

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Niere

Die Nieren der Säugetiere regulieren den Wasser- und Elektrolythaushalt, modulieren das Säure-Basengleichgewicht des Körpers und sie scheiden Stoffwechselprodukte aus. Der funktionelle Grundbaustein der Niere ist das Nephron. Wie in Abb.1 schematisch dargestellt, beginnt das Nephron im Nierenkortex mit dem Glomerulum, welches von der Bowmannschen Kapsel umgeben ist. Der Primärharn wird durch Ultrafiltration aus dem Blutplasma im Glomerulum gewonnen. Eine wichtige Funktion des Nephrons ist die Rückresorption des Wassers aus dem Primärharn. Man unterscheidet zwischen regulierter und nichtregulierter Wasserrückresorption:

- (i) Die nichtregulierte Wasserrückresorption beginnt im proximalen konvoluten Tubulus, welcher in den dicken und dann in den dünnen absteigenden Ast der Henleschen Schleife übergeht. Die treibende Kraft für die Wasserrückresorption ist der osmotische Gradient, der vom Kortex bis in die Medullaspitze ansteigt. Die nicht regulierte Wasserrückresorption endet in der Henleschen Schleife, es folgt der aufsteigende Ast, der über den Verbindungstubulus in das Sammelrohr mündet (Nielsen et al., 2002). Gegenüber dem Gewebe ist der Primärharn, welcher in das kortikale Sammelrohr gelangt, hypoton. Die Wasserrückresorption wird durch eine gesteigerte Wasserpermeabilität einzelner Nierensegmente erleichtert. Sie erfolgt über Wasserkanäle (Aquaporine - AQP), die sich in den apikalen und/oder basolateralen Zellmembranen von definierten Nierenepithelzellen befinden (für die Lokalisation der Aquaporine s. Abb. 1). Ungefähr 90% des freien luminalen Wassers verlässt den proximalen Tubulus und den dünnen absteigenden Ast über den konstitutiv in der Plasmamembran vorhandenen Wasserkanal AQP1 (Nielsen *et al.*, 2002).
- (ii) Das antidiuretische Hormon Arginin-Vasopressin (AVP) reguliert die Feinabstimmung des Körperwasserhaushaltes in Säugetieren. Entlang des Sammelrohrs erfolgt die durch AVP regulierte Wasserrückresorption über

den in der apikalen Plasmamembran eingebauten Wasserkanal AQP2 und über die in der basolateralen Plasmamembran vorliegenden Wasserkanäle AQP3 (basal und lateral) und AQP4 (hauptsächlich basal). AQP2 ist verantwortlich für die Rückresorption von 10% des Wassers aus dem Primärharn (Nielsen *et al.*, 2002; s. 1.3).

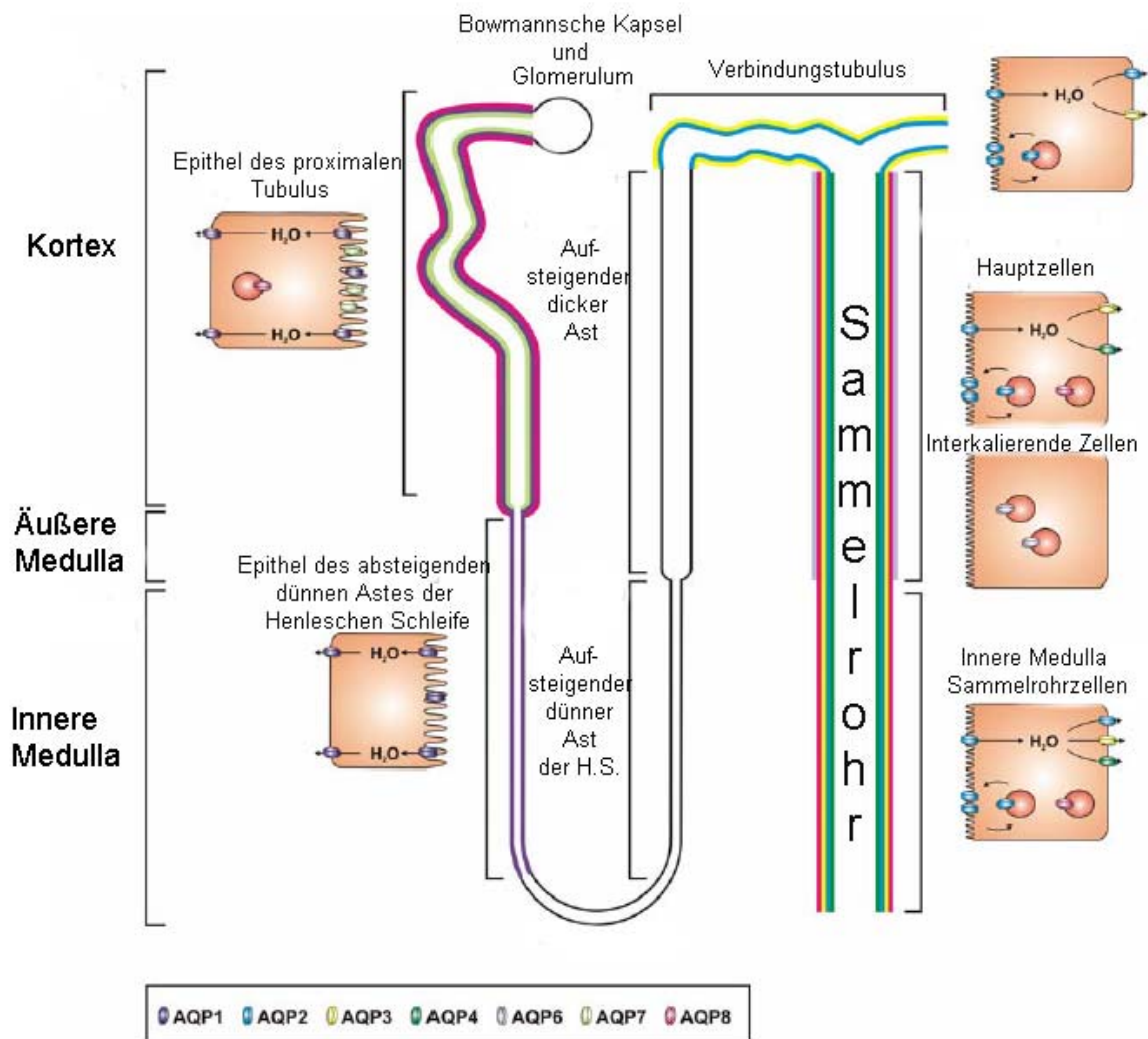


Abb. 1: Schematische Darstellung der Lokalisation von Aquaporinen in den Epithelien des Nephrons und Sammelrohrsystems der Niere (Längsschnitt). Den Wasserkanal AQP1 (dunkelblau) findet man in den apikalen und basolateralen Membranen des proximalen Tubulusepithels und im absteigenden dünnen Ast der Henleschen Schleife. AQP2 (hellblau) findet man in der apikalen Membran und in intrazellulären Vesikeln von Sammelrohrepithelzellen. Man findet dort AQP3 (gelb) in basalen und lateralen Membranen hingegen AQP4 (grün) nur in den basalen Membranen. AQP6 (grau) findet man an intrazellulären Vesikeln von Säuresekretierenden Interkalierenden Zellen. AQP7 (hellgrau) findet man in der apikalen Plasmamembran des proximalen Tubulusepithels. AQP8 (rot) findet man in intrazellulären Vesikeln des proximalen Tubulusepithels und im Sammelrohrepithel.

1.2 Struktur und Funktion von Wasserkanälen

Die Aquaporine sind eine Familie von membranständigen Proteinen, welche für den Wassertransport durch biologische Membranen verantwortlich sind. Der erste identifizierte und bis dato auch am besten charakterisierte Wasserkanal ist AQP1. Er wurde von Peter Agre und Kollegen in Membranen von Erythrozyten entdeckt. Seit der Entdeckung des ersten Aquaporins konnten 10 weitere in Säugetieren identifiziert werden (AQP0-10). Man unterscheidet selektiv Wasser-transportierende Aquaporine (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 und AQP8) und zusätzlich Glycerin-transportierende Aquaporine (AQP3, AQP7, AQP9 und AQP10) (Nielsen *et al.*, 2002).

Alle Aquaporine besitzen intrazelluläre N- und C-Termini und sechs Transmembranhelizes, die durch fünf Schleifen verbunden sind (Abb. 2). Durch Aufklärung der Struktur von AQP1 konnten die molekularen Prozesse für den Wasserfluss weitgehend aufgeklärt werden. Die Struktur von AQP1 unterstützt die These des selektiven Transportes von Wasser ohne bewegliche Strukturen. Es konnte gezeigt werden, dass die zentrale Pore eines AQP1-Monomers an ihrer engsten Stelle einen Durchmesser von 2,8 Ångström (Å) besitzt (entspricht dem Durchmesser eines Wassermoleküls) und somit für die Größenselektion verantwortlich ist (de Groot *et al.*, 2003; Preston und Agre, 1991). Der in der Aminosäuresequenz aller Wasserkanäle konservierte Argininrest R195 an der schmalsten Stelle der Pore ist für die elektrostatische Abstoßung von Kationen, wie etwa H_3O^+ , verantwortlich (de Groot *et al.*, 2003). Eine zweite Barriere für H_3O^+ ist ein starker Dipol, gebildet durch das NPA-Motiv in zwei kurzen Porenhelizes in der Mitte des Kanals (Abb. 2). Diese positiven Ladungen bewirken eine Umorientierung des Wassermoleküls. Durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zu den benachbarten Wassermolekülen, die als Wassersäule durch Aquaporine fließen, wird der Protonentransport inhibiert (Murata *et al.*, 2000). Röntgenkristallographiestudien zeigten, dass Aquaporine in der Zellmembran als Tetramer vorliegen (Verbavatz *et al.*, 1993).

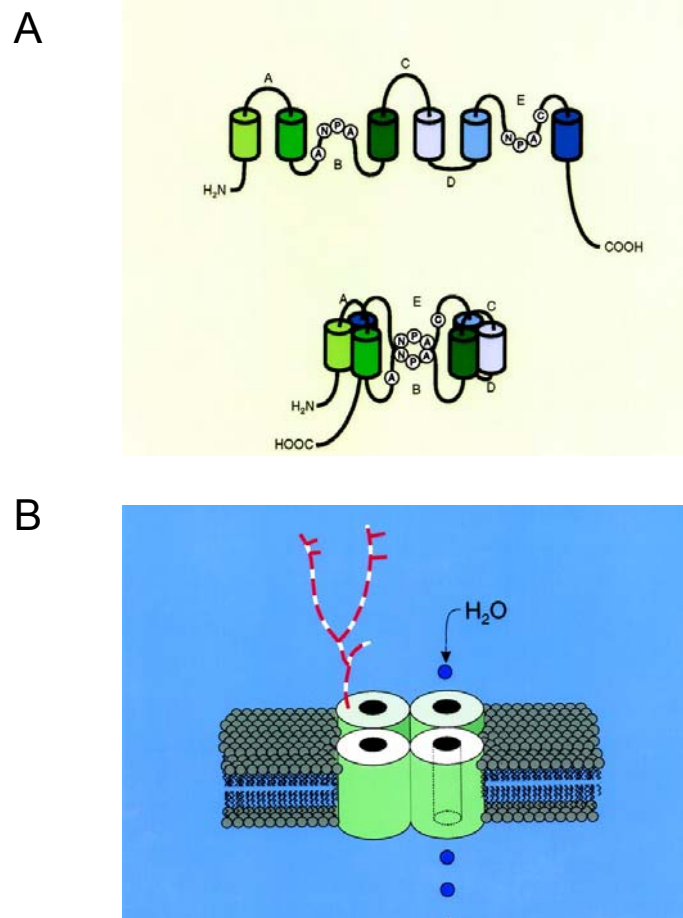


Abb. 2: Schema der strukturellen Organisation von Aquaporinen am Beispiel von AQP1. (A) Aquaporine besitzen intrazelluläre N- und C-Termini und sechs Transmembranhelizes, die durch fünf Schleifen (A-E) verbunden sind. Die Schleifen B und E bilden in der Membran die wasserdurchlässige Pore. Die zwei NPA-Motive bilden einen starken Dipol aus, der den selektiven Wasserfluss ermöglicht. (B) Aquaporine liegen in der Membran als Homotetramere vor (ein Monomer besitzt einen Glykanrest; adaptiert von Nielsen *et al.*, 2002).

1.3 Molekularer Mechanismus der Translokation von AQP2 (AQP2-Shuttle)

AVP wirkt auf die renalen Hauptzellen, welche das renale Sammelrohr umkleiden. An der basolateralen Oberfläche der Hauptzellen bindet AVP an den heptahelikalen Vasopressin V2-Rezeptor, der an das Gs/Adenylatzyklasesystem gekoppelt ist (Birnbaumer *et al.*, 1992). Die Aktivierung der Signalkaskade durch die Bindung des Hormons an den Rezeptor führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase durch das G-Protein. Infolgedessen erhöht sich die Menge an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), das wiederum an die Protein Kinase A (PKA) bindet und sie dadurch

aktiviert (s.1.5.1). Die aktivierte PKA phosphoryliert ihre Substrate, eines davon ist AQP2. Sie phosphoryliert AQP2 an dem Serinrest S256 und induziert die Umverteilung von AQP2 aus intrazellulären Vesikeln in die dem Urin zugewandte apikale Plasmamembran. Eine Mutation an dieser Stelle (S256A) oder auch Inhibition der PKA verhindern die Translokation von AQP2 (Fushimi et al., 1997; Katsura et al., 1997; Klusmann et al., 1999; van Balkom et al., 2002). Mindestens drei Moleküle in einem Tetramer müssen am S256 phosphoryliert werden, um eine Translokation von AQP2 in die Plasmamembran zu induzieren (Kamsteeg et al., 2000). Die AVP-abhängige Umverteilung von AQP2 ist die Voraussetzung für eine regulierte Wasserrückresorption (*Shuttle*-Hypothese; Agre und Kozono, 2003; Brown, 2003; King et al., 2004; Klusmann et al., 2000; Wade et al., 1981). Die Phosphorylierungsstelle S256 ist auch Substrat für die Golgi-Caseinkinase. Die Phosphorylierung durch diese Kinase ist notwendig für den Transport von AQP2 durch den Golgikomplex (Procino et al., 2003). Der Phosphorylierungsstatus von AQP2 am S256 scheint keine Veränderung der Wasserpermeabilität zu verursachen. Sie ist wahrscheinlich also ausschließlich für die Initiation der Translokation verantwortlich (Katsura et al., 1997; Kuwahara et al., 1995; Lande et al., 1996).

Durch das in die apikale Plasmamembran eingebaute AQP2 fließt Wasser in die Hauptzellen hinein. Es verlässt sie über die konstitutiv in der basolateralen Plasmamembran vorliegenden Wasserkanäle AQP3 und AQP4 (Abb. 3A und Abb. 3B). Die Translokation von AQP2 in die apikale Plasmamembran wird als Kurzzeitregulation von AQP2 bezeichnet. Der AVP induzierte Anstieg der Menge an cAMP ist aber auch eine Voraussetzung für den Erhalt der Expression von AQP2 (Langzeitregulation von AQP2; Marples et al., 1999). Die aktivierte PKA phosphoryliert unter anderem den Transkriptionsfaktor cAMP-*responsive* Elementbindeprotein (CREB) am Serinrest S133. Die darauffolgende Bindung von CREB an das cAMP-*responsive* Element (CRE) in der Promoterregion von AQP2 veranlasst die Transkription des AQP2-Gens (Sasaki et al., 1998).

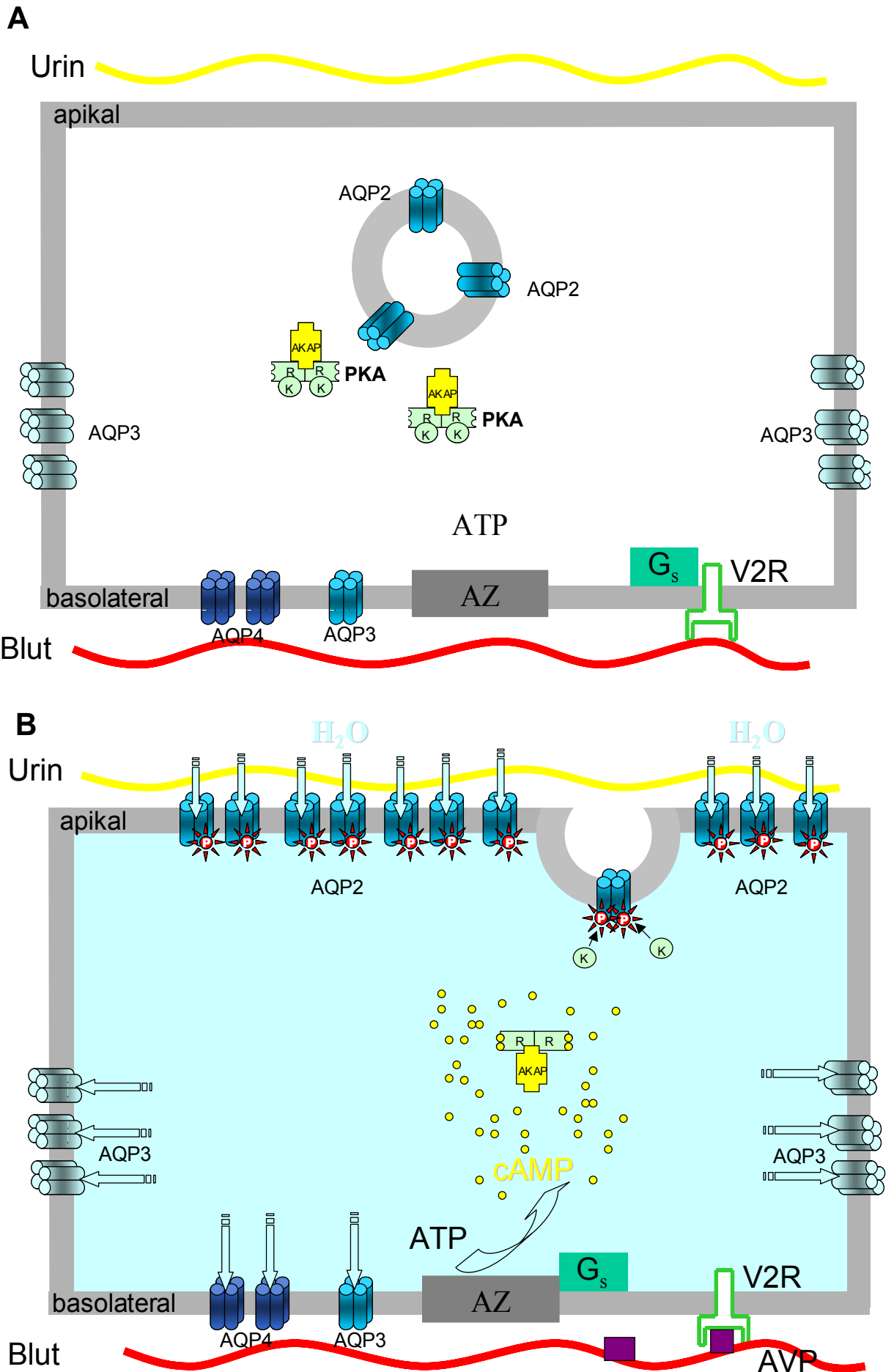


Abb. 3: Mechanismus der AVP-abhängigen Umverteilung von AQP2 aus intrazellulären Vesikeln in die apikale Plasmamembran von renalen Hauptzellen. (A) AQP2 liegt in ruhenden Hauptzellen in Vesikeln im Zytoplasma vor. **(B)** Das Hormon Arginin-Vasopressin (AVP; wird im Hypothalamus synthetisiert) bindet an den in der basolateral Plasmamembran lokalisierten G-Protein gekoppelten Vasopressin V2-Rezeptor (V2R). Der Rezeptor aktiviert die G-Proteine, wobei G_s die Adenylatzyklase (AZ) aktiviert. Die Adenylatzyklase bildet aus ATP (Adenosintriphosphat) den *second messenger* cAMP, der an die regulatorische Untereinheit der PKA (R für regulatorische und K für katalytische Untereinheit der PKA) bindet. Die über AKAP-Proteine an ihren Wirkungsort verankerte PKA (siehe 1.5.2) wird aktiviert. Nach Bindung von cAMP dissoziieren die katalytischen Untereinheiten und phosphorylieren ihre Substrate, unter anderem AQP2. Es folgt die Translokation von AQP2 in die apikale Plasmamembran. Die Wasserrückresorption aus dem Sammelrohr in die Hauptzellen erfolgt durch AQP2. Das Wasser verlässt die Hauptzellen durch AQP3 und AQP4.

1.4 Ursachen für Veränderungen des AVP-regulierten Wasserhaushaltes

Es gibt eine Reihe verschiedener Ursachen bei denen es zu einer Störung der über AQP2 regulierten Wasserhomeostase kommt. Defekte der Translokation von AQP2 resultieren in der Krankheit Diabetes insipidus, die durch einen hohen Verlust an Wasser charakterisiert ist. Die Erkrankung kann entweder genetische Ursachen haben oder erworben sein. Man unterscheidet zwei verschiedene Formen des vererbten Diabetes insipidus (DI): den zentralen (neurogenen) und den nephrogenen.

- (i) Ersterer ist durch Defekte bei der Synthese von Vasopressin im Hypothalamus oder bei dessen Freisetzung charakterisiert. Er wird durch Vererbung (seltener) oder als Konsequenz von Kopftraumata und als Folge von Krankheiten im Hypothalamus oder der Hypophyse verursacht (Oksche und Rosenthal, 1998).

- (ii) Der nephrogene Diabetes insipidus (NDI) resultiert aus einem Defekt bei der AVP-abhängige Translokation von AQP2. Die häufigste Ursache ist die Vererbung von Mutationen im X-chromosomal-gekoppelten V2-Rezeptorgen, wodurch die AVP-abhängige Signalkaskade in den Hauptzellen des Sammelrohrs nicht mehr ausgelöst werden kann. Es kommt zur Reduktion der Expression von AQP2 und somit zur Verminderung der AQP2-abhängigen Wasserrückresorption (Morello und Bichet, 2001; Nielsen *et al.*, 2002; Oksche *et al.*, 1998; Rosenthal *et al.*, 1992). In weniger als 10% der NDI-Fälle kommt es zu einer autosomal rezessiven Vererbung von Mutationen im AQP2-Gen, oft resultierend in Transportdefekten von ansonsten funktionsfähigen AQP2-Tetrameren (Deen und Knoers, 1998; Nielsen *et al.*, 2002). Es wurden auch seltene Fälle mit autosomal dominanter Vererbung von Mutationen im AQP2-Gen beschrieben (Marr *et al.*, 2002; Mulders *et al.*, 1998).

- (iii) Erworbener NDI kann z.B. als Nebenwirkung einer Lithiumtherapie bei manisch-depressiven Patienten auftreten. Es kommt zu einem Vasopressin-resistenten Urinkonzentrierungsdefekt, der durch ein Absinken der Expression von AQP2 verursacht wird (Marples *et al.*, 1995). Auch Störungen im Elektrolythaushalt führen zu erworbenem NDI. Beispielsweise bewirken Hyperkalämie und Hyperkalzämie eine Senkung der Expression von AQP2 (Marples *et al.*, 1996).

1.5 Proteinkinase A (PKA) und A-Kinaseankerproteine (AKAP) spielen eine Rolle bei der Translokation von AQP2

1.5.1 PKA

Das unter basalen Bedingungen inaktive PKA-Holoenzym ist ein Tetramer bestehend aus zwei regulatorischen Untereinheiten (R), welche jeweils eine katalytische Untereinheit binden (K; s. Abb.2). Nach Bindung von zwei cAMP-Molekülen an jede regulatorische Untereinheit kommt es zur Dissoziation der katalytischen Untereinheiten, die in der Folge ihre Substrate phosphorylieren (Francis et al., 2002; Johnson et al., 2001; Skalhegg und Tasken, 2000; Wong und Scott, 2004). So wie die PKA liegen auch deren Substrate über die Zelle verteilt vor und es ist unklar inwieweit der Anstieg des frei diffundierenden cAMP eine spezifische Zellantwort durch Aktivierung der PKA hervorruft. Eine teilweise Erklärung für dieses Phänomen ist die Kompartimentierung der PKA durch sogenannte A-Kinaseankerproteine (AKAP-Proteine) an spezifische subzelluläre Wirkungsorte. Neuere Veröffentlichungen zeigen auch, dass AKAP-Proteine neben der Kompartimentierung der PKA auch an der Verankerung ganzer Signaltransduktionskomplexe beteiligt sind. Sie fungieren als Gerüstproteine und ermöglichen dadurch die fokussierte Aktivierung der PKA in der unmittelbaren Umgebung ihrer Substrate (Colledge und Scott, 1999; Smith und Scott, 2002; Tasken und Aandahl, 2004; Wong et al., 2004). Die lokale Aktivierung der PKA durch einen Anstieg der Menge an cAMP konnte kürzlich in neonatalen Herzmuskelzellen visualisiert werden (Zaccolo und Pozzan, 2002). AKAP-Proteine begrenzen somit Signalkaskaden, insbesondere cAMP-abhängige, räumlich und zeitlich. Neben den AKAP-Proteinen sind auch Phosphodiesterasen (PDE; s. 1.6) an der Kompartimentierung von cAMP- (aber auch cGMP-) Signalen beteiligt.

1.5.2 AKAP-Proteine

Die AKAP-Familie umfasst zur Zeit etwa 50 Proteine. Alle AKAP-Proteine besitzen eine amphipathische Helix (wird als R-Bindungsdomäne bezeichnet), ein konserviertes Strukturmotiv, welches für die Interaktion mit den regulatorischen Untereinheiten (R) der PKA verantwortlich ist. Durch Verwendung von Peptiden, die aus den Aminosäuren einer amphipatischen Helix (s.u.) bestehen, lässt sich die Verankerung der PKA an AKAP-Proteine hemmen (Alto et al., 2003; Klussmann et al., 1999). Neben der R-Bindungsdomäne für die PKA besitzen viele AKAP-Proteine zusätzliche Domänen (*targeting*-Domänen). Diese vermitteln die Verankerung an bestimmte subzelluläre Kompartimente oder die Interaktion mit weiteren Signalmolekülen wie z.B. Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase D (PKD), Phosphatasen (PP) oder Phosphodiesterasen (PDE; s.u.; (Michel und Scott, 2002; Tasken et al., 2004; Wong et al., 2004).

Hierfür sollen drei Beispiele angeführt werden:

- (i) AKAP79 verankert nicht nur die PKA sondern auch die Proteinkinase C, die Proteinphosphatase Calcineurin und bindet zusätzlich an die postsynaptischen Dichteproteine PSD-95 und PSD-97, welche mit Glutamatrezeptoren interagieren. Durch die Kompartimentierung von Phosphatasen und Proteinkinasen in räumlicher Nähe zum Glutamatrezeptor wird dessen Phosphorylierungsstatus reguliert (Colledge et al., 2000).
- (ii) AKAP450 und das muskelspezifische mAKAP interagieren mit der PKA und der Phosphodiesterase 4D3 (PDE4D3), welche an der Kompartimentierung und Terminierung des cAMP-Signals beteiligt ist (s. 1.6, Dodge et al., 2001; Tasken et al., 2001; Wong et al., 2004).
- (iii) AKAP-Lbc/Ht31 ist für die Integration von PKA- und RhoA-Signalen verantwortlich (s. 1.7; Diviani et al., 2001; Diviani et al., 2004; Klussmann et al., 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass AKAP-Lbc PKA- und PKC-Aktivitäten synchronisiert und dadurch eine Aktivierung einer dritten Kinase, der Proteinkinase D (PKD), ermöglicht (Carnegie et al., 2004).

1.5.2.1 AKAP18

In den renalen Hauptzellen der inneren Medulla (s. 2.4) konnten wir eine neue AKAP18-Spleißvariante (AKAP18 δ) identifizieren, welche an der Translokation von AQP2 beteiligt sein könnte (s.u.). Neben AKAP18 δ gibt es weitere Spleißvarianten von AKAP18: AKAP18 α , β , und γ . AKAP18 α (Fraser et al., 1998), auch bekannt als AKAP15 (Gray et al., 1997; Gray et al., 1998), besteht aus 81 Aminosäuren. Es verankert die PKA durch eine RII-Bindungsdomäne an die basolaterale Plasmamembran von Epithelzellen und interagiert durch ein Leuzinzippermotiv mit dem L-Typ Ca²⁺-Kanal in Skelett- und Herzmuskelzellen. Die Verankerung ermöglicht die Phosphorylierung des Kanals durch die PKA, wodurch seine Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht wird (Catterall, 2000; Hulme et al., 2002). Eine weitere mögliche Funktion von AKAP18 α ist die Beteiligung an der Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas (Fraser *et al.*, 1998). AKAP18 β besteht aus 104 Aminosäuren. Eine Funktion ist noch nicht beschrieben worden. AKAP18 α und AKAP18 β besitzen die gleichen Membranbindungsdomänen. Diese bestehen aus den N-terminalen Aminosäuren G1, C4 und C5, modifiziert durch Lipidanker, einer Myristoylierung und einer doppelten Palmitoylierung (Fraser *et al.*, 1998; Trotter et al., 1999). Im Vergleich zu AKAP18 α besitzt AKAP18 β zusätzlich eine aus 23 Aminosäuren bestehende Insertion, die für die Lokalisation an der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen verantwortlich ist (Trotter *et al.*, 1999).

AKAP18 γ besteht aus 326 Aminosäuren. Die subzelluläre Verteilung wurde in Mausoozyten und in Homogenaten vom Rattennierengewebe untersucht. In der Niere konnte es nicht nur in der partikulären sondern auch in der löslichen Fraktion gefunden werden. Die Lokalisation eines AKAP-Proteins im Zytosol ist höchst ungewöhnlich und eine Funktion ist noch nicht bekannt (Trotter *et al.*, 1999). AKAP18 γ scheint für den Transport der PKA in den Zellkern verantwortlich zu sein. In diesem Zusammenhang wird eine Beteiligung an der Transkriptionsregulation vermutet (Brown et al., 2003).

1.5.2.2 Die Verankerung der PKA an AKAP-Proteine stellt eine Voraussetzung für die AVP-induzierte Umverteilung von AQP2 dar

AKAP-Proteine spielen bei der Translokation von AQP2 eine Rolle. Lande und Koautoren (Lande *et al.*, 1996) isolierten die PKA zusammen mit AQP2-tragenden Vesikeln. Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe untersucht, inwieweit die Bindung von AKAP-Proteinen an die PKA notwendig für die Translokation von AQP2 ist. Als Modellsystem dienten primär kultivierte Hauptzellen aus der Ratte (s. 2.4; Maric *et al.*, 1998). Es wurde das membranpermeable Peptid S-Ht31 (Stearatgekoppelt) bestehend aus den Aminosäuren einer amphipatischen Helix des AKAP-Proteins AKAP-Lbc/Ht31 verwendet, wodurch die Verankerung der PKA an AKAP-Proteine inhibiert wird (Alto *et al.*, 2003). Dieses Peptid verhindert die AVP-abhängige Translokation von AQP2 in die Plasmamembran (Klussmann *et al.*, 1999). Daraus wurde geschlossen, dass die Verankerung der PKA an AKAP-Proteine eine Voraussetzung für die Translokation von AQP2 darstellt.

1.6 Phosphodiesterasen

PDE terminieren das PKA-Signal durch Hydrolyse von cAMP. Sie sind u. a. für die Kontrolle des basalen cAMP-Signals verantwortlich. Eine wesentliche Funktion von PDE ist die Etablierung von Gradienten von zyklischen Nukleotiden. Durch die Limitierung der Diffusion von cAMP und/oder cGMP wird in subzellulären Kompartimenten unter anderem die Aktivität der PKA reguliert. Ähnlich wie bei AKAP-Proteinen, wird durch PDE die Spezifität der Signalkaskade gewährleistet (Abb. 5; Houslay und Adams, 2003; Soderling und Beavo, 2000).

1.6.1 Phosphodiesterase 4

Bis jetzt konnten elf verschiedene PDE-Familien identifiziert werden, wobei PDE4, PDE7 und PDE8 spezifisch cAMP hydrolysieren. Die PDE4-Familie weist die höchste cAMP-Hydrolyseaktivität auf (Conti et al., 2003; Houslay et al., 2003). Die PDE4-Familie umfasst die von verschiedenen Genen kodierten Subtypen PDE4A,B,C und D. Alternatives Spleißen ergibt eine Reihe verschiedener Spleißvarianten, insgesamt 16, wie z.B. PDE4D3. Diese sind durch spezifische N-Termini charakterisiert (Conti et al., 2003; Houslay et al., 2003). Die vier PDE4-Subtypen besitzen eine für jede Subfamilie spezifischen C-Terminus. Am N-Terminus der hoch konservierten katalytischen Domäne befinden sich die regulatorischen Bereiche, die als *upstream conserved regions* 1 und 2 (UCR1 und UCR2) bezeichnet werden (Conti et al., 2003; Houslay et al., 2003). Durch Vorhandensein der UCR-Domänen kann man die PDE4-Subtypen in lange (*long*), kurze (*short*) und superkurze (*supershort*) Isoformen unterteilen. Bei den langen Isoformen kontrollieren die vorhandenen UCR1- und UCR2-Module die Konformation der katalytischen Region. Die kurzen Isoformen besitzen nur eine oder keine UCR-Domäne (Abb. 4; Richter und Conti, 2002).

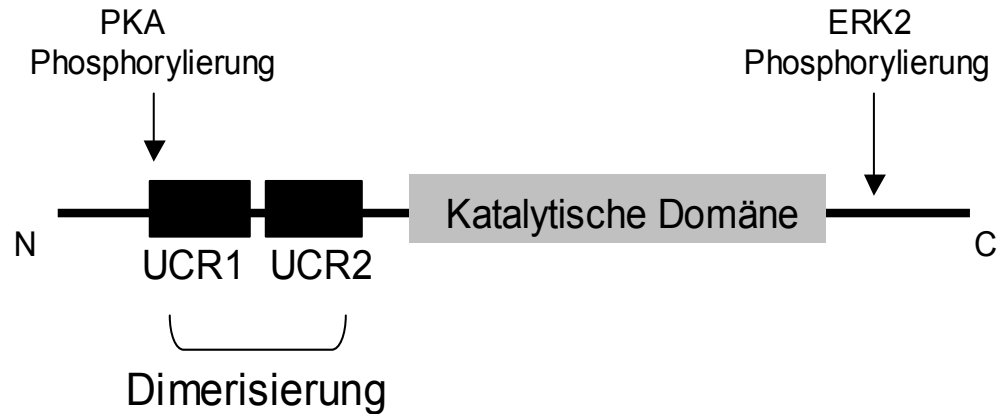


Abb. 4: Domänen der langen PDE4-Isoformen am Beispiel von PDE4D3. Die unterschiedlichen Domänen sind über sogenannte Verbindungsregionen miteinander verbunden. Die Phosphorylierungsstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Domänenanordnung ist allen langen PDE4-Spleißvarianten, die von den Genen PDE4A, B, C und D kodiert werden, gemeinsam. Sie unterscheiden sich durch die Sequenzen der N-Termini. Die UCR-Module sind für die Dimerisierung verantwortlich.

Die langen Isoformen können durch die PKA am S54 in der UCR1-Domäne phosphoryliert werden, wodurch ihre Aktivität erhöht wird (Hoffmann *et al.*, 1998; MacKenzie *et al.*, 2002; Sette und Conti, 1996). Durch Austausch des Serins in der PKA Konsensussequenz RRESF durch einen Aspartat- oder Glutamatrest kann eine konstitutiv aktive PDE4-Variante hergestellt werden (Hoffmann *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang konnte ein Ansteigen der PDE4D3-Aktivität um das 2- bis 3-fache beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte die Aktivierung von PDE4A4 einen Anstieg der Enzymaktivität von nur 50 % (Houslay *et al.*, 2003). Die PDE4-Isoformen können verschiedenen subzellulären Kompartimenten zugeordnet werden (über die *targeting*-Domäne s.u.; Houslay *et al.*, 2003).

1.6.1.1 Interaktionspartner von PDE4

PDE4-Isoformen sind Bestandteil von Signalproteinkomplexen (s. 1.5.2). PDE4D3 bindet beispielsweise verschiedene AKAP-Proteine (Dodge *et al.*, 2001; Tasken *et al.*, 2001). Ein weiterer Interaktionspartner von PDE4D3 ist β -Arrestin (Baillie *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2002).

- (i) In Herzmuskelzellen konnte eine Assoziation von PDE4D3 mit dem muskelspezifischen mAKAP festgestellt werden (Dodge *et al.*, 2001). Nach hormoneller Stimulation des β -adrenergen Rezeptors kommt es zum Anstieg der Menge an cAMP, die an mAKAP gebundene PKA wird aktiviert und phosphoryliert ihre Substrate, u.a. PDE4D3. Phosphorylierung von PDE4D3 erhöht dessen Aktivität (s.o.). Dies führt zu einem Absinken der Menge an cAMP wodurch die PKA-Aktivität sinkt und die Dephosphorylierung von PDE4D3 induziert wird (Houslay *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die räumliche Nähe der PKA und der PDE4D3 in dem mAKAP-Signalkomplex die Grundlage für einen negativen *feedback loop* bildet, der für die Wiederherstellung der basalen Menge an cAMP verantwortlich ist (Dodge *et al.*, 2001).

- (ii) In Sertolizellen wurde ein Komplex bestehend aus AKAP450, der regulatorischen Typ II Untereinheit (RII) der PKA und PDE4D3 immunpräzipitiert. Dieser Komplex ist am Zentrosom kolokalisiert und könnte den Phosphorylierungszustand zentrosomaler Proteine regulieren (Tasken *et al.*, 2001).

- (iii) β -Arrestin, ein weiterer Interaktionspartner von PDE4D3, spielt bei der Desensibilisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine wichtige Rolle. Nach Aktivierung des Rezeptors (beschrieben anhand des β_2 -adrenergen Rezeptors) kommt es zur Aktivierung des G-Proteins $G\alpha_s$. Die Rezeptorkinasen (GRK) phosphorylieren den Rezeptor und zytosolisches β -Arrestin wird an die Plasmamembran rekrutiert (Luttrell *et al.*, 2001). Die Arbeitsgruppen um Miles Houslay und Robert Lefkowitz konnten zeigen, dass durch β -adrenerge Stimulation von Herzmuskelzellen neben β -Arrestin auch dessen Interaktionspartner PDE4D3 und PDE4D5 an die Plasmamembran rekrutiert werden. Die PDE4D regulieren die Menge an cAMP an der Plasmamembran und sind am Umschalten des β_2 -adrenergen Rezeptors von $G\alpha_s$ auf $G\alpha_i$ mitbeteiligt (Baillie *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2002).

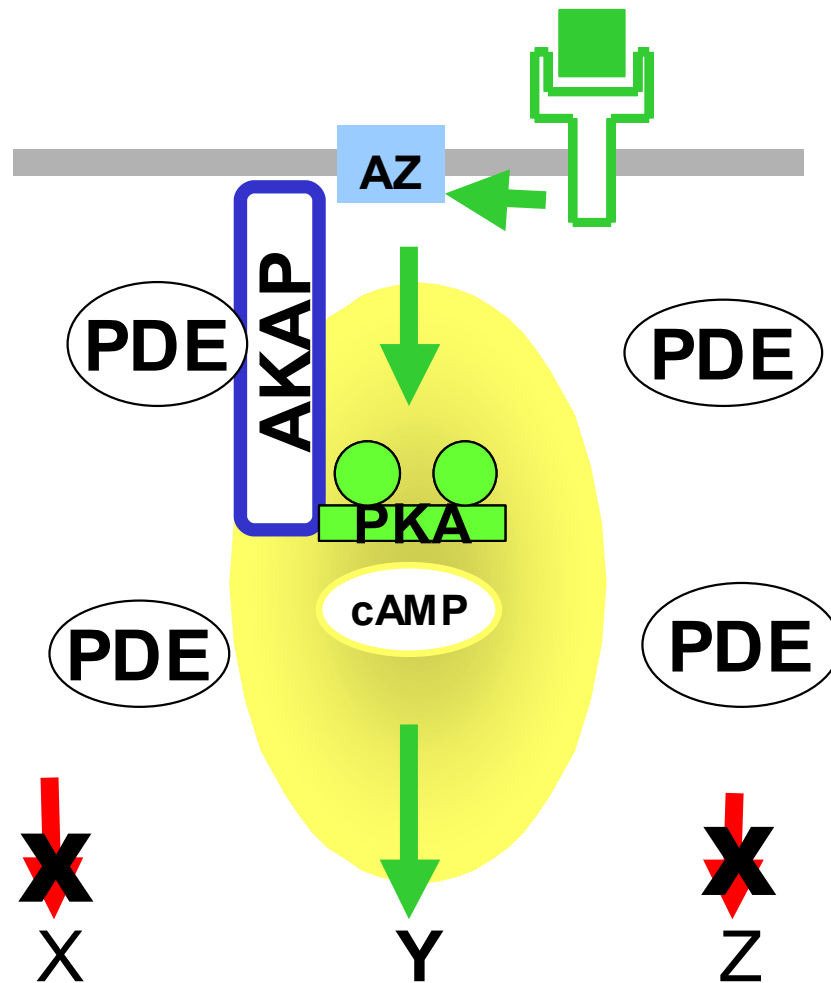


Abb. 5: AKAP-Proteine und Phosphodiesterasen (PDE) spielen bei der Kompartimentierung von cAMP-abhängigen Signalwegen eine Rolle. Nach Aktivierung einer cAMP-abhängigen Signalkaskade z.B. Y durch das an einen Rezeptor bindende Hormon kommt es zur Bildung von cAMP durch die Adenylatzyklase (AZ). Bindung von cAMP an die PKA aktiviert diese. Durch die Verankerung der PKA über AKAP-Proteine an spezifische subzelluläre Wirkungsorte kommt es zur Spezifikation des Signalweges; die Signalwege X und Z werden nicht aktiviert (s. 1.5). Phosphodiesterasen (PDE) koordinieren und kompartimentieren die lokalen Gradienten der zyklischen Nukleotide. Sie unterbrechen das PKA-Signal durch Hydrolyse von cAMP und sind u.a. für die Kontrolle der basalen Menge an cAMP verantwortlich (s. 1.6). Beide Proteinfamilien können auch in Multiproteinsignalkomplexen vorliegen, welche in subzellulären Kompartimenten zu finden sind (s. 1.5 und 1.6).

1.6.1.2 Zusammenhang zwischen PDE4 und der regulierten Wasserrückresorption

Eine erhöhte Aktivität der cAMP-spezifischen PDE4-Familie verursacht in Mäusen NDI (DI +/+ Mäuse; Dousa, 1999). Die Menge von cAMP in den Hauptzellen der DI +/+ Mäuse steigt nach Behandlung mit AVP nicht an (Homma et al., 1991). Zudem ist der Gehalt von AQP2 in der Niere der DI +/+ Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren um 75 % reduziert (Frøkiaer et al., 1999). DI +/+ Mäuse konnten erfolgreich mit dem selektiven PDE4-Inhibitor Rolipram behandelt werden (Homma *et al.*, 1991; Moses und Scheinman, 1993). Dies deutet auf eine Einflussnahme von PDE4 auf die Langzeitregulation von AQP2 hin. Weitere Beweise für eine Rolle von PDE4 an der AVP-vermittelten Wasserrückresorption stammt von der Beobachtung, dass das Absinken der Expression von AQP2 in hyperkalzämischen polyurischen Ratten durch eine Langzeitbehandlung mit Rolipram verhindert werden kann (Wang et al., 2002). Eine Beteiligung von PDE4 an der Kurzzeitregulation von AQP2 (Translokation von AQP2) wurde noch nicht beschrieben.

1.7 Die Beteiligung von RhoA an der AVP-abhängigen Umverteilung von AQP2

Neben AQP2 und CREB gibt es noch weitere Substrate für die PKA, die an dem AVP-vermittelten Signalweg beteiligt sind, z.B. die kleinen GTPase RhoA. Sie gehört zur Rho-Familie (Rho, Rac und Cdc42), die an der Organisation des Aktinzytoskelettes beteiligt ist (Hall, 1998). Zudem spielt RhoA beim Vesikeltransport (Murphy et al., 1996), bei Rezeptor-vermittelter Endozytose (Lamaze et al., 1996; Lamaze et al., 1997) und bei mehreren exozytotischen Prozessen eine Rolle (Gasman et al., 2003).

Alle kleinen GTPasen unterliegen einem Zyklus zwischen aktivem (GTP-gebunden) und inaktivem (GDP-gebunden) Status, der durch verschiedene Faktoren reguliert wird. Guaninnukleotid austauschfaktoren (GEFs) aktivieren die Proteine durch die Beschleunigung des Austausches von GDP durch GTP. GTPase-aktivierende Proteine hingegen (GAPs) beschleunigen die GTP-Hydrolyse und senken so die Aktivität. Die aktivierten kleinen GTPasen sind Membran-assoziiert. Guanin-dissoziations inhibitoren (GDI) entfernen die inaktiven GTPasen aus der Membran (Hall, 1998).

RhoA z.B. spielt bei der Exozytose von Katecholaminen in Rinderchromaffinzellen eine Rolle. In diesen Zellen konnte RhoA an sekretorischen Vesikeln gefunden werden und ist Bestandteil einer Signalkaskade, die für die Polymerisation des Aktins in der Nähe der Vesikel verantwortlich ist. Polymerisiertes Aktin dient als Barriere für die Freigabe von Katecholaminen in diesen Zellen (Gasman *et al.*, 2003; Qualmann und Mellor, 2003). RhoA könnte somit eine ähnliche Rolle bei der Translokation von AQP2 spielen.

Die Inhibition von RhoA durch bakterielle Toxine oder die Auflösung des F-Aktins durch Cytochalasin D bewirken in der Abwesenheit von cAMP-steigernden Agenzien (Forskolin und AVP) eine Akkumulation von AQP2 an der Plasmamembran von primär kultivierten Hauptzellen (s. 2.4) und einer Zelllinie aus Hauptzellen von Kaninchen (CD8-Zellen) (Klussmann et al., 2001; Tamma et al., 2001).

Aktiviertes RhoA inhibiert die Translokation von AQP2, vermutlich durch Induktion der Polymerisation von Aktin, das als physikalische Barriere den Transport der AQP2-tragenden Vesikel an die Plasmamembran verhindern könnte (Klussmann *et al.*, 2001; Tamma *et al.*, 2001; Tamma *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung von cAMP in primär kultivierten Hauptzellen die RhoA-Aktivität herabsetzt und eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von RhoA sowie eine Komplexbildung von RhoA mit dessen Inhibitor Rho-GDI induziert (Tamma *et al.*, 2003). Dies deutet daraufhin, dass eine AVP-vermittelte Inhibition von RhoA die Translokation von AQP2 ermöglicht. Die Faktoren, welche die kleinen GTP-bindenden Proteine regulieren, unterliegen selbst der Regulation von davor geschalteten Signalmolekülen. Ein Rho-spezifisches GEF ist AKAP-Lbc/Ht31, welches durch das G-Protein $G_{\alpha_{12}}$ aktiviert wird (Diviani *et al.*, 2001; Diviani *et al.*, 2004; Klussmann *et al.*, 2001). Zusätzlich zur Funktion als RhoGEF fungiert AKAP-Lbc/Ht31 als AKAP. Daher ist es ein Kandidatprotein, welches durch Integration von PKA- und Rho-Signalen für die Kontrolle der zellulären Lokalisation von AQP2 mitverantwortlich sein könnte.

1.8 Zielsetzung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen der AVP-abhängigen Translokation des Wasserkanals AQP2 von intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran von renalen Hauptzellen geleistet werden. Insbesondere sollte die Rolle von Proteinen untersucht werden, die mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert sind. Darum sollte eine Methode etabliert werden, mit der es möglich ist, AQP2-tragende Vesikel aus dem Gewebe und den verwendeten primär kultivierten Hauptzellen zu isolieren. An den AQP2-tragenden Vesikeln sollten Proteine, die an cAMP-Signalwegen beteiligt sind, nachgewiesen werden. Es sollte untersucht werden, ob AQP2-tragende Vesikel Kompartimente darstellen, an denen cAMP-abhängige Signalkomponenten die Lokalisation von AQP2 mitbestimmen. Insbesondere sollten die durchgeführten Studien Aufschluss darüber geben, ob die PKA an AQP2-tragenden Vesikeln verankert ist und ob PKA-Substrate auf die Lokalisation von AQP2 Einfluss nehmen.

Spezifische Ziele

1. Um eine Charakterisierung und Identifikation von Signalproteinen zu ermöglichen, die an der Translokation von AQP2 beteiligt sind, sollte eine Methode zur Isolierung von AQP2-tragenden Vesikeln mittels spezifischer anti-AQP2-Antikörper etabliert werden.
2. Es sollte festgestellt werden, welche AKAP-Proteine die PKA in unmittelbarer Nähe von AQP2 verankern.
3. Eine Identifikation und Lokalisation von Substraten der PKA, die an der Translokation von AQP2 beteiligt sind, sollte durchgeführt werden.
4. Eine mögliche Beteiligung der PDE4-Familie an der Translokation von AQP2 sollte untersucht werden.