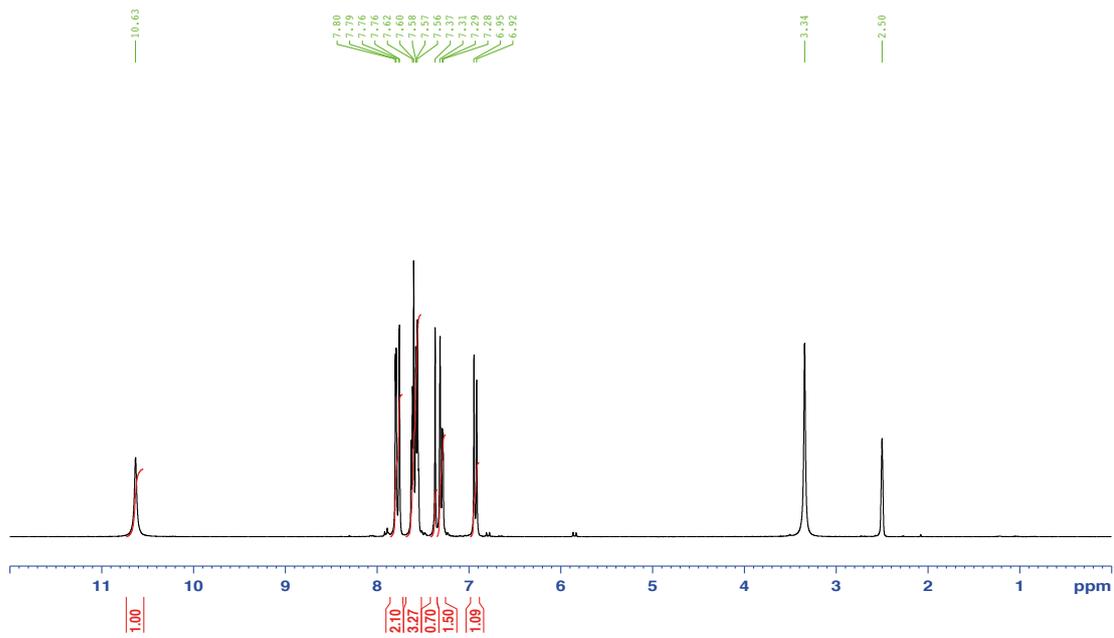
29393		$C_{21}H_{23}N_3O_4S$	1.13	84	A16	413.5	3.82
26993		$C_{14}H_{12}ClFN_4S$	1.15	77	A20	322.8	4.22
28183		$C_{18}H_{19}NO_4$	1.16	81	G6	313.3	3.84
26422		$C_{18}H_{13}ClN_4O_3S$	1.17	76	F6	400.8	4.43
25905		$C_{22}H_{11}ClN_2O_4$	1.18	74	A18	402.8	3.78
32393		$C_{25}H_{33}N_3$	1.18	93	I5	375.5	4.49
32936		$C_{20}H_{15}NO_5S_2$	1.18	94	H17	413.5	4.34
