

Aus dem Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie und
dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in der Helmholtz-
Gemeinschaft

DISSERTATION

Vasopressin kontrolliert die Proteinmenge des Wasserkanals
Aquaporin-2 durch Hemmung des proteosomalen Abbaus

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sven Beulshausen

Datum der Promotion: 03.12.2021

Vorwort

Die Experimente dieser Arbeit wurden zwischen April 2007 und November 2009 im Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie unter der Leitung von PD Dr. Enno Klusmann und Dr. Pavel Nedvetsky durchgeführt.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Nedvetsky PI, Tabor V, Tamma G, Beulshausen S, Skroblin P, Kirschner A, Mutig K, Boltzen M, Petrucci O, Vossenkämper A, Wiesner B, Bachmann S, Rosenthal W, Klusmann E. Reciprocal Regulation of Aquaporin-2 Abundance and Degradation by Protein Kinase A and p38-MAP Kinase. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(10):1645–56.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Begriffe und Abkürzungen	III
Abstract (Deutsch)	1
Abstract (English)	2
1 Einleitung	3
1.1 Die Nieren	3
1.2 Regulation der Homöostase in den Nieren	3
1.3 Aquaporine	5
1.4 Regulation von AQP2	9
1.4.1 Nicht-hormonelle Einflüsse	9
1.4.2 Hormonelle Einflüsse	10
1.4.3 Die AVP-Signal-Kaskade	11
1.5 Intrazellulärer Transport von AQP2	13
1.5.1 Vesikuläre Speicherung	14
1.5.2 Kompartimentalisierung durch Ankerproteine	15
1.5.3 Das Zytoskelett	16
1.5.4 Phosphorylierungen von AQP 2	17
1.5.5 Glykosylierung von AQP2	19
1.6 Induktion der Proteinexpression	20
1.7 Steuerung der Translation	21
1.8 Abbau der Proteine	23
1.9 Klinische Bedeutung der AVP-AQP2 Signalkaskade	24
1.10 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Geräte und Software	28
2.1.2 Puffer und Lösungen	30
2.1.3 Reagenzien	30
2.1.4 Antikörper	31
2.1.5 Zelllinien	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Tierversuche	32
2.2.2 Präparation von primären innermedullären Sammelrohr- (IMCD-) Zellen	32

2.2.3	Immunpräzipitation.....	33
2.2.4	Western Blot	34
2.2.5	Real-Time quantitative PCR	34
2.2.6	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	36
2.2.7	Transfektion von HEK293-Zellen mit AQP2-Plasmid-DNA	36
2.2.8	Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Mikroskopie	37
2.2.9	Statistik	37
3	Ergebnisse und Auswertung	39
3.1	Untersuchung des Einflusses von Forskolin und Argininasopressin auf die AQP2 Menge	39
3.2	Analyse des Einflusses von cAMP auf die Proteinmenge	41
3.3	Messung der intrazellulären AQP2-mRNA Menge	42
3.4	Analyse des Phosphorylierungsstatus von AQP2 an Serin256.....	43
3.5	Untersuchung des Einflusses der Proteinkinase A auf die intrazelluläre AQP2 Anreicherung	44
3.6	Etablierung von HEK293-Zellen als Zellmodell	45
3.7	Analyse des Verhaltens von AQP2 und einer nicht-phosphorylierbaren AQP2-Mutante gebunden an einen nicht durch cAMP-beeinflussbaren Promoter	47
3.8	Untersuchung der Auswirkung einer Hemmung der Transkription auf die FSK-induzierte AQP2-Mengenvermehrung.....	49
3.9	Untersuchung der Auswirkung einer Hemmung der Translation auf die FSK-induzierte AQP2-Mengenvermehrung.....	50
3.10	dDAVP erhöht nach 30 Minuten die AQP2 Menge <i>in vivo</i>	52
3.11	Analyse des Effektes einer Hemmung des Proteasoms	53
4	Diskussion	56
4.1	AVP hemmt den proteosomalen Abbau von AQP2.....	56
4.2	Phosphorylierung und Ubiquitinierung von AQP2	61
4.3	Rolle der p38MAP-Kinase.....	64
4.4	Medikamente mit Wirkung auf den AQP2-Stoffwechsel.....	66
4.5	Aspekte der Entwicklung neuer Therapeutika.....	69
5	Literaturverzeichnis.....	73
	Eidesstattliche Versicherung	88
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	89
	Lebenslauf.....	90
	Publikationsliste.....	92
	Danksagung	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Bändermodell der Struktur eines AQP1 (Sagittalschnitt).	6
Abbildung 1.2	Die AVP-Signalkaskade	13
Abbildung 1.3	Hormonelle Steuerung von AQP2 in den Hauptzellen des Sammelrohres.	18
Abbildung 3.1	AVP und FSK erhöhen nach 30 Minuten die AQP2-Menge in IMCD Zellen.	41
Abbildung 3.2	Die AQP2-Proteinmengenerhöhung steht in direkter Abhängigkeit zur cAMP-Konzentration.	42
Abbildung 3.3	FSK erhöht mittelfristig die AQP2-mRNA Menge.	43
Abbildung 3.4	Stimulation von IMCD-Zellen mit FSK und AVP führt zu einer Zunahme der Phosphorylierung von AQP2 an Serin 256	44
Abbildung 3.5	Der Kinasenhemmer H89 verhindert die durch FSK auslösbare AQP2- Mengenerhöhung.	45
Abbildung 3.6	Die Menge von AQP2 verhält sich nach FSK-Stimulation in HEK293- Zellen genauso wie in IMCD-Zellen.	46
Abbildung 3.7	Stimulation mit FSK führt zu einer Zunahme der Proteinmenge von AQP2-S256A unter Kontrolle des CMV-Promoters in HEK293-Zellen	48
Abbildung 3.8	FSK erhöht in IMCD-Zellen die AQP2-Proteinmenge trotz Hemmung der Transkription.	50
Abbildung 3.9	FSK erhöht in HEK293-Zellen die AQP2-Proteinmenge trotz Hemmung der Translation.	51
Abbildung 3.10	dDAVP erhöht in vivo bereits nach 30 Minuten die AQP2 Proteinexpression.	52
Abbildung 3.11	Eine Hemmung des proteosomalen Abbaus von AQP2 mit MG132 führt zu derselben Mengenvermehrung von AQP2 wie eine Stimulation der Zellen mit FSK.	55
Abbildung 4.1	Signalkaskade, die zur Verlängerung der AQP2 Halbwertszeit führt ..	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Übersicht der in der Niere vorkommenden Aquaporine.....	8
--	---

Begriffe und Abkürzungen

A1-Rezeptor	Adenosinrezeptor
AC	Adenylylzyklase
AKAP	Proteinkinase A-Ankerproteine
AQP	Aquaporin
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Argininvasopressin, ADH, Antidiuretisches Hormon
BK2-Rezeptor	Bradykinin-Rezeptor B2
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMV	Cytomegalovirus
CRE	<i>cAMP responsive Element</i>
CREB	<i>cAMP-responsive element-binding protein</i>
dbcAMP	zyklisches Dibutyryladenosinmonophosphat
dDAVP	Desmopressin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EP1/3-Rezeptoren	Prostaglandin EP1/3 Rezeptor
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FMP/API 1	3,3'-diamino-4,4'-dihydroxydiphenylmethan
FSK	Forskolin
HEK 293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
IMCD	<i>Inner medullary collecting duct</i>
kD	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
miRNA	mikroRNA
mRNA	messenger-RNA
NDI	nephrogener Diabetes Insipidus
P2Y2-Rezeptor	P2Y Purin-Rezeptor
p38-MAPK	p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PDE4D	Phosphodiesterase 4D
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PKA	Proteinkinase A
PP2C	Proteinphosphatase 2C
RNA	Ribonukleinsäure
SIADH	Syndrom der inadäquaten ADH Sekretion
SNAP	<i>synaptosome-associated proteins</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimidimide-factor attachment protein target receptor</i>
TonEBP	<i>tonicity-responsive enhancer-binding protein</i>
tRNA	transfer-RNA
USP4	Ubiquitin-spezifische Protease 4
VAMP	<i>vesicle-associated membrane proteins</i>
V ₂ R	Vasopressin-V ₂ -Rezeptor

Abstract (Deutsch)

In den Hauptzellen des Sammelrohres der Nieren (*Inner medullary collecting duct* IMCD-Zellen) wird Aquaporin-2 (AQP2) unter Kontrolle des antidiuretischen Hormons (Argininvasopressin, AVP) aus intrazellulären Vesikeln in die Zellmembran verlagert und ermöglicht durch Wasserrückresorption aus dem Primärharn die Kontrolle der Wasserhomöostase. AVP bindet hierfür an den AVP-Rezeptor Typ 2 (V₂R) und initiiert eine intrazelluläre Signalkaskade, die über das Signalmolekül zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und Phosphorylierung von AQP2 unter anderem am Serin-Rest 256 (S256) führt.

Daneben führt die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CRE (*cAMP responsive Element*). Während die AQP2 Umverteilung innerhalb von Sekunden eintritt, benötigt der zweite Mechanismus Stunden bevor er eine Wirkung entfaltet.

In dieser Arbeit kann erstmals sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein neuer mittelfristiger Regulationsmechanismus von AQP2 nachgewiesen werden. Bereits 30 Minuten nach Stimulation mit AVP bzw. Forskolin (FSK), einem Reagenz, das die cAMP-Konzentration erhöht, konnte eine mehr als sechzigprozentige Erhöhung der AQP2-Proteinmenge festgestellt werden.

Als Mechanismus konnte eine Hemmung des proteosomalen Abbaus identifiziert werden. Die cAMP-vermittelte Aktivierung der PKA ist Teil der Signalkaskade, die zu dieser Wirkung führt, jedoch geschieht dies nicht über eine Phosphorylierung an S256. Weder eine Hemmung der Transkription noch eine Hemmung der Translation heben die Wirkung von AVP und FSK auf. Da eine Hemmung des proteosomalen Abbaus zu einer gleichartigen Vermehrung der Proteinmenge führt, ist zu vermuten, dass AVP und FSK über die Aktivierung der PKA zu einer Hemmung des proteosomalen Abbaus von AQP2 führen.

Krankheiten, die mit einer Fehlregulation der Wasserhomöostase in Form von übermäßigem Wasserverlust (Diabetes insipidus) oder übermäßiger Wasserretention wie bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz, Leberzirrhose oder dem Syndrom der inadäquaten ADH Sekretion (SIADH) einhergehen, sind nach wie vor eine klinische Herausforderung aufgrund limitierter pharmakologischer Wirkstoffe. Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten in Zukunft die Entwicklung spezifischer Therapeutika ermöglichen, die gezielt in den AQP2-Stoffwechsel eingreifen.

Abstract (English)

In the inner medullary collecting duct (IMCD) cells of the kidney, aquaporin-2 (AQP2) translocates from intracellular vesicles to the apical plasma membrane following hormonal stimulation by arginine-vasopressin (AVP). The membrane insertion facilitates water resorption from tubular fluid (primary urine) and fine-tunes body water homeostasis. AVP binds to the vasopressin type 2 receptors (V₂R), initiating an intracellular signaling pathway in which the activation of protein kinase A (PKA) by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) leads to the phosphorylation of AQP2, e.g., an increase in serine-256 phosphorylation.

In addition, AVP causes activation of the transcription factor CRE (cAMP responsive element) and increased transcription of the AQP2-encoding gene. While AQP2 transport takes place in seconds, the activation of CRE and transcription takes several hours.

Using *in vitro* and *in vivo* models, the present study shows the presence of a third, previously undescribed, mechanism of AQP2 regulation. An increase in cAMP concentration in IMCD cells following stimulation by AVP or Forskolin (FSK), a direct activator of adenylyl cyclases, led to an increase in AQP2 protein abundance by more than 60 percent within 30 minutes.

As a mechanism explaining this observation, the inhibition of proteasomal degradation of AQP2 was identified. The inhibition occurs as a result of AVP-mediated activation of PKA and consequent inhibition of the proteasomal degradation of AQP2. The mechanism is independent of phosphorylation of AQP2 at S256 and of translation and transcription of the AQP2 gene.

Diseases resulting from inadequate water homeostasis leading to either excessive water excretion (diabetes insipidus) or excessive water retention (end-stage congestive heart failure, liver cirrhosis or SIADH (Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone)) continue to present many clinical challenges due to a lack of pharmacological treatment options. The findings of this study could aid the development of pharmacological strategies for the treatment of water balance disorders by targeting the metabolism of AQP2.

1 Einleitung

Die Motivation zur Erstellung dieser Arbeit war die Beobachtung, dass im Rahmen anderer Versuchsreihen eine Stimulation von Sammelrohrzellen aus dem Nierenmark (*Inner medullary collecting duct* IMCD) von Ratten mit Arginin-Vasopressin (AVP) bereits nach einem kurzen Zeitintervall von etwa 30 Minuten zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinmenge des Wasserkanals Aquaporin 2 (AQP2) führte.

Bis zum Zeitpunkt der Versuchsreihe (2007-2009), die dieser Arbeit zugrunde liegt, war eine Erhöhung in diesem Zeitintervall nicht beschrieben und ein etwaiger Mechanismus unklar. Es bestand somit auch die Möglichkeit, dass es sich um ein Artefakt handeln könnte.

Gegenstand dieser Arbeit war zu überprüfen, ob die Beobachtung reproduzierbar ist und ob ein möglicher Mechanismus gefunden werden kann, der für die Proteinmengenerhöhung ursächlich ist.

1.1 Die Nieren

Die Nieren gehören zu den vielseitigsten Organen unseres Körpers. Primär dienen sie der Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und Fremdstoffen über den Urin, haben darüber hinaus aber eine Vielzahl weiterer Funktionen, die tief in die Regulation weiterer Organsysteme eingreifen. Neben hormonellen und metabolischen Aufgaben sind sie vor allem für die Homöostase und Regulation des Säure-/Base-, des Elektrolyt- und des Wasserhaushaltes zuständig. In den Nieren befinden sich Nierenkörperchen (Glomeruli), die für die Filtrierung des Bluts zum Primärharn verantwortlich sind und Tubulussysteme, die sich an die Glomeruli anschließen und deren Aufgabe Resorptions- und Sekretionsprozesse sind. Eine funktionelle Einheit bestehend aus Nierenkörperchen und anschließendem Tubulussystem wird als Nephron bezeichnet. Auch wenn das Sammelrohr embryologisch nicht zum Nephron gehört, wird es in der Physiologie funktionell als dazugehörig betrachtet, so dass es in dieser Arbeit der Einfachheit halber dazu gerechnet wird. Pro Niere gibt es etwa eine Million Nephrone (1).

1.2 Regulation der Homöostase in den Nieren

Die Nieren sind außerordentlich stark durchblutet. Ca. 20% des Herzminutenvolumens fließen in Ruhe durch die Nieren. Dies entspricht ca. 1l/min, so dass man bei einem

durchschnittlichen Hämatokrit von 0,4 von einem renalen Plasmafluss von 600 ml/min ausgehen kann. Hiervon werden wiederum ca. 20% in den Glomeruli abfiltriert. Somit entspricht die glomeruläre Filtrationsrate 120 ml/min. Innerhalb von 24 Stunden werden so über 170 Liter Primärharn gebildet.

Aus diesem Primärharn resorbiert die Niere alle notwendigen kleinmolekularen Stoffe und Wasser mit spezialisierten Kanälen zurück. Die treibende Kraft für die meisten Transportprozesse an den Zellmembranen der Kanalproteine ist der aktive Transport von Natrium und ein daraus entstehendes osmotisches und elektrostatisches Gefälle.

Die an den basolateralen Zellmembranen der Nierenepithelzellen gelegene Na⁺-K⁺-ATPase tauscht unter Energieverbrauch intrazelluläres Natrium gegen extrazelluläres Kalium aus, so dass über der Zellmembran ein Natriumgradient sowie ein elektrischer Gradient entsteht. Dadurch können Natrium-Ionen durch spezialisierte Kanäle ohne Energieverbrauch aus dem Primärharn in die Epithelzellen einströmen (2). Co-Transporter, die neben Natrium noch andere Stoffe transportieren, nutzen den Natriumgradienten, um Bestandteile des Primärharns, wie zum Beispiel Aminosäuren oder Glucose, gegen einen Konzentrationsgradienten in die Zelle zu pumpen. In den wasserpermeablen Anteilen des Tubulussystems diffundiert Wasser teils trans-, teils paravasal mit dem resorbierten Natrium, einem lokal begrenzten osmotischen Gradienten folgend (3).

Der durch die Glomeruli filtrierte und im Kapselraum der Bowmanschen Kapsel befindliche Primärharn fließt von dort in den gewundenen Anteil des proximalen Tubulus (proximales Konvolut). Etwa 70% des Natriums und des Wassers aus dem Primärharn werden in diesem Anteil des Tubulussystems resorbiert.

Der folgende Teil des Tubulussystems, die Henle-Schleife, besteht aus einem wasserpermeablen, absteigenden Teil und einem aufsteigenden Teil, der wasserimpermeabel ist. Hier werden im Gegenstromprinzip der Harn und das Interstitium zunehmend konzentriert. Durch aktiven Natrium-Transport im aufsteigenden Anteil der Henle-Schleife steigt die Osmolarität des zwischen den Tubuli gelegenen Interstitiums, was wiederum eine passive Diffusion des Wassers aus dem Primärharn im absteigenden Teil der Henle-Schleife ermöglicht. Hierdurch werden im absteigenden Teil der Henle-Schleife weitere 10% Flüssigkeit des Primärharns resorbiert. Der bei all diesen Prozessen wichtigste Wasserkanal ist AQP1, der sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Zellmembran der Epithelzellen des absteigenden Teils der Henle-Schleife konstitutiv exprimiert wird (4,5).

Die Konzentrationsfähigkeit der Niere ist enorm: so kann der Urin - in Situationen systemischen Wasserüberschusses – bis auf ein Sechstel der Osmolalität des Blutes verdünnt werden (50 mosmol/kg H₂O anstelle von 300 mosmol/kg H₂O) und in Situationen systemischen Wassermangels auf die vier- bis fünffache Konzentration des Blutes (1200-1400 mosmol/kg H₂O anstelle von 300 mosmol/kg H₂O) konzentriert werden (3).

Der osmotische Gradient dient auch im distalen Konvolut und vor allem im Sammelrohr, in dem unter hormoneller Kontrolle die letzten 15-20% des ursprünglichen Volumens des Primärharns in den Blutkreislauf zurückgeführt werden, als treibende Kraft für den Wassereinstrom. Hier erfolgt die entscheidende Feinjustierung der Wasserhomöostase. Der Wasserkanal, der im Sammelrohr unter hormoneller Kontrolle den Wassereinstrom durch die wasserimpermeable Zellmembran ermöglicht, ist AQP2 (6).

Am Ende dieses Tubulussystems hat der Körper ca. 99% des ursprünglichen Flüssigkeitsvolumens resorbiert, so dass die endgültige Harnausscheidung nur bei ca. 1,5-2 Liter/Tag liegt (7).

Eine krankhafte Funktions- und Regulationsstörung der Wasser-Rückresorption im Sammelrohr kann einerseits zu Zuständen des systemischen Wasserverlustes (renaler bzw. zentraler Diabetes insipidus, Schwangerschaftsdiabetes insipidus, dipsogener Diabetes insipidus, oder erworbener Diabetes insipidus z.B. als Nebenwirkung einer Lithium-Therapie) führen, andererseits zu Zuständen unkontrollierter Wasser-Rückresorption, wie zum Beispiel im Rahmen einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz, Leberzirrhose oder des Syndroms der inadäquaten ADH-Sekretion (SIADH) (8).

1.3 Aquaporine

Aquaporine (AQP) sind eine Familie von Kanalproteinen, die seit ihrer Erstbeschreibung im Jahre 1992 viel zu unserem Verständnis der Physiologie der Wasserhomöostase beigetragen haben (9). Ihre wesentliche Funktion besteht im selektiven Transport von Wassermolekülen durch die sonst wasserundurchlässige Zellmembran. Sie sind hochgradig selektiv für H₂O, so dass sie sogar Hydronium-Ionen (H₃O⁺) abstoßen. In ihrer Struktur und Aminosäuresequenz ähneln sich alle Aquaporine. Sie besitzen sechs α -Helices, welche die Membran durchspannen und zwei kurze Helices, die sich in der Mitte der Zellmembran treffen. C- und N-Terminus liegen intrazellulär. Als Funktionseinheit in

der Zelle dienen Homotetramere eines Typs. Pro Aquaporinkanal können $3 \cdot 10^9$ Moleküle H_2O pro Sekunde die Zellmembran passieren (10–12).

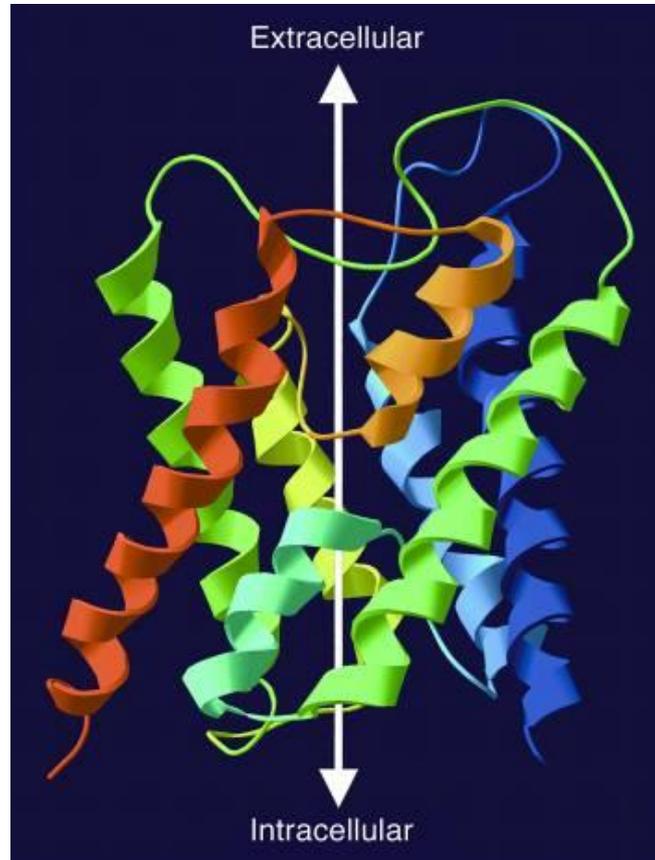


Abbildung 1.1 Bändermodell der Struktur eines AQP1 (Sagittalschnitt).

Der N-Terminus ist blau und der Carboxy-Terminus rot dargestellt. Sechs membran-durchspannende α -Helices umgeben zwei kurze Helices, die sich in der Zellmembran treffen (cyan und orange). Der weiße Pfeil zeigt den Wasserkanal an (10).

Die hohe Selektivität der Aquaporine für Wassermoleküle ist zum einen in der geringen Größe der Kanalpore von 2,8 Ångström, was etwa der Größe eines Wassermoleküls entspricht, und zum anderen in einer Ionenblockade begründet. Der geringe Durchmesser der Pore verhindert, dass Moleküle, die größer als Wassermoleküle sind, überhaupt in den Kanal eindringen können. Die Ionenblockade vermeidet mithilfe eines in allen Aquaporinen konservierten, positiv geladenen Arginins-195 an der Engstelle, dass kleine Kationen in die Zelle eindringen können. Die wichtigsten Kationen, deren Eintritt in die Zelle es zu verhindern gilt, sind Protonen, da das transmembranäre

Protonenkonzentrationsgefälle als elektrostatische Triebkraft für den Transport anderer Ionen in vorangeschalteten Nephronabschnitten dient und der Säure-Base-Stoffwechsel der Niere ganz wesentlich von der Undurchlässigkeit für Protonen abhängt. Den Schlüsselmechanismus zur Protonenblockade bilden die beiden in die Zellmembran reichenden kurzen Helices. Sie formen einen starken Dipol, der zur Rotation der Wassermoleküle führt. Durch diese Rotation wird verhindert, dass Protonen über die Wasserstoffbrückenbindungen der Wasserstoffatome untereinander in die Zelle geleitet werden (10).

Ungefähr die Hälfte der Aquaporintypen sind neben Wasser für kleine, ungeladene Moleküle wie Glycerol oder Harnstoff durchlässig, so dass hier eine Unterscheidung in multifunktionelle Porine oder Aquaglyceroporine erfolgt.

Der Unterschied zwischen selektiven Aquaporinen und multifunktionellen Porinen liegt in der Aminosäure an Stelle 180. In Aquaporinen findet sich an dieser Stelle ein Histidin und in Aquaglyceroporinen ein Glycin, so dass die engste Stelle in Aquaglyceroporinen etwa 1 Å weiter ist als in Aquaporinen (10,13,14).

Bei Säugetieren sind bisher 13 (unterschiedliche) Aquaporintypen beschrieben – AQP 0-12. Die Aquaporine befinden sich in allen Zellen, in denen Wasseraustausch stattfinden muss. Dazu gehören unter anderem Drüsen-, Darmmukosa- und Nierentubuluszellen, aber auch Erythrozyten, Gehirn- und Sinnesorganzellen, Kardiomyozyten und Lungenepithelzellen (15,16).

Entlang des Nephrons werden neun Aquaporine (AQP 1-8 und AQP 11) exprimiert, wobei die unterschiedlichen Typen unterschiedliche Lokalisationen und Funktionen aufweisen. Eine wesentliche Rolle bei der Wasserrückresorption spielen AQP 1-4 (Tab. 1.1). AQP 1 wird im proximalen Tubulus und dem absteigenden Teil der Henle-Schleife an den apikalen Zellmembranen exprimiert und ist dort für 80-90% der Wasserrückresorption (aus dem Primärharn) verantwortlich (17).

In den Hauptzellen des Sammelrohres befinden sich die Aquaporine 2, 3 und 4. Aquaporine 3 und 4 kommen in der basolateralen Zellmembran vor und werden, so wie die meisten anderen Aquaporine auch, konstant exprimiert. Eine hormonelle Kontrolle der beiden Wasserkanäle durch AVP scheint keine klinische Bedeutung zu haben. Die AQP3 Expression wird zwar durch AVP reguliert, jedoch hat eine funktionshemmende

Mutation in AQP3 keine krankhafte Auswirkung (18–20). AQP4 wird nicht durch AVP reguliert (7).

AQP2 ist das Hauptziel der hormonellen Kontrolle durch AVP (s. Kapitel 1.4.3). So wird sowohl die Expression als auch die Verlagerung aus intrazellulären Vesikeln in die Membran reguliert. Durch diese Translokation (vornehmlich in die apikale Zellmembran) wird die Zelle wasserpermeabel. So kann Wasser aus dem hypertonen Lumen des Sammelrohres entlang eines osmotischen Gradienten, der über das Tubulussystem aufgebaut wird, über die Zelle ins Blut rückresorbiert werden. Durch eine Regulation der Menge an AQP2 in der apikalen Zellmembran hat der Körper so die Möglichkeit das Niveau der Wasserrückresorption zu steuern (21,22).

Als Teil eines komplexen Regulationsmechanismus ist AQP2 somit anfällig für Störungen, die sowohl auf Ebene der Hormonproduktion und -sekretion als auch auf Ebene der zellulären Antwort auf den hormonellen Reiz liegen können.

In Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass in den meisten Krankheiten, die mit einer Fehlregulation der Wasserhomöostase einhergehen, Veränderungen der AQP2-Menge gegenüber Problemen mit dem Transport des Proteins überwiegen (7). Umso relevanter ist es, die einzelnen Schritte der hormonellen Regulation und der intrazellulären Signalkaskade genau zu verstehen und insbesondere alle Faktoren zu identifizieren, die Auswirkungen auf die Proteinmenge von AQP2 haben. In diesem Punkt liegen die Bedeutung und Relevanz dieser Arbeit.

Mit diesem Wissen können Strategien entwickelt werden, um durch ein dezidiertes pharmakologisches Eingreifen in den Regulationsmechanismus von AQP2 und dessen Proteinmenge etwaige Störungen gezielt zu beheben und die unter 1.9 dargestellten klinischen Bilder erfolgreicher zu behandeln.

Tabelle 1.1 Übersicht der in der Niere vorkommenden Aquaporine

Name	Klasse	Synonym	Nierenabschnitt	Subzelluläre Verteilung	Lokalisation außerhalb der Niere	Funktion	Symptome in Knock-out Mäusen
AQP 1	I	AQP-CHIP CHIP-28	PT, AbTHS	Apikale und basolaterale Zellmembran	Gehirn, Erythrozyten, Auge, Herz, Lunge, Pankreas, Skelettmuskel, Vagina	Wasserrückresorption aus Primärharn, Angiogenese, Zellwanderung	Reduziertes Schmerzempfinden, Polyurie

AQP 2	I	AQP-CD WCH-CH	HZSR	Intrazelluläre Vesikel, Apikale und basolaterale Zellmembran	Ohr, Nebenhoden, Vagina	Hormonell- gesteuerte Wasserrück- resorption aus dem Primärharn	Polyurie, Gedeih- störungen
AQP 3	II	GLIP	HZSR	Basolaterale Zellmembran	Erythrozyten, Auge, Kolön, Konjunktiven, Lunge, Haut, Vagina	Wasseraustritt aus den HZSR, Regulation des Glycerolgehalts der Epidermis	Gestörte Wundheilung, reduzierte Haut- befeuchtung, Polyurie
AQP 4	I	MIWC WCH4	HZSR	Basolaterale Zellmembran	Gehirn, Auge, Lunge, Muskel, Netzhaut, Haut, Magen	Wasseraustritt aus den HZSR, Regulation des Wasserflusses im ZNS	Seh-, Hör- und Riechstörungen, Polyurie

Klasse I: klassische Aquaporine, Klasse II: Multifunktionale Aquaporine, PT: proximaler Tubulus, AbTHS: absteigender Teil der Henle-Schleife, HZSR: Hauptzellen des Sammelrohrs modifiziert nach (22).

1.4 Regulation von AQP2

Das wesentliche Ziel der hormonellen und nicht-hormonellen Regulation von AQP2 ist die Feinjustierung des Flüssigkeitshaushaltes, um dem Körper die Möglichkeit zu geben, schnell auf Veränderungen in der Wasserhomöostase zu reagieren. Auslöser hierfür können Umwelteinflüsse, wie veränderte Temperaturen oder Luftfeuchtigkeit, physiologische Faktoren, wie wechselnde Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr oder vermehrtes Schwitzen sein, aber auch pathologische Zustände, wie gastroenterologische, renale, kardiovaskuläre oder Infektionskrankheiten.

Für die Mobilisierung von AQP2 ist AVP verantwortlich, Inhibitoren des AQP2-Systems sind vor allem Dopamin, ATP und Prostaglandin E2. Zudem gibt es nicht-hormonelle Einflüsse (23).

1.4.1 Nicht-hormonelle Einflüsse

AQP2 wird durch interstitielle Osmolalität reguliert. Brattleboro-Ratten haben eine Mutation im AVP-Gen, die zum Funktionsverlust des Hormons führt (24). Wenn diese Ratten dursten und sich ihre Blutosmolalität erhöht, schaffen sie es, ihren Urin trotz des Mangels an AVP zu konzentrieren (25,26).

Für diesen Effekt könnte das *tonicity-responsive enhancer-binding protein* (TonEBP) verantwortlich sein, da es im Zustand erhöhter Osmolalität zur gesteigerten Expression kommt (27). Mutationen im zum TonEBP gehörenden *tonicity-responsive element* im AQP2 Promoter führten zu einer verringerten AQP2 Expression und Mäuse ohne TonEBP zeigten eine Abnahme der AQP2-Menge (28,29).

1.4.2 Hormonelle Einflüsse

Die Aktivierung von AQP2 erfolgt durch AVP und ist der wesentliche Schritt in der Regulation der Wasserhomöostase. Die Signalkaskade und deren Auswirkungen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Auch wenn APV das Hormon mit dem größten Einfluss auf die Lokalisation von AQP2 ist, hat die Forschung der letzten Jahre ergeben, dass vermutlich zahlreiche weitere Hormone die AQP2-Aktivität steuern:

Das RAAS-System via **Angiotensin II** (ATII) und dessen AT II Typ 1-Rezeptor scheint die Wasserresorption steigern zu können. Mäuse mit einem sammelrohr-spezifischen ATII Typ-1a Rezeptor Mangel konnten den Primärharn nicht im gewohnten Maße aufkonzentrieren. Die Hauptwirkung von ATII scheint dabei in einer Induktion der AQP2-Expression zu liegen und weniger in einer Steuerung des intrazellulären AQP2-Transportes (30).

Auch für **Insulin** wurde gezeigt, dass es über die Aktivierung einer zyklischen Adenosinmonophosphat- (cAMP-) abhängigen Signalkaskade die Transkription von AQP2 steigert (31).

Oxytocin ist AVP strukturell sehr ähnlich. Nur zwei der Aminosäuren unterscheiden sich in diesen jeweils aus neun Aminosäuren bestehenden Hormonen (32). *In vitro* kam es in IMCD-Zellen von Brattleboro-Ratten nach Stimulation mit Oxytocin zu einer Verlagerung von AQP2 in die Zellmembran und zu einer Induktion der Expression von AQP2. Diese Wirkung, wenn auch insgesamt deutlich abgeschwächt im Vergleich zu AVP, scheint Oxytocin über den Vasopressin-2-Rezeptor (s.u.) zu vermitteln (33). Auch wenn die Datenlage hierzu widersprüchlich ist, scheint Oxytocin auch *in vivo* als antidiuretisches Hormon zu wirken (34).

Prostaglandin E₂ inhibiert durch Stimulation von EP1- und EP3-Rezeptoren die Bildung von cAMP, so dass AQP2 von der Zellmembran zurücktransportiert wird und die unter 1.5.3 beschriebenen Veränderungen des Zytoskeletts eintreten (35,36).

Die Aktivierung des A1 Rezeptors durch **Adenosin** hemmt Wasserrückresorption im Sammelrohr (37), genauso wie die Aktivierung des P2Y2-Rezeptors durch **ATP**, indem hierdurch jeweils die AVP-Signalkaskade alteriert wird und PGE₂-Produktion erhöht wird (38).

ATP wirkt zusätzlich, genauso wie **Dopamin**, auf die intrazelluläre Lokalisation von AQP2, indem es dessen Endozytose und lysosomalen Abbau fördert (39).

Bradykinin (BK) kann über BK2-Rezeptoren, die im Sammelrohr lokalisiert sind, den Transport von AQP2 hemmen (40).

Noch nicht zweifelsfrei bewiesen ist die Bedeutung von **Stickstoffmonoxid** (NO). Zum einen hängt dessen Wirkung davon ab, über welchen Weg das Signal weitergeleitet wird, zum anderen sind die Ergebnisse hier teils widersprüchlich. Fungiert zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) als Signalmolekül, so scheint durch Eingriff in den AVP-Signalweg eine Hemmung des AQP2-Transports im Vordergrund zu stehen (41), kommt es zu einer Erhöhung des cAMP durch NO, erhöht sich die Menge von AQP2 in der Zellmembran (42).

Schließlich wurde für **Endothelin-1** im Mausmodell beobachtet, dass es durch Aktivierung des Endothelin-B-Rezeptors zu einer Hemmung der AVP-vermittelten Wasserrückresorption kommt (43).

1.4.3 Die AVP-Signal-Kaskade

Das Hormon Arginin-Vasopressin (AVP), auch unter dem Namen antidiuretisches Hormon (ADH) bekannt, ist das bedeutendste Hormon für die Regulation von AQP2. Es wird in den Nuclei supraopticus und paraventricularis des Hypothalamus synthetisiert und über Axone in den Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) transportiert. Ein Anstieg der Blutosmolarität oder ein Abfall des Blutdrucks wird in Osmorezeptoren bzw. Barorezeptoren des Hypothalamus detektiert. Hierdurch kommt es zur Ausbildung von Aktionspotentialen, die zu den Axonterminalen der hypothalamischen Ganglienzellen weitergeleitet werden und dort zu einer Freisetzung von AVP führen mit dem Ziel die Wasserrückresorption in der Niere zu erhöhen (3,44,45).

AVP bindet in der Niere an den Vasopressin-2-Rezeptor (V₂R), der überwiegend basolateral in den Hauptzellen des Sammelrohres exprimiert wird (46). Außerdem kann AVP an zwei weitere Vasopressin-Rezeptorsubtypen V_{1a}R und V_{1b}R binden, und wirkt

dort vasokonstriktiv, thrombozytenaggregierend und ACTH-sekretionssteigernd. Diese Wirkungen entfaltet AVP außerhalb des Sammelrohres (47,48).

Beim V_2R handelt sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der aus 7 transmembranären Domänen besteht, die über je 3 extra- und intrazelluläre Schleifen verbunden sind. Der V_2R aktiviert über das stimulierende G-Protein G_s die Adenylylzyklasen 3, 5 und 6 (AC 3, 5 und 6). Hierbei handelt es sich um membranständige Enzyme, die aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellen. cAMP dient als intrazelluläres Signalmolekül. Eines der Zielmoleküle von cAMP ist die Proteinkinase A (PKA). Folge der Bindung von cAMP an die PKA ist eine Konfigurationsänderung, nach der sich aus dem Enzym, das aus einem Dimer aus regulatorischen Untereinheiten ($R1\alpha$, $R1\beta$, $R1\alpha$ oder $R1\beta$) und zwei katalytischen Untereinheiten ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$ oder $PrKX$) besteht, die katalytischen Untereinheiten lösen. Diese katalytischen Untereinheiten können nun unter ATP-Verbrauch nahegelegene Substrate phosphorylieren und somit weitere Prozesse starten. So verändert sich durch Konzentrationsänderungen des cAMP die Aktivität der PKA (49,50).

Nach Ausbleiben der AVP-Rezeptorstimulation sinkt durch Einfluss von Phosphodiesterasen, z.B. der Phosphodiesterase 4D (PDE4D), die cAMP-Konzentration. Diese führt zur Terminierung der Signalkaskade (51). Der V_2R wird nach AVP-Stimulation erstens ubiquitiniert, internalisiert und dem Proteasom zugeführt (s.u.), zweitens lysosomal abgebaut und drittens durch membranständige Metalloproteinasen gespalten (52–54).

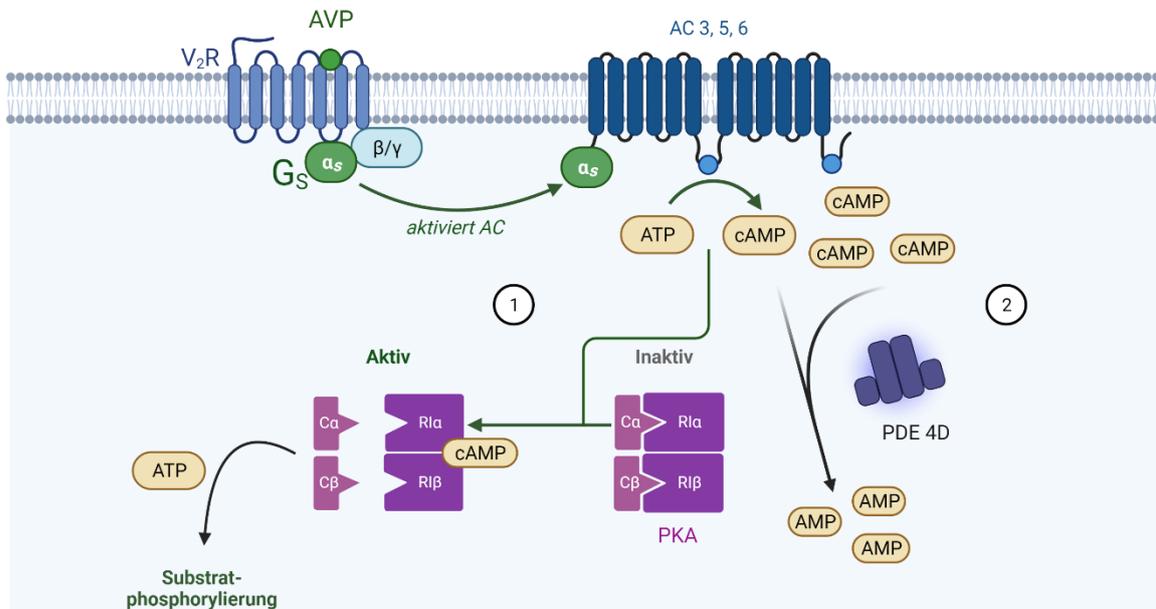


Abbildung 1.2 Die AVP-Signalkaskade

1. Eine Aktivierung des Vasopressin-2-Rezeptors (V₂R) durch Argininvasopressin (AVP) führt zur Stimulation der Adenylzyklasen (AC) 3, 5 und 6 via ein stimulierendes G-Protein (G_s). Die AC katalysiert die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP wiederum bindet an die Proteinkinase A (PKA), was zu einer Dissoziation der katalytischen Untereinheiten (Ca und Cβ) von den dimerisierten regulatorischen Untereinheiten (R1α oder R1β) führt. Die katalytischen Untereinheiten können nun unter ATP-Verbrauch Substrate phosphorylieren.
2. Die Phosphodiesterase PDE4D baut cAMP zu AMP ab und beendet so die Signaltransduktion.

1.5 Intrazellulärer Transport von AQP2

In den Hauptzellen des Sammelrohrs der Nieren besteht ein Gleichgewicht zwischen Endo- und Exozytose von AQP2 in die Zellmembran (s.u.).

Nach hormoneller Stimulation durch AVP kommt es zu einer Änderung des Phosphorylierungszustandes der Serin-Reste S256, S261, S264 und S269 des AQP2, deren Auswirkungen in der Folge genauer dargestellt werden. Das Gleichgewicht zwischen Exo- und Endozytose verschiebt sich zur Exozytose-ähnlichen Umverteilung und die Menge von AQP2 in der apikalen Zellmembran erhöht sich. In dem Maße steigt die osmotische Wasserpermeabilität der apikalen Zellmembran und der Netto-Wassereinstrom nimmt zu (55).

An diesem Prozess ist eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren und nachgeschaltete Prozesse beteiligt, von denen die für meine Fragestellung Wesentlichen im Folgenden genauer erläutert werden.

1.5.1 Vesikuläre Speicherung

AQP2 wird in supranukleären Vesikeln gespeichert, die neben vielen anderen Proteinen auch Rab11 exprimieren, so dass AQP2 vorwiegend in den subapikalen Rab11-positiven Zell-Kompartimenten nachzuweisen ist. Über Rab11-FIP2 interagieren die AQP2-tragenden Vesikel mit Myosin Vb (56). Eine der wesentlichen Funktionen von Myosin Vb ist die subzelluläre Verteilung von Recycling-Endosomen, indem es die Verbindung der Endosomen zu Aktin (s.u.) herstellt (57). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass AQP2 weder im endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat, noch im trans-Golgi Netzwerk oder Lysosom zu finden ist (58).

Auf den AQP2 exprimierenden Vesikeln lassen sich weiterhin sogenannte *vesicle-associated membrane proteins* (VAMPs), konkret VAMP2 und VAMP3 nachweisen. Wie in der von Jahn und Scheller 2006 dargestellten SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-factor attachment protein target receptor*)-Hypothese bilden die VAMPs (oder Synaptobrevine) den vesikulären Anteil eines Mechanismus, der die Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran vermitteln – den SNARE-Komplex. SNARE-Proteine sind unter anderem Syntaxin und *synaptosome-associated proteins* (SNAPs). Eine Interaktion der vesikulären SNARE-Proteine (v-SNARE bzw. R-SNARE) und der membranösen SNARE-Proteine (t-SNARE bzw. Q-SNARE) führt zur Bildung des SNARE-Komplexes und der Fusion der Vesikel mit der Zellmembran (59).

Munc18 scheint diese Interaktion zu steuern. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das Syntaxin in einer bindungsunfähigen Konfiguration hält. Löst sich diese Bindung zwischen Syntaxin und Munc18, kann Syntaxin mit den anderen SNARE-Proteinen interagieren und die Fusion vermitteln (60). Im Stoffwechsel von AQP2 handelt es sich bei den R-SNARE um VAMP2 und VAMP3 und bei den Q-SNARE um Syntaxin 3 und SNAP23. Die negative Regulation erfolgt durch Munc18b. Ein Funktionsverlust von VAMP2, VAMP3, Syntaxin und SNAP23 führt jeweils zu einer deutlichen Abnahme von AQP2 in der Zellmembran der Zellen. Dieser Effekt konnte auch durch eine Stimulation der Zellen mit Forskolin (FSK – s. Kapitel 3) nicht umgekehrt werden. Wird wiederum

Munc18b ausgeschaltet, kann eine deutliche Zunahme von AQP2 in der Zellmembran beobachtet werden (61).

1.5.2 Kompartimentalisierung durch Ankerproteine

Wie zuvor erwähnt wird die Funktion der PKA durch die Konzentration von cAMP gesteuert. Auch wenn eine basale Aktivität von nicht-dissoziierten Proteinkinasen A beschrieben ist (62,63), kommt es nach Trennung der katalytischen von den regulatorischen Untereinheiten zu einer wesentlichen Aktivitätszunahme (64). Damit die folgende Phosphorylierungsaktivität der katalytischen Untereinheiten zielgerichtet abläuft und bereits geringe cAMP-Konzentrationsveränderung die gewünschte Wirkung erzielen, muss eine räumliche Nähe zwischen der PKA und dem Zielsubstrat bestehen.

Diese direkte räumliche Nähe wird durch Proteinkinase A-Ankerproteine (*A-kinase anchoring proteins*; AKAP) sichergestellt. AKAPs sind Proteine, die darauf spezialisiert sind, die Interaktion zwischen PKAs und ihren Substraten zu vermitteln. Hierfür besitzen AKAPs eine Region, die sie mit der PKA verbindet. Abgesehen von dieser R-Bindungs-Domäne (RBD), die die N-terminale Dimerisierung/Docking Domäne an der regulatorischen Untereinheit der PKA bindet und in allen AKAPs konserviert ist, handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe mit mehr als 50, strukturell unterschiedlichen Mitgliedern. Je nach Lokalisation und Aufgabe besitzen sie variable Regionen für die Interaktion mit anderen Signalproteinen wie ACs, PDEs, Phosphatasen, Substrate der Kinasen, andere Kinasen und Ankerdomänen, mit denen sie mit einem zellulären Kompartiment verbunden sind (65,66).

Für die Regulation von AQP2 spielt das AKAP18 δ eine wesentliche Rolle, das auf denselben intrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden konnte wie AQP2 (67).

AKAP18 δ bindet neben der PKA die PDE4D3, die durch Hydrolyse des cAMP lokal, direkt am Zielsubstrat eine Feinregulation der cAMP-Konzentration und somit der Aktivität der PKA ermöglicht (51). Durch diesen Mechanismus kann die Verlagerung von AQP2 in die Zellmembran sehr genau gesteuert werden. Eine Trennung der PKA vom AKAP verhindert den Transport von AQP2 in die Zellmembran (68–70).

Wie sich herausstellte, bindet nicht nur AKAP18 δ direkt an die AQP2-tragenden Vesikel, sondern mindestens drei weitere AKAPs (AKAP220, AKAP-Lbc und STUB1). Diese sind sowohl an der Regulation der Lokalisation als auch der Proteinmenge beteiligt (71,72).

1.5.3 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett ist ein Netzwerk aus Mikrofilamenten im Zytoplasma aller Zellen, das den Zellen Formstabilität gibt und durch unzählige Interaktionen an vielen Signal- und Steuerungsprozessen innerhalb der Zellen beteiligt ist. Es besteht aus drei grundlegenden Komponenten: den Mikrotubuli, Mikrofilamenten (F-Aktin) und den Intermediärfilamenten. Jede dieser Komponenten hat unterschiedliche Eigenschaften und unterschiedliche Funktionen, insbesondere sind Mikrotubuli und das F-Aktinzytoskelett an der Kontrolle von AQP2 beteiligt.

Mikrotubuli sind Polymere des Tubulins, sehr rigide Hohlzylinder mit einem Durchmesser von ca. 25 nm, die typischerweise als individuelle Fasern auftreten. Ihre Hauptaufgaben liegen im intrazellulären Transport, in der Mitose und in der Fixierung der Organellen. Als Motorproteine, die sich entlang der Schienen, die die Mikrotubuli bilden, bewegen, dienen hierfür Kinesin und Dynein. Wobei ersteres für den anterograden und zweiteres für den retrograden Transport zuständig ist. Dynein interagiert mit Dynactin, das die Verbindung zwischen Dynein und den zu transportierenden Organellen bzw. Vesikeln herstellt (73,74). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Dynactin als auch Dynein mit den AQP2 tragenden Vesikeln co-exprimieren (75). Eine direkte Dynein-Hemmung führt dazu, dass die antidiuretische Wirkung nach AVP Stimulation ausbleibt, so dass davon auszugehen ist, dass die Mikrotubuli mit den dazugehörigen Motorproteinen eine wesentliche Rolle beim Transport von AQP2 an die Zellmembran spielen (76).

Aktinfilamente sind semiflexible, ca. 6 nm durchmessende Polymere, die als sehr variable drei-dimensionale Netzwerke auftreten. Von allen Strukturen des Zytoskeletts sind sie die dynamischsten und können sich sehr schnell auf äußere Reize hin verändern. Sie bestimmen die Form der Zelle, sind für Zellwanderung verantwortlich und regulieren Transportprozesse. Das globuläre Einzelmolekül wird G-Aktin genannt, das filamentäre Polymer F-Aktin (77). Die kleine GTPase RhoA stimuliert die Polymerisierung von G-Aktin zu F-Aktin (78). Das Aktinnetzwerk scheint eine physikalische Barriere für AQP2 tragende Vesikel zu bilden. Durch AVP-Stimulation kommt es zu einer PKA-vermittelten Phosphorylierung der GTPase RhoA an der Aminosäure S188, die deren Aktivität hemmt. Dies wiederum führt zu einer Depolymerisation des F-Aktin zu G-Aktin und einem Verschwinden der Barriere, was den Transport von AQP2 zur Zellmembran ermöglicht

(69,79,80). Hierdurch wird nicht nur die reine Transportfunktion, sondern auch die regulatorische Funktion des Zytoskeletts unterstrichen.

1.5.4 Phosphorylierungen von AQP 2

Lange galt die Aktivierung der PKA als der wesentliche Schritt in der cAMP-abhängigen Regulation des Wasserkanals (81). Aktuelle Forschung zeigt, dass es auch PKA-unabhängige Phosphorylierung und Mobilisierung von AQP2 gibt. So findet in mpkCCD Zellen mit einem *PKA-knock-out* nichtsdestotrotz eine Phosphorylierung von AQP2 statt (82).

Es sind sieben Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von AQP2 beschrieben, von denen 6 jeweils an Serin-Resten und eine an einem Threonin-Rest liegen (83). Für vier dieser Stellen (S256, S261, S264, and S269) sind die Folgen der Phosphorylierung weitestgehend erforscht, wobei jedoch neuere Forschungsergebnisse teilweise über Jahre bestehende Einigkeit in Frage gestellt haben.

Die Phosphorylierung an S256 wurde lange als das Signal für die Exozytose von AQP2 und als Voraussetzung für eine Phosphorylierung an S269 und S264 betrachtet (84,85). Neuere Forschung hat jedoch gezeigt, dass die Phosphorylierung an S256 eher eine Bedeutung für den Transport von AQP2 durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat hat und der Phosphorylierungsstatus an S256 die Endozytose steuert (23). Nichtsdestotrotz akkumuliert eine AQP2-Mutante, bei der außer S256 alle potenziellen Phosphorylierungsstellen des C-Terminus durch Punkt-Mutationen nicht-phosphorylierbar gemacht wurden, nach Stimulation mit FSK in der Zellmembran (83). Auch die Annahme, dass die Phosphorylierung von AQP2 an S256 ausschließlich durch die PKA erfolgt, hat sich nicht bestätigt (82). So können auch andere Kinasen wie die Calmodulin-regulierte Kinase 2, die Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 und die Proteinkinase G S256 phosphorylieren (86,87).

Die Phosphorylierung an S269 wurde lange als Exozytose steigernd eingeordnet (88), scheint aber wohl eher die Endozytose zu hemmen, indem es eine Interaktion einer PDZ-Domain mit dem Liganden unterbricht. Es wird jedoch in jedem Fall das Vorkommen von AQP2 in der Zellmembran erhöht (89,90).

Auch S264 wird durch AVP-Stimulation vermehrt phosphoryliert, die genaue Funktion dieser Phosphorylierung ist noch unklar. Als Voraussetzung hierfür scheint AQP2 an S256 phosphoryliert sein zu müssen (82,83).

Verlagerung von AQP2 aus intrazellulären Vesikeln in die apikale Zellmembran veranlasst. Dies ist mit Phosphorylierung von S256, S264 und S269 und Dephosphorylierung von S261 assoziiert. Entlang des osmotischen Gradienten tritt Wasser aus dem Primärharn durch die apikale Zellmembran in die Hauptzellen ein und verlässt die Zelle über die konstitutiv exprimierte AQP3 und 4 in der basolateralen Zellmembran. In der Folge wird der Urin konzentriert. Aktivieren Hormone wie PGE₂, ATP oder Dopamin ihre Rezeptoren, wirken sie der AVP-Stimulation über ihre Rezeptoren entgegen, indem sie u.a. eine Ubiquitinierung von AQP2 an K270 verursachen, was zur Internalisierung des Proteins und zum Abbau im Lysosom oder Proteasom führt. Im Zuge der Endozytose kommt es zur erneuten Phosphorylierung an S261, diesmal durch die PKC. AC: Adenylatecyclase; AVP: Argininevasopressin; CREB: cAMP-responsive element-binding protein; Dop: Dopamin; PKA: Proteinkinase A; PKC: Protein kinase C; Ub: Ubiquitin; V2R: Vasopressinrezeptor Typ 2 (23)

1.5.5 Glykosylierung von AQP2

Viele verschiedene Proteine werden posttranslational durch kovalente Bindung von Kohlenhydratgruppen zu Glykoproteinen umgewandelt. Als Bindungsstellen eignen sich hierfür eine Amidgruppe in der Seitenkette des Asparagins (N-glykosidische Bindung), oder das Sauerstoffatom in der Seitenkette von Serin oder Threonin (O-glykosidische Bindung). Für die N-glykosidische Bindung muss Asparagin (N) in einer Kombination mit Serin (S) oder Threonin (T) vorliegen, die folgende Form hat: N-X-S/T. „X“ kann hierbei jede Aminosäure außer Prolin sein (93).

Die Glykosylierung der Proteine findet im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und im Golgi-Komplex statt, wo enzymatisch gesteuert die Kohlenhydratgruppen von langkettigen Lipidmolekülen auf wachsende Proteinketten übertragen werden. Die Glykosylierungen haben unterschiedliche Funktionen, unter anderem versetzen sie Proteine in eine bestimmte Faltung und helfen dabei, sie zu ihrem Bestimmungsort in der Zelle zu steuern (94).

Auch AQP2 wird posttranslational glykosyliert. Die Zielaminosäure ist Asparagin-123, die komplex N-glykosyliert wird. Aus dem 29 kD schweren nicht-glykosylierten Protein können eine High-Mannose-Form, die 30 kD wiegt und komplex-glykosylierte Formen, die 35-50 kD wiegen, entstehen. Ca. ein Drittel des intrazellulär vorliegenden AQP2 ist glykosyliert.

Die genaue Funktion dieser Glykosylierungen ist noch unklar, auch weil in unterschiedlichen Zellmodellen unterschiedliche Glykosylierungen erfolgen (95,96). Es gibt aber Hinweise darauf, dass die Glykosylierung von AQP2 für den Austritt des Proteins aus dem Golgi-Apparat und den Transport zur Zellmembran notwendig ist (97).

Eine der Mutationen in der rezessiven, vererbaren Form des Diabetes insipidus ist AQP2-T125M, bei der Threonin an Stelle 125 durch Methionin ausgetauscht wird. Somit geht die Zielsequenz für eine Glykosylierung verloren. Als Folge kann bei betroffenen Patienten AQP2 nicht mehr in die Zellmembran transloziert werden (98).

1.6 Induktion der Proteinexpression

Die zelluläre Wirkung der Hormone beschränkt sich nicht nur auf die Wirkung auf das bereits vorhandene Zielprotein und dessen Transport in der Zelle. Sie regulieren über Steuerung der Transkription auch die Proteinexpression und dadurch die vorliegende Proteinmenge.

Im Rahmen der Transkription werden die in den Genen der DNA gespeicherten Informationen in RNA-Synthese umgesetzt. Die DNA dient hierbei als Matrize, die die RNA-Polymerase nutzt, um Kopien der DNA in Messenger-RNA (mRNA) umzuwandeln. Die RNA-Polymerase sucht sich einen im DNA-Strang gespeicherten Promoter und setzt an dieser Stelle an. Sie entwindet hiervon ausgehend die DNA-Doppelhelix und synthetisiert einen zur DNA komplementären RNA-Strang. Dies wird so lange durchgeführt, bis die RNA-Polymerase auf ein Terminationssignal stößt.

Im Bereich der Promoter gibt es bestimmte DNA-Motive, die nach Bindung von Transkriptionsfaktoren die Aktivität der RNA-Polymerase und somit die Menge der mRNA dieses Gens erhöht.

Hormone können rezeptorvermittelt entweder direkt (lipophile Hormone: Schilddrüsenhormone, alle Steroidhormone, 1,25-(OH)₂-Cholecalciferol und die Eicosanoide) oder indirekt über intrazelluläre Signaltransduktion (hydrophile Hormone: AVP und alle weiteren, nicht zuvor genannten, Hormone) auf die Transkription einwirken. Lipophile Hormone können im Komplex mit ihrem intrazellulären Rezeptor direkt als Transkriptionsfaktor fungieren, hydrophile Hormone aktivieren eine Signalkaskade an deren Ende eine Aktivierung eines Transkriptionsfaktors stehen kann (94,99).

Für AVP ist beschrieben, dass es die Transkriptionsrate von AQP2 und somit die intrazellulär nachweisbare mRNA Menge erhöht (100,101).

Auch wenn AVP theoretisch noch zahlreiche andere Gene beeinflussen kann, scheint jedoch eine hohe Selektivität für das AQP2-Gen zu bestehen (102). Wie oben bereits beschrieben, erhöht AVP durch Bindung an den V₂R die intrazelluläre cAMP

Konzentration. cAMP wiederum aktiviert das *cAMP-responsive-element-binding protein* (CREB), das über Bindung an das *cAMP-responsive-element* (CRE) die Transkriptionsrate des AQP2-Gens erhöht (103). Lange Zeit war es allgemein akzeptiert, dass dies der wesentliche Mechanismus ist, der zu einer langfristigen Erhöhung der AQP2-Menge nach hormoneller Stimulation führt. In letzter Zeit wurden jedoch einerseits zahlreiche andere Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die AQP2-Transkription beeinflussen (104), andererseits wurde beschrieben, dass nach längerer Stimulation mit AVP die Aufgabe von CREB und CRE durch den PKA-unabhängigen *nucleotide-exchange-factor* (GTP-Austauschfaktor) Epac1 übernommen wird (105). Unabhängig davon über welchen Transkriptionsfaktor Vasopressin die Transkription von AQP2 erhöht, ist die hierdurch ausgelöste Proteinmengenvermehrung frühestens nach Stunden, mit einem Maximum nach frühestens einem Tag, nachzuweisen (106). Die durch uns beobachtete Proteinmengenvermehrung nach 30 Minuten war nicht durch das bisherige Wissen über die Mechanismen der Transkription zu erklären.

1.7 Steuerung der Translation

Der Zweck der Translation ist es, die in der mRNA kopierten Informationen der DNA in die Bildung von Proteinen zu überführen. An der Proteinbiosynthese sind sowohl Proteine als auch RNA – insgesamt mehr als 100 Makromoleküle - in jeweils unterschiedlichen Funktionen beteiligt. Ort der Translation ist das Ribosom, das selbst aus RNA und Proteinen zusammengesetzt ist.

Die Translation muss zwei sehr schwer in Einklang zu bringende Qualitätserfordernisse erfüllen: sie muss einerseits sehr schnell sein, um den teilweise hohen Proteinumsatz zu ermöglichen (s.u.) und sie muss exakt sein, damit die entstehenden Proteine auch zuverlässig ihre Funktion aufnehmen können. Pro Ribosom können ca. zwei Aminosäuren pro Sekunde verbunden werden. Da das gleiche Proteine parallel an mehreren Ribosomen gleichzeitig synthetisiert wird, kann ein Vielfaches dieser Rate erreicht werden. Etwa jede tausendste Aminosäure wird dabei fehlerhaft eingebaut. In der Summe ergibt sich ein System, das innerhalb kürzester Zeit auch komplexe, langkettige Proteine mit großer Präzision herstellen kann.

Im ersten Schritt werden die einzelnen Aminosäuren an die korrespondierende Transport-RNA angefügt (tRNA). Auch dieser Schritt ist hochpräzise und nur etwa jede tausendste Aminosäure wird an die falsche tRNA angeknüpft. Am entgegengesetzten

Ende zum Bindungspunkt der jeweiligen Aminosäure an der tRNA befindet sich die Anticodon-Schleife. Hier sitzt das Basentriplet, das über die Bindung mit einem, auch aus drei Basen bestehenden, Codon der mRNA die Translation der Informationen der mRNA in eine Aminosäuresequenz sicherstellt.

Jedes Ribosom besitzt drei Bindungsstellen für tRNA. An der Peptidyl-(P-)Stelle ist die tRNA gebunden, die mit der Aminosäure verbunden ist, die verlängert werden soll. An der Aminoacyl-(A-)Stelle bindet nun die tRNA, die die nächste Aminosäure für die Sequenz liefert. Es kommt zu einer Reaktion zwischen den beiden Aminosäureresten, an deren Ende eine Verlängerung der Peptidkette mit Transfer der Aminosäure von der tRNA an der P-Stelle auf die tRNA auf der A-Stelle steht. Die mRNA wird relativ zur tRNA verschoben, so dass die tRNA von der A-Stelle weiter zur P-Stelle wandert und die tRNA von der P-Stelle weiter zur Exit-(E-)Stelle wandert, wo sie das Ribosom verlässt.

Die Interaktion zwischen mRNA und tRNA bestimmt somit, welche Aminosäure in die Peptidkette eingebaut wird, wobei, laut Wobble-Hypothese, insbesondere die ersten beiden Basen jedes Basentriplets die Bindung zwischen mRNA und tRNA bestimmen und die dritte Base häufig wechselnd sein kann (94).

Eine Regulation der Translation erfolgt durch microRNA (miRNA): kurze Basenfolgen, die durch Anheften an die mRNA nicht nur einen Spleißvorgang initiieren, sondern auch die Translation entweder beschleunigen, hemmen oder sogar komplett verhindern (107).

Dieser Regulationsmechanismus wird durch viele unterschiedliche, unter anderem auch hormonelle Faktoren, beeinflusst und ist Gegenstand aktueller Forschung (108,109).

Es ist sehr wenig über die Translationsregulation von AQP2 bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass in den Hauptzellen der Niere Desmopressin (dDAVP) die Transkription von insgesamt neun miRNA-Molekülen erhöht und dass sich in der mRNA-Sequenz von AQP2 Zielsequenzen für vier miRNA-Moleküle befinden (u.a. miR-32 und miR-137). Mit dDAVP stimulierte Zellen, die zusätzlich mit miR-32 und miR-137 transfiziert werden, zeigen eine deutlich verminderte Transkription und Translation von AQP2. Jedoch sind weder miR-32 noch miR-137 unter den neun miRNA-Molekülen, die durch AVP reguliert werden (110). Dieser Aspekt der fehlenden Kongruenz zwischen miRNA Molekülen, die durch dDAVP Stimulation vermehrt transkribiert werden, und miRNA Molekülen, die die Translation von AQP2 regulieren, ist beispielhaft dafür, dass die Translationsregulation ein noch weitgehend unerforschtes Feld der AQP2-Forschung ist.

1.8 Abbau der Proteine

Die Proteinmenge in den Zellen wird durch ständige Neusynthese (s.o.) bei gleichzeitigem Abbau im Gleichgewicht gehalten. Einige Proteine sind sehr stabil, so dass der Kreislauf zwischen Synthese und Abbau sehr langsam abläuft, andere Proteine haben eine sehr kurze Halbwertszeit und werden nach der Synthese schnell wieder abgebaut. Stoffwechselproteine und Proteine mit einer Steuerungsfunktion haben eher kurze Halbwertszeiten (z.B. ca. 11-12 Minuten für die Ornithin-Decarboxylase), Strukturproteine wiederum haben sehr lange Halbwertszeiten (z.B. mehrere Jahre für Kollagen und die Lebenszeit des Organismus für Crystallin) (94). Die Halbwertszeit von Aquaporinen beträgt wenige Stunden, was einen sehr aktiven und genauestens regulierten Synthese- und Abbauprozess voraussetzt (111).

Proteine können entweder mono- oder oligoubiquitiniert im Rahmen der Autophagozytose in Lysosomen verdaut werden oder sie werden polyubiquitiniert und dem Proteasom zugeführt (112). Die Markierung mit Ubiquitin erfolgt durch eine kovalente Bindung an Lysin-Reste, die durch die Enzyme E1, E2 und E3 vermittelt wird (94).

Auch AQP2 wird aus der Zellmembran entfernt und durch unterschiedliche Mechanismen abgebaut, ausgeschieden oder dem Protein-Recycling zugeführt.

Die Entfernung aus der Zellmembran erfolgt entweder per Endozytose oder per Exozytose. In der Exozytose wird AQP2 über *multi-vesicular-bodies* aus der apikalen Zellmembran in den Urin sezerniert und darüber ausgeschieden. Die physiologische Bedeutung dieses Prozesses ist noch nicht erschlossen (113).

Die Endozytose von AQP2 erfolgt Clathrin-vermittelt und führt entweder zum Abbau des Proteins oder es wird durch das im AQP2-Vesikel befindliche Rab11 und das Adapter-Protein Rab11-FIP2 in das Protein-Recycling eingesteuert (56).

Eine Hemmung sowohl des lysosomalen durch Chloroquin als auch des proteosomalen Abbauweges durch MG132 in IMCD-Zellen führen zu einer Hemmung des AQP2-Abbaus, so dass davon auszugehen ist, dass AQP2 sowohl über das Proteasom als auch über das Lysosom abgebaut wird (92,114,115).

Die Ubiquitinierung von AQP2 an der Aminosäure Lysin 270 (K270) spielt hier eine wesentliche regulatorische Rolle (116).

Der Abbau von AQP2 wird als Gegenstand der Diskussion in ebendiesem Kapitel genauer erläutert.

1.9 Klinische Bedeutung der AVP-AQP2 Signalkaskade

Der Diabetes insipidus ist eine Erkrankung, die mit einer stark erhöhten Diurese und somit ebenfalls stark erhöhtem Durstgefühl einhergeht. Die betroffenen Patienten scheiden große Mengen ($>2 \text{ l/m}^2$ Körperoberfläche in 24 Stunden $\hat{=}$ $>40\text{-}50 \text{ ml/kg}$ Körpergewicht pro Tag bei Erwachsenen) stark verdünnten ($<250 \text{ mmol/l}$) Urins aus. In klinisch ausgeprägten Fällen können bis zu 20 l Urin ausgeschieden werden. Ursache hierfür ist eine Störung in der Harnkonzentration (117–119).

Unterschieden werden vier Typen von Diabetes insipidus:

1. der Diabetes insipidus centralis, in einer angeborenen und erworbenen (z.B. Schädel-Hirn-Traumata, intrakranielle Tumoren, Meningitis) Form, der mit einer gestörten Sekretion von AVP einhergeht,
2. der renale Diabetes insipidus, in einer angeborenen und erworbenen (z.B. polyzystische Nierenerkrankung, Pyelonephritis, als Nebenwirkung bei ca. 20-50% der Patienten unter Lithium-Therapie) Form, der mit einem gestörten Ansprechen der Sammelrohrzellen auf AVP einhergeht,
3. der dipsogene Diabetes insipidus, der durch stark erhöhte Flüssigkeitsaufnahme zum Beispiel im Rahmen einer psychiatrischen Erkrankung charakterisiert ist und
4. der reversible Diabetes insipidus der Schwangerschaft, der mit einem relativen Mangel an ADH bedingt durch die plazentare Produktion von Oxytocinase/Vasopressinase einhergeht (120–123).

Während der zentrale Diabetes insipidus und der reversible Diabetes insipidus der Schwangerschaft mit dem synthetischen AVP-Analogon dDAVP in der Regel gut therapierbar sind, gibt es insbesondere für die heterogene Gruppe der renalen Diabetes Insipidus-Erkrankungen keine Therapie, die zu einer wesentlichen Beschwerdebesserung führt. Für erworbene renale Diabetes insipidus-Formen, zum Beispiel im Rahmen einer Amyloidose, polyzystischen Nierenerkrankung oder Medikamentennebenwirkungen (v.a. Lithium), steht der Versuch einer kausalen Therapie der Grunderkrankung im Vordergrund. Dasselbe gilt für Elektrolytverschiebungen wie Hypokaliämien oder Hyperkalzämien. Gelingt dies nicht, wird genauso wie bei den erblich bedingten Formen des renalen Diabetes insipidus vornehmlich supportiv therapiert. Thiaziddiuretika, eine natrium- und eiweißarme Diät und nicht-steroidale Antirheumatika

(NSAR) können die ausgeschiedene Urinmenge und somit die notwendige Flüssigkeitsaufnahme reduzieren (124,125).

Für den besonderen Fall eines Lithium-induzierten renalen Diabetes insipidus steht eine Therapie mit Amilorid zur Verfügung (126).

Das klinische Gegenbild zum Diabetes insipidus sind Erkrankungen, die mit einer erhöhten Wasserretention einhergehen. Laborchemisches Korrelat der Wasserretention ist eine Hyponatriämie. Die Hyponatriämie ist die häufigste Elektrolytstörung hospitalisierter Patienten (127).

Eine Erkrankung, die direkt in die AQP2 Regulation durch ADH eingreift, ist das Schwartz-Bartter-Syndrom bzw. das Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (SIADH), bei der - losgekoppelt vom Kontrollmechanismus der Blutosmolalität - eine zu große Menge an AVP sezerniert wird. Charakteristisch ist vor allem die mit der vermehrten Wasserretention einhergehende Hyponatriämie, die auch prognostische Bedeutung hat. Ursachen können sowohl traumatisch, entzündlich als auch medikamentös sein. Am häufigsten tritt es jedoch als paraneoplastisches Syndrom insbesondere des kleinzelligen Bronchialkarzinoms auf (8,128).

Eine Herzinsuffizienz führt durch Senkung des Herzzeitvolumens oder durch periphere Vasodilatation und dadurch Abfall des systemischen Blutdruckes sowohl zu einer Erhöhung der AVP-Sekretion als auch zu einer Zunahme der AQP2-Expression (129–131).

Die zugrunde liegenden Mechanismen sind komplex. Neben AVP sind mit dem Renin-Angiotensin-System und Obestatin noch weitere hormonelle Einflüsse beteiligt (132,133). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass das Nervensystem die AQP2 Expression in einer Herzinsuffizienz beeinflusst (134,135). Sowohl prä-therapeutisch als auch therapeutisch ist eine Hyponatriämie prognostisch für schwere Verläufe mit vermehrten Hospitalisierungen und erhöhter Mortalität (135).

Auch eine fortgeschrittene Leberzirrhose mit Aszites - exemplarisch für alle Krankheiten, die mit einer portalen Hypertension einhergehen - führt zu einer Fehlregulation von AQP2. Durch Vasodilatation, insbesondere im Splanchnicus-Versorgungsgebiet, und Bildung von Umgehungskreisläufen kommt es zu einem Abfall des systemischen Blutdruckes. Dies führt unter anderem zu einer nicht-osmotischen AVP-Sekretion und einer zunehmenden Resorption freien Wassers. Auch hier bildet die folgende Hyponatriämie einen wichtigen prognostischen Faktor für einen schweren Krankheitsverlauf (136).

Gemeinsamkeiten sowohl des renalen Diabetes insipidus als auch der Erkrankungen, die mit einer vermehrten Wasserretention einhergehen, sind einerseits die fehlende Verfügbarkeit von Medikamenten, mit denen man gezielt in die Regulation der Wasserhomöostase eingreifen kann, andererseits, dass im Pathomechanismus der letzte Schritt eine Fehlregulation von AQP2 ist. Um bei diesen Krankheitsbildern zielgerichtete Medikamente entwickeln zu können, ist es unerlässlich die genauen Details der intrazellulären Signalkaskaden zu verstehen. Auf diesem Wege können dann etwaige Angriffstellen für neue Therapeutika identifiziert werden.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Wie in der Einleitung dargestellt, unterliegt die Wasserhomöostase einer komplexen Regulation durch zahlreiche, miteinander verbundene Mechanismen, die auf den Wasserkanal AQP2 in den Hauptzellen des Sammelrohres wirken. Störungen in diesem System führen zu unterschiedlichen Krankheitsbildern, die entweder mit zu viel oder zu wenig Flüssigkeit im Körper einhergehen und regelmäßig mit Verschiebungen im Elektrolythaushalt verbunden sind. Für alle diese Krankheitsbilder existieren nach wie vor keine Medikamente, die gezielt, selektiv und nebenwirkungsarm in die Steuerung von AQP2 und damit in die Regulation des Wasserhaushaltes eingreifen.

Um derartige Medikamente entwickeln zu können, ist es notwendig, die Faktoren und Schritte, die die Regulation ausmachen, im Detail zu verstehen, um mögliche Angriffspunkte zu identifizieren und zu charakterisieren.

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Beobachtung war, dass eine Stimulation von IMCD-Zellen mit AVP bereits nach einem kurzen Zeitraum von 30 Minuten zu einer Erhöhung der Proteinmenge von AQP2 führt. Als die Versuche für diese Doktorarbeit durchgeführt wurden, gab es für diese Beobachtung keine Erklärung.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, diese Beobachtung zu verifizieren, und zu überprüfen, welche Rolle die Auswirkungen der AVP-Stimulation spielen. Es galt zu klären, ob eine Änderung des Phosphorylierungs-Zustandes von AQP2 eintritt, welche Bedeutung dem intrazellulären Signalmolekül cAMP und der Proteinkinase A zukommt und ob eine Aktivierung einer der Schritte der Proteinbiosynthese für diese Beobachtung verantwortlich sind.

Falls keine der bekannten AVP-Wirkungen die beobachtete Proteinmengenvermehrung erklärt und somit ein bisher nicht beschriebener Mechanismus zu ebendieser führen muss, sollte eruiert werden, welcher Mechanismus hierfür in Frage kommt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Gerät	Art	Anbieter
1092	Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
4000QTRAP®	Massenspektrometer	AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt
ArrayScan VTI HCS reader microscope	Automatisches Mikroskop	Cellomics, Thermo Fischer Inc., Pittsburgh, PA; USA
Axiovert 25	Inverses Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
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
Eppendorf Research© plus	Einkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg
EnSpire® 2300	Mikroplatten-Lesegerät	PerkinElmer, Rodgau
Fireboy eco	Sicherheitsbrenner	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
KS 15 A control	Kompaktschüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
LSM 510 META	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Lumilmager™ 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
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	Semi-dry Western Blot Modul	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Universal 320 R	Kühlzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Vacusaft	Absaugsystem	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald

Software	Anbieter
BioRender	biorender.com
Excel 365	Microsoft Corporation, Redmond, WA; USA
Illustrator 24.2.1	Adobe Systems Inc., San Jose, CA; USA
Inkscape 1.02	inkscape.org
LumiAnalyst 3.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Photoshop CS6	Adobe Systems Inc., San Jose, CA; USA
Powerpoint 365	Microsoft Corporation, Redmond, WA; USA
Readcube Papers	Digital Science & Research Solutions Inc., 625 Massachusetts Avenue; Cambridge, MA 02139
Word 365	Microsoft Corporation, Redmond, WA; USA

2.1.2 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
Laemmli-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% Natriumdodecylsulfat
Lysepuffer	10 mM KH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM Benzamidine, 0.5 mM Phenylmethanesulfonylfluorid, 3.2 µg/ml Trypsin Hemmer I-S, 1.4 µg/ml Aprotinin; 1ml
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 KH ₂ PO 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-AcetatEDTA-(TAE)- Puffer	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 1.14% (v/v) Eisessig

Die Puffer und Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser hergestellt.

2.1.3 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
dbcAMP	Biolog, Bremen
AVP	Dr. M. Beyermann (Leibnitz-Institut für Molekulare Pharmakologie Berlin)
Actinomycin D	Calbiochem Darmstadt
Cycloheximid	Calbiochem Darmstadt
Forskolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Schnellendorf
H89	Calbiochem Darmstadt
MG 132	Sigma Deisenhofen

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Spezies und Verdünnung	Quelle
AQP2 H27	Kaninchen 1:600	Hausintern (137)
AQP2 pS256	Kaninchen 1:250	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
AQP2 C-Terminus (C-20)	Maus 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
AQP2 N-Terminus (N-20)	Maus 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Sekundärantikörper		
anti-Kaninchen F(ab)2-IgG POD	Esel, 1 : 20 000	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, UK
anti-Ziege IgG POD	Esel, 1 : 20 000	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, UK

2.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Medium	Bezugsquelle
HEK293 Humane embryonale Nierenzellen	DMEM 5% fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml bzw. 100 µg/ml)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Die Versuchsprotokolle wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, genehmigt. Die Tierhaltung entsprach den regionalen und internationalen Voraussetzungen. Erwachsene Mäuse (C57/Bl6) wurden von Charles River Laboratories, Germany GmbH, Sulzfeld, bezogen und erhielten eine standardisierte Ernährung und Leitungswasser. Die Mäuse wurden per Zufallsverfahren in zwei Gruppen eingeteilt:

1. Kontrollgruppe, die mit der Transportersubstanz DPBS für 30, 60 und 120 Minuten behandelt wurden und
2. Studiengruppe, die mit dDAVP (1 ng/g Körpergewicht) für 30, 60 and 120 Minuten behandelt wurden.

Jede Gruppe bestand aus 5 Tieren. Am Ende der Experimente wurden die Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital getötet, die Nieren entfernt und das Nierenmark präpariert.

2.2.2 Präparation von primären innermedullären Sammelrohr- (IMCD-) Zellen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Anbieter der Komponenten
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% nichtessenzielle 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

Zur Präparation von IMCD-Zellen wurden die in der beidseitigen Nephrektomie entnommenen Nieren in 4°C kaltes DPBS-GN überführt. Das innere Nierenmark wurde unter sterilen Kautelen präpariert und in einer Gewebekulturschale mit wenig DPBS-GN auf Eis gesammelt. Es erfolgte eine grobe Zerkleinerung mit Hilfe einer Rasierklinge, um die Oberfläche für den Enzymverdau zu vergrößern (137). Anschließend wurde die Gewebesuspension in ein Zentrifugenröhrchen mit Enzymlösung überführt und bei 220 U/min im Wasserbad bei 37°C für 1.5 bis 2 h geschüttelt. Dem Verdau folgte eine intensive Dissoziation der Zellsuspension mit einer Pasteurpipette. Enzyme wurde durch Zentrifugieren (5 min bei 300xg, 16°C) und zweimaliges Waschen mit DPBS-GN entfernt. Das entstandene Zellpellet wurde in IMCD-Medium aufgenommen, re-suspendiert und auf Typ-IV-Collagen-beschichteten Schalen- bzw. Zellkulturplatten ausgesät. Durch Zusatz von dbcAMP wird eine stabile Expression von AQP2 erreicht. Am ersten und jedem zweiten bis dritten weiteren Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden eine Woche nach der Präparation verwendet. Als Vorbereitung auf das Experiment erfolgte am Tag zuvor der Wechsel auf dbcAMP-freies Medium unter Zusatz von 50 µM Indometacin, um die basalen cAMP-Spiegel zu senken.

2.2.3 Immunpräzipitation

IMCD- und HEK 293-Zellen, die transient AQP2 exprimieren, wurden auf 60mm Schälchen angezchtet. Es erfolgte die Behandlung mit Reagenzien, wie in den einzelnen Experimenten ausgewiesen.

Für die Immunopäzipitation von AQP2 wurden die Zellen mit Lysepuffer für 15 Minuten auf Eis permeabilisiert. Die Zelllysate wurden aufgefangen und im Ultraschall-Homogenisator mit 6 Impulsen (65% Amplitude) zerkleinert.

Zelltrümmer wurden per Zentrifugation entfernt (12,000 x g, 15 min, 4°C). 500 µl des Zellüberstandes wurden mit Protein-A Sepharose inkubiert. Es folgte die Behandlung mit polyklonalem anti-AQP2 Kaninchen Antiserum H27 (138). Es wurden 1 µl-Antikörper pro 350 µg Sepharose-Kügelchen in 50 µl Lysepuffer angesetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C rotiert. Die Kügelchen wurden zweimal mit 500 µl Lysepuffer gewaschen. Es wurden 120µl Laemmli-Puffer hinzugefügt und der Probenansatz für 10 Minuten gekocht.

2.2.4 Western Blot

Mit Hilfe der Western-Blot Technik wurden zelluläre Proteine analysiert. Hierfür wurden Zelllysate gewonnen und am Ultraschall-Homogenisator mit 6 Impulsen (65% Amplitude) behandelt. Eine Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte mit Hilfe einer Zentrifugation (22.500xg, 4°C, 10 min). Die Proben wurden unter Zusatz von Probenpuffer 10 min bei 70°C erhitzt. In einem 12% Polyacrylamid-Gel (SDSPAGE) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung nach Größe mit einem anschließenden Transfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF, Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus) mittels Semidry-Blot (51). Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde ein Proteinmarker mit vorgefärbten Standardproteinen (Precision Plus Protein Standards, Dual Color, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) genutzt. Zum Nachweis von AQP2 wurden Antikörper, die gegen den C- (C-20, Santa Cruz) bzw. N-Terminus (N-20; Santa Cruz) von AQP2 gerichtet sind, genutzt. Die Detektion erfolgte mit sekundären anti-Ziege- Meerrettichperoxidase-(POD)-gekoppelten Antikörpern. An S256 phosphoryliertes AQP2 wurde mit phospho-spezifischen polyklonalen Kaninchenantikörpern und den entsprechenden Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die jeweiligen Ladekontrollen sind in der Beschreibung der Ergebnisse aufgeführt. Die Proteinmengen wurden densitometrisch nach Lumineszenzreaktion mit Lumi-Light Western Blotting Substrate (LumiAnalyst 3.0 Software, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bestimmt.

2.2.5 Real-Time quantitative PCR

mRNA aus dem inneren Nierenmark von Mäusen wurde mit TRIZOL (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Um auszuschließen, dass genomische DNA in der Probe verbleibt und so nach der in-vitro-Transkription die Menge an synthetisierter cDNA verfälscht, folgte auf der Extraktionssäule eine 15-minütige Behandlung mit DNase I (Invitrogen, Karlsruhe, 2,27 U/µl). Die mRNA wurde mit 30µl RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt (Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Freiburg).

Unter Zuhilfenahme eines cDNA-Synthese-Kits (SuperScript™ *First-Strand Synthesis System for reverse transcription-PCR*, Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte nun die reverse Transkription.

In einem 20 µl Ansatz wurden ca. 0,8 µg RNA, 0,5 µg Oligo dT Primer Mix und 10 mM dNTPs 5 min bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Es wurden 20% 5x RT-Puffer, 0,1 mM DTT, 1 µl RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, 40 U/µl) hinzugegeben und die Lösung für 2 min auf 42°C erwärmt. Nach Zugabe von 1 µl reverser Transkriptase (SuperScript™, 50 U/µl) erfolgte die reverse Transkription für 50 min bei 42°C und abschließend für 15 min bei 70°C.

Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung der so erhaltenen cDNA erfolgte die Abkühlung auf Eis und schließlich Lagerung bei -20°C.

Zur Analyse des Zielgens AQP2 und des Referenzgens GAPDH wurden TaqMan®-Genexpressions-Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet.

Die Proben wurden in 15 µl-Doublets aufgetragen. Der Reaktionsansatz bestand aus 50% 2x TaqMan® FAST Universal PCR Master Mix, 5% [v/v] 20x TaqMan® Gene Expression Assay Mix, 5% [v/v] 20x TaqMan® Gene Expression Assay Mix [*GAPDH*], ca. 0,1 µg cDNA) und wurde durch Klebefolie vor Verdunstung geschützt. In 45 Zyklen mit 3 Sek Denaturierung bei 95°C und 30 Sek. Annealing und Elongation bei 60°C wurden die Proben vervielfältigt (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Neben den Reporterfluoreszenzfarbstoffen FAM (6-Carboxyfluoreszin, Emission bei 518 nm [grün]) und VIC (geschützter Markenfarbstoff von Applied Biosystems für GAPDH, Emission bei 550 nm [grün]) waren die Gensonden auch mit einem Quencher, TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, Emission bei 582 nm [gelb]), markiert. ROX (6-Carboxy-X-rhodamin, Emission bei 602 nm [orange]) diente zum Herausrechnen eventueller Pipettierfehler als passiver Referenzfarbstoff. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach Anregung bei 488 nm (blau) am Ende jedes Zyklus mit Hilfe der Applied Biosystems Sequence Detection Software. Für Referenz- und Zielgen wurden pro Probe Ct-Werte ermittelt. Die Ct-Werte geben denjenigen PCR-Zyklus an, bei dem eine definierte Fluoreszenzschwelle in der exponentiellen Phase der cDNA-Synthese überschritten wird. Die Auswertung und Datenquantifizierung erfolgten mit Hilfe von Applied Biosystems Sequence Detection Software und Microsoft Excel unter Verwendung der komparativen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) (139).

2.2.6 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

HEK-293 Zellen, die auf Zellkulturschalen mit 100 mm Durchmesser angesetzt wurden, wurden mit 2,5µg Plasmid-DNA und 50µl Lipofectamine™ transfiziert und 24 Stunden belassen. Die Zellen wurden zweifach mit PBS bei einem pH von 7,4 gewaschen. Es erfolgte die Biotinylierung der Oberflächenproteine mit 4 ml einer Lösung, die 0.5 mg/ml EZ-Link™ Sulpho-NHS-Biotin in PBS (pH 7.4) enthielt (30 Minuten auf Eis). Der Prozess wurde durch den Austausch der Biotin-Lösung durch eine Stopp-Lösung (50 mM NH₄Cl in PBS) beendet.

Die Zellen wurden 10 Minuten in der Stopp-Lösung inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit 3 ml Lyse-Puffer versetzt (0.5 mM PMSF, 0.5 mM Benzamidin, 1.4 µg/ml Aprotinin, 3.2 µg/ml Trypsin Hemmer, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1%, v/v, Triton X-100, 0.1% SDS und 50 mM Tris/HCl, pH 8.0). Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten. Anschließend wurden unlösliche Zellreste per Zentrifugation entfernt (20 Minuten bei 20000 g). Aus dem Überstand wurden die biotinylierten Proteine während einer 90-minütigen Inkubation mit 50µl NeutrAvidin™ Agarose-Kügelchen gesammelt. Die Kügelchen wurden sedimentiert (5 Sekunden bei 17000 g), dreimal mit 1ml Waschpuffer (500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5%, v/v, Triton X-100, 0.1%, w/v, SDS und 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) und einmal mit Waschpuffer 2 (1 mM EDTA, 0.5%, v/v, Triton X-100, 0.1%, w/v, SDS und 50 mM Tris/HCl, pH 7.4) gewaschen. Die Trennung der Proteine von den Agarose-Kügelchen erfolgte mit 80 µl Laemmli-Puffer. Es folgte die Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung im 10% Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE). AQP2 (C-20) und Cadherin (Membranprotein, Ladekontrolle) wurden dann mittels Western Blot detektiert und densitometrisch quantifiziert (LumiAnalyst 3.0 Software, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) (140).

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

Um ein AQP2-Konstrukt unter der Kontrolle des CMV-Promoters zu erhalten, wurde ein Abschnitt von GFP-AQP2, das den CMV-Promoter beinhaltet, verwendet. Die GFP-Sequenz wurde durch ein Fragment des Vektors pEGFP-N1, das den CMV-Promoter ohne GFP enthält, ersetzt. Es wurden die Restriktionsschnittstellen von EcoRI und ApaLI genutzt.

AQP2-S256A wurde durch zielgerichtete Mutagenese mit dem Quickchange II kit (Stratagene, Heidelberg) generiert. Wild-Typ AQP2 diente als Vorlage.

HEK293-Zellen wurden in Zellkultur-Schalen (Durchmesser 60 mm) auf mit Poly-Lysinbromid-beschichteten Deckgläschen (12 mm) ausgesät. 48 Stunden später erfolgte die Transfektion mit 1µg Plasmid-DNA durch Nutzung von Transfectin (Biorad, München). Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte nach einem Mediumwechsel 24 Stunden später.

2.2.8 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

HEK293-Zellen oder primäre IMCD-Zellen wurden in Zellkulturschalen auf Deckgläschen (12 mm) ausgesät (51,137). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Testsubstanzen behandelt und anschließend mit DPBS gewaschen und mit Fix-Puffer (15 min, 23°C) fixiert. Mit 0.1% Triton X-100 in DPBS (5 min, 23°C) wurden die Zellen permeabilisiert. Eine Inkubation mit Blockpuffer (20 min, 37°C) hemmte die unspezifische Antikörperbindung. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden in Blocklösung angesetzt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Zwischen der Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte ein Waschschriff mit DPBS auf einem Schüttler dreimal für jeweils 10 Minuten. AQP2 wurde mit spezifischen primären Antikörpern (H27) und Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen Sekundärantikörpern (Dianova Hamburg) detektiert (21). Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (5 ng/ml). 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. Die Aufnahme der Bilder erfolgte 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).

2.2.9 Statistik

Mit Prism5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) erfolgte die statistische Datenanalyse unter Nutzung des one-way ANOVA Testes mit Bonferonni-posthoc-Testung. Werte für $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant erachtet. Alle Werte

wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes (mean \pm SEM) dargestellt.

3 Ergebnisse und Auswertung

Diese Arbeit hatte als Ziel, zu überprüfen, ob eine Erhöhung der Konzentration des intrazellulären Signalmoleküls zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) neben den bereits bekannten Wirkungen der Verlagerung von Aquaporin 2 in die Zellmembran (55) und die Erhöhung der Transkriptionsrate (100) des Proteins auch zu einer kurzfristigen Proteinmengenvermehrung führt. Falls dies der Fall ist, sollte nach einem Mechanismus gesucht werden, der diesen Effekt erklären könnte.

Inner medullary connecting duct (IMCD)-Zellen sind primär kultivierte Zellen aus den Sammelrohren der Nierenpapillen von Ratten. Sie exprimieren den Vasopressin-2 Rezeptor (V_2R) und unterliegen somit der hormonellen Kontrolle durch Argininvasopressin (AVP). Als intrazelluläres Signalmolekül dient zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), das durch die Adenylylzyklase (AC) aus Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird. cAMP erhöht die Aktivität der Proteinkinase A (PKA), indem es eine Dissoziation der zwei katalytischen Untereinheiten der PKA von den regulatorischen Untereinheiten vermittelt. Die freiwerdenden katalytischen Untereinheiten können nun Zielmoleküle unter ATP-Verbrauch phosphorylieren (49). Forskolin (FSK) ist ein Reagenz, welches ACs direkt stimuliert und so eine Erhöhung der cAMP-Konzentration verursacht, ohne einen Rezeptor zu stimulieren (141).

3.1 Untersuchung des Einflusses von Forskolin und Argininvasopressin auf die AQP2 Menge

Die Stimulation der IMCD-Zellen erfolgte mit AVP oder FSK. Hierfür wurden die Zellen über 15 oder 30 Minuten mit AVP (100 nM) oder über 15, 30, 45, 60 und 120 Minuten mit FSK (10 μ M) behandelt. Die genannten Konzentrationen von AVP und FSK wurden für alle folgenden Experimente beibehalten. Die Inkubationszeit mit AVP wurde auf maximal 30 Minuten beschränkt, da die anschließende Internalisierung des V_2R zu einer Abnahme der hormonellen Stimulation und somit zu einem Abfall der cAMP Konzentration führt.

In Folge der Inkubation wurde das AQP2-Protein über den Antikörper H27, der an Protein-A-Sepharose gebunden vorlag, durch eine Immunpräzipitation gefällt. Das präzipitierte Protein wurde mittels Western Blot aufgetrennt. Mit einem gegen den N-

Terminus von AQP2 gerichteten Antikörper wurde AQP2 qualitativ nachgewiesen und die Proteinmenge semiquantitativ bestimmt. Die semiquantitative Mengenbestimmung erfolgte durch densitometrische Analysen der Western Blots.

AQP2 liegt in der Zelle in unterschiedlichen Zuständen vor. Es gibt eine nicht-glykosylierte Form, die durch eine Bande bei 29 kD repräsentiert wird, eine mit Mannoseketten versehene Form (High-Mannose-Form) bei 30 kD und eine komplex-glykosylierte Form, die sich mit einem Gewicht von 35-50 kD darstellt. Bei der High-Mannose-Form handelt es sich um eine Übergangsform zur komplex-glykosylierten Form des Proteins (95). Diese wird zwar im Western Blot sichtbar, liegt jedoch in der Zelle in deutlich geringerer Menge vor als die anderen beiden Formen und wird daher in den Auswertungen der Versuche vernachlässigt.

Nach der Behandlung mit AVP konnte ein signifikanter Anstieg der Proteinmenge von AQP2 im Vergleich zu nicht behandelten Zellen festgestellt werden. Schon nach 15 Minuten zeigte sich ein dreißigprozentiger Anstieg der Menge nicht-glykosylierten AQP2's, der sich nach 30 Minuten zu einem sechzigprozentigen Anstieg entwickelte. Die Menge der komplex-glykosylierten Form erhöhte sich nach 15 Minuten auf 150 % und nach 30 Minuten auf 180 % des Ausgangswertes.

In den Zellen, die mit FSK behandelt wurden, war der erste signifikante Proteinmengenanstieg von AQP2 nach 30 Minuten zu verzeichnen. Während sich die Menge der nicht-glykosylierten AQP2 Form von einer Erhöhung um 50 % nach 60 Minuten auf mehr als eine Verdopplung nach 120 Minuten vergrößerte, verdoppelte sich die Menge der komplex-glykosylierten AQP2 Form bereits nach 30 Minuten und hatte sich nach 120 Minuten verdreifacht.

Die Menge des zellulären Referenzzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) veränderte sich weder unter der 30-minütigen Behandlung mit AVP noch unter der bis zu 2-stündigen Behandlung mit FSK.

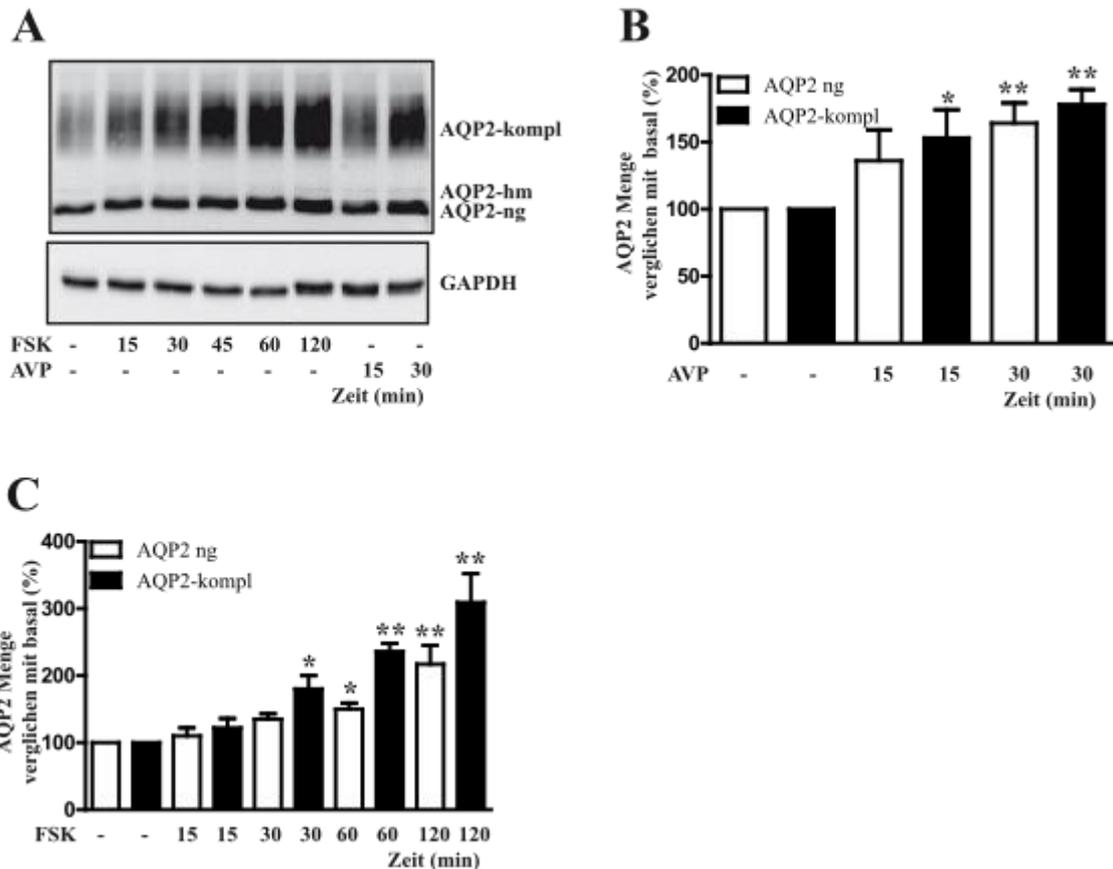


Abbildung 3.1 AVP und FSK erhöhen nach 30 Minuten die AQP2-Menge in IMCD Zellen.

A. IMCD Zellen wurden mit AVP (100 nM) oder FSK (10 μ M) für die genannten Zeiten behandelt. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen. AQP2 wurde immunpräzipitiert und im Western Blot nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus fünf unabhängigen Experimenten. In den verwendeten Zellysaten wurde GAPDH als intrazelluläres Kontrollprotein nachgewiesen.

B. Quantitative Auswertung der in **A** dargestellten Ergebnisse der AVP-Stimulation durch densitometrische Analysen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden markiert.

(n=5, *, p<0,05 und **, p<0,01)

C. Quantitative Auswertung der in **A** dargestellten Ergebnisse der FSK-Stimulation.

(n=5, *, p<0,05 und **, p<0,01)

3.2 Analyse des Einflusses von cAMP auf die Proteinmenge

Um sicher zu gehen, dass cAMP an der Vermittlung des beobachteten Effektes beteiligt ist, wurden IMCD-Zellen zur Kontrolle unter denselben Bedingungen wie im vorherbeschriebenen Experiment mit zyklischem Dibutyryladenosinmonophosphat (dbcAMP 500 μ M) versetzt. dbcAMP ist ein Analogon von cAMP, das die Zellmembran durchdringen kann und es so ermöglicht, von extrazellulär die intrazelluläre cAMP Konzentration kontrolliert zu erhöhen (142). Die Zellen wurden für 60 Minuten stimuliert,

um zu beurteilen, ob auch hier eine kurzfristige AQP2-Mengenveränderung auffällt. Wiederum verglichen mit unbehandelten Zellen erhöhte sich die AQP2 Menge nach der Behandlung mit dbcAMP auf das Dreifache der Ausgangsmenge.

Als Kontrollprotein wurde die Menge von IgG ermittelt. Hier zeigte sich kein Einfluss von dbcAMP auf die Proteinmenge.

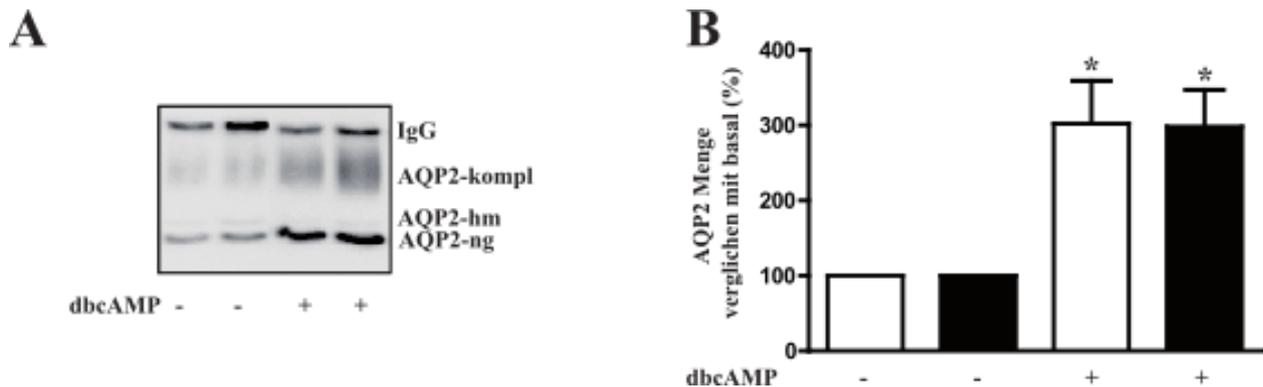


Abbildung 3.2 Die AQP2-Proteinmengenerhöhung steht in direkter Abhängigkeit zur cAMP-Konzentration.

A. IMCD-Zellen wurden mit dbcAMP (500 μ M; 60 min) stimuliert, AQP2 immunopräzipitiert und im Western Blot detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus fünf unabhängigen Experimenten.

B. Densitometrische quantitative Analyse der Ergebnisse des Western Blots. Statistisch signifikante Unterschiede wurden markiert. (n=5, *, p<0,05)

3.3 Messung der intrazellulären AQP2-mRNA Menge

Es ist bekannt, dass cAMP über eine Induktion der Transkription die Menge der produzierten mRNA und somit durch verstärkte Translation auch die Proteinmenge erhöht (100). Misst man nun die AQP2-spezifische mRNA-Menge in einer quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* qRT-PCR), so stellt man fest, dass sich diese nach Stimulation der IMCD-Zellen mit FSK erhöht. Jedoch geschieht dies - wie erwartet und in der Literatur beschrieben (106) – erst nach 60 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich 60 % mehr mRNA in der Zelle feststellen als zu Beginn. Vier Stunden nach der Behandlung mit FSK hat sich die mRNA auf das 14-fache des Ausgangswertes vermehrt. Nach 30-minütiger Stimulation ist noch keine signifikante Erhöhung der AQP2-mRNA Menge in der qRT-PCR nachweisbar.

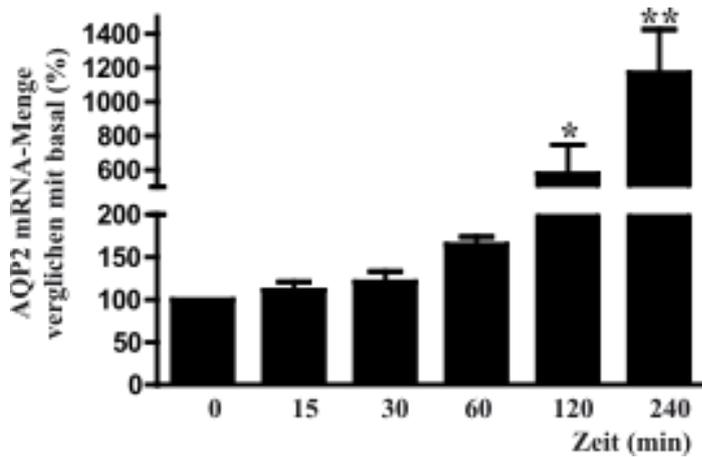


Abbildung 3.3 FSK erhöht mittelfristig die AQP2-mRNA Menge.

IMCD-Zellen wurden für 15-240 Minuten mit FSK (10 μ M) behandelt, lysiert und die mRNA isoliert. AQP2-mRNA wurde durch eine qRT-PCR quantifiziert und mit unbehandelten Zellen verglichen. Die quantitative Analyse von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden, ist dargestellt, statistisch signifikante Unterschiede sind markiert. (n=3, *, p<0,05, **, p<0,01)

Experiment durch Dr. Pavel I. Nedvetsky durchgeführt.

3.4 Analyse des Phosphorylierungsstatus von AQP2 an Serin256

Wie bereits beschrieben aktiviert die intrazelluläre cAMP-Erhöhung die PKA-Aktivität. Eines der Zielmoleküle der PKA ist AQP2, das unter anderem an der Aminosäure Serin an Stelle 256 (S256) phosphoryliert wird (81). Es sollten nun die Spiegel von an S256 phosphoryliertem AQP2 (pAQP2-S256) unter dem Einfluss von AVP und FSK bestimmt werden. Hierfür wurden IMCD-Zellen mit AVP für 10, 15, 20, 30 und 60 Minuten und mit FSK für 10, 20 und 30 Minuten stimuliert. Die Menge an pAQP2-S256 wurde semiquantitativ bestimmt und mit dem basalen Niveau der pAQP2-S256 Menge verglichen. Unter dem Einfluss der cAMP-steigernden Reagenzien erhöhte sich auch der Phosphorylierungsstatus von AQP2 (pAQP2-S256) signifikant. Nach 10-minütiger FSK-Stimulation war bereits doppelt so viel Protein phosphoryliert wie in unstimulierten Zellen. Dies setzte sich fort, bis nach 30 Minuten fast 10-mal so viel Protein phosphoryliert war wie im Ausgangszustand. Dasselbe Bild zeigte sich nach AVP-Stimulation. Über eine Verdoppelung nach 10 Minuten und eine Versiebenfachung nach 20 Minuten stellte sich eine Verzehnfachung der Menge des phosphorylierten Proteins nach 30 Minuten ein, die nach 60 Minuten weiterhin vorzufinden war. Als intrazelluläres Kontrollprotein diente bei diesem Versuch Cadherin, dessen Menge und Konzentration unverändert blieb.

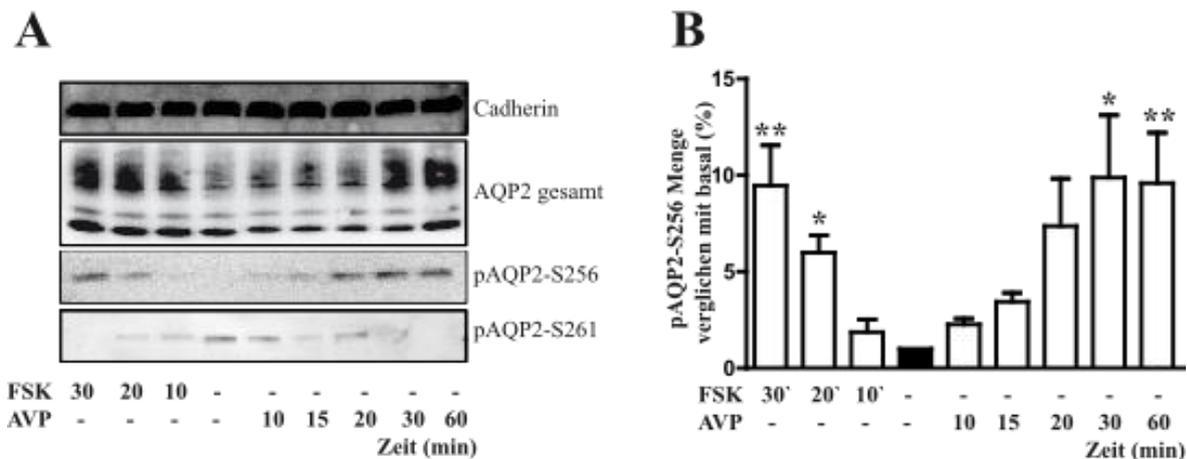


Abbildung 3.4 Stimulation von IMCD-Zellen mit FSK und AVP führt zu einer Zunahme der Phosphorylierung von AQP2 an Serin 256

A. IMCD-Zellen wurden mit FSK (10 μ M) und AVP (100 nM) für die dargestellten Zeiten stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und Gesamt-AQP2 bzw. an S256 phosphoryliertes AQP2 wurden im Western Blot nach Immunpräzipitation detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von vier unabhängigen Experimenten.

B. Densitometrische Quantifizierung des in **A.** dargestellten Western Blots. Statistische Signifikanz wurde markiert. (n=4, *, p<0,05, **, p<0,01)

3.5 Untersuchung des Einflusses der Proteinkinase A auf die intrazelluläre AQP2 Anreicherung

Um den Einfluss der PKA auf die Effekte von FSK zu untersuchen, wurde die PKA-Hemmung durch H89 durchgeführt. H89 ist ein Kinasenhemmer, der die Aktivität der PKA auf 2 % im Vergleich zur Kontrollaktivität reduziert (143). IMCD-Zellen wurden in 4 Ansätzen erstens als Kontrolle unbehandelt gelassen, zweitens mit FSK versetzt, drittens mit H89 und viertens mit H89 und FSK behandelt. Die semiquantitative Auswertung ergab, dass die solitäre Hemmung der PKA durch H89 (Ansatz 3) keine Auswirkung auf die Proteinmenge von AQP2 hatte, dass jedoch die Behandlung mit H89 eine Erhöhung der Proteinmenge durch FSK verhinderte (Ansatz 4). Im Gegensatz hierzu führte FSK-Stimulation ohne gleichzeitige Hemmung der PKA durch H89 zu einer Erhöhung der nachgewiesenen Menge an der nicht-glykosylierten AQP2 Form auf 160 % und der komplex-glykosylierten Form auf 220 % des Vergleichswertes. Demzufolge hat die Funktion der PKA elementare Wichtigkeit für die Wirkung von FSK. Die Stimulation der

PKA durch FSK nach cAMP Erhöhung scheint den Schlüsselmechanismus in dem beobachteten Prozess darzustellen.

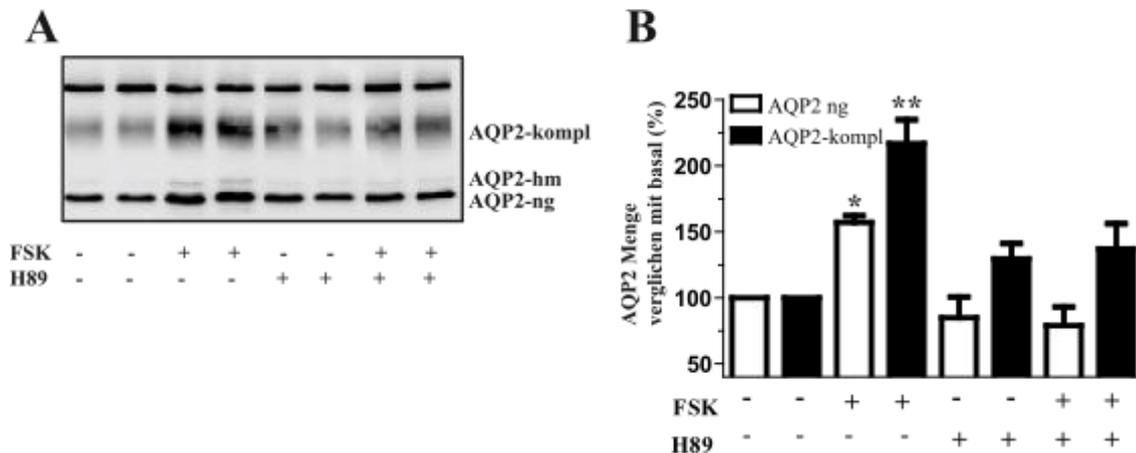


Abbildung 3.5 Der Kinasenhemmer H89 verhindert die durch FSK auslösbare AQP2-Mengenerhöhung.

A. IMCD-Zellen wurden mit FSK (10 μ M 30min), H89 (30 μ M 30min) oder einer Kombination aus FSK (10 μ M) und H89 (30 μ M) für 30 Minuten behandelt, lysiert, immunopräzipitiert und im Western Blot detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von fünf unabhängigen Experimenten.

B. Densitometrische Auswertung und Quantifikation der in **A.** ermittelten Ergebnisse. (n=5, *, p<0,05, **, p<0,01)

3.6 Etablierung von HEK293-Zellen als Zellmodell

Da eine Hemmung der PKA den Effekt von FSK aufhebt, sollte nun untersucht werden, ob die Phosphorylierung von AQP2 an Serin 256, die PKA-vermittelt stattfindet, für den beschriebenen Effekt notwendig ist. Hierfür wurde eine Mutante von AQP2 hergestellt, bei der an Stelle 256 das Serin durch Alanin (AQP2-S256A) ersetzt wurde.

Ein Austausch der Aminosäure Serin durch Alanin führt dazu, dass eine Phosphorylierung durch die PKA an dieser Stelle nicht mehr möglich ist. Anders als Serin besitzt Alanin im Aminosäurerest keine Hydroxylgruppe. Diese Hydroxylgruppe ist jedoch Voraussetzung, um eine Phosphorylierung des Proteins durch eine Esterbindung mit einem Phosphatrest zu ermöglichen.

Diese sollte nun in die Zellen eingebracht und die Proteinmengen der Mutante unter Stimulation beobachtet werden. Hierfür zeigten sich IMCD-Zellen leider gänzlich

ungeeignet: Ähnlich wie alle primär kultivierten Zellreihen sind IMCD-Zellen aufgrund ihrer Vulnerabilität schwierig zu transfizieren. Zudem müssen zu ihrer Gewinnung Ratten geopfert werden. Demzufolge wäre es zur einfacheren Handhabung der Zellen und Reproduktion der Ergebnisse sinnvoll Zellen zu finden, die dieselben Eigenschaften wie IMCD-Zellen unter Stimulation aufweisen, jedoch leichter zu kultivieren und zu transfizieren sind. Des Weiteren kann so die Zahl der Tiere, die geopfert werden müssen, reduziert werden. Unter anderem wurden *Human-Embryonic-Kidney-293* Zellen (HEK293) getestet. Hierbei handelt es sich um Zellen, die nach Transformation von menschlichen Nierenzellen mit Adenovirus DNA gewonnen wurden. Sie sind sehr einfach zu kultivieren und zu transfizieren. Die Nummer 293 erklärt sich dadurch, dass die Zellen im 293sten Versuch des Entwicklers Frank Graham erstmals erfolgreich kultiviert wurden (144).

HEK293-Zellen wurden mit AQP2 kodierender DNA transfiziert. Nach Behandlung der Zellen mit FSK verhielt sich das AQP2-Protein genauso wie in primär kultivierten IMCD-Zellen. AQP2 wurde an S256 phosphoryliert, verlagerte sich an die Zellmembran und nach wenigen Minuten war eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge nachweisbar. Auch in vielen anderen Forschungsarbeiten wurden HEK293-Zellen als Zellmodell zur Untersuchung der Signaltransduktion verwendet (56,67). In dieser Arbeit wurden sie für weitere Versuchsansätze genutzt.

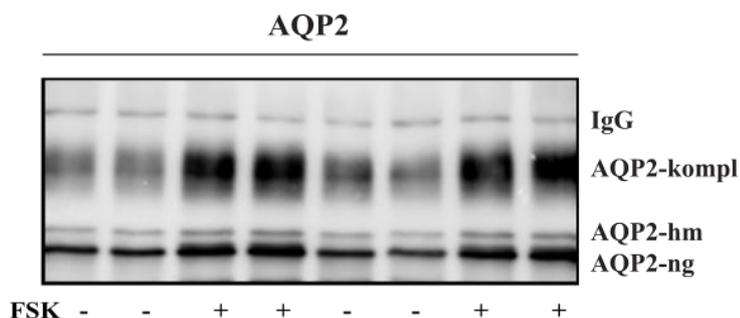


Abbildung 3.6 Die Menge von AQP2 verhält sich nach FSK-Stimulation in HEK293-Zellen genauso wie in IMCD-Zellen.

Mit AQP2 Wild-Typ transfizierte HEK293-Zellen wurden mit FSK (10 μ M) für 30 Minuten behandelt oder unbehandelt gelassen. Die Zellen wurden lysiert, immunopräzipitiert und AQP2 wurde im Western Blot detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von fünf unabhängigen Experimenten. In den verwendeten Zelllysaten wurde IgG als intrazelluläres Kontrollprotein nachgewiesen. (n=5)

3.7 Analyse des Verhaltens von AQP2 und einer nicht-phosphorylierbaren AQP2-Mutante gebunden an einen nicht durch cAMP-beeinflussbaren Promoter

Für den nächsten Versuchsansatz wurde ein AQP2-Konstrukt unter Kontrolle des Cytomegalovirus-Promoters (CMV-Promoter) hergestellt, und zwar in der Wild-Typ und in der AQP2-S256A-Form. Der CMV-Promoter wird, anders als der *in vivo* vorhandene Promoter von AQP2, nicht durch die cAMP-Konzentration beeinflusst.

HEK293-Zellen wurden mit dem AQP2 Wildtyp oder der AQP2-S256A-Mutante transfiziert und entweder für 30 Minuten mit FSK stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Zellen wurden lysiert oder durch Oberflächenbiotinylierung markiert und anschließend ein Pull-Down-Experiment mit Proteinnachweis durchgeführt. Bei der Oberflächenbiotinylierung werden alle Proteine, die sich an der Zelloberfläche befinden über eine kovalente Bindung mit Biotin verbunden. Mit Streptavidin können die biotinylierten Proteine nun gezielt isoliert und anschließend mit proteinspezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Wie zu erwarten war, erhöhte sich in der semiquantitativen Auswertung - anders als bei dem Wildtyp von AQP2 - die auf der Zelloberfläche exprimierte Menge von AQP2-S256A nach Stimulation nicht. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass die AQP2 Mutante nicht phosphoryliert werden kann und daher auch nicht an die Zellmembran transportiert wird.

Anders sieht es bei den Lysaten der Zellen aus. Hier erhöhte sich die Proteinmenge der Mutante ähnlich stark wie die des Wildtyps.

Um dies genauer zu quantifizieren, wurden die gleichen Zellen wie im vorherigen Versuch für 60 Minuten mit FSK stimuliert. Es zeigte sich eine Erhöhung der nicht-glykosylierten Form auf ca. 160 % und der komplex-glykosylierten Form auf ca. 200 % des Ausgangswertes. Dies war sowohl beim AQP2-Wildtyp als auch bei der AQP2-S256A-Mutante zu beobachten.

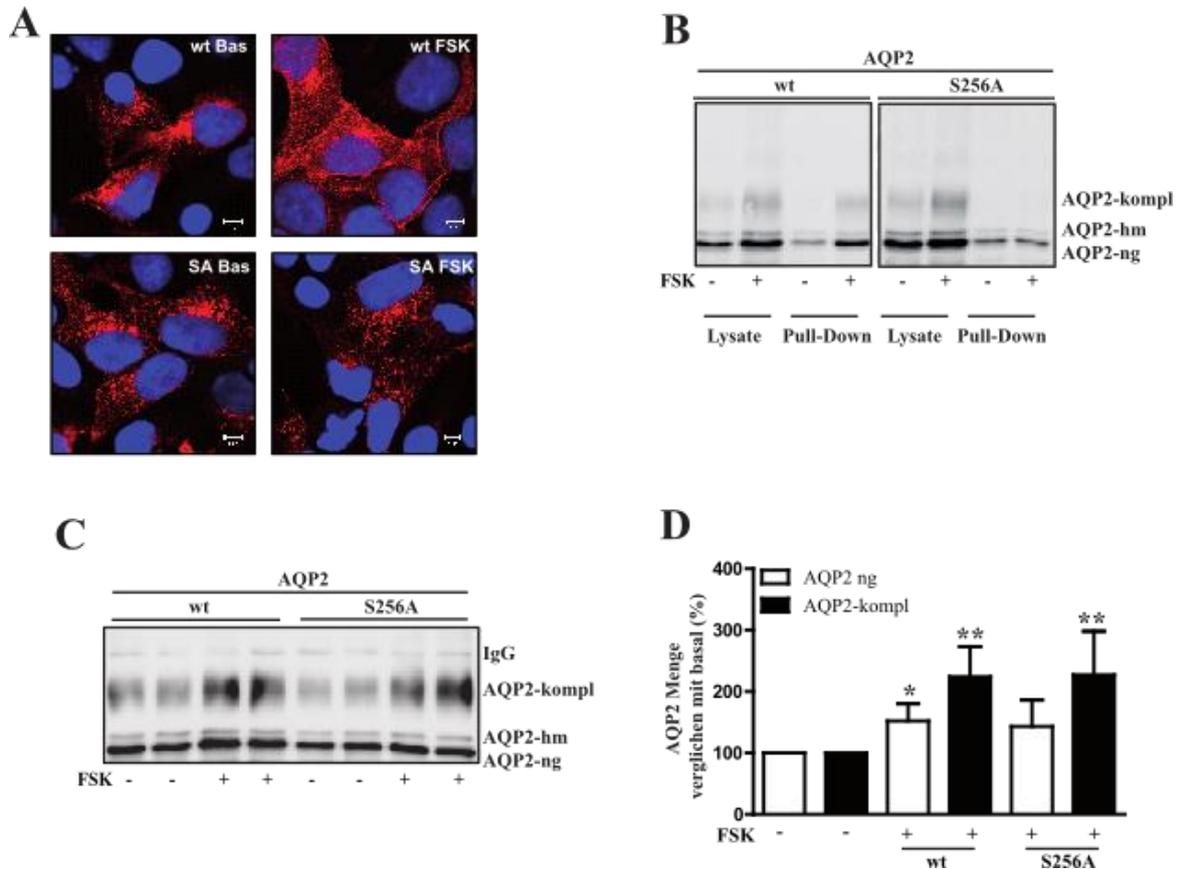


Abbildung 3.7 Stimulation mit FSK führt zu einer Zunahme der Proteinmenge von AQP2-S256A unter Kontrolle des CMV-Promoters in HEK293-Zellen

Nicht phosphorylierbare AQP2-S256A-Mutanten translozieren nach FSK Stimulation nicht vermehrt in die Plasmamembran von HEK293-Zellen, sind jedoch in erhöhter Menge intrazellulär nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigt sich trotz Bindung von AQP2 und AQP2-S256A an den CMV-Promoter. Durchführung des Experimentes in HEK293-Zellen.

A. Transient AQP2 exprimierende HEK293-Zellen (Wildtyp-AQP2 oder die AQP2-S256A-Mutante) wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit FSK (10 μ M, 30 min) stimuliert. Mit Wildtyp-AQP2 transfizierte Zellen sind in der oberen Reihe dargestellt – links unbehandelt, rechts stimuliert. Mit AQP2-S256A transfizierte Zellen finden sich in der unteren Reihe; unbehandelt wiederum links, rechts stimuliert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und AQP2 wurde angefärbt (rot). Blau: in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbte Zellkerne.

B. HEK293-Zellen wurden transfiziert und wie in **A** behandelt. Um AQP2 an der Zelloberfläche zu detektieren, wurden Oberflächenproteine mit Sulfo-NHS-SS-Biotin biotinyliert und mit Streptavidin-Sepharose präzipitiert. Nach Proteinauftrennung in der SDS-PAGE wurde AQP2 im Western Blot nachgewiesen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten.

C. Mit Wildtyp AQP2 und AQP2-S256A transfizierte HEK293-Zellen wurden unbehandelt gelassen oder mit FSK (10 μ M, 60min) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, AQP2 immunopräzipitiert und durch das Wester Blot Verfahren detektiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten.

D. Densitometrische Auswertung und Quantifikation der in **C**. ermittelten Ergebnisse. (n=5, *, p<0,05, **, p<0,01)

3.8 Untersuchung der Auswirkung einer Hemmung der Transkription auf die FSK-induzierte AQP2-Mengenvermehrung

Um zusätzlich zu den oben beschriebenen Beobachtungen sicherzustellen, dass nicht eine Erhöhung der Transkriptionsrate für die Proteinmengenvermehrung verantwortlich ist, wurden IMCD-Zellen mit Actinomycin D (10 µg/ml, 60 min) behandelt. Actinomycin D ist eine Substanz, die durch Interkalation in die DNA zur Öffnung des DNA-Doppelstranges führt und so die DNA-abhängige RNA-Polymerase der Zellen hemmt. Dies verhindert die Transkription von DNA zu mRNA (145). Die Zellen wurden entweder unbehandelt für 60 Minuten mit FSK stimuliert beziehungsweise unstimuliert gelassen oder sie wurden mit Actinomycin D behandelt und anschließend stimuliert beziehungsweise unstimuliert gelassen. Betrachtet man zunächst die mRNA Menge, erhöht sich diese bei mit FSK stimulierten Zellen ohne Hemmung der Transkription signifikant auf 170 % des Ausgangswertes. Hemmt man nun die Transkription mit Actinomycin D, ist keine Veränderung der mRNA Menge nach FSK-Stimulation feststellbar.

Auf Proteinebene verhielten sich die Zellen, in denen keine Hemmung der Transkription stattfand, wie erwartet: in der semiquantitativen Auswertung des Western Blot zeigte sich eine Proteinemengenerhöhung um 70 % beziehungsweise 90 % für die nicht- und die komplex-glykosylierte Form. Nach Actinomycin D Behandlung veränderte sich die Proteinmenge in den nicht stimulierten Zellen nicht. Nach Stimulation mit FSK erhöhte sich die Proteinmenge der nicht-glykosylierten Form jedoch auf das 160 % und die der komplex-glykosylierten Form auf mehr 200 % des Ausgangswertes.

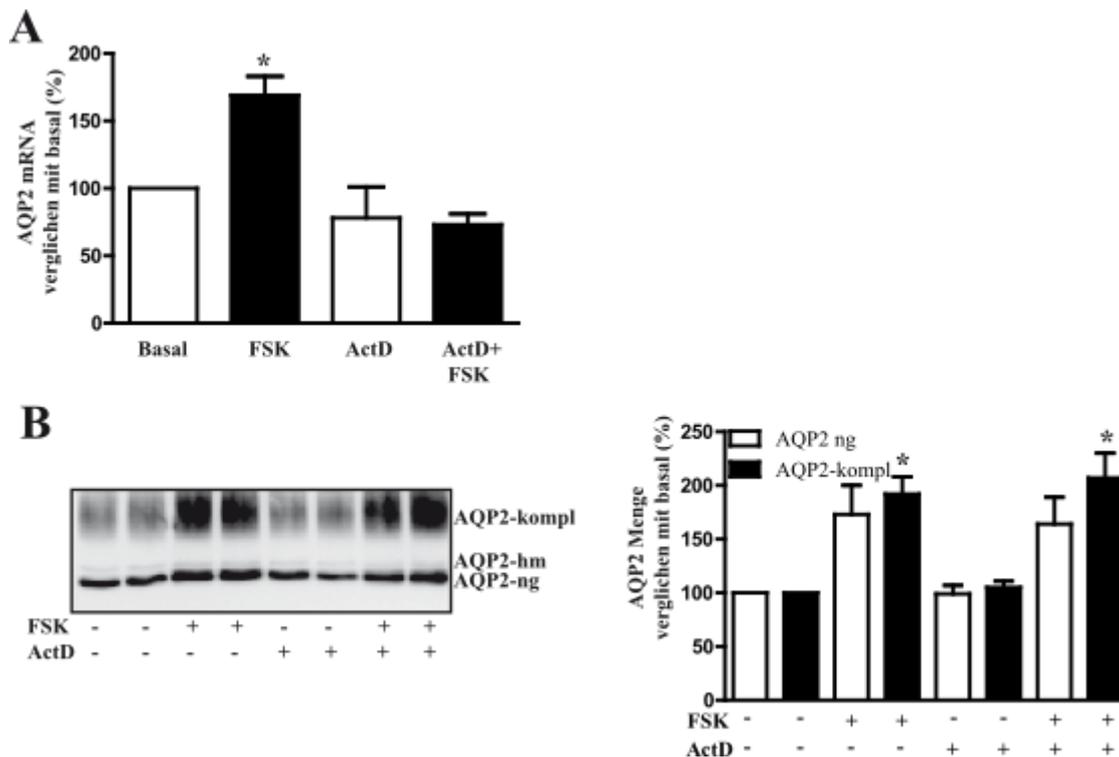


Abbildung 3.8 FSK erhöht in IMCD-Zellen die AQP2-Proteinmenge trotz Hemmung der Transkription.

Actinomycin D hemmt durch Interkalation die AQP2 mRNA Synthese in IMCD-Zellen. Diese Hemmung kann durch FSK Stimulation nicht überwunden werden. Auf Proteinebene ist die Hemmung durch Actinomycin D nicht mehr nachweisbar. FSK Stimulation erhöht die Proteinexpression trotz einer wirksamen Transkriptionshemmung durch Actinomycin D.

A. IMCD-Zellen wurden mit Actinomycin D (10µg/ml, 60min) behandelt, wie beschriftet mit FSK (10µM, 60min) stimuliert, und nach Zellyse und mRNA Isolation wurde durch eine qRT-PCR die AQP2 mRNA Menge bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen im stimulierten oder unstimulierten Zustand, in denen ebenfalls die AQP2 mRNA bestimmt wurde.

Experiment durch Dr. Pavel I. Nedvetsky durchgeführt.

B. IMCD-Zellen wurden, wie in **A** beschrieben, behandelt. Im Anschluss an die Lyse wurde anstatt der mRNA-Isolation eine AQP2 Immunopäzipitation durchgeführt. Die Detektion erfolgte anhand des Western Blot Verfahrens. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von vier unabhängigen Experimenten.

C. Quantifizierung der in **B** bestimmten Effekte von Actinomycin D und FSK auf die AQP2 Proteinexpression in IMCD Zellen. Statistisch signifikante Werte in **A** und **C** wurden markiert. (n=4, *, p<0,05)

3.9 Untersuchung der Auswirkung einer Hemmung der Translation auf die FSK-induzierte AQP2-Mengenvermehrung

Als nächste Instanz der Proteinbiosynthese wurde überprüft, wie sich eine Hemmung der Translation auf die Wirkung von FSK auswirkt. Hierzu wurde *de-novo* Proteinsynthese mit Cycloheximid gehemmt. Cycloheximid ist ein Reagenz, das durch Bindung an das

Ribosom die mRNA-gesteuerte Synthese neuer Proteine verhindert (146). Mit AQP2 transfizierte HEK293-Zellen wurden entweder mit Cycloheximid (10 µg/ml 90 min) versetzt oder unbehandelt gelassen und mit FSK für 60 Minuten stimuliert oder nicht stimuliert. In der semiquantitativen Auswertung des Western Blots führte eine Behandlung der HEK293-Zellen mit FSK zu einer Erhöhung der Proteinmenge auf 180 % bzw. 210 % der nicht- bzw. komplex-glykosylierten Form von AQP2. Nach Behandlung mit Cycloheximid zeigte sich in ruhenden Zellen eine Abnahme der Proteinmenge auf etwa 50 % des Wertes in unbehandelten Zellen. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass die Proteinsynthese gehemmt ist, gleichzeitig jedoch Protein abgebaut wird. Werden die mit Cycloheximid behandelten Zellen nun mit FSK stimuliert, zeigt sich semiquantitativ ausgewertet ein deutlich signifikanter Anstieg der Proteinmenge. Die Stimulation führt zu einer Verdoppelung der Menge an nicht-glykosyliertem Protein und zu einer mehr als Vervielfachung der Menge an komplex-glykosyliertem Protein.

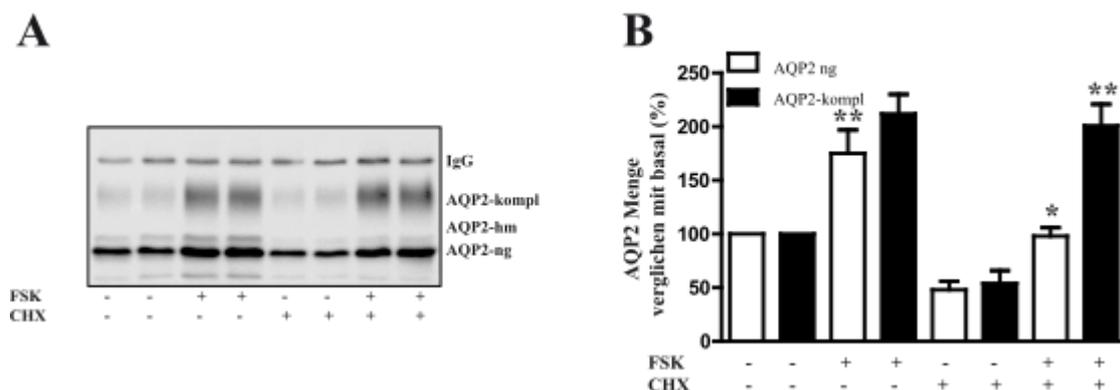


Abbildung 3.9 FSK erhöht in HEK293-Zellen die AQP2-Proteinmenge trotz Hemmung der Translation.

Behandlung von HEK293-Zellen mit Cycloheximid führt zu einer effektiven Hemmung der Translation. Stimulation dieser Zellen mit FSK vermag die Reduktion der Proteinexpression durch Translationshemmung aufzuheben.

A. HEK293-Zellen wurden mit Cycloheximid (10µM, 90min) behandelt und anschließend mit FSK stimuliert oder ruhend belassen. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt und AQP2 im Western Blot nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von vier unabhängigen Experimenten.

B. Die Quantifikation erfolgte densitometrisch. Statistisch signifikante Werte sind markiert. (n=4, *, p<0,05; **, p<0,01)

3.10 dDAVP erhöht nach 30 Minuten die AQP2 Menge *in vivo*

Die bisher beschriebenen Versuche wurden alle *in vitro* durchgeführt. Nun sollte überprüft werden, ob der cAMP-abhängige Anstieg der AQP2 Menge auch *in vivo* nachweisbar ist. Hierfür wurden Wildtyp C57/Bl6 Mäuse mit dDAVP behandelt und 30, 60 oder 120 Minuten nach der Behandlung geopfert. Als Kontrolle wurden Mäuse unbehandelt gelassen oder mit der dDAVP Transportersubstanz versetzt. Vergleicht man die behandelten Mäuse mit unbehandelten Mäusen, zeigt sich bereits nach 30 Minuten ein signifikanter Anstieg der AQP2 Menge auf das mehr als Doppelte des Ausgangswertes. Die Transportersubstanz hat keinerlei Einfluss auf die AQP2 Menge. Vergleichend zu der Proteinmenge wurde die AQP2 spezifische mRNA Menge gemessen. Diese erhöhte sich erst nach 2-stündiger Behandlung mit dDAVP auf 150 % des Vergleichswertes.

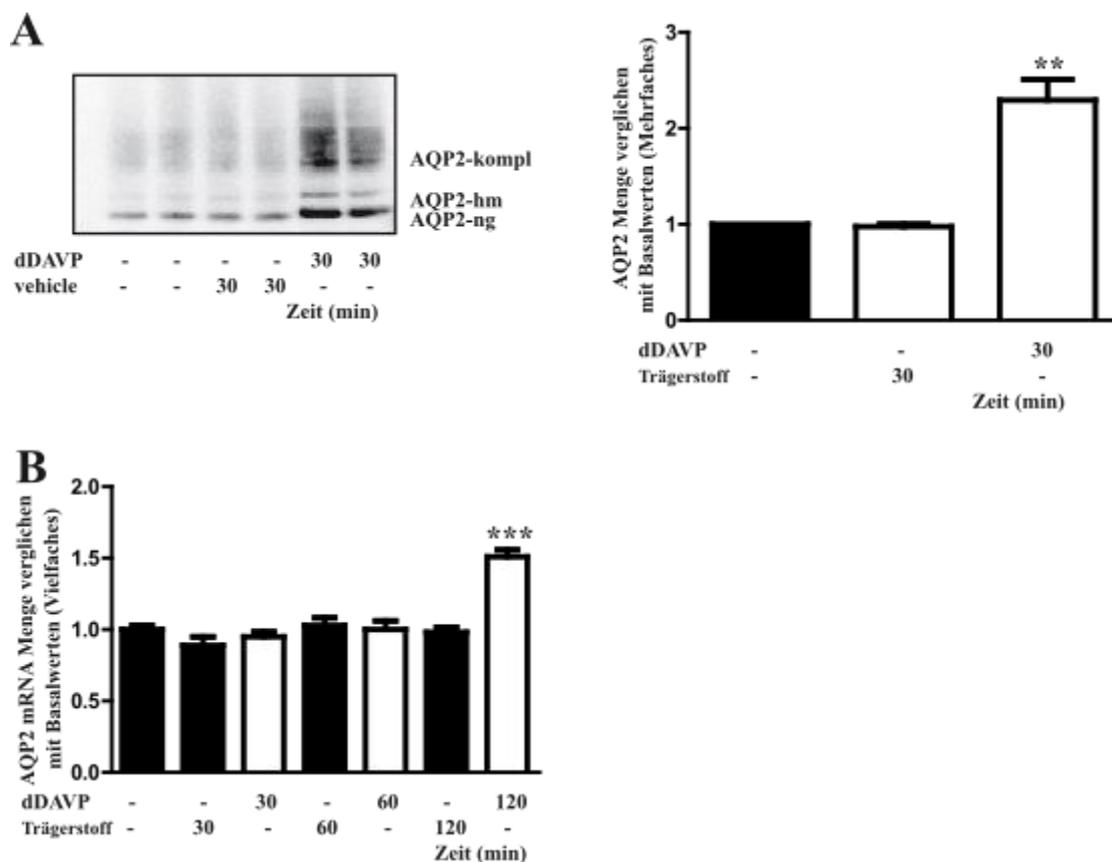


Abbildung 3.10 dDAVP erhöht *in vivo* bereits nach 30 Minuten die AQP2 Proteinexpression.

Die AQP2 mRNA Menge vermehrt sich *in vivo* erst nach 120-minütiger Stimulation mit dDAVP. Behandlung der Tiere ausschließlich mit der Transportersubstanz DPSB führt zu keiner Veränderung der Proteinexpression.

A. Wildtyp C57/Bl6 Mäusen wurde peritoneal dDAVP injiziert (1ng/g Körpergewicht), 30 Minuten später wurden die Mäuse geopfert und die AQP2-Level im Nierenmark wurden mit der Western Blot Technik bestimmt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von zwei von insgesamt fünf Tieren.

B. Quantifizierte Auswertung von **A.** (n=5, **, p<0,01)

C. Quantitative Auswertung der AQP2-mRNA Menge im Nierenmark von C57/Bl6 Mäusen (5 Tiere pro Gruppe). Wie in **A** beschrieben, wurden die Mäuse mit dDAVP behandelt, jedoch diesmal für 30, 60 und 120 Minuten. Die AQP2-mRNA Menge wurde in einer qRT-PCR bestimmt, statistisch signifikante Werte sind markiert. (n=5, **, p<0,01)

Experiment durch Dr. Pavel I. Nedvetsky durchgeführt.

3.11 Analyse des Effektes einer Hemmung des Proteasoms

Die oben beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass FSK und AVP durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Proteinmenge von AQP2 in der Zelle erhöhen. Dies geschieht nicht auf der Ebene der Transkription und auch eine Erhöhung der Translationsrate als Ursache des Effektes konnte ausgeschlossen werden. Folglich wird nicht mehr Protein produziert. Ein möglicher Mechanismus, der die Beobachtung erklären könnte, ist, dass weniger Protein abgebaut wird und sich so die intrazelluläre Halbwertszeit des Proteins erhöht.

AQP2 wird, wie viele Proteine, unter anderem über das Proteasom abgebaut. Hierfür wird AQP2 polyubiquitiniert und diese Polyubiquitinierung dient als Signal, um das Protein mittels des Proteasoms abzubauen (116).

Es sollte nun besagter proteosomaler Abbau gehemmt werden, um zu überprüfen, ob dies möglicherweise eine vergleichbare Anreicherung von AQP2 in der Zelle verursacht. Hierzu wurden IMCD-Zellen entweder unstimuliert gelassen oder für 30 Minuten mit FSK inkubiert. Bei einem Teil der Zellen wurde FSK ausgewaschen und bei einem Teil der gewaschenen Zellen folgte anschließend eine 120-minütige Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (10 µM) (147). Die FSK-Stimulation sorgte für eine signifikante Anreicherung von AQP2 auf das 1,5-fache der Ausgangsmenge. Nachdem das FSK über 30 Minuten ausgewaschen wurde, sank die intrazelluläre AQP2 Menge auf ca. 80 % des Wertes in unbehandelten Zellen ab. Die folgende Behandlung mit MG132 erhöhte die Proteinmenge wiederum auf ca. 150 % des Ausgangswertes in ruhenden Zellen.

Die Menge des Kontrollproteins Cadherin veränderte sich unter all diesen Einflüssen nicht.

Die Behandlung mit pharmakologischen Agenzien und eine extrazelluläre Einflussnahme auf intrazelluläre Signalwege stellt immer eine Stresssituation für Zellen dar. Um nachzuweisen, dass die Reagenzien keine derartige Reaktion in den Zellen hervorrufen, sondern nur physiologische Prozesse verstärken, beschleunigen oder verhindern, wurde AQP2 in IMCD-Zellen unter Einfluss der Reagenzien mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen. Zusätzlich wurde eine Probe IMCD-Zellen ausschließlich mit MG132 behandelt, um auszuschließen, dass MG132 einen Einfluss auf die Zellarchitektur oder die Verteilung von AQP2 in der Zelle hat.

Wie beschrieben findet sich AQP2 in ruhenden Zellen in perinukleären Kompartimenten (56). Eine Behandlung mit MG132 verändert die Lokalisation von AQP2 nicht, die Proteinmenge erhöht sich jedoch deutlich. Nach FSK-Stimulation wird AQP2 in die Zellmembran verlagert. Wäscht man FSK nun aus, wird ein großer Teil des AQP2 in die Zelle zurückverlagert. Ein Teil verbleibt jedoch in der Zellmembran. Eine Behandlung der Zellen mit MG132 im Anschluss an das Auswaschen verändert die Lokalisation wiederum nicht: Ein Teil des Proteins befindet sich in der Zellmembran, ein Teil in perinukleären Kompartimenten. Die Proteinmenge ist jedoch wiederum sichtbar erhöht.

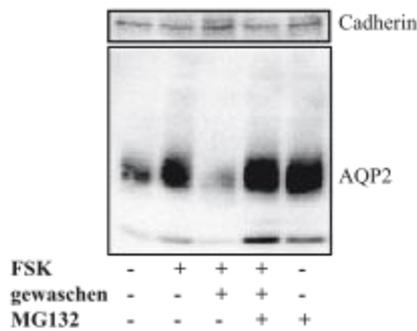
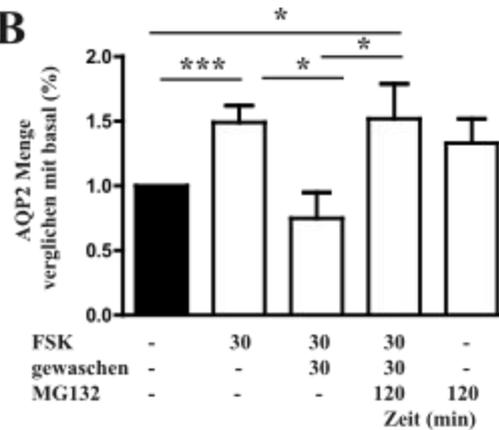
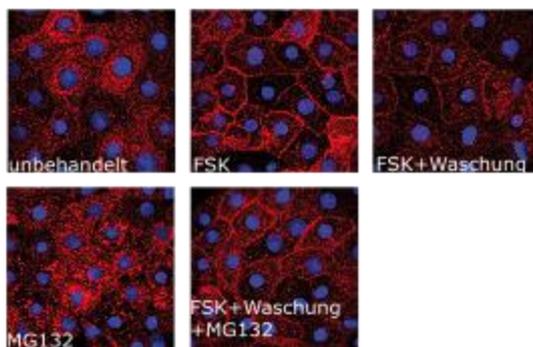
A**B****C**

Abbildung 3.11 Eine Hemmung des proteosomalen Abbaus von AQP2 mit MG132 führt zu derselben Mengenvermehrung von AQP2 wie eine Stimulation der Zellen mit FSK.

A. IMCD-Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen, für 30 Minuten mit FSK behandelt, für 120 Minuten mit MG132 behandelt oder für 30 Minuten in FSK inkubiert, um nach einer 30-minütigen Auswaschphase ebenfalls mit MG132 für 120 Minuten behandelt zu werden. Es zeigt sich nach Hemmung des proteosomalen Abbaus dieselbe AQP2-Mengenvermehrung wie nach FSK-Stimulation. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten.

B. Sowohl eine Stimulation von IMCD-Zellen mit FSK als auch eine Hemmung des proteosomalen Abbaus durch eine Behandlung mit MG132 führen zu einer AQP2-Proteinmengen Zunahme auf ca. 150%. Quantifizierte Auswertung von **A**. (n=3, **, p<0,01)

C. IMCD-Zellen wurden, wie in **A** beschrieben, behandelt und mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Es zeigt sich, dass die Architektur und Integrität der Zellen trotz der chemischen Manipulation erhalten bleibt. In unbehandelten Zellen befindet sich AQP2 in perinukleären Kompartimenten und verlagert sich nach Stimulation mit FSK in die Zellmembran. Nach der Auswaschung von FSK findet sich AQP2 nach wie vor in der Zellmembran, nur hat die Proteinmenge - repräsentiert in der Farbintensität - deutlich abgenommen. Durch die Hemmung des proteosomalen Abbaus wird die intrazelluläre AQP2-Menge erhöht, was sich in der verstärkten Farbintensität der Zellen im Vergleich mit unbehandelten Zellen zeigt. Nach FSK-Stimulation findet auch hier eine Verlagerung von AQP2 in die Zellmembran statt, was zeigt, dass die intrazellulären Transportmechanismen durch die Reagenzien nicht beeinflusst werden.

4 Diskussion

4.1 AVP hemmt den proteosomalen Abbau von AQP2

Diese Arbeit zeigt, dass eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP eine Erhöhung der Proteinmenge von Aquaporin 2 in renalen Hauptzellen zur Folge hat. Neuartig ist hierbei, dass bereits nach 30 Minuten eine signifikante Proteinmengenerhöhung nachweisbar ist. Dieser Effekt ist sowohl durch Forskolin (FSK), ein Reagenz, das direkt die Adenylzyklase stimuliert und somit cAMP erhöht (141), als auch durch das körpereigene Hormon AVP und dessen V₂R-selektives Analogon dDAVP auslösbar. Und er ist sowohl im Zellmodell *in vitro* als auch in der Maus *in vivo* nachweisbar.

Es ist bekannt, dass eine intrazelluläre cAMP Erhöhung durch Stimulation des V₂R und der PKA zu einer Phosphorylierung von AQP2 und dessen Verlagerung in die Zellmembran führen (85). Dies steigert die Wasserpermeabilität der Zellmembran und ermöglicht dem Organismus die kurzfristige Aufrechterhaltung der Wasserhomöostase. Zudem ist beschrieben, dass cAMP durch Bindung an das *cAMP-responsive-element-binding-protein* (CREB) und dessen nachfolgende Bindung an das *cAMP-responsive-element* (CRE) eine Zunahme der Transkription und dadurch eine gesteigerte Synthese von AQP2 induziert (103). Dieses findet parallel zu der konstitutiven Synthese von AQP2 statt, die im Gleichgewicht mit der konstitutiven Degradation eine stabile Expression des Proteins ermöglicht (111). Durch diesen Mechanismus wird sichergestellt, dass bei langem Bestehen eines erhöhten Wasserbedarfes des Organismus genügend Kanalprotein zur Verfügung steht, um eine suffiziente Wasserrückresorption zu garantieren.

Als Antwort auf die AVP-Stimulation finden diese beiden Mechanismen zu definierten Zeitpunkten statt. Während die Insertion von AQP2 in die Plasmamembran Sekunden bis wenige Minuten nach der hormonellen Stimulation stattfindet, bedarf es mindestens 60 Minuten und mehr bis eine messbare Erhöhung der AQP2 spezifischen mRNA nachweisbar ist. Aus dieser muss anschließend noch Protein synthetisiert werden, so dass eine erste Proteinmengenerhöhung bedingt durch eine Steigerung der Transkription und anschließender Proteinbiosynthese noch später zu erwarten wäre (106).

Der in dieser Arbeit nachgewiesene AQP2-Anstieg ist vom Zeitpunkt des ersten Einsetzens keinem der bekannten Regulationsmechanismen zuzuordnen und unterliegt folglich einem neuen Mechanismus der AQP2-Regulation.

Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration entweder durch G-Protein-vermittelte AC-Stimulation nach dDAVP-Bindung am V₂R oder durch direkte Aktivierung der AC durch FSK führt bereits nach 30 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der AQP2 Menge (Abb.3.1). Dieses Phänomen zeigt sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Abb. 3.10).

Auch das cAMP-Analogon dbcAMP, das durch Penetration der Zellmembran direkt auf die Zielproteine wirken kann und somit von außen gesteuert eine definierte intrazelluläre cAMP-Konzentration ermöglicht (142), führt zu einem gleichartigen Anstieg der intrazellulären AQP2 Menge (Abb.3.2), was nahelegt, das cAMP als intrazelluläres Signalmolekül in diesem Prozess dient.

Diese Proteinmengenvermehrung tritt ein, bevor eine Induktion der Transkription und Erhöhung der AQP2-spezifischen mRNA nachweisbar wird. Erst nach 60 Minuten kommt es zu einer nachweisbaren Erhöhung der AQP2 mRNA (Abb.3.3). *In vivo* zeigt sich eine Vermehrung der mRNA-Menge sogar erst nach 120 Minuten (Abb. 3.10b). Dass eine cAMP-vermittelte Induktion der Transkriptionsrate nicht für die Vermehrung der intrazellulären AQP2-Proteinmenge verantwortlich sein kann, unterstreicht die Beobachtung, dass in HEK293-Zellen, in denen das AQP2-Gen unter Kontrolle des cAMP-unempfindlichen konstitutiven CMV-Promoters steht, eine FSK-Stimulation über einen Zeitraum von 30 Minuten zu einer gleichartigen Erhöhung der Proteinmenge führt (Abb. 3.7). Eine Hemmung der Transkription durch Behandlung der Zellen mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D unterdrückt nachweislich die mRNA-Produktion (145). Jedoch kommt es trotz Hemmung der Transkription weiterhin zu einem Anstieg der Proteinmenge (Abb. 3.8).

cAMP könnte durch Induktion der Translation eine Zunahme der Proteinmenge hervorrufen. Eine Hemmung der Translation durch Cycloheximid (146) führt - wie zu erwarten - zu einer Abnahme der Menge an AQP2 in den Zellen, da der Proteinabbau weiterhin ungehindert stattfinden kann. Eine Stimulation mit FSK führt jedoch auch in derartig vorbehandelten Zellen zu einem Anstieg der Proteinmenge (Abb. 3.9). Hieraus

lässt sich ableiten, dass eine Induktion der Translation nicht das beobachtete Phänomen erklärt.

Da eine Steigerung der Proteinsynthese ausgeschlossen ist, gilt es nun zu untersuchen, ob eine Hemmung des Proteinabbaus die Ursache sein könnte. AQP2 wird sowohl über das lysosomale als auch über das proteosomale System abgebaut. Eine Hemmung des Proteasoms durch MG132 (147) führt zu einer gleichartigen Proteinmengenvermehrung wie eine Stimulation der Zellen durch FSK. Dies geschieht sowohl in Zellen, die zuvor einer FSK-Stimulation ausgesetzt waren, als auch in Zellen, die zuvor ohne Stimulation belassen wurden (Abb. 3.11).

Wie in der Literatur beschrieben (81) ist eine Phosphorylierung von AQP2 nach hormoneller Stimulation notwendig, um den Transport des Proteins in die Plasmamembran zu veranlassen. Eine der hierfür wesentlichen Phosphorylierungsstellen ist die Aminosäure S256. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass sowohl FSK als auch dDAVP eine deutliche Zunahme der Menge an S256-phosphoryliertem AQP2 (pS256-AQP2) verursacht. Mit zunehmender Dauer der Stimulation nimmt die Menge an pS256-AQP2 zu (Abb. 3.4).

Die Phosphorylierung an S256 erfolgt unter anderem PKA-vermittelt (81). Wie in Abb. 3.5 dargestellt ist die Funktion der PKA ein essenzieller Bestandteil der zuvor beobachteten Vermehrung der Proteinmenge. Eine Hemmung der PKA verhindert eine mittelfristige FSK-induzierte Vermehrung der Proteinmenge.

Jedoch scheint die Phosphorylierung an S256 nicht der Mechanismus zu sein, über den die PKA die proteinvermehrende Wirkung von FSK vermittelt. Eine Mutante von AQP2, in der die Aminosäure Serin an der Stelle 256 durch Alanin ersetzt wird (AQP2-S256A) und die somit nicht mehr phosphorylierbar ist, zeigt dieselbe Erhöhung der Proteinmenge nach FSK-Stimulation wie der Wildtyp-Kanal (Abb. 3.7).

Somit lässt sich ableiten, dass die PKA den beobachteten Effekt vermittelt, dass dies jedoch nicht durch eine Phosphorylierung an S256 erfolgt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Stimulation sowohl mit dDAVP als auch mit FSK sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer schnellen Vermehrung der AQP2-Proteinmenge führt. Dies geschieht innerhalb von 30 Minuten und wird durch cAMP und

die PKA vermittelt. Hierfür ist weder eine vermehrte Transkription noch eine vermehrte Translation ursächlich. Eher scheint der Mechanismus auf posttranslationaler Ebene durch eine Hemmung des proteosomalen Abbaus begründet zu sein. Die durch cAMP erhöhte Aktivität der PKA ist essenziell für diese Beobachtung, jedoch entfaltet sie ihre Wirkung nicht über eine Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 256.

Dieser Versuchsreihe schlossen sich Folgeexperimente unserer Arbeitsgruppe an. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine FSK induzierte cAMP-Erhöhung durch Aktivierung der PKA tatsächlich zu einer Hemmung des proteosomalen Abbaus von AQP2 führte. Die PKA inhibiert die *p38-mitogen-activated protein kinase* (p38-MAPK). Bereits in einer vorangegangenen Publikation wurde vermutet, dass p38-MAPK für die Phosphorylierung von AQP2 an S261 verantwortlich sein könnte (148), so dass deren Hemmung zu einer reduzierten Phosphorylierung von AQP2 an S261 führen könnte. Dies bestätigte sich in den Experimenten.

Die Polyubiquitinierung von Proteinen führt zu deren proteosomalem Abbau (149). Es konnte durch uns gezeigt werden, dass eine Abnahme der Phosphorylierung an S261 mit einer Abnahme der Polyubiquitinierung von AQP2 und somit vermindertem proteosomalem Abbau einhergeht. Auch eine Stimulation von IMCD-Zellen mit FSK führt zu einer Verminderung der Ubiquitinierung von AQP2.

Die Ergebnisse suggerieren, dass FSK durch eine Steigerung von cAMP zu einer Aktivierung der PKA führt. Eine Phosphorylierung der p38-MAPK durch die PKA führt zu einer Abnahme der aktiven Form und somit einer Hemmung der p38-MAPK, wodurch wiederum eine Abnahme der Phosphorylierung von AQP2 an S261 folgt. Abschließend führt dies zu einer Reduzierung der Polyubiquitinierung von AQP2, einer Hemmung des proteosomalen Abbaus und somit einer Stabilisierung und Mengenzunahme des Proteins. Diese Kaskade erklärt, wieso es bereits 30 Minuten nach Stimulation von IMCD-Zellen mit FSK oder dDAVP zu einer deutlichen Zunahme der AQP2 Menge unabhängig von einer Zunahme der Transkription oder Translation kommt.

Diese Erkenntnisse wurden im Oktober 2010 im *Journal of the American Society of Nephrology* veröffentlicht. (92)

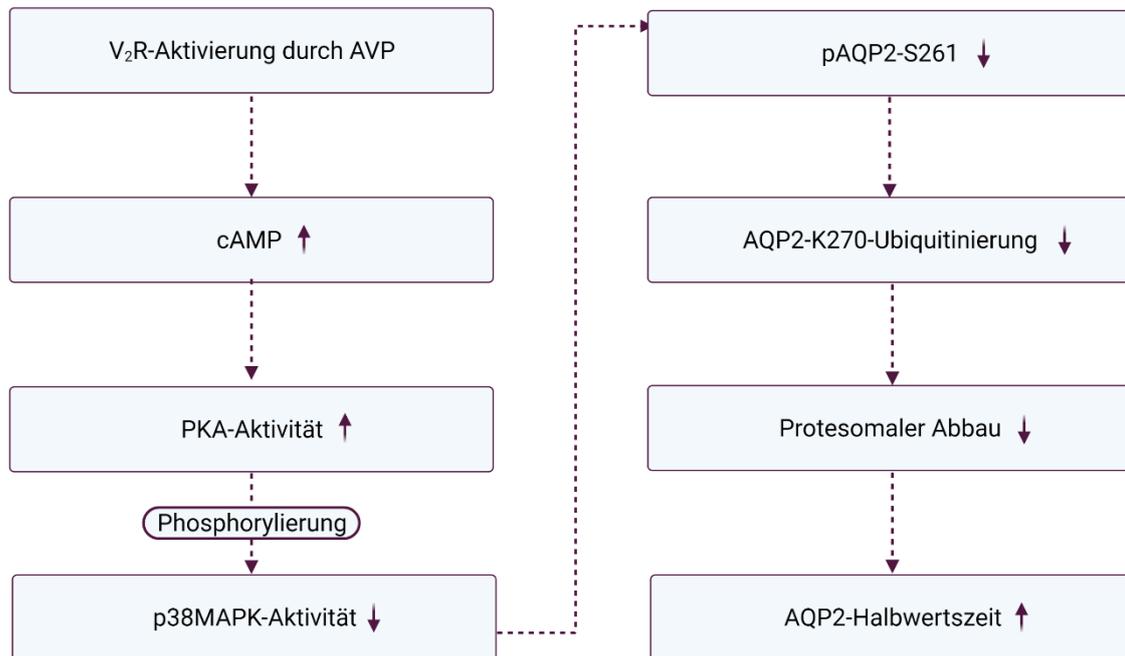


Abbildung 4.1 Signalkaskade, die zur Verlängerung der AQP2 Halbwertszeit führt

Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung standen diese Erkenntnisse zum Teil im Gegensatz zu dem damaligen Expertenkonsens. In den Experimenten der Arbeitsgruppe von Hanne Moeller und Robert Fenton zeigte sich im Tiermodell keine Veränderung der AQP2-Proteinmenge nach kurzfristiger Stimulation mit dDAVP und auch keine Veränderung der Halbwertszeit des Proteins (88,150). Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen unserer Arbeit wurden in der Fachliteratur zunächst überrascht aufgenommen. Insbesondere der Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung an Serin 261 und dem Ubiquitinierungszustand von AQP2 wurde zur Diskussion gestellt (95).

In den folgenden Jahren wurden zahlreiche neue Erkenntnisse über die intrazelluläre Signalkaskade und den Stoffwechsel von AQP2 gewonnen. Insbesondere der Einsatz der Methoden der (Phospho-)Proteomik und der Systembiologie haben dazu geführt, dass in breit angelegten Versuchsansätzen eine große Menge Wissen über die Auswirkungen einer hormonellen Stimulation von dDAVP auf das Verhalten von unterschiedlichsten Proteinen und deren mRNA, inklusive AQP2, in den Zellen gesammelt werden konnte (151).

So konnte 2011 in einer Massenspektrometrie-Analyse durch Khositseth S et al. nachgewiesen werden, dass in mpkCCD Zellen nach Stimulation mit AVP 188 der 3000 untersuchten Proteinen verändert exprimiert wurden. Unter Ihnen auch AQP2. Tatsächlich überstieg die Erhöhung der AQP2-Menge die der anderen untersuchten Proteine noch deutlich (152). Während in dieser Untersuchung noch die Proteinmengenvermehrung durch Vermehrung der mRNA untersucht wurde, zeigten Sandoval et al. zwei Jahre später mit einer ähnlichen Methode, die jedoch auch die Dynamik des Proteasoms in mpkCCD-Zellen mit einbezog, dass nicht nur die Translationsrate von AQP2, sondern auch die Halbwertszeit des Proteins sich nach Stimulation mit dDAVP erhöhte (153).

Neben der Erhöhung der Transkriptionsrate ist die Verlängerung der Halbwertszeit von AQP2 durch Veränderung des Ubiquitinierungsstatus nun als zweiter wesentlicher Faktor, der zur mittel- bis langfristigen Erhöhung der Proteinmenge führt, anerkannt (154).

4.2 Phosphorylierung und Ubiquitinierung von AQP2

Als wesentliches Signal der intrazellulären Signalkaskade, das die Halbwertszeit von AQP2 verändert, gilt die Dephosphorylierung der Aminosäure Serin 261 (6), die auch in unserer Arbeit als einer der wesentlichen Schritte in der Erhöhung der intrazellulären Proteinmenge identifiziert wurde.

Das Wechselspiel zwischen einer Phosphorylierung an S256, S261, S269 und der Ubiquitinierung an K270 erlaubt eine sehr exakte Regulation der Lokalisation von AQP2 als Reaktion auf eine hormonelle Stimulation. Eine Phosphorylierung an S256 nach Stimulation mit FSK führt zum AQP2-Transport in die Zellmembran und zu einer Reifung im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat, eine Phosphorylierung an S269, führt zur Hemmung der Endozytose und eine Abnahme der Phosphorylierung an S261 führt zur Reduktion der Ubiquitinierung und zum Verbleib in der Zellmembran (155).

In Experimenten von Tamma et al. befand sich eine dauerhaft an S256 phosphorylierte Mutante AQP2-S256D in der Zellmembran. Eine Phosphorylierung an S261 (durch AQP2-S261D simuliert) führte aufgrund einer vermehrten Ubiquitinierung zur intrazellulären Lokalisation von AQP2. Die Mutante AQP2-S256D-S261D, welche sowohl

eine Phosphorylierung an S256 als auch an S261 simuliert, befand sich jedoch anders als die AQP2-S261D Mutante nicht innerhalb der Zelle, sondern in der Zellmembran. Eine dauerhafte Ubiquitinierung von AQP2, die durch die Mutante AQP2-K270R-Ub simuliert wird, veranlasste wiederum eine Verlagerung in das Zytosol, selbst wenn sie als AQP2-S256D-K270R-Ub vorlag. Tamma et al. beobachteten somit eine Gewichtung der unterschiedlichen Regulationsmechanismen. Eine Phosphorylierung an S256 übersteuert die Phosphorylierung an S261, wird jedoch selbst wiederum von einer Polyubiquitinierung an K270 überwunden (91).

In einer späteren Arbeit konnten Moeller et al. 2014 zeigen, dass Polyubiquitinierung nicht vollständig die Wirkung aller Phosphorylierungen antagonisiert, sondern, dass im Gegenteil eine Phosphorylierung dominant gegenüber einer Polyubiquitinierung ist. In der hier untersuchten Phosphorylierungsstelle handelt es sich jedoch um die bis zu diesem Zeitpunkt noch wenig charakterisierte Stelle S269. Trotz Polyubiquitinierung an der direkt benachbarten Aminosäure K270 verringert sich die Endozytoserate von AQP2 durch die Mutation AQP2-S269D. Der Mechanismus, der hierfür die Ursache ist, bleibt unklar. Zwei Theorien werden diskutiert. Erstens könnte die Phosphorylierung von AQP2 an S269 dazu führen, dass der Wasserkanal in Regionen der Zellmembran lokalisiert ist, in denen weniger Clathrin-vermittelte Endozytose stattfindet. Zweitens könnte eine Veränderung der stereometrischen Eigenschaften des Proteins durch die Phosphorylierung in unmittelbarer Nachbarschaft zur Polyubiquitinierung dazu führen, dass Proteine mit einer *ubiquitin-binding-domain* eine geringere Affinität zu p269-AQP2 haben (90).

In den beiden zuvor beschriebenen Arbeiten wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Phosphorylierungsstellen am C-Terminus von AQP2 auf ihr Wechselspiel mit einer Ubiquitinierung von AQP2 hin untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Wirkung einer Phosphorylierung an S256 durch Ubiquitinierung überwunden wird, während eine Phosphorylierung an S269 im Vergleich zur Ubiquitinierung dominant ist. Hier verdeutlicht sich erneut die Differenziertheit der Regulationsmechanismen, die in den intrazellulären Signalkaskaden beteiligt sind. Es sollte das Ziel zukünftiger Forschungsarbeiten sein, die Rolle der vierten wichtigen Phosphorylierungsstelle von AQP2 – Serin 264 - in diesem Regulationsmechanismus genauer zu untersuchen. Auch stellt sich die Frage, in welcher Form die Phosphorylierungsstellen S269 und S261 interagieren. Während eine Phosphorylierung an S256 vornehmlich die Translokation in die Plasmamembran

veranlasst, scheinen S261 und S269 den Verbleib in der Plasmamembran und die Endozytose zu steuern. Ob die Auswirkung einer Phosphorylierung an S269 die Wirkung einer Dephosphorylierung an S261 dominiert, sollte ebenfalls Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Mit dem Wissen um die unterschiedlichen und teils gegensätzlichen Auswirkungen von Phosphorylierungsstellen in Proteinen, die auch in enger räumlicher Nähe zueinander liegen, sind natürlich auch die Folgen der Änderung des Phosphorylierungszustandes der Proteine interessant, die mit AQP2 interagieren: Deshpande et al. haben in einer aktuellen phosphoproteomischen Untersuchung an IMCD-Zellen von Ratten aus einem Gesamtkollektiv von 10,738 Phosphopeptiden 219 Proteine identifiziert, deren Phosphorylierungszustand durch Stimulation mit Vasopressin verändert wird. Zehn dieser Proteine interagieren direkt mit AQP2 und es ist davon auszugehen, dass Veränderungen am Phosphorylierungszustand dieser Proteine in die Regulation von AQP2 eingreifen (156).

In unserer Arbeit (92) konnten wir nachweisen, dass eine Reduktion der Phosphorylierung an S261 nach FSK-Stimulation mit einer Reduktion der Polyubiquitinierung von AQP2 einhergeht. Die Ubiquitinierung von Proteinen markiert diese für die Endozytose und ist ein wichtiger Faktor in der Steuerung des Abbaus der Proteine (116). Genauso wie die Phosphorylierung von AQP2 wird auch dessen Ubiquitinierung unter Beteiligung unterschiedlicher Enzyme reguliert. Unterschiedliche E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen wie NEDD4/NEDD4L, aber vermutlich auch BRE1B und CUL5 ubiquitinieren AQP2 an der Aminosäure K270 (115,157). Auch die E3 *ubiquitin-protein ligase* STUB1/CHIP kann AQP2 ubiquitinieren. Sie co-lokalisiert mit AQP2 und ihre Proteinmenge vermehrt sich nach Stimulation von Nierensammelrohrzellen mit AVP. Eine Fehlfunktion dieser Ligasen führt zu einer Erhöhung der AQP2-Menge, insbesondere in der apikalen Zellmembran (72,158).

Gegenspieler in diesem System sind Deubiquitinasen. Murali et al. konnten 2019 die erste Deubiquitinase identifizieren, die mit AQP2 interagiert. Die Ubiquitin-spezifische Protease 4 (USP4) kann die Ubiquitinierung von AQP2 reduzieren. Zellen mit einem Funktionsverlust von USP4 zeigten eine vermehrte Ubiquitