

3 Ergebnisse

3.1 Vesikelisolierung

3.1.1 AQP2-tragende Vesikel wurden durch Verwendung von anti-AQP2-Antikörpern isoliert

Intrazelluläre AQP2-tragende Vesikel wurden durch Verwendung von anti-AQP2 Antikörpern, die an Eupergit-*beads* gekoppelt wurden (s. 2.8; AQP2AB-*beads*; Burger *et al.*, 1989; Holroyd *et al.*, 1999), entweder aus der inneren Medulla von Rattennieren oder aus primär kultivierten IMCD-Zellen isoliert. In beiden Vesikelpräparationen konnte AQP2 in der Fraktion, die mit AQP2AB-*beads* erhalten wurde, angereichert werden (Abb. 6A und 6B).

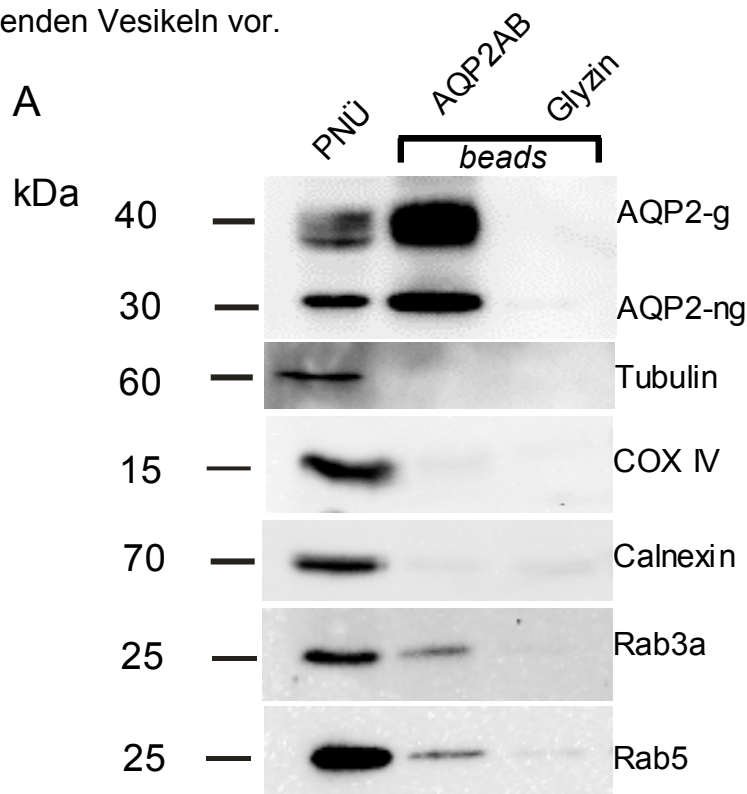
Um die Qualität der AQP2-tragenden Vesikel zu überprüfen wurde die Präparation auf das Vorhandensein von Markerproteinen, die in bestimmten Zellkompartimenten vorkommen, hin untersucht. Tubulin, ein Protein des Zytoskeletts, Calnexin, ein Marker für das Endoplasmatische Retikulum oder Zytochromoxidase C Untereinheit IV (COX IV), ein Mitochondrienprotein, konnten nicht detektiert werden. Um das Vorhandensein von Plasmamembranbestandteilen zu überprüfen wurden die IMCD-Zellen mit AVP behandelt, um die Translokation von AQP2 in die Plasmamembran zu induzieren. Nach AVP-Behandlung konnte nur eine geringe Menge AQP2 in der mit den AQP2-AB-*beads* erhaltenen Fraktion detektiert werden. Es konnte nur eine geringe Verunreinigung der Vesikelfraktion durch die Plasmamembran festgestellt werden (Abb. 6B). Als weiteres Markerprotein für die Plasmamembran konnte hingegen kein AQP4 in der Vesikelfraktion nachgewiesen werden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass mit dieser Präparationsmethode selektiv AQP2-tragende Vesikel, mit nur geringer Verunreinigung durch Proteine aus anderen Zellkompartimenten, angereichert werden können.

3.1.2 Die GTPasen Rab3a und Rab5 kommen auf AQP2-tragenden Vesikelpräparationen vor

Aufgrund der AVP-abhängigen Umverteilung und des konstitutiven *Recycling*-Prozesses von AQP2 (Lu et al., 2004) wurde untersucht, ob endozytotische und exozytotische Vesikel in der Präparation, die mit AQP2AB-beads erhalten wurde, vorliegen. Aus diesem Grund wurden AQP2-tragende Vesikel auf die Anwesenheit von Rab3a- und Rab5-Proteinen überprüft; hierbei handelt es sich um Markerproteine für exo- und endozytotische Vesikel. Beide GTPasen konnten in der AQP2-tragenden Vesikelfraktion gefunden werden (Abb. 6A).

3.1.3 PKA Typ II Untereinheiten kommen auf AQP2-tragenden Vesikelpräparationen vor

Lande und Koautoren isolierten PKA-Aktivität mit AQP2-tragenden Vesikel, die über Dichtegradientenzentrifugationen angereichert wurden (Lande et al., 1996). Es wurde daher überprüft, welche PKA-Untereinheiten mit den AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert sind. Es konnten die regulatorischen Typ II PKA-Untereinheiten RII α und RII β an den Vesikeln detektiert werden (Abb. 6C). Im Gegensatz dazu konnte die Typ I PKA-Untereinheit RI α in der Vesikelpräparation nicht detektiert werden. Western Blot-Experimente mit einem Antikörper, der die katalytische PKA-Untereinheit erkennt, zeigt ein schwaches Signal in der AQP2-tragenden Vesikelpräparation. Damit kommen alle Bestandteile des tetrameren Typ II PKA-Holoenzym an den AQP2-tragenden Vesikeln vor.



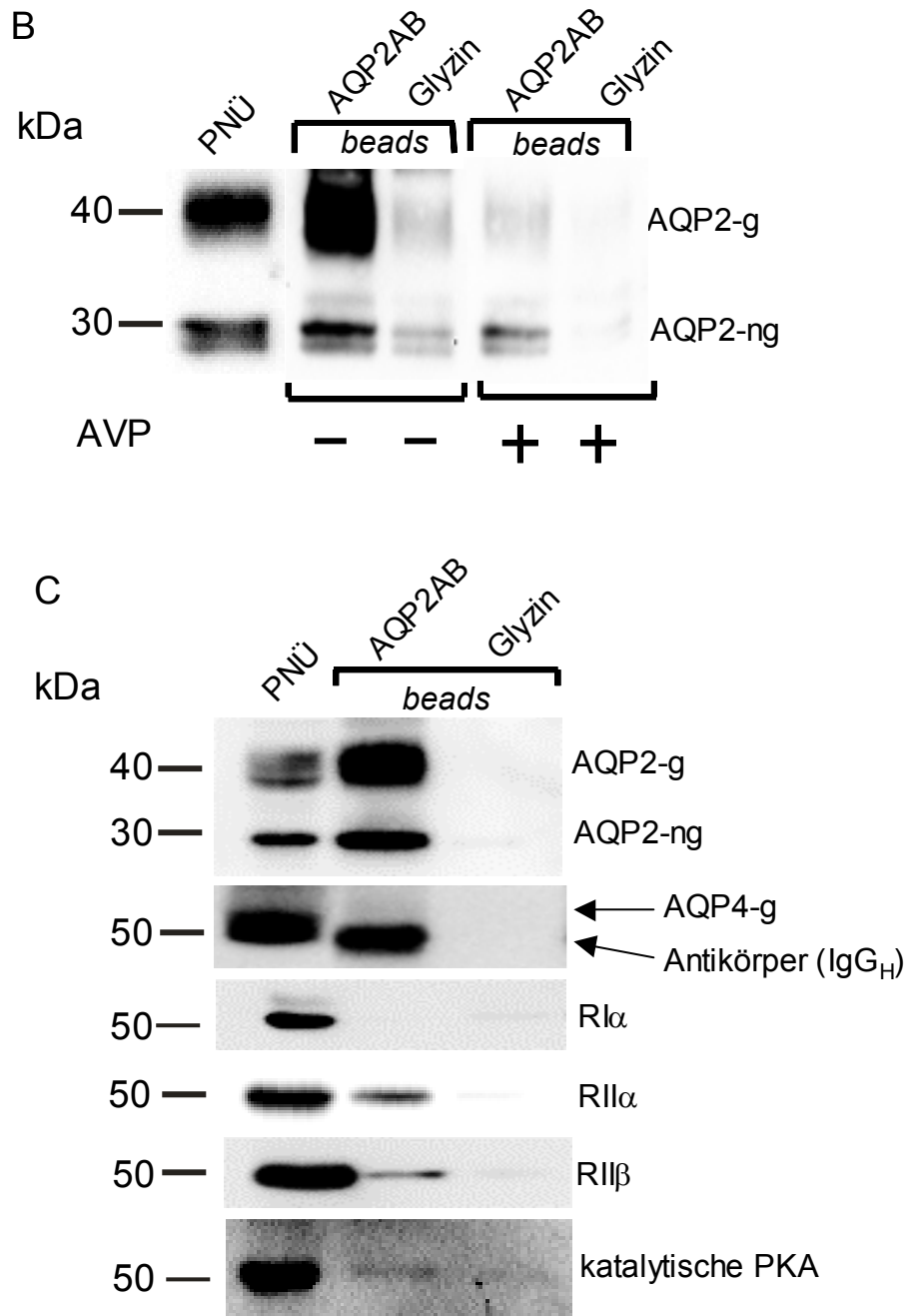


Abb. 6: Isolierung von AQP2-tragenden Vesikeln und die Identifizierung von assoziierten Proteinen. (A) Es wurde Gewebe aus der inneren Medulla von Rattennieren homogenisiert, Zelldebris wurde durch Zentrifugation entfernt und der sogenannte postnukleäre Überstand (PNÜ) wurde mit den Eupergit-beads inkubiert. Vesikel, die an die AQP2AB-beads gebunden haben, wurden durch Zugabe von Probenbuffer solubilisiert. Glykosyliertes (g) und nicht-glykosyliertes (ng) AQP2, Tubulin, Calnexin, COXIV, Rab3a, Rab5 wurden in Western Blot-Experimenten detektiert. **(B)** IMCD-Zellen wurden entweder unbehandelt oder nach Behandlung mit AVP (15 Minuten, 100 nM) homogenisiert. AQP2-tragende Vesikel wurden wie oben beschrieben aufgereinigt. Glykosyliertes (g) und nicht-glykosyliertes (ng) AQP2 wurden in Western Blot-Experimenten detektiert. **(C)** An den AQP2-tragenden Vesikeln konnten die regulatorischen Untereinheiten RII α , RII β und die katalytische Untereinheit der PKA detektiert werden.

3.2 Lokalisation von AKAP-Proteinen

3.2.1 AKAP-Proteine sind für die Verankerung der PKA an AQP2-tragende Vesikel verantwortlich

Wie die Abb. 6 zeigt, ist die Typ II PKA mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert. Um herauszufinden, ob AKAP-Proteine an deren Verankerung beteiligt sind, wurden AQP2-tragende Vesikel aus der inneren Medulla von Rattennieren immunisoliert. Die Vesikel wurden im Anschluss daran mit Peptiden inkubiert, die die Interaktion zwischen PKA und AKAP-Proteinen hemmen (s. 1.5.2 und 2.14). Wie die PKA-Messungen zeigen, senkt das Peptid Ht31 (s. 2.14) die PKA-Aktivität im Vergleich zu dem Kontrollpeptid Ht31-P und zu den unbehandelten Vesikeln um mehr als 40%, wobei auch ein schwacher Effekt des Kontrollpeptids festzustellen ist (Abb. 7). Dieser Versuch zeigt, dass AKAP-Proteine für die Verankerung der PKA an die Vesikel verantwortlich sind.

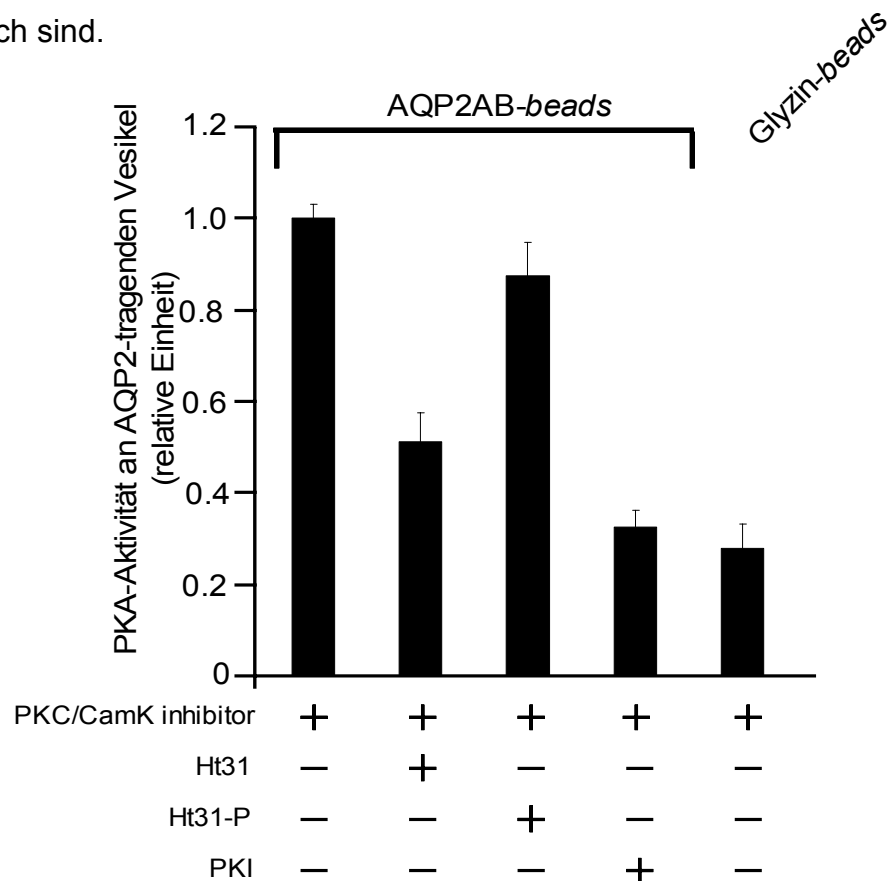


Abb. 7: PKA-Aktivität an AQP2-tragenden Vesikeln. Es wurde Gewebe aus der inneren Medulla von Rattennieren homogenisiert, Zelldebris wurde durch Zentrifugation entfernt und der sogenannte postnukleäre Überstand (PNÜ) wurde mit AQP2AB-beads oder Kontroll-beads inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit PBS wurden die AQP2-tragenden Vesikel 30 Minuten mit den Peptiden Ht31 (100 μ M), welches die Bindung der PKA an AKAP-Proteine hemmt oder dem inaktiven Kontrollpeptid Ht31-P (100 μ M) inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten wurden die PKA-Aktivitätsmessungen durchgeführt (drei unabhängige Versuche).

3.2.2 AQP2, PKA und AKAP18 δ kolokalisieren auf den gleichen Vesikeln

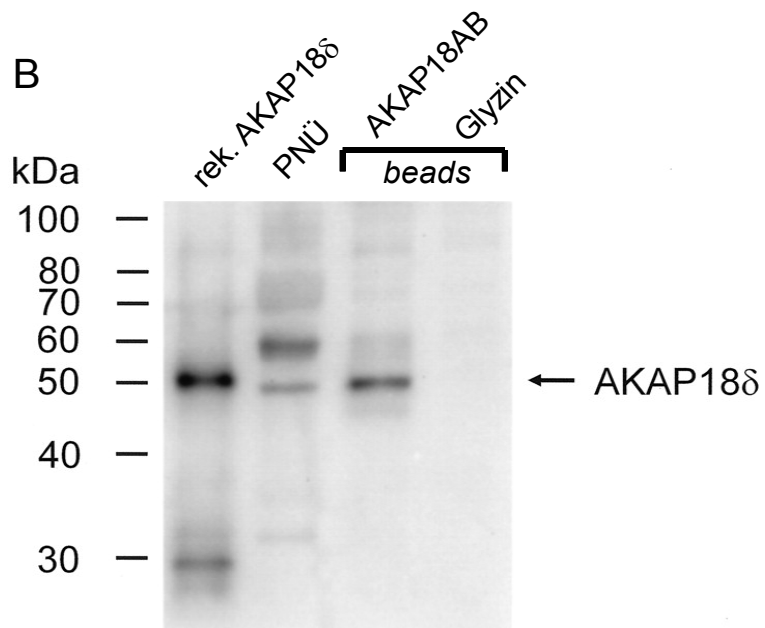
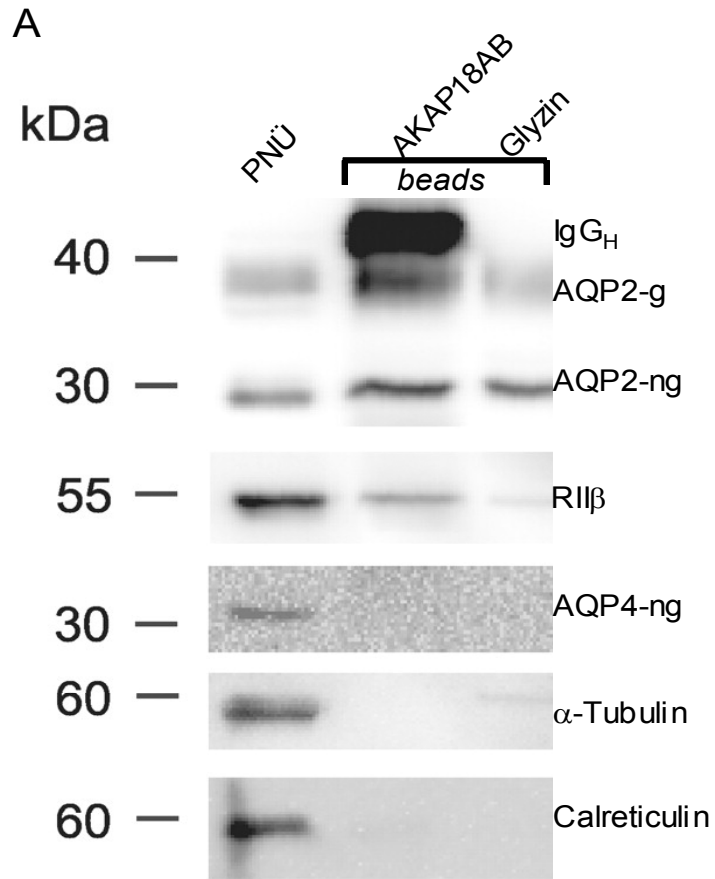
AKAP18 δ kommt in der partikulären Fraktion der inneren Medulla von Rattennieren vor (Henn *et al.*, 2004). Daher wurde überprüft, ob AKAP18 δ mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert ist. Die Detektion von AKAP18 δ an AQP2-tragenden Vesikeln war aufgrund der Tatsache, dass die schwere Kette des AQP2-Antikörpers der AQP2AB-beads mit AKAP18 δ komigriert (50 kDa), nicht möglich. Deshalb wurden Vesikel mittels A18 δ 4AB-beads isoliert (der Antikörper A18 δ 4 ist ein AKAP18 δ spezifischer Antikörper).

In RII-*Overlay*-Analysen konnte ein 50 kDa-AKAP-Protein (Abb. 8B) in der A18 δ 4AB Vesikelfraktion festgestellt werden. In der Glyzinkontrolle war kein AKAP-Protein detektierbar. Die Größe des 50 kDa-AKAP-Proteins entspricht der des rekombinanten AKAP18 δ . Im Vergleich mit der Glyzinkontrolle konnten in der Vesikelfraktion, die mit dem AKAP18 δ 4 Antikörper erhalten wurde, sowohl AQP2 als auch die regulatorische RII β -Untereinheit der PKA angereichert werden (Abb. 8A). In Experimenten mit einem weiteren AKAP18 δ Antikörper (der A18 δ 3 erkennt zusätzlich AKAP18 γ) konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (s. Abb. 13A). Diese Ergebnisse zeigen, dass AKAP18 δ mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert ist (Henn *et al.*, 2004).

3.2.3 AQP2 und AKAP18 δ sind vor und nach Behandlung mit AVP in IMCD-Zellen kolokalisiert

Die Lokalisation von AQP2 und AKAP18 δ wurde an primär kultivierten Hauptzellen der inneren Medulla von Rattennieren untersucht (IMCD-Zellen; s. 2.4). IMCD-Zellen enthalten die molekulare Maschinerie für die AQP2-Translokation. In unbehandelten liegt AQP2 hauptsächlich intrazellulär vor. Nach erfolgter Behandlung mit AVP kommt es zur Insertion von AQP2 in die basolaterale Plasmamembran (Abb. 3; Abb. 8C, Klusmann *et al.*, 1999; Klusmann *et al.*, 2001; Lorenz *et al.*, 2003; Maric *et al.*, 1998; Storm *et al.*, 2003; Tamma *et al.*, 2003). In ähnlicher Weise konnte AKAP18 δ in unbehandelten IMCD-Zellen hauptsächlich intrazellulär gefunden werden. Nach Behandlung der Zellen mit AVP konnte man eine Assoziation mit der Plasmamembran erkennen (Abb. 8C).

Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Verwendung des Peptids, welches für die Immunisierung verwendet worden war, überprüft. Nach Präinkubation des A18 δ 4-Antikörpers mit dem Peptid war in der Immunfluoreszenz das Signal deutlich abgeschwächt (Abb. 8C, unterer Teil der Abbildung). Biochemische Analysen zeigen, dass AKAP18 δ hauptsächlich im Zytosol und nicht ausschließlich an den Vesikeln zu finden ist (Henn *et al.*, 2004). Die Umverteilung von AKAP18 δ nach Behandlung mit AVP erfolgt nur partiell, während AQP2 vollständig in die Plasmamembran transloziert. Quantitative Analysen der Immunfluoreszenzsignale bestätigten diese Beobachtungen (Abb. 8D). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten die Ergebnisse bestätigt werden (Henn *et al.*, 2004). Die Daten deuten auf eine mögliche Beteiligung von AKAP18 δ an der Translokation von AQP2 hin.



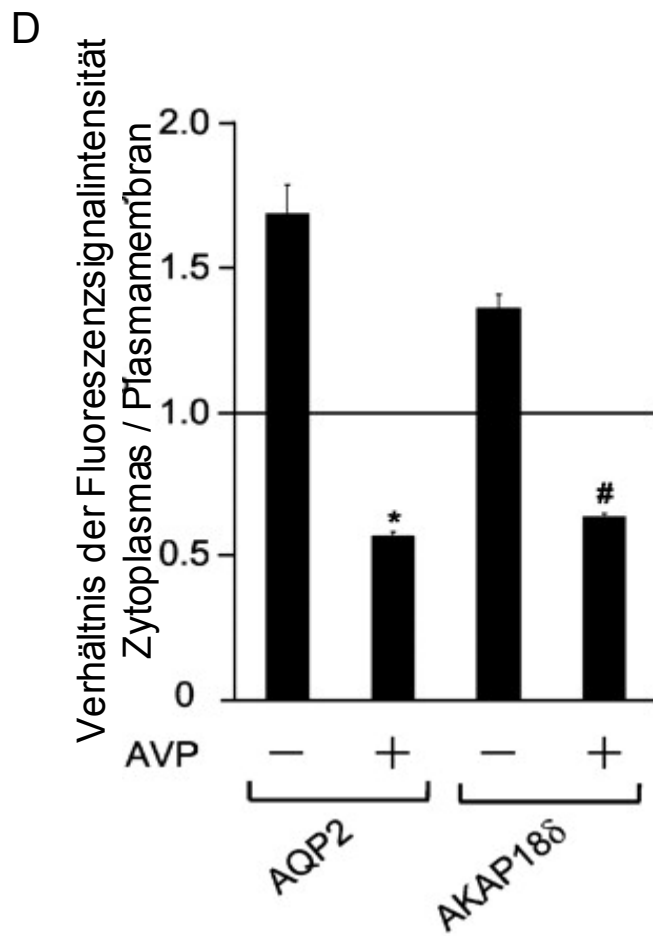
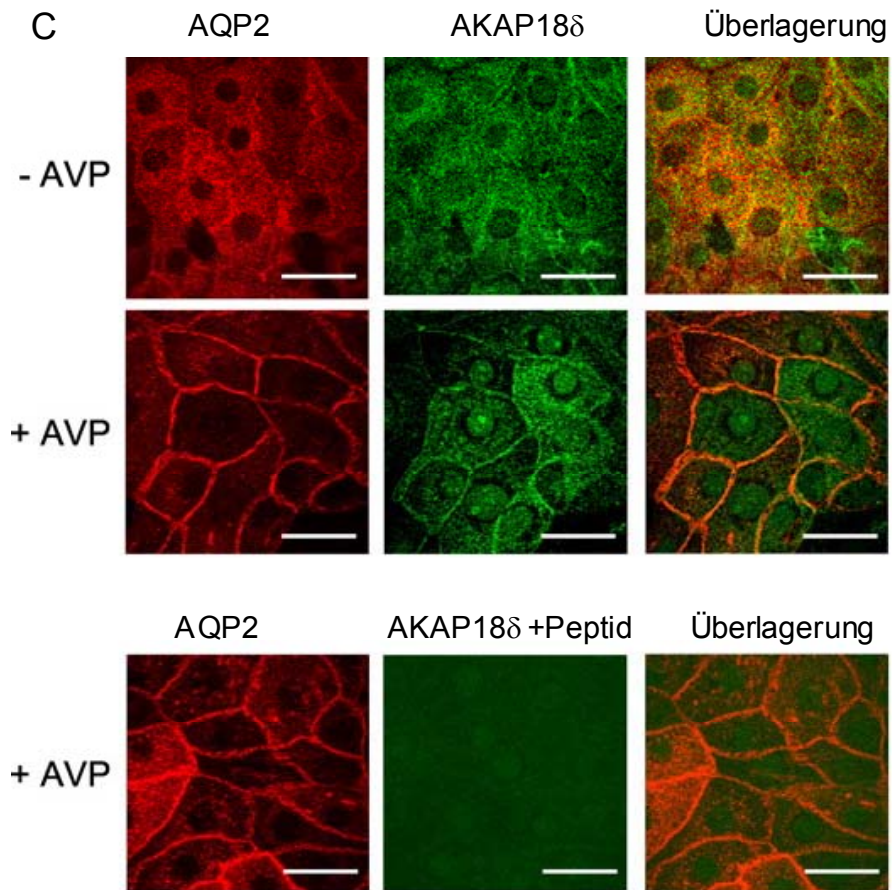


Abb. 8: AQP2, PKA und AKAP18 δ kommen an den gleichen Vesikeln vor. (A) Es wurde die innere Medulla von Rattennieren homogenisiert, Zelldebris wurde durch Zentrifugation entfernt und der sogenannte postnukleäre Überstand (PNÜ) wurde mit AQP2AB- oder A18 δ AB-*beads* inkubiert. Vesikel, die gebunden haben, wurden durch Zugabe von Probenbuffer solubilisiert. AQP2, RII β , AQP4, α -Tubulin und Calreticulin wurden in Western Blot-Experimenten detektiert. **(B)** Wie in A beschrieben wurden die Vesikel präpariert. Nach dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen wurde die RII-*Overlay*-Analysen durchgeführt. Die RII-bindenden Proteine wurden nach Exposition der Membran auf einer Phosphoimagerplatte mit einem Phosphoimager detektiert. Es konnte ein prominentes 50 kDa-AKAP-Protein in der A18 δ 4AB-*beads* Vesikelfraktion festgestellt werden. **(C)** IMCD-Zellen wurden entweder unbehandelt (-AVP) oder mit AVP (100 nM, 15 Minuten) behandelt. Anschließend erfolgte die Fixierung, die Zellen wurden permeabilisiert und bei Doppelfärbungen mit Ziege anti-AQP2-Antikörpern (mit Cy3-konjugiertem Anti-Ziege Zweitantikörpern) und Kaninchen anti-A18 δ 4-Antikörper (mit Cy5-konjugiertem Anti-Kaninchen-Zweitantikörpern) inkubiert. Die Immunfluoreszenzsignale wurden am *Laserscanning*-Mikroskop (LSM) detektiert (Maßstabsbalken, 20 μ m). **(D)** Quantitative Analyse der Immunfluoreszenzsignale: Die intrazellulären Fluoreszenzsignale und die Plasmamembransignale wurden bestimmt, die nukleären Hintergrundsignale wurden abgezogen und das Verhältnis wurde berechnet ($n \geq 20$ Zellen wurden für jeden Ansatz getestet; Mittelwert \pm Standardfehler; drei unabhängige Experimente). Verhältnisse > 1 zeigen eine hauptsächlich intrazelluläre Lokalisation, Verhältnisse < 1 eine hauptsächlich Lokalisation an der Plasmamembran. * Werte unterscheiden sich signifikant von den Werten der unbehandelten Zellen ($p < 0.0001$); #, Werte unterscheiden sich signifikant von den Werten der unbehandelten Zellen ($p < 0.0001$).

3.3 Funktion von PDE4 in IMCD-Zellen

3.3.1 Die Inhibition von PDE4 steigert die AVP-abhängige Translokation von AQP2 in die Plasmamembran von IMCD-Zellen

Um zu überprüfen, ob Phosphodiesterasen an der Translokation von AQP2 beteiligt sind, wurden Immunfluoreszenzexperimente mit PDE-Inhibitoren durchgeführt. Nach Behandlung mit dem selektiven PDE4-Inhibitor Rolipram (100 μ M) und mit dem nicht selektiven PDE-Inhibitor IBMX (250 μ M) kommt es zu keiner Veränderung der zellulären Lokalisation von AQP2. Im Gegensatz dazu verstärken diese beiden Agenzien in ähnlicher Weise die AVP-abhängige Translokation von AQP2 in die Plasmamembran (Abb. 9A). Die quantitative Analyse der Immunfluoreszenzbilder (Abb. 9B) zeigt, dass Rolipram und IBMX, eine um 20% gesteigerte Akkumulation von AQP2 in der Plasmamembran bewirken. In Wasserpermeabilitätsmessungen konnte gezeigt werden, dass Rolipram die AVP-induzierte Zunahme der osmotischen

Wasserpermeabilität von IMCD-Zellen, im Vergleich zu den nur mit AVP-behandelten IMCD-Zellen, um etwa 50 % erhöht (Experimente wurden von Rustam Mollajew durchgeführt; Stefan et al., in Vorbereitung). Diese Daten unterstützen die These, dass die PDE4-Familie bei der Translokation von AQP2 eine Rolle spielt.

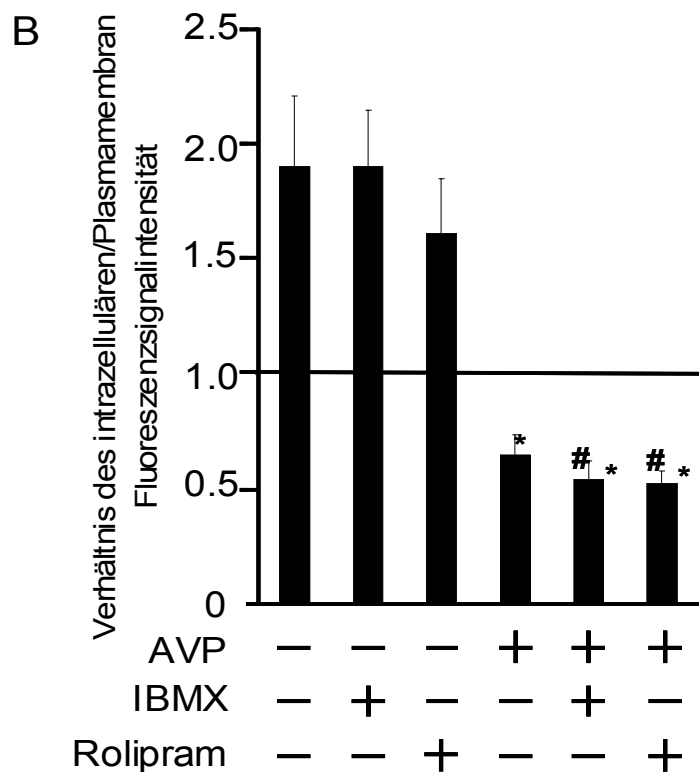
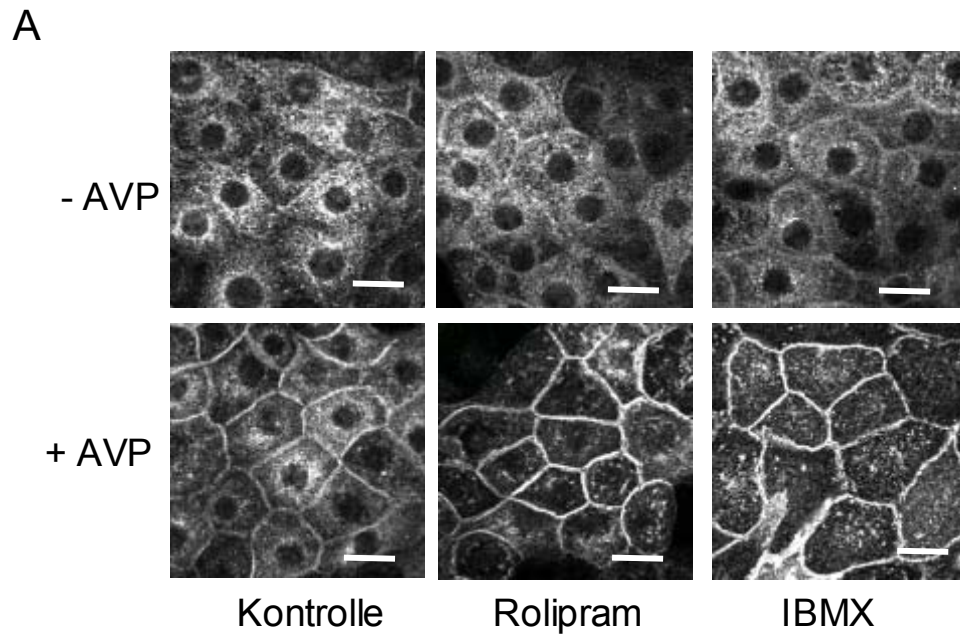


Abb. 9: Effekt der Hemmung von PDE4 auf die Translokation von AQP2 (A) IMCD-Zellen wurden entweder unbehandelt (Kontrolle) oder mit AVP (100 nM; 15 Minuten), IBMX (250 μ M; 30 Minuten), Rolipram (100 μ M; 30 Minuten) oder mit den angegebenen Kombinationen dieser Substanzen behandelt. Nach Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert und mit anti-AQP2 und mit Cy3-konjugierten Anti-Kaninchenantikörper inkubiert. AQP2-Immunfluoreszenzsignale wurden am *Lasercanning*-Mikroskop detektiert (Maßstabsbalken, 20 μ m). **(B)** Quantitative Analyse der Immunfluoreszenzsignale wurden, wie in Abb.8 beschrieben, vorgenommen ($n \geq 20$ Zellen wurden für jeden Ansatz getestet; Mittelwert \pm Standardfehler; drei unabhängige Experimente). Verhältnisse > 1 zeigen eine hauptsächlich intrazelluläre Lokalisation, Verhältnisse < 1 eine hauptsächlich Lokalisation an der Plasmamembran. * Werte unterscheiden sich signifikant von den Werten der unbehandelten Zellen ($p < 0.0001$); #, Werte unterscheiden sich signifikant von den Werten der nur mit AVP-behandelten Zellen ($p < 0.0001$).

3.3.2 Nach Behandlung mit AVP kotransloziert PDE4D mit AQP2 an die Plasmamembran von IMCD-Zellen

Um herauszufinden, welche der PDE4-Subtypen PDE4A,B,C oder D an der AVP-vermittelten Rückresorption des Wassers beteiligt ist/sind, untersuchten wir in Immunfluoreszenzexperimenten deren Expression und Lokalisation. In unbehandelten IMCD-Zellen wurden die Isoformen PDE4A und PDE4C in der ganzen Zelle, einschließlich des Nukleus und der Plasmamembran detektiert (Abb. 10A). PDE4B war nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt). Die PDE4D-Isoform war intrazellulär und im geringen Maße auch an der Plasmamembran verteilt (Abb. 10A). Die Behandlung der IMCD-Zellen mit AVP zeigte keine Veränderung der Lokalisation von PDE4A und C. Im Gegensatz dazu verursachte AVP eine Translokation von PDE4D an die Plasmamembran (Abb. 10A). Western Blot-Experimente zeigten, dass in Lysaten der inneren Medulla von Rattennieren ein Protein vorkommt, welches mit rekombinanter PDE4D3 komigriert. Es kann sich dabei um die PDE4D-Isoformen 3, 8 oder 9 handeln (Abb. 10B). Keine weiteren PDE4D-Isoformen konnten detektiert werden. Massenspektroskopische Analysen konnten bestätigen, dass PDE4D in IMCD Zellen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Die in IMCD-Zellen exprimierten PDE4D-Isoformen wurden über RT-PCR identifiziert. Aus einer cDNA, präpariert aus dem Gewebe der inneren Medulla von Rattennieren, konnte mit spezifischen Primern gegen die Spleißvarianten PDE4D3, 8 und 9 nur PDE4D3 und 9 amplifiziert werden (Abb. 10C). Alle Ergebnisse deuten daraufhin, dass als einzige PDE4D-Spleißvarianten PDE4D3 und 9 in der inneren Medulla von Rattennieren exprimiert werden. PDE4D3 und 9 unterscheiden sich nur durch die 15 N-terminalen Aminosäuren.

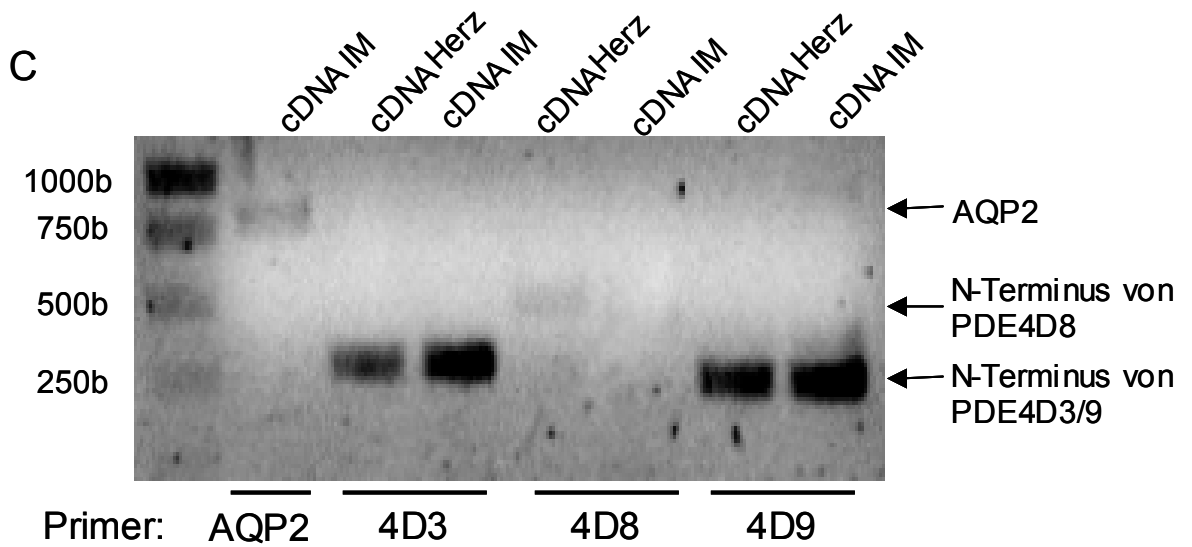
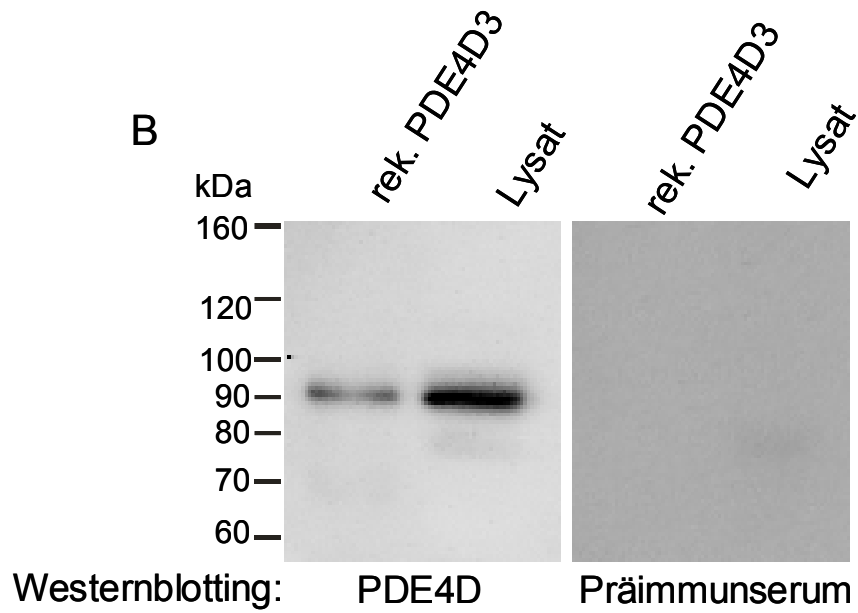
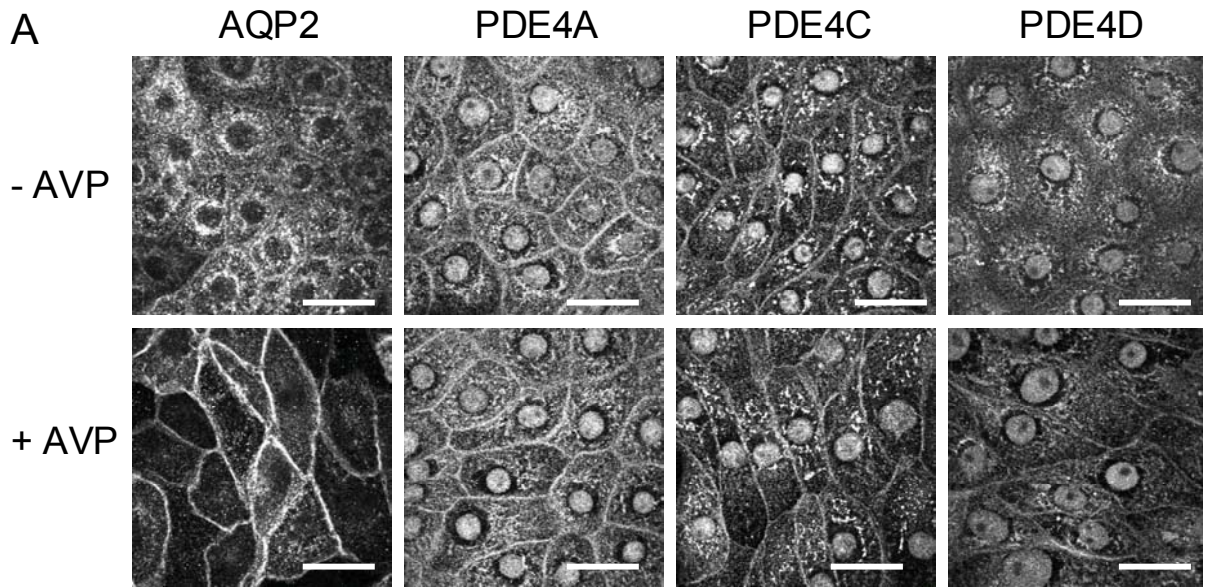


Abb. 10: Die Expression und Lokalisation von PDE4-Subtypen in IMCD-Zellen. **(A)** IMCD-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit AVP behandelt. Nach Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert und mit anti-AQP2 Antikörpern (Kaninchen) oder anti-PDE4A, C und D Antikörpern (Schaf) inkubiert. Als Zweitantikörper wurden anti-Kaninchen Cy3- und anti-Schaf Cy3-konjugierte Antikörper eingesetzt (Maßstabsbalken, 20 µm). **(B)** Lysate vom Gewebe der inneren Medulla von Rattennieren und rekombinantes PDE4D3 wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Für das Western Blot-Experiment wurde der anti-PDE4D-Schafantikörper oder das entsprechende Präimmunsereum verwendet. **(C)** Eine RT-PCR wurde mit PDE4D3, 8, 9 und AQP2 spezifischen Primern durchgeführt. Als Matrize dienten cDNAs, angefertigt durch reverse Transkription aus mRNAs, die aus der inneren Medulla (IM) von Rattennieren oder aus Rattenherz isoliert wurden.

Um die Daten aus Abb. 10 zu bestätigen, wurde eine Doppelfärbung von PDE4D (monoklonaler anti-Maus-Antikörper) und AQP2 durchgeführt. Erneut wurden AQP2 und PDE4D in den Kontrollzellen hauptsächlich intrazellulär gefunden. Nach Behandlung der IMCD-Zellen mit AVP waren die Proteine dagegen hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 11A). Nach Vorinkubation des PDE4D-Antikörpers mit einem GST-Fusionsprotein, bestehend aus der C-terminalen Sequenz von PDE4D (wurde für die Immunisierung verwendet), konnte eine deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals festgestellt werden. Die quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzsignale bestätigte diese Beobachtung (Abb. 11B).

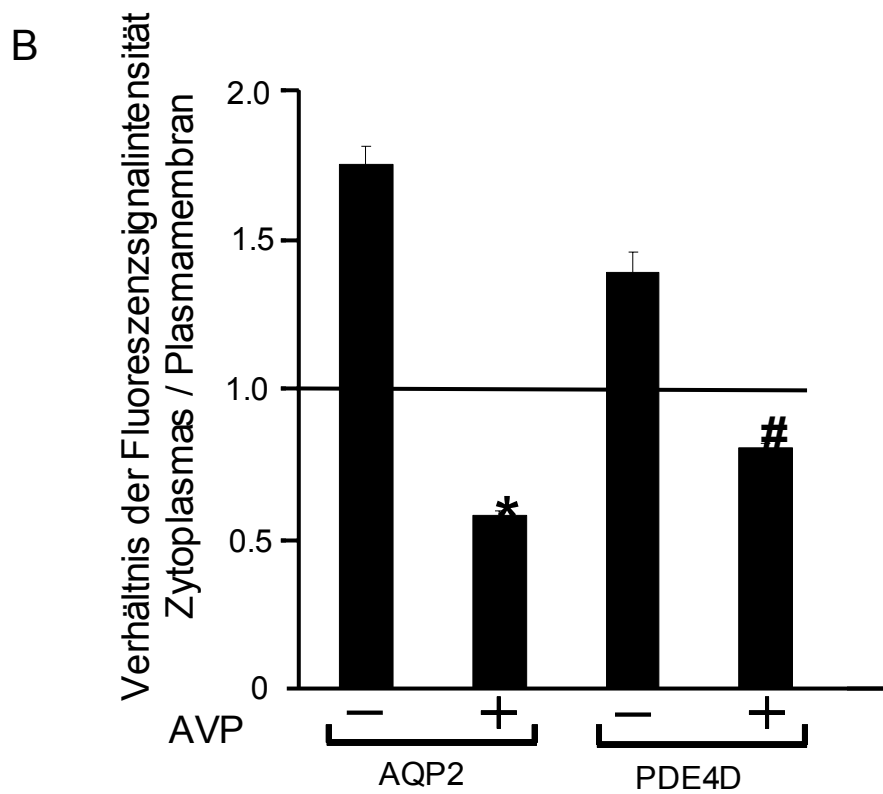
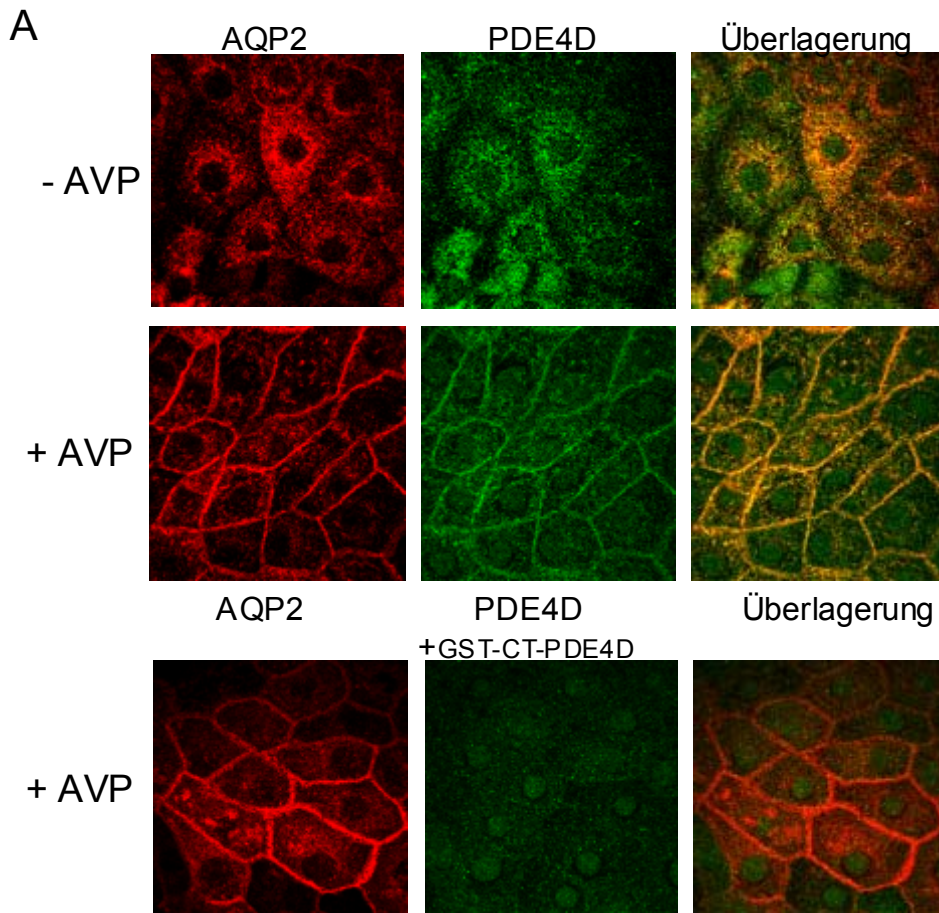
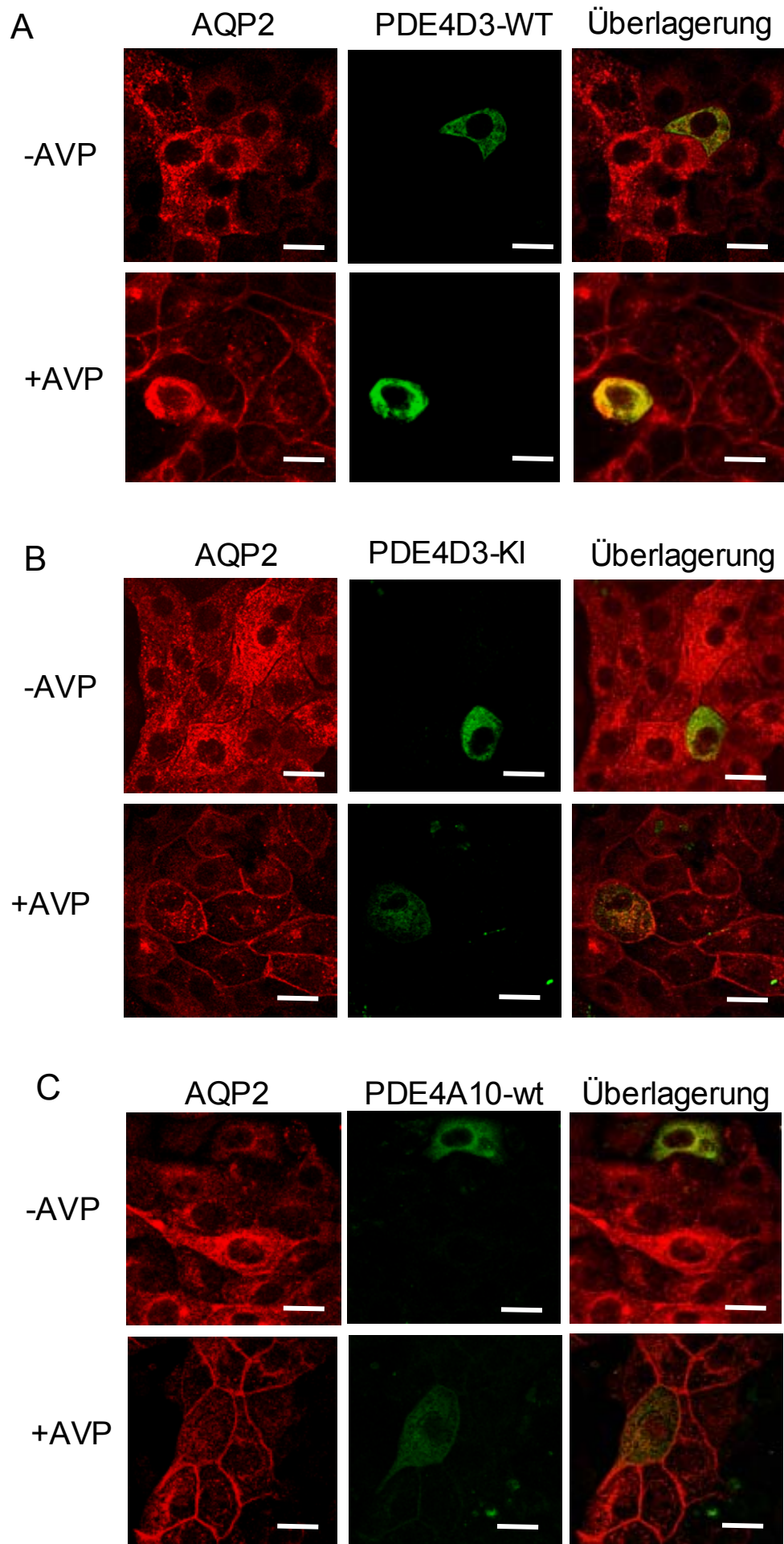


Abb. 11: AVP-abhängige Kotranslokation von PDE4D und AQP2 in die Plasmamembran von IMCD-Zellen; (A) Unbehandelte oder mit AVP-behandelte IMCD-Zellen (100 nM, 15 Minuten) wurden fixiert und permeabilisiert. Doppelfärbungen wurden mit anti-AQP2-Antikörpern aus Kaninchen und anti-PDE4D-Antikörpern aus Maus durchgeführt (anti-Kaninchen Cy3- und anti-Maus Cy5-konjugierter Zweitantikörper). Die Immunfluoreszenzsignale wurden am *Laserscanning*-Mikroskop detektiert (Maßstabsbalken, 20 µm). **(B)** Quantitative Analyse der Immunfluoreszenzsignale wurde, wie in Abb. 8 beschrieben, durchgeführt (n ≥ 20 Zellen wurden für jeden Ansatz getestet; Mittelwert ± Standardfehler; drei unabhängige Experimente). Verhältnisse > 1 zeigen eine hauptsächlich intrazelluläre Lokalisation, Verhältnisse < 1 eine hauptsächlich Lokalisation an der Plasmamembran. * ; # Werte unterscheiden sich signifikant von den Werten der unbehandelten Zellen (p < 0.0001).

3.3.3 PDE4D3 reguliert die Lokalisation von AQP2 in IMCD-Zellen

Um zu untersuchen, ob katalytisch aktives PDE4D3 an der Translokation von AQP2 beteiligt ist, wurde PDE4D3 in IMCD-Zellen überexprimiert. Nach Überexpression von wildtypischer PDE4D3-GFP und katalytisch inaktiver (KI) PDE4D3-GFP-D438A in IMCD-Zellen wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von AQP2 wurde untersucht (s. 2.5). Abb. 12A zeigt die intrazelluläre Lokalisation von wildtypischer PDE4D3-GFP und AQP2. Es konnte nach AVP-Behandlung der IMCD-Zellen keine Translokation von AQP2 festgestellt werden. Expression der katalytisch inaktiven PDE4D3-GFP scheint die AVP-induzierte Translokation von AQP2 in die Plasmamembran in ähnlichem Maße wie der selektive PDE4-Inhibitor Rolipram zu verstärken (Abb. 12B). Der Unterschied gegenüber Zellen, die nur mit AVP behandelt wurden, war allerdings nicht signifikant. Die Ergebnisse zeigen, dass nur durch Überexpression von katalytisch aktiver PDE4D3 die Translokation von AQP2 an die Plasmamembran von IMCD-Zellen inhibiert wird. Die Überexpression der wildtypischen PDE4A10 hatte keine Auswirkung auf die Translokation von AQP2 (Abb. 12C). Die quantitative Analyse (Abb. 12D) bestätigt diese Beobachtung.



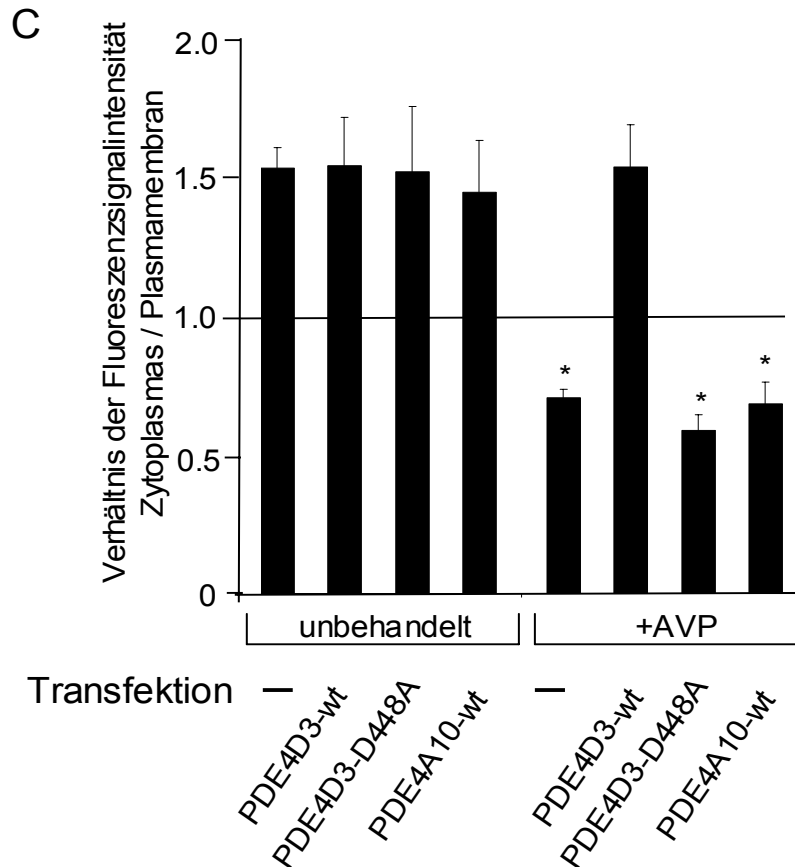


Abb. 12: Überexpression von wildtypischer PDE4D3-GFP hemmt die AVP-abhängige Translokation von AQP2 in IMCD-Zellen. IMCD-Zellen wurden entweder mit der wildtypischen (A) oder der katalytisch inaktiven (KI) GFP fusionierten Variante von PDE4D3 (B) oder mit der wildtypischen GFP fusionierten Variante von PDE4A10 (C) transfiziert. Die Zellen wurden nicht behandelt (-AVP) oder mit AVP (100 nM; 15 Minuten) behandelt. Anschließend folgte die Fixierung, dann wurden die IMCD-Zellen permeabilisiert und AQP2 wurde mit einem anti-AQP2 (Kaninchen) Erstantikörper und einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper detektiert. Die Immunfluoreszenzsignale wurden am *Laserscanning*-Mikroskop aufgenommen (Maßstabsbalken, 20 µm). (D) Quantitative Analyse der Immunfluoreszenzsignale wurde, wie in Abb. 8 beschrieben, vorgenommen. ($n \geq 8$ Zellen wurden für jeden Ansatz getestet; Mittelwert \pm Standardfehler; drei unabhängige Experimente). Verhältnisse > 1 zeigen eine hauptsächlich intrazelluläre Lokalisation, Verhältnisse < 1 eine hauptsächlich Lokalisation an der Plasmamembran. * Werte unterscheiden sich signifikant von den Werten der mit wildtypischer PDE4D3-GFP transfizierten Zellen nach Behandlung mit AVP ($p < 0.0001$).

3.3.4 PDE4D3, PKA, AKAP-Proteine und AQP2 kommen an den gleichen Vesikeln vor

Die AVP-abhängige Kotranslokation von AQP2 und der Isoform PDE4D in die Plasmamembran veranlasste uns zu untersuchen, ob man diese Proteine an den gleichen intrazellulären Vesikeln detektieren kann. Wie Abb. 8A und Abb. 8B zeigen, wurden AQP2, PKA und AKAP18 δ an den gleichen intrazellulären Vesikeln gefunden. Im Größenvergleich mit rekombinanter PDE4D3 konnte in der Vesikelpräparation, die mit den A18 δ 3AB- und AQP2AB-*beads* erhalten wurde, eine Anreicherung im Vergleich zur Glyzinkontrolle festgestellt werden (Abb. 13B). Nach ersten Versuchen mit einem PDE4D9-spezifische Antikörper zeigte sich, dass nur die Spleißvariante PDE4D3 an den Vesikeln zu finden ist (Daten nicht gezeigt). Diese Daten sprechen dafür, dass wesentliche Komponenten für eine cAMP-abhängige Signalkaskade mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert sind.

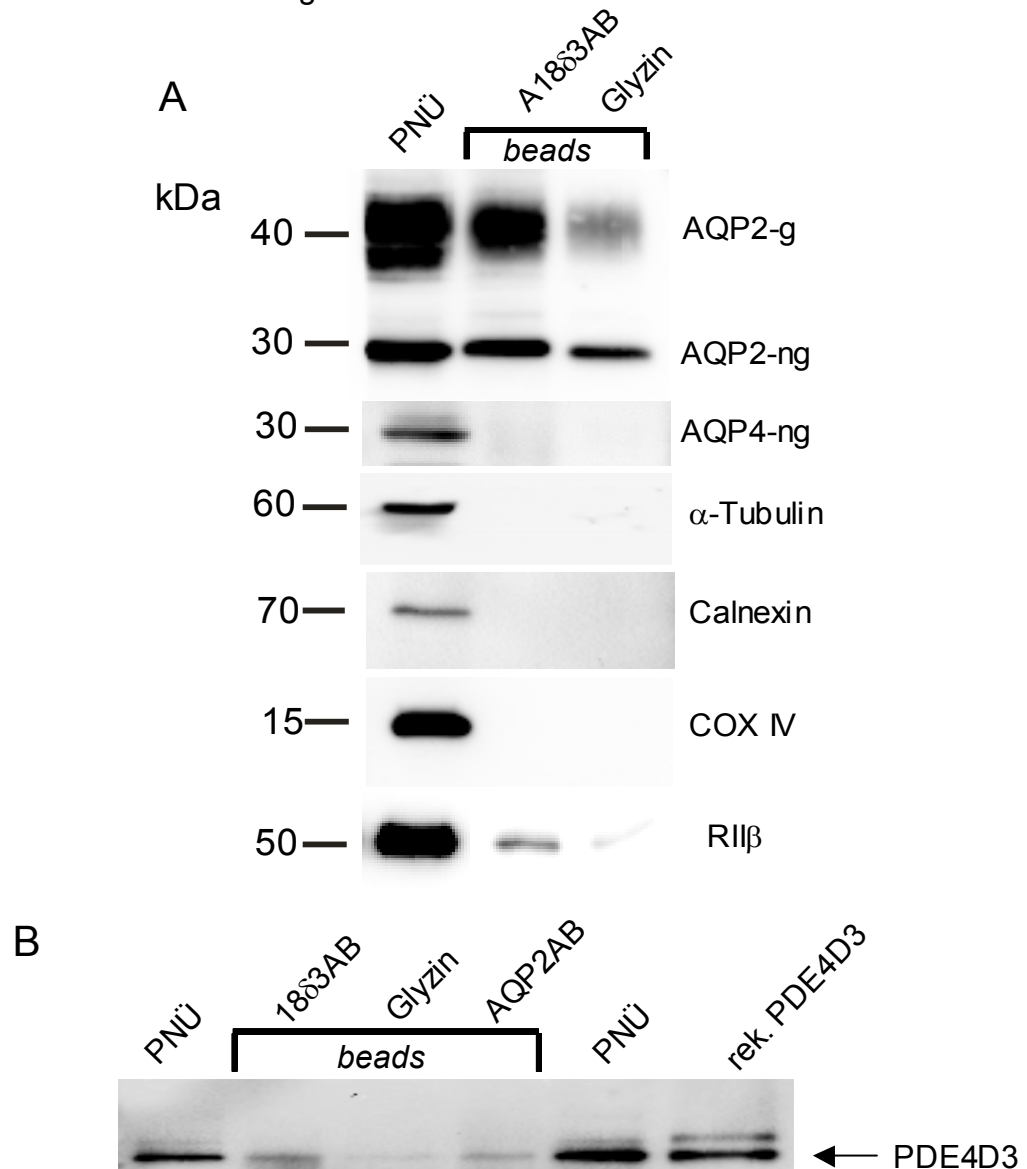


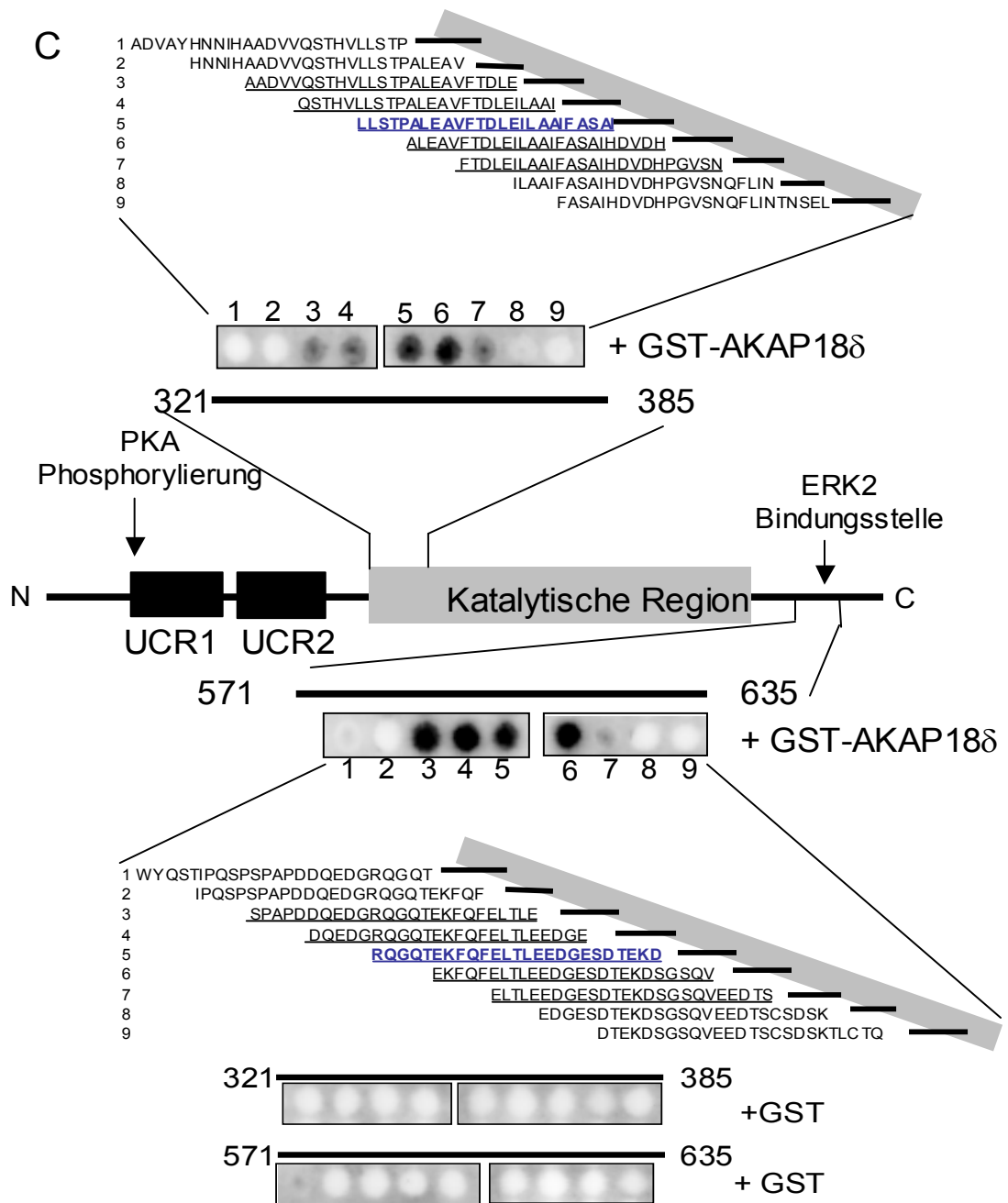
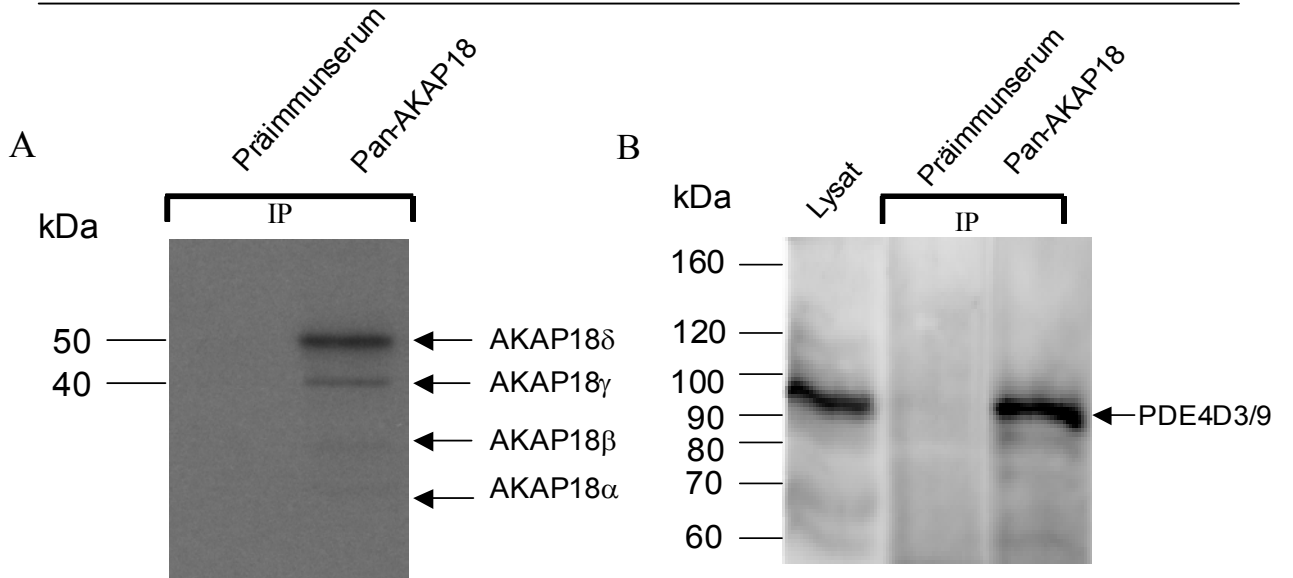
Abb. 13: PDE4D3, PKA und AKAP-Proteine sind mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert. (A) Intrazelluläre Vesikel wurden aus dem PNÜ, hergestellt aus der inneren Medulla von Rattennieren, mit A18 δ 3AB-*beads* isoliert. Die in Abb. 6 beschriebenen Proteine wurden in Western Blot-Experimenten detektiert. (B) Intrazelluläre Vesikel wurden aus dem PNÜ mit AQP2AB- und A18 δ 3AB-*beads* isoliert.

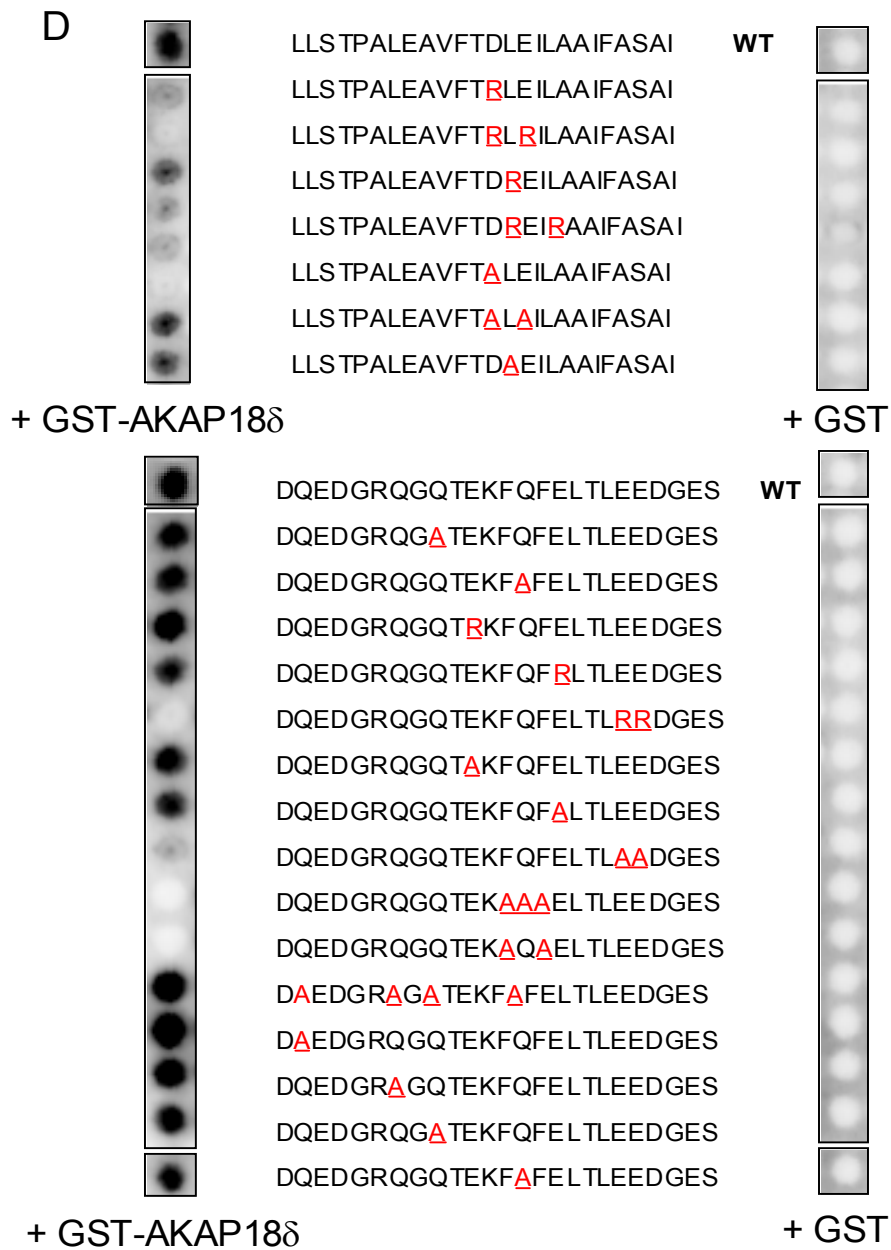
3.3.5 Interaktion von AKAP18 δ mit PDE4D3

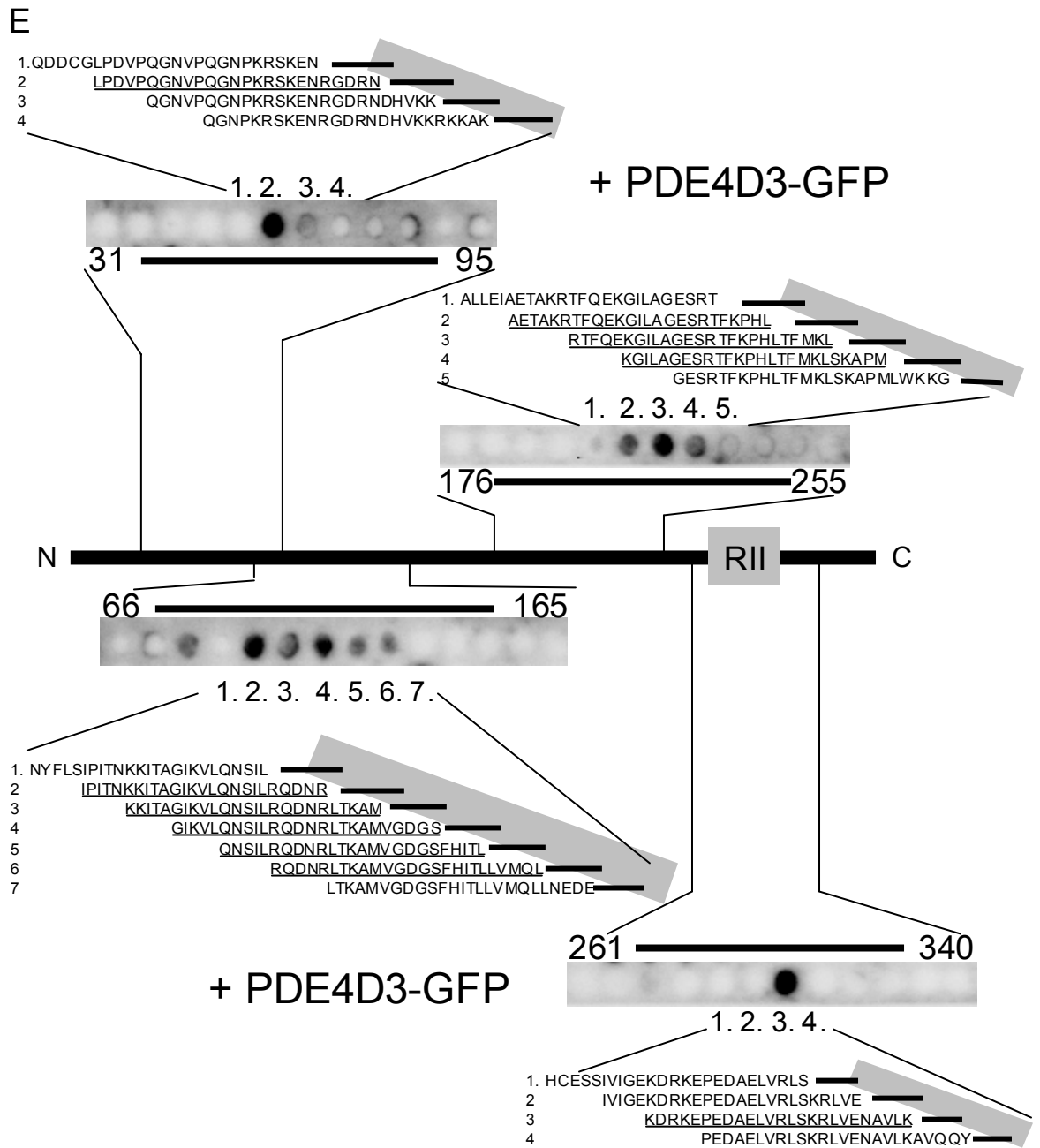
AKAP18 δ und PDE4D3 sind mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert und beide Proteine translozieren AVP-abhängig in die Plasmamembran von IMCD-Zellen. Nach erfolgter Immunpräzipitation mit einem Antikörper, der alle AKAP18-Isoformen erkennt (s. 2.10), wurde ein RII-*Overlay*-Experiment durchgeführt. In der Immunpräzipitation mit einem pan-AKAP18-Antikörper konnten AKAP18 γ und δ gut aber nur geringe Signale von AKAP18 α und β nachgewiesen werden. In der Immunpräzipitation mit dem Präimmenserum konnte kein AKAP-Protein detektiert werden (Abb. 14A). In Western Blot-Experimenten mit dem PDE4D-Antikörper konnte ein deutliches Signal in der Immunpräzipitation mit dem pan-AKAP18-Antikörper festgestellt werden. Mit dem Präimmenserum konnte PDE4D nicht mitpräzipitiert werden (Abb. 14B).

Um Herauszufinden, ob AKAP18 δ mit PDE4D3 interagiert wurden überlappende Bereiche der Proteine PDE4D3 und AKAP18 δ als 25mer Aminosäurenabfolgen auf Membranen synthetisiert. In Western Blot-Experimenten konnte gezeigt werden, dass rekombinantes AKAP18 δ -GST (Abb. 14C) und in HEK293-Zellen überexprimiertes AKAP18 δ -GFP (Daten nicht gezeigt) mit zwei Bindungsstellen in der PDE4D3-Sequenz interagiert. GST oder überexprimiertes GFP binden nicht an auf die Membranen synthetisierte Peptide von PDE4D3 (Abb. 14C). Nach Austausch von aromatischen (F) oder sauren (D,E) Aminosäuren durch Alanin (aliphatisch) oder Arginin (basisch) konnten die Sequenzmotive FQF (am C-Terminus) und DLE (am N-Terminus der katalytischen Domäne) als direkt Bindungsstelle für AKAP18 δ identifiziert werden (Abb.14D). PDE4D3-GFP (in HEK293-Zellen überexprimiert) interagiert mit vier Bindungsstellen in der AKAP18 δ -Sequenz (in diesem Fall indirekt oder direkt; Abb. 14E). Diese Versuche zeigen, dass AKAP18 δ direkt mit PDE4D3 interagiert.

Ergebnisse







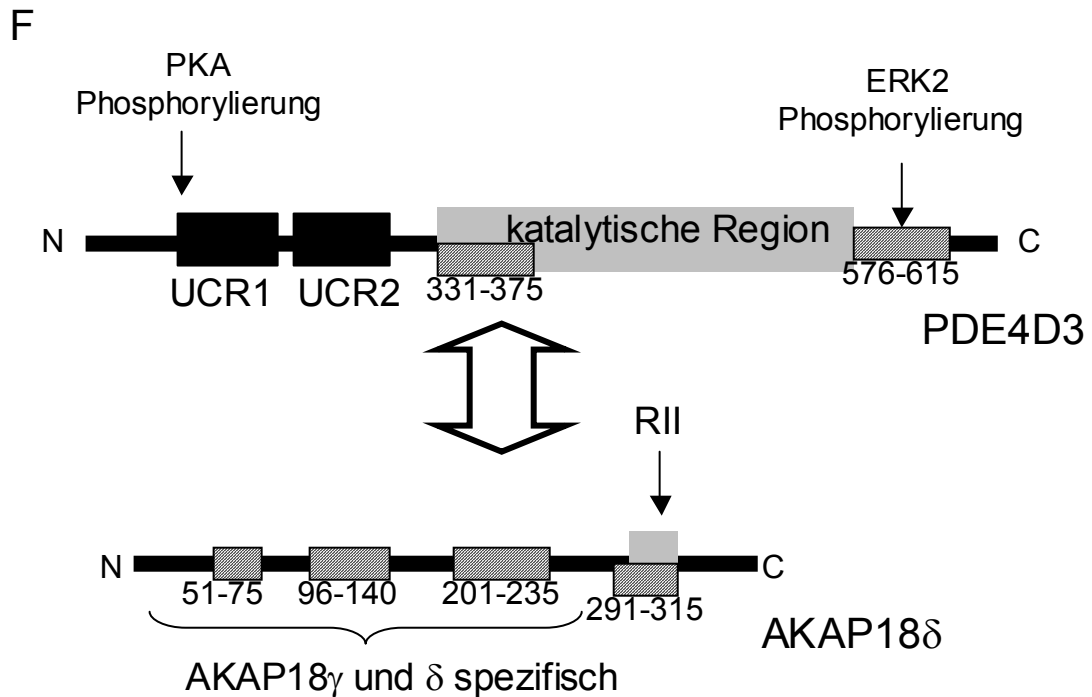


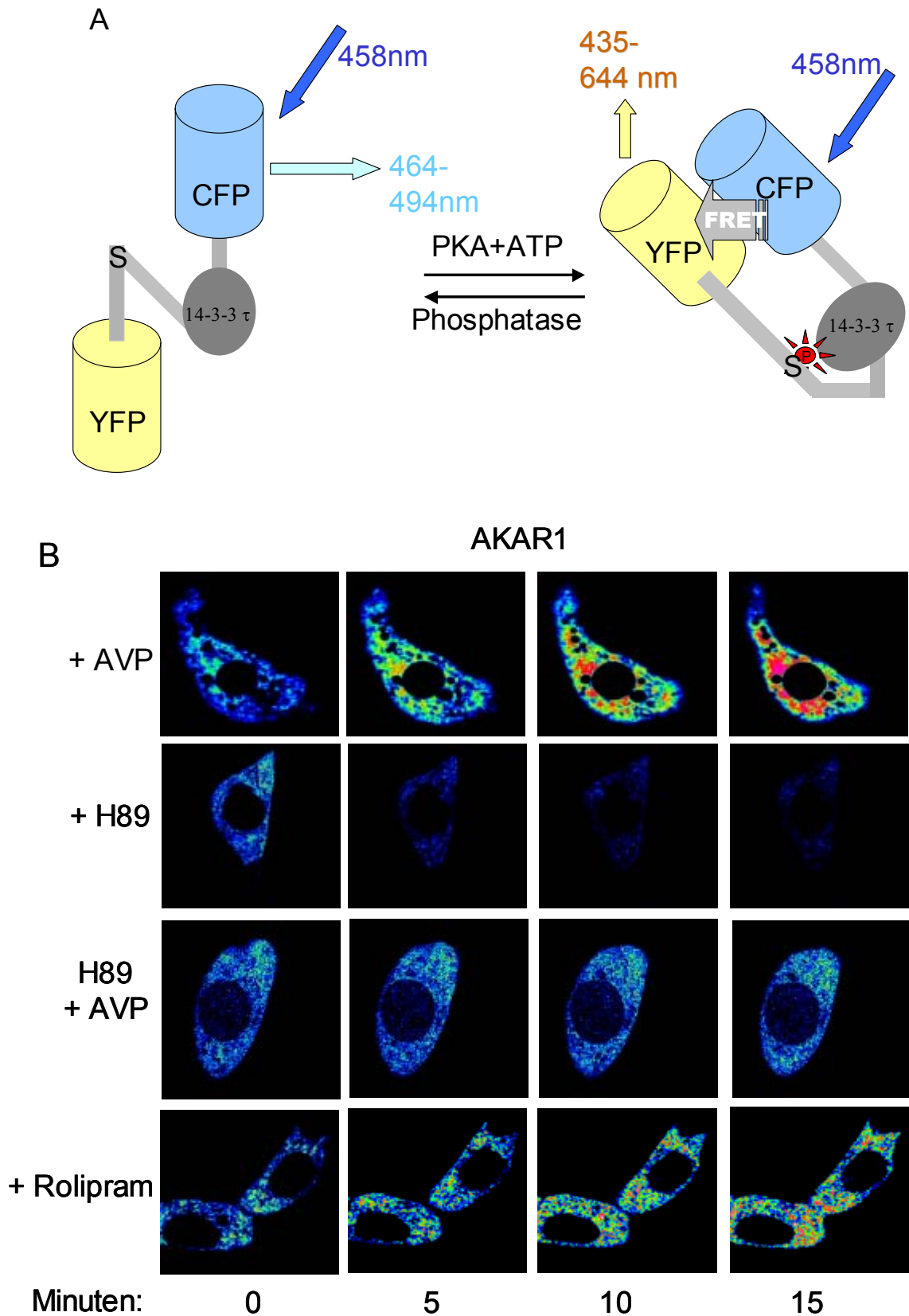
Abb. 14: AKAP18 δ interagiert direkt mit PDE4D3. Immunpräzipitationen mit einem pan-AKAP18-Antikörper und mit dem Präimmenserum wurden aus der inneren Medulla von Rattennieren durchgeführt. **(A)** In RII-*Overlay*-Experimenten wurden AKAP-Proteine detektiert. **(B)** PDE4D3/9 wurde mit dem anti-PDE4D-Schafantikörper in Western Blot-Experimenten detektiert. **(C)** Überlappende Bereiche von PDE4D3, welche auf Membranen synthetisiert wurden, wurden mit GST-AKAP18 δ oder GST inkubiert. Es folgten Western Blot-Experimente mit einem anti-GST-Antikörper. **(D)** Identifikation von Sequenzmotiven von PDE4D3, die für die Interaktion mit AKAP18 δ notwendig sind. Peptide mit substituierten Aminosäuren wurden auf die Membranen synthetisiert und mit GST-AKAP18 δ oder GST inkubiert. Es folgten Western Blot-Experimente mit einem anti-GST-Antikörper. **(E)** Überlappende Bereiche von AKAP18 δ , welche auf Membranen synthetisiert wurden, wurden mit Lysaten von PDE4D3-GFP exprimierenden HEK293-Zellen inkubiert. Es folgten Western Blot-Experimente mit einem anti-GFP-Antikörper. **(F)** Schematische Darstellung der interagierenden Bereiche von AKAP18 δ und PDE4D3.

3.3.6 FRET-Messungen zur Visualisierung lokaler PKA-Aktivitäten in IMCD-Zellen.

PKA-Aktivitätsmessungen wurden *in vivo* in IMCD-Zellen durchgeführt. Durch Verwendung der Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) Methode (s. 2.15) konnte die PKA-Aktivität mittels des genetisch kodierten PKA-Reporters AKAR1 bestimmt werden. Zuerst wurde das maximale FRET-Signal durch Verwendung eines Fusionsproteins bestehend aus CFP und YFP festgestellt. Das FRET-Signal wird als Verhältnis von 535 nm/480 nm angegeben und beträgt 1,37 (Standardfehler ± 0.06). In Zellen, die die Einzelproteine CFP und YFP exprimierten beträgt das Verhältnis von 535 nm/480 nm 0.63 (Standardfehler ± 0.03). Daher wurden Verhältnisse größer als 0,7 als positives FRET-Signal definiert. Dies verdeutlicht, dass eine Interaktion von Proteinen (< 10 nm) nötig ist, um ein FRET-Signal zu erhalten. Die Behandlung von IMCD Zellen, die das Fusionsprotein bestehend aus CFP und YFP exprimierten, mit AVP zeigte keine Veränderung des FRET-Signals (Daten nicht gezeigt).

Die PKA-Aktivität wurde durch Verwendung des PKA-Aktivitätsreporters AKAR1 bestimmt (Abb. 15A; Zhang *et al.*, 2001). Nach Phosphorylierung einer PKA-Phosphorylierungsstelle, flankiert durch CFP- und YFP-Proteine, kommt es zu einer Konformationsänderung, welche einen Anstieg des intramolekularen FRET-Signals bewirkt. Nach Transfektion war der Reporter gleichmäßig im Zytosol verteilt. Das FRET-Verhältnis (YFP-Emission/CFP-Emission) von AKAR1 exprimierenden IMCD-Zellen unter basalen Bedingungen betrug 0.95 (Standardfehler ± 0.05). Die Behandlung der Zellen mit AVP bewirkt einen bis zu 8 % Anstieg des relativen FRET-Signals (nach Quantifizierung der gesamten Zelle) über die Dauer von 15 Minuten. Die Behandlung der IMCD-Zellen mit AVP bewirkt eine Aktivierung des Reporters in der Umgebung des Nukleus (Abb. 15B). In unbehandelten Zellen erkennt man ein punktuell Muster, welches auf basale PKA-Aktivität in bestimmten Kompartimenten verweist. Die Behandlung der Zellen mit dem PKA-Inhibitor H89 verursachte ein 20 % Absinken des relativen FRET-Signals (Abb. 15B). Diese Ergebnisse deuten auf basale PKA-Aktivität in unbehandelten IMCD-Zellen hin. Als Kontrolle wurden die IMCD-Zellen mit dem PKA-Inhibitor H89 für die Dauer von 30 Minuten vorbehandelt. Die darauffolgende Zugabe von AVP konnte keine Aktivierung der PKA induzieren (Abb. 15B). Die selektive Hemmung der PDE4-Familie mit Rolipram bewirkt einen punktuellen Anstieg des FRET-Signals durch lokal erhöhte

Mengen an generiertem cAMP. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Beteiligung von PDE4 an der Regulation der PKA-Aktivitäten in bestimmten Kompartimenten *in vivo*. Für die Quantifizierung der FRET-Signaländerungen wurden die Mittelwerte der FRET-Signale der gesamten Zelle verglichen (Abb. 15D).



C

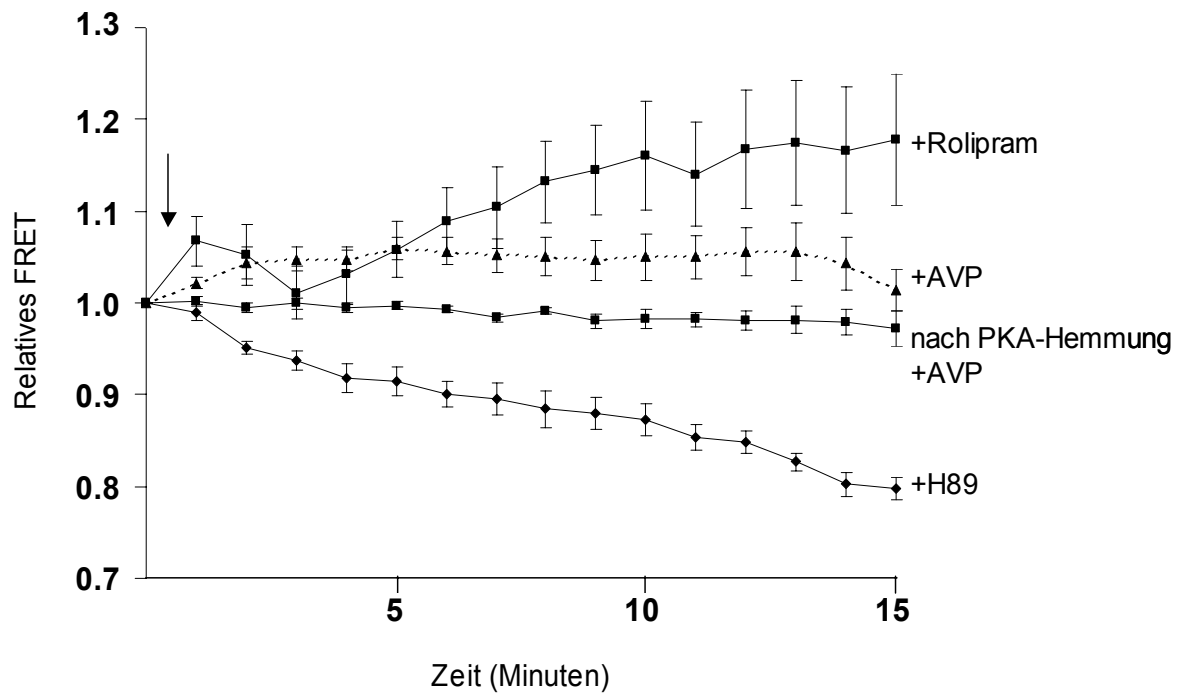


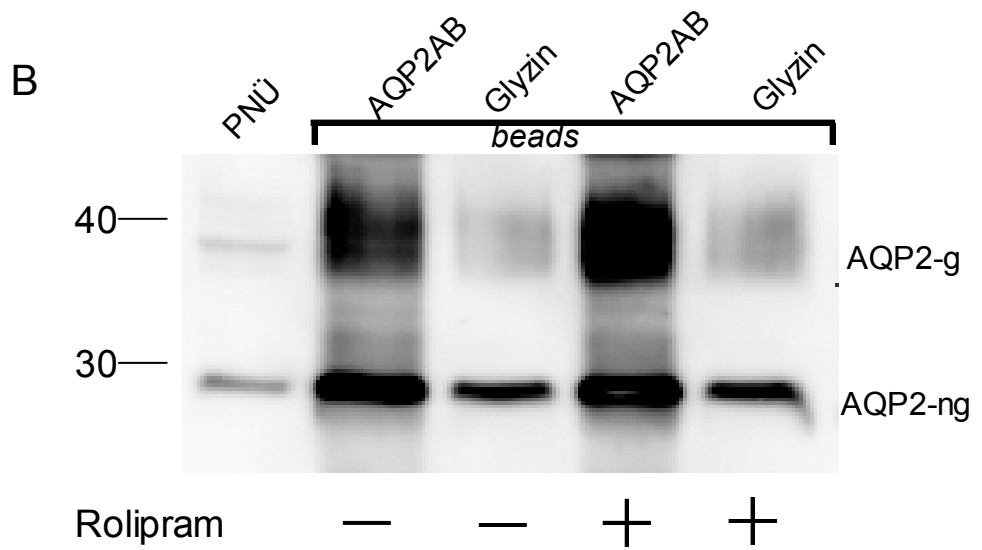
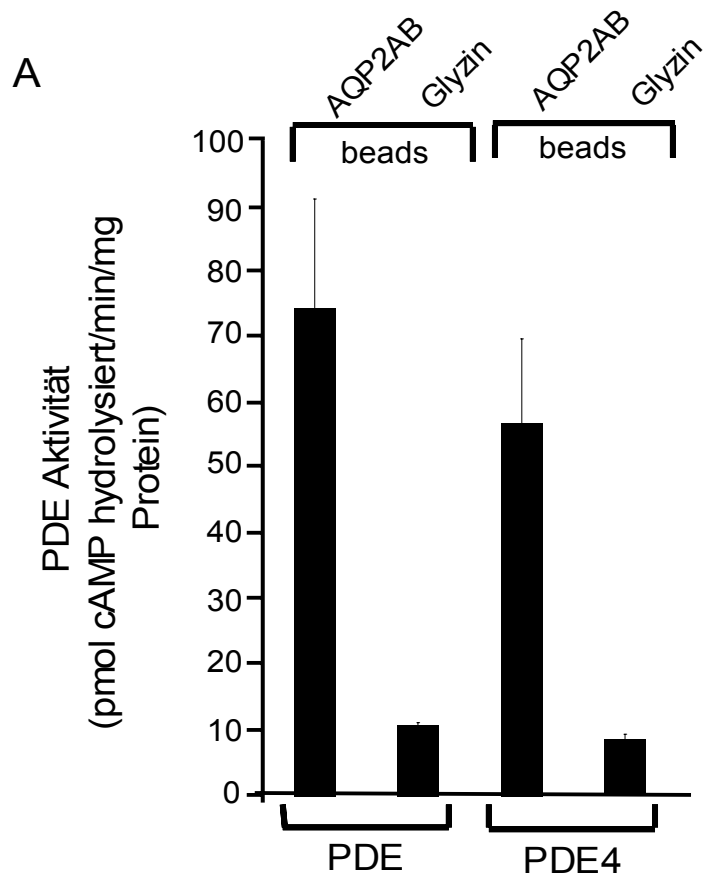
Abb. 15: FRET-Messungen zur Visualisierung der PKA-Aktivitäten in IMCD-Zellen. IMCD-Zellen wurden mit dem PKA-Reporter AKAR1 transient transfiziert. Die FRET Messungen wurden an lebenden Zellen vor Behandlung mit den angegebenen Agenzien vorgenommen. **(A)** Schematische Darstellung des PKA-Reporters AKAR1: Nach PKA-Phosphorylierung eines Serinrests (S) in der PKA-Substratsequenz, die zwischen den CFP und YFP-Enden des Proteins liegt, kommt es zu einer Konformationsänderung, welche sich in einem erhöhtem FRET-Signal äußert. Verantwortlich dafür ist die Bindung des Phosphoprotein-bindende Abschnitt aus dem 14-3-3 tau Proteins an das phosphorylierte Serin. **(B)** Die transfizierten IMCD-Zellen wurden mit AVP (100 nM), H89 (30 μ M) oder Rolipram (100 μ M) behandelt. Als Kontrolle wurde eine Vorinkubation der mit AKAR1 transfizierten IMCD-Zellen mit dem PKA-Inhibitor H89 (30 μ M) für 30 Minuten vorgenommen. Nach der Hemmung der PKA kommt es daher zu keinem AVP-abhängigen Anstieg der PKA-Aktivität. Bilder werden für eine bessere Darstellung der FRET Veränderungen in Falschfarben dargestellt. Die Farben beschreiben die Veränderung der 128 ersten Schritte einer 8-bit Grauskala (0-255). **(C)** Die Veränderung der PKA-Aktivitäten (relative FRET-Signalveränderungen ganzer Zellen; n=10) über den Zeitraum von 15 Minuten wurden quantifiziert. Das FRET-Signal zum Zeitpunkt 0 Minuten (unmittelbar vor Zugabe der Substanzen) wurde gleich 1 gesetzt (Veränderungen der relativen FRET-Signale).

3.3.7 PDE4-Aktivität an AQP2-tragenden Vesikeln

Es wurde überprüft, ob auch unter basalen Bedingungen PDE4-Aktivität an AQP2-tragenden Vesikeln gefunden werden kann. PDE-Aktivitätsmessungen von AQP2-tragenden Vesikeln, die unser Kooperationspartner George Baillie in Glasgow durchgeführt hat, zeigen deutlich durch Rolipram hemmbare PDE4-Aktivität im Vergleich zur Glyzinkontrolle (Negativkontrolle) (Abb. 16A). Im Vergleich zur gesamten vorhandenen PDE cAMP-Hydrolyseaktivität ist die PDE4-Familie für über 75% der cAMP-Hydrolyse an den AQP2-tragenden Vesikeln verantwortlich. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die einzige an den AQP2-tragenden Vesikeln detektierbare Spleißvariante PDE4D3 eben dort hauptverantwortlich für die cAMP-Hydrolyse ist.

3.3.8 Inhibition der PDE4D3 durch Rolipram senkt die PKA-Aktivität an AQP2-tragenden Vesikeln

Um die Funktion der PDE4D3 an den AQP2-tragenden Vesikeln herauszufinden, wurde der Einfluss auf die vesikuläre PKA-Aktivität untersucht. Die IMCD-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden für 15 Minuten mit 100 µM Rolipram behandelt. AQP2-tragende Vesikel wurden aus IMCD-Zellen isoliert und davon wurden PKA-Aktivitätsmessungen vorgenommen. Nach Behandlung der IMCD-Zellen mit dem spezifischen PDE4-Inhibitor Rolipram wurden ähnliche Mengen von AQP2-tragenden Vesikeln mit AQP2AB-beads isoliert (Abb. 16B). Nach Roliprambehandlung der IMCD-Zellen wurde nach Abzug der Glyzinaktivität eine um bis zu 50 % verringerte PKA-Aktivität an den AQP2-tragenden Vesikeln festgestellt (Abb. 16C). Als Kontrolle wurden die PKA-Aktivitätsmessungen in Gegenwart eines PKA-Inhibitorpeptids durchgeführt. Als zweite Negativkontrolle diente die Glyzinkontrolle. Die Ergebnisse zeigen, dass die PDE4D3 an den AQP2-tragenden Vesikeln die vesikuläre PKA-Aktivität mitreguliert: Nach Hemmung der an AQP2-tragende Vesikel gebundenen PDE4D3 durch Rolipram kommt es zu einem Anstieg der Menge an cAMP in der Umgebung der vesikulären PKA. Diese wird durch Bindung von cAMP an die regulatorischen PKA-Untereinheiten aktiviert. Es kommt zur Dissoziation der katalytischen PKA-Untereinheiten. Diese Ergebnisse zeigen, dass PDE4D3 an den AQP2-tragenden Vesikeln die vesikuläre PKA-Aktivität unter basalen Bedingungen mitreguliert.



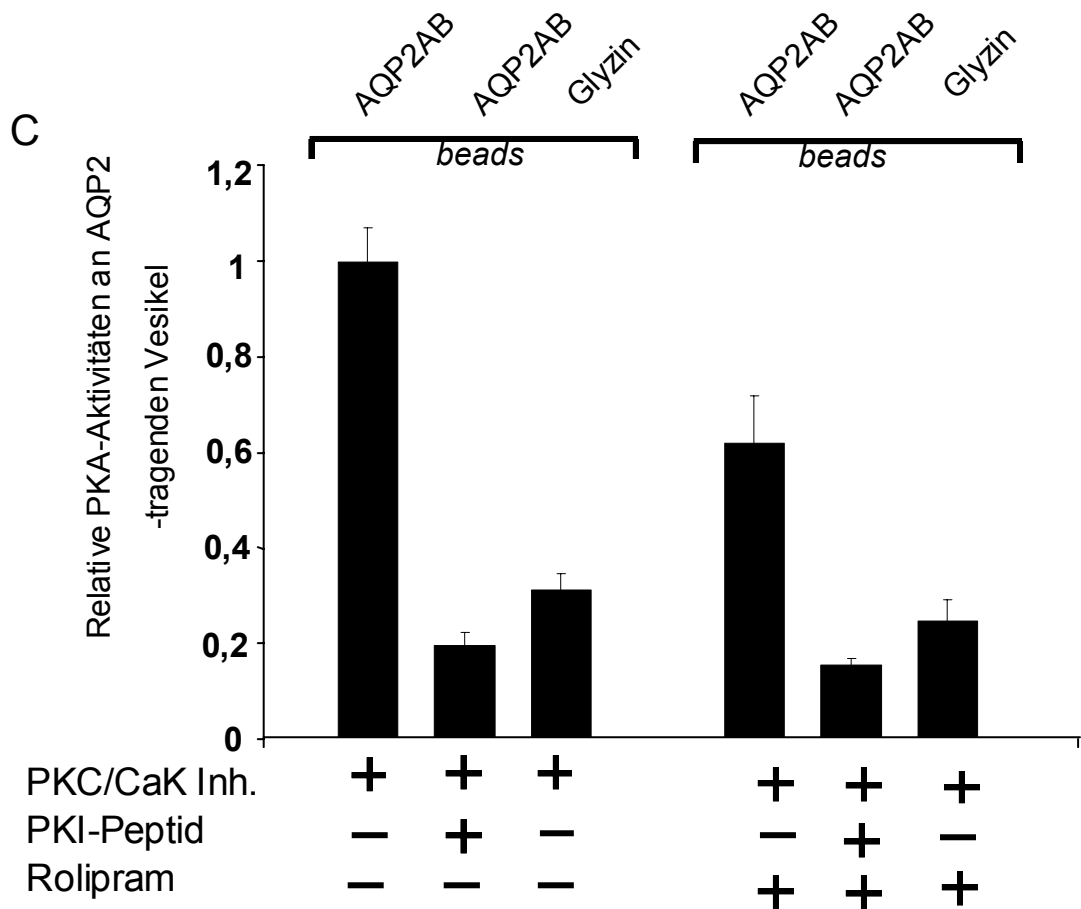
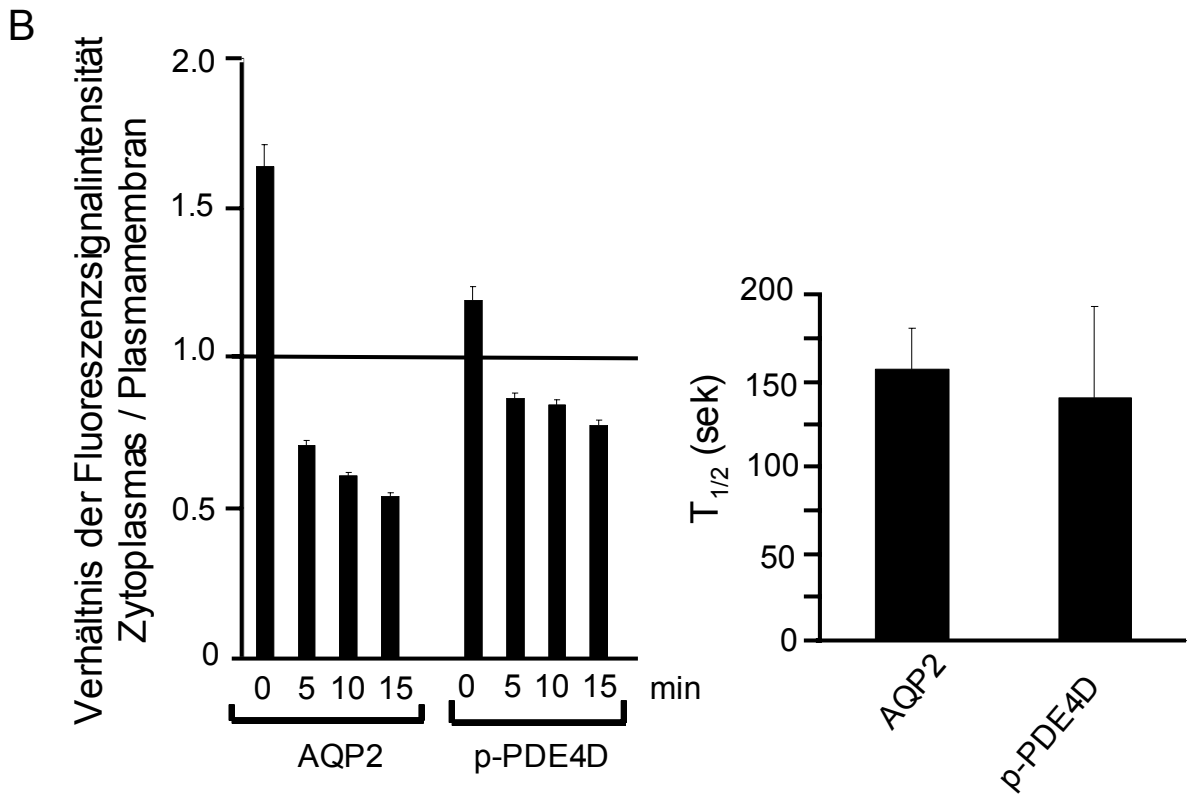
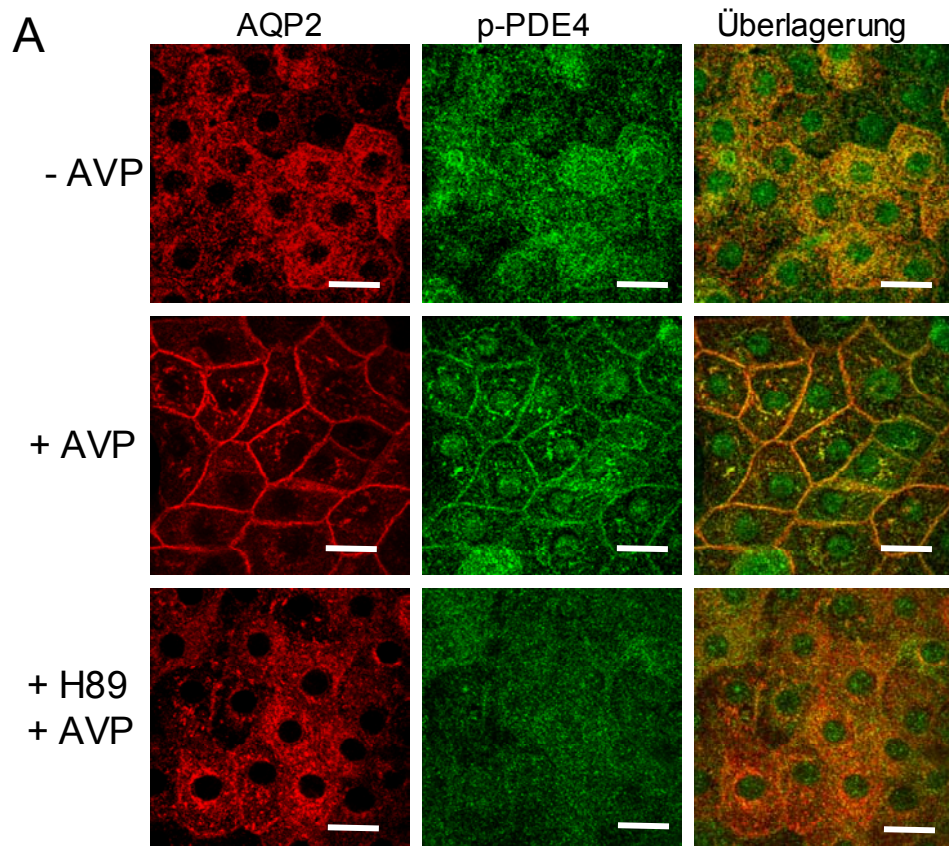


Abb. 16: PDE4D3 reguliert die PKA-Aktivität an AQP2-tragenden Vesikeln. (A) Nach Isolierung von AQP2-tragenden Vesikeln (als Kontrolle dienten die Glyzin-beads) aus dem Rattennierengewebe wurden PDE-Aktivitätsmessungen in der An- und Abwesenheit von Rolipram vorgenommen (drei unabhängige Versuche). (B) IMCD-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden nach Behandlung mit dem selektiven PDE4-Inhibitor Rolipram behandelt (15 Minuten, 100 μ M) und anschließend homogenisiert. Zelldebris wurde durch Zentrifugation entfernt und der sogenannte postnukleäre Überstand (PNÜ) wurde mit den beads inkubiert. Proteine, die an die AQP2AB-beads oder an die Kontroll-beads (Glyzin) gebunden haben, wurden in Western Blot-Experimenten analysiert: Glykosyliertes (g) und nichtglykosyliertes (ng) AQP2 konnte in der mit AQP2AB-beads erhaltenen Fraktion detektiert (angereichert) werden. (C) Nach durchgeführter Vesikelisolierung wurden die *in vitro* PKA-Phosphotransferasemessungen (durch Verwendung eines PKA-spezifischen Substratpeptids) vorgenommen. Als Negativkontrollen wurden zum einen die PKA-Aktivitätsmessungen von Glyzinpräparationen vorgenommen und zur Bestimmung des spezifischen Phosphotransfers wurde die PKA durch das PKA-Inhibitorpeptid PKI inhibiert. Die erhaltenen PKA-Aktivitäten wurden auf die entsprechenden AQP2-Mengen normiert (drei unabhängige Versuche).

3.3.9 AVP-abhängige Umverteilung von PKA-phosphorylierter PDE4D3

PKA phosphoryliert PDE4D3 am Serinrest S54 und erhöht die Enzymaktivität um das zwei- bis dreifache (Hoffmann *et al.*, 1998; MacKenzie *et al.*, 2002; Sette *et al.*, 1996). Um herauszufinden, wo es nach Behandlung von IMCD-Zellen mit AVP zu einer Veränderung der Phosphodiesteraseaktivität kommt, wurde ein Antikörper verwendet, der nur die phosphorylierte Form von PDE4 (p-PDE4) erkennt (MacKenzie *et al.*, 2002). Immunfluoreszenzanalysen von unbehandelten IMCD-Zellen zeigen, dass p-PDE4 hauptsächlich zytoplasmatisch, aber auch im Nukleus vorhanden ist (Abb. 17A). Behandlung der Zellen mit AVP für unterschiedliche Zeiträume (5, 10 und 15 Minuten) resultiert in einer Akkumulation von p-PDE4 an der Plasmamembran (Abb. 17A). Diese Beobachtung wurde nach quantitativer Analyse der Immunfluoreszenzsignale bestätigt (Abb. 17B). Die Umverteilung von AQP2 und p-PDE4 wird durch den PKA-Inhibitor H89 verhindert. Die Färbung mit p-PDE4 nach Behandlung mit H89 zeigt eine Reduktion des p-PDE4 Fluoreszenzsignals (Abb. 17A, untere Abbildung). Die AVP-abhängige Kotranslokation von AQP2 und p-PDE4 folgt der gleichen Kinetik. Die ähnlichen Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) der Translokation der zwei Proteine sind ein Indiz für die Präsenz auf den gleichen, also den AQP2-tragenden Vesikeln (Abb. 17B). Die Abbildung 17C zeigt die Kollokalisierung von PDE4D3, p-PDE4 und AQP2 sowohl in unbehandelte IMCD-Zellen als auch nach Behandlung mit AVP in der Plasmamembran. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die durch die PKA phosphorylierte PDE4D3 mit den AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert ist und nach Behandlung mit AVP in die Plasmamembran transloziert. Die PKA moduliert möglicherweise die an die Vesikel verankerte Aktivität der PDE4D3.



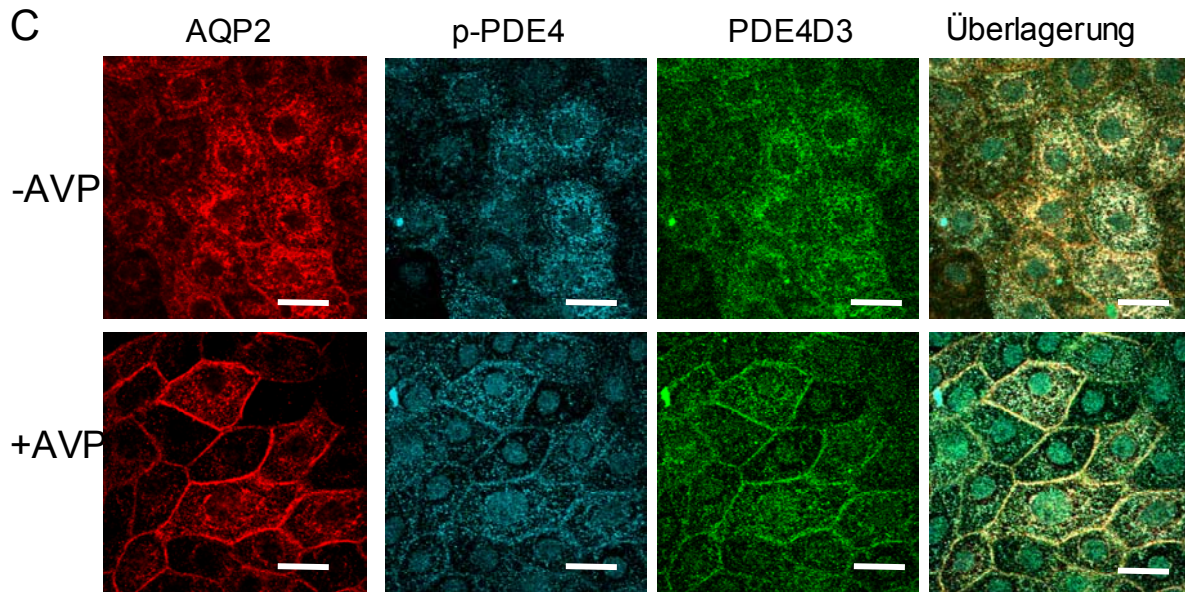


Abb. 17: Nach Behandlung mit AVP transloziert die durch PKA phosphorylierte PDE4D3 in die Plasmamembran von IMCD-Zellen. (A) IMCD-Zellen blieben entweder unbehandelt (-AVP) oder wurden mit AVP (100 nM, 15 Minuten) oder H89 (30 μ M; 15 Minuten) behandelt. Nach Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert. AQP2 wurde durch Inkubation mit dem anti-AQP2-Antikörper aus Ziege und Cy3-konjugierten Zweitantikörper detektiert, phosphoryliertes PDE4 (p-PDE4) mit phosphospezifischen anti-PDE4-Antikörper aus Kaninchen und Cy5-konjugierten Zweitantikörper. (B) IMCD-Zellen blieben entweder unbehandelt (-AVP) oder wurden mit AVP (100 nM) für 5, 10 oder 15 Minuten behandelt. AQP2 und p-PDE4 wurden wie in (A) detektiert. Quantitative Analyse der Immunfluoreszenzsignale wurde, wie in Abb. 8 beschrieben, durchgeführt ($n \geq 20$ Zellen wurden für jeden Ansatz getestet; Mittelwert \pm Standardfehler; drei unabhängige Experimente). Verhältnisse > 1 zeigen eine hauptsächlich intrazelluläre Lokalisation, Verhältnisse < 1 eine hauptsächlich Lokalisation an der Plasmamembran. Die erhaltenen Werte des Verhältnisses der Plasmamembranfluoreszenz zu den intrazellulären Signalintensitäten wurden verwendet, um die Kinetik der AVP-abhängigen Translokation von AQP2 und p-PDE4 an die Plasmamembran zu bestimmen. (C) IMCD-Zellen blieben entweder unbehandelt (-AVP) oder wurden mit AVP (100 nM) behandelt. Für die Dreifachfärbung wurde der anti-AQP2-Antikörper aus Ziege (mit Cy3-konjugiertem Zweitantikörper), anti-PDE4D-Antikörper aus Maus (mit Cy5-konjugiertem Zweitantikörper) und anti p-PDE4-Antikörper aus Kaninchen (mit Cy2-konjugiertem Zweitantikörper) verwendet. Alle Immunfluoreszenzsignale wurden am *Laserscanning*-Mikroskop detektiert (Maßstabsbalken, 20 μ m).

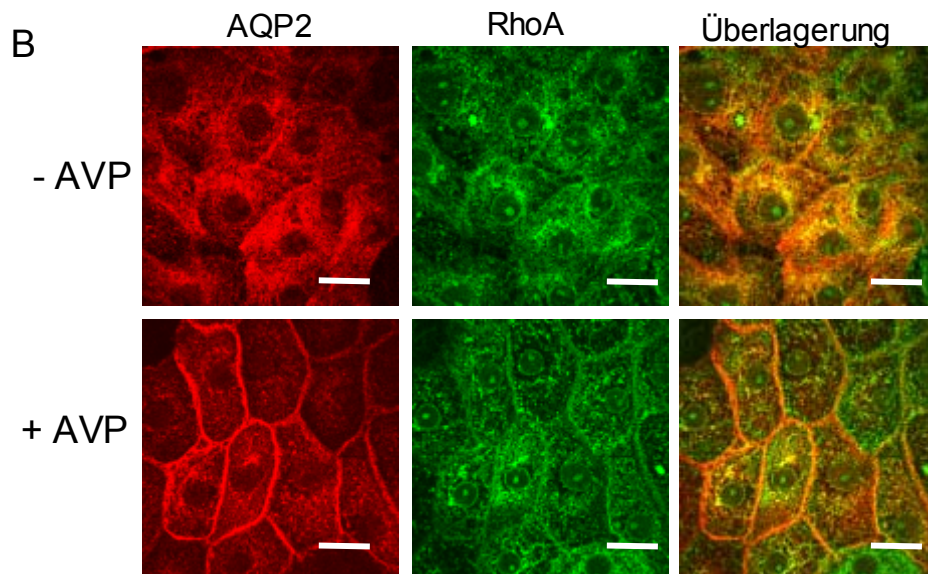
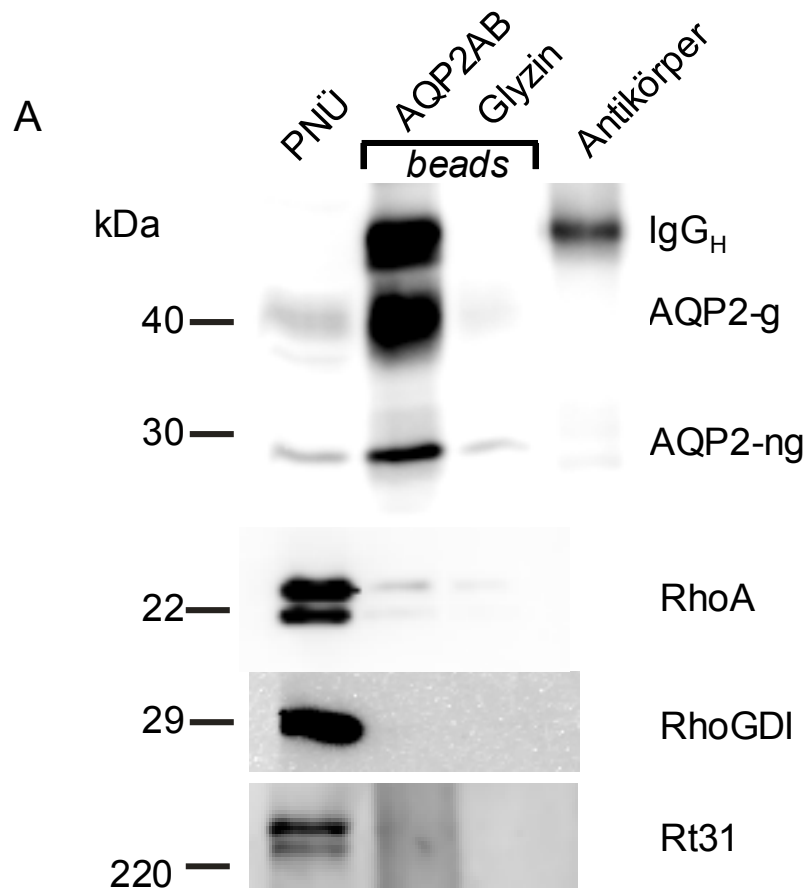
3.4 Lokalisation von RhoA

3.4.1 RhoA ist mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert

Da die kleine GTPase RhoA an der Translokation von AQP2 beteiligt ist, untersuchten wir ob RhoA und Proteine, die RhoA regulieren, an AQP2-haltigen Vesikeln vorkommen. Ausgangsmaterial für die Immunsolierung von AQP2-tragenden Vesikeln war die innere Medulla von Rattennieren. Western Blot-Analysen zeigten eine Anreicherung von RhoA in dieser Fraktion gegenüber der Glyzinkontrolle (Abb. 18A). Im Gegensatz dazu konnten weder der Rho-Inhibitor RhoGDI noch der Rho-Aktivator (Rho-Austauschfaktor; RhoGEF) Rt31, welcher auch AKAP-Funktion besitzt, in der AQP2-tragenden Vesikelfraktion gefunden werden (Abb. 18A).

3.4.2 AQP2 und RhoA sind in IMCD-Zellen kolokalisiert und translozieren nach Behandlung mit AVP an die Plasmamembran

In unbehandelten IMCD-Zellen (Kontrollzellen) findet man AQP2 hauptsächlich intrazellulär (Abb. 18B). RhoA wurde unter diesen Bedingungen in der ganzen Zelle detektiert, einschließlich dem Nukleus und der Plasmamembran. Die Behandlung der IMCD-Zellen mit AVP führte neben der Translokation von AQP2 zu einer Akkumulation von RhoA an der Plasmamembran (Abb. 18B). Quantitative Analyse der Immunfluoreszenzsignale bestätigten diese Beobachtung (Abb. 18C). An den AQP2-tragenden Vesikeln ist RhoA möglicherweise an der Induktion der Polymerisation von Aktin beteiligt (Barriere für die AQP2-Translokation), an der Plasmamembran übernimmt es möglicherweise eine Funktion bei der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran.



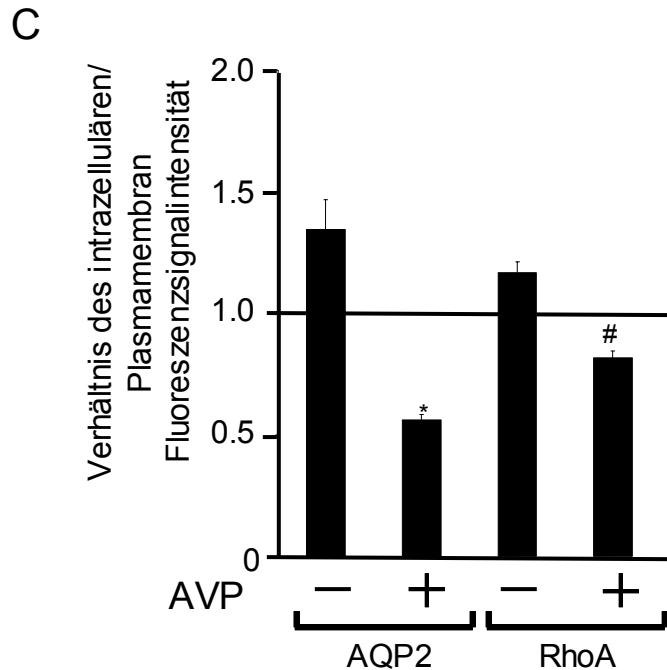


Abb. 18: RhoA ist mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert und transloziert AVP-abhängig in die Plasmamembran von IMCD-Zellen. (A) Die innere Medulla von Rattennieren wurde homogenisiert und Kerne und Zelldebris wurden über Zentrifugation entfernt. Man erhält den postnukleären Überstand (PNÜ). Der PNÜ wurde mit AQP2AB-beads inkubiert, als Negativkontrolle dienten die Glyzinkontrolle. Glykosyliertes (g) und nicht-glykosyliertes (ng) AQP2, und die angegebenen weiteren Proteine wurden im Western Blot-Experiment detektiert: RhoGDI (Rho *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*) und Rt31, ein Rho *Guanine nucleotide Exchange Factor* (RhoGEF). (B) IMCD-Zellen wurden entweder unbehandelt oder nach Behandlung mit AVP (100 nM, 15 Minuten) fixiert und permeabilisiert. AQP2 wurde nach Inkubation mit anti-AQP2-Antikörpern aus Kaninchen und dem Cy3-konjugierten Zweitantikörper detektiert, RhoA wurde mit dem anti-RhoA aus Maus und Cy5-konjugiertem Zweitantikörper detektiert. Die Immunfluoreszenzsignale wurden mittels *Laserscanning*-Mikroskop visualisiert (Maßstabsbalken, 20 µm). (C) IMCD-Zellen wurden wie es in (B) erläutert wurde behandelt. Quantitative Analyse der Immunfluoreszenzsignale wurden, wie in Abb. 8 beschrieben, vorgenommen (n ≥ 20 Zellen wurden für jeden Ansatz getestet; Mittelwert ± Standardfehler; drei unabhängige Experimente). Verhältnisse > 1 zeigen eine hauptsächlich intrazelluläre Lokalisation, Verhältnisse < 1 eine hauptsächlich Lokalisation an der Plasmamembran. * Werte unterscheiden sich signifikant von den Werten der unbehandelten Zellen (p < 0.0001); #, Werte unterscheiden sich signifikant von den Werten der unbehandelten Zellen (p < 0.0001).