25864		$C_{29}H_{49}NO_{10}$	1.19	74	H15	571.7	4.58
29374		$C_{17}H_{18}N_2O_2S$	1.19	84	N14	314.4	3.78

29168		$C_{29}H_{20}FN_3O_5$	1.19	84	P1	509.5	3.78
26389		$C_{19}H_{12}ClNO_4$	1.2	76	E4	353.8	3.44
26646		$C_{29}H_{23}N_3O_3$	1.2	76	F20	461.5	4.78
26362		$C_{21}H_{16}O_4$	1.2	76	J2	332.3	4.58
27092		$C_{24}H_{24}N_2O_2$	1.2	78	D4	372.5	4.6
29463		$C_{21}H_{21}N_3O_2S$	1.2	84	G20	379.5	3.72

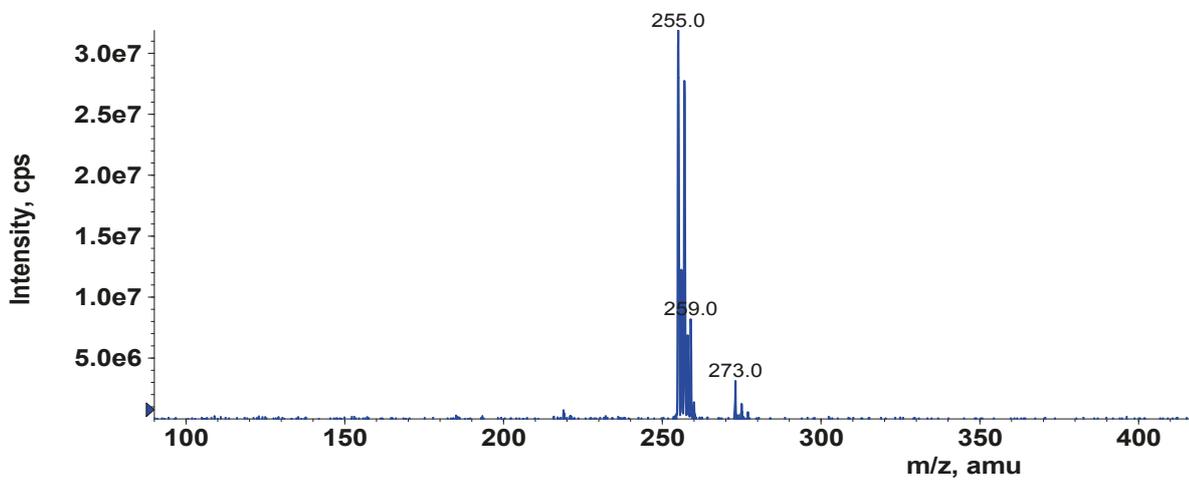
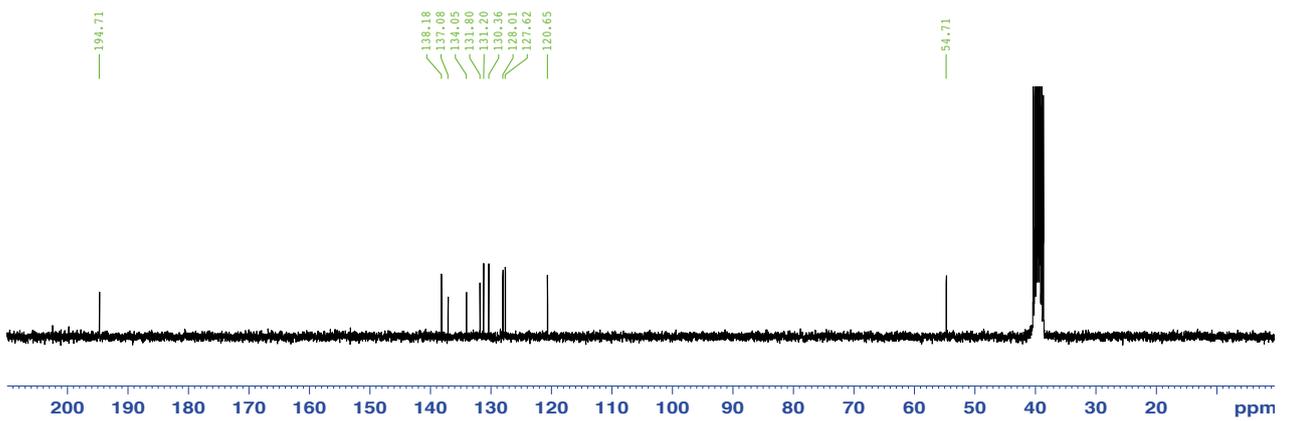
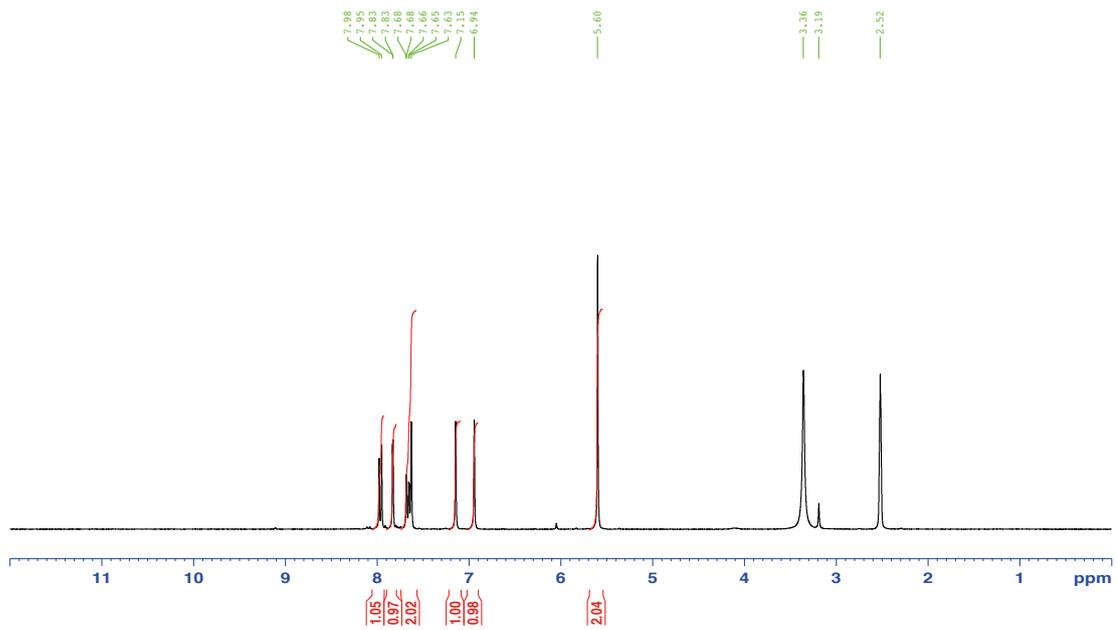
Übersicht zu den 83 identifizierten Hemmstoffen der AQP2-Umverteilung.

Die Darstellung erfolgt aufsteigend anhand des Verhältnisses von Plasmamembran zu intrazellulärer AQP2-Fluoreszenzsignalintensität (Vh.). Es sind die Identifikationsnummern der Verbindungen (#), die Position der Verbindungen auf den Bibliotheksplatten (Platte, Well), sowie die Molekulargewichte (MG, g/mol) und der Verteilungskoeffizient (logP) angegeben. Die 17 im sekundären Test auf MCD4-Zellen positiven Verbindungen sind kursiv dargestellt, die 5 auf IMCD-Zellen positiv getesteten Verbindungen sind fett und kursiv dargestellt.

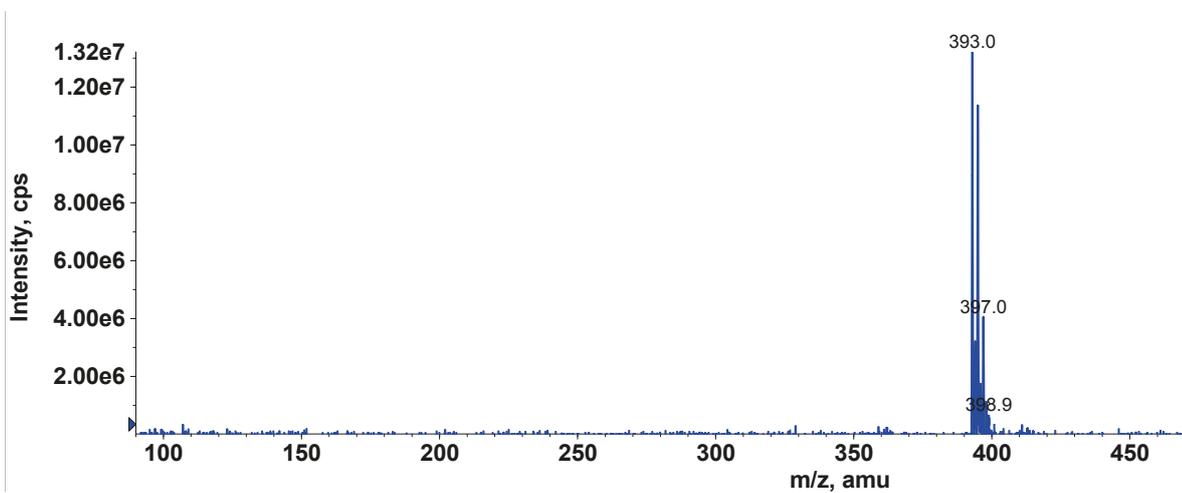
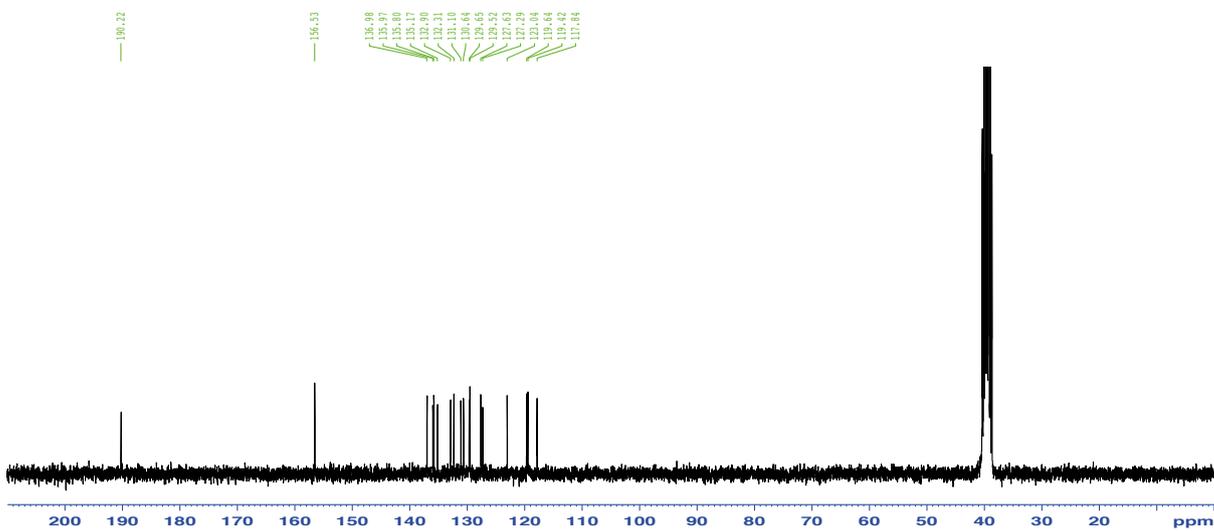
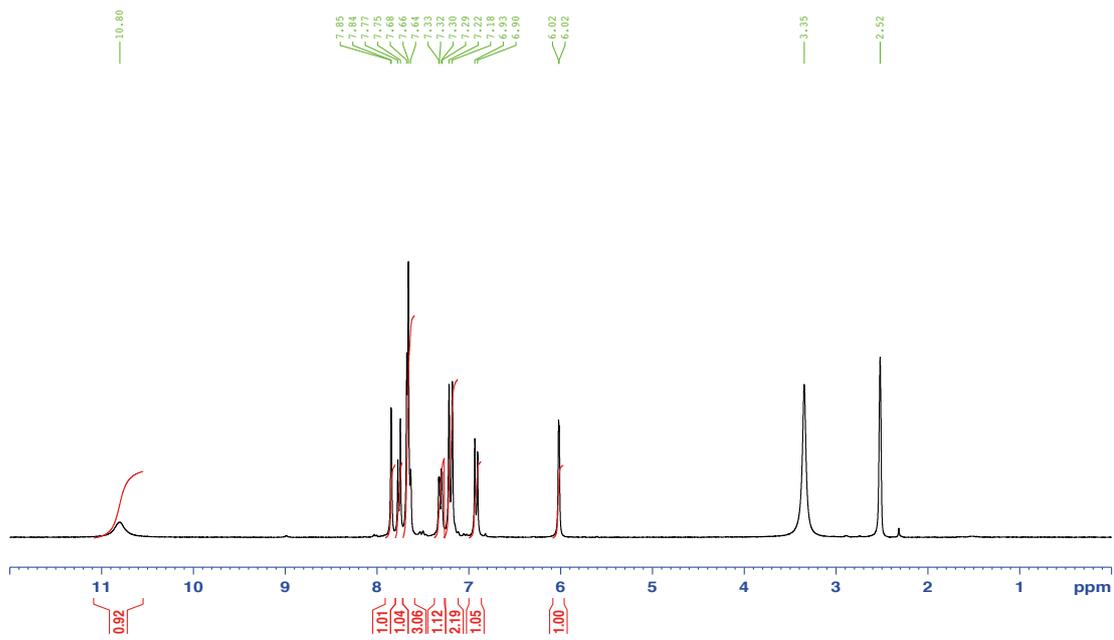
Anhang D: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum, sowie MS-Spektrum von JB01



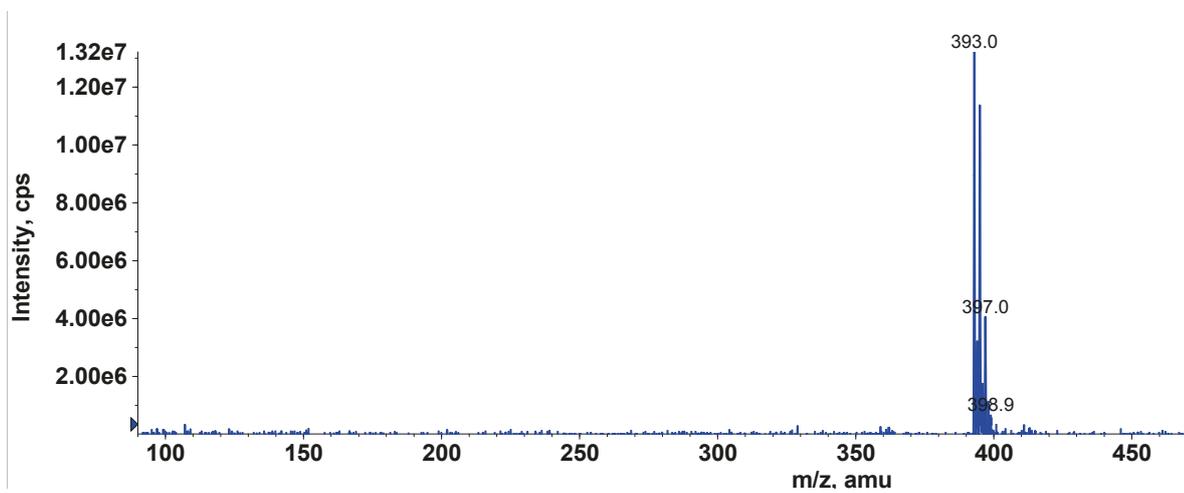
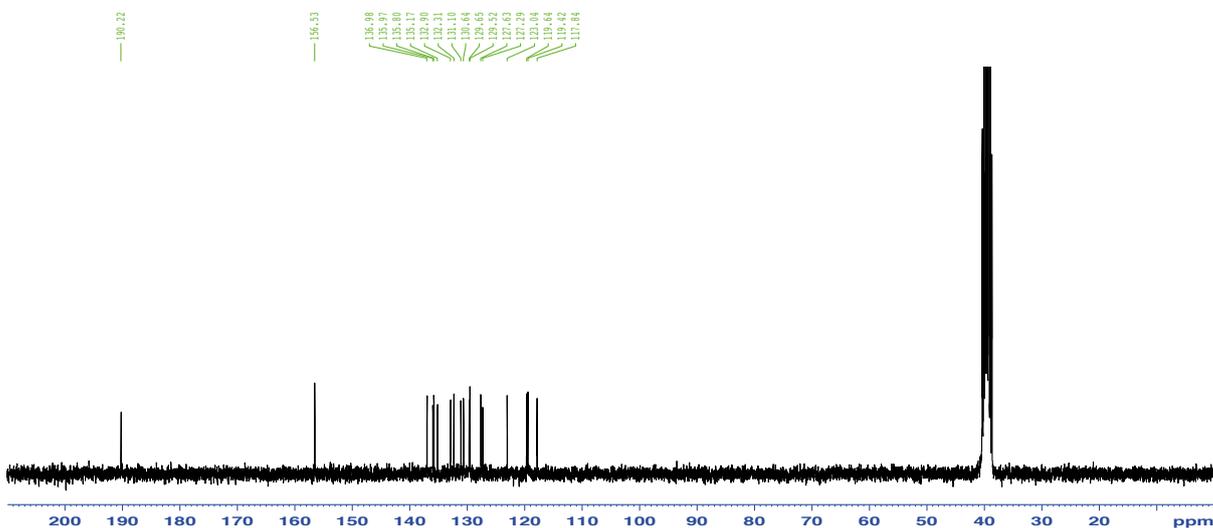
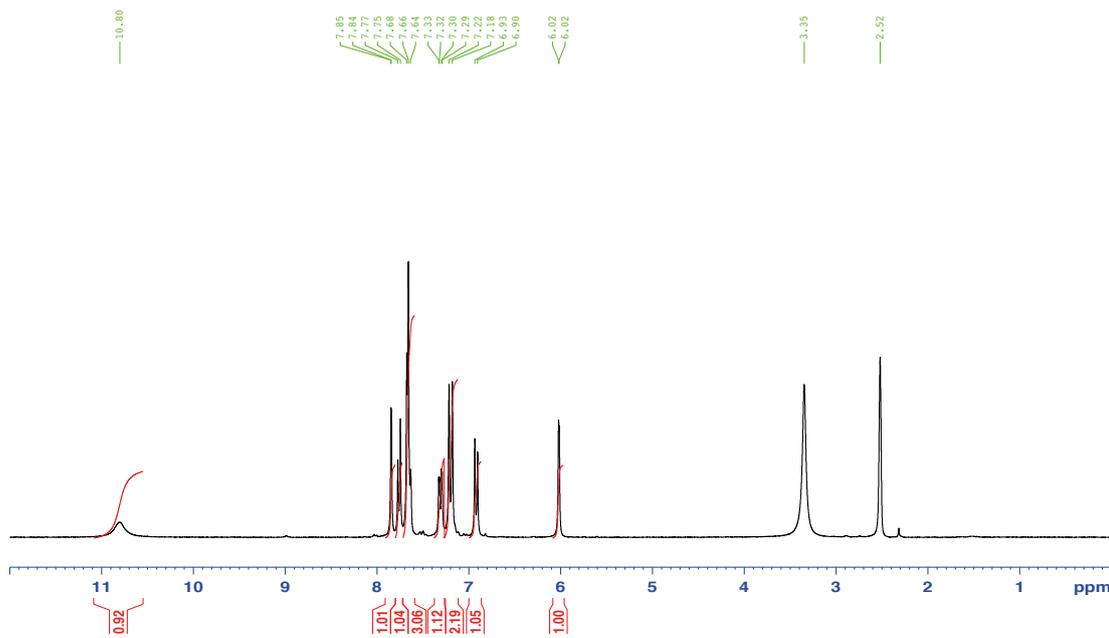
Anhang E: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum, sowie MS-Spektrum von JB02



Anhang F: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum, sowie MS-Spektrum von JB03



Anhang G: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum, sowie MS-Spektrum von JB04



Anhang H: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum, sowie MS-Spektrum von JB05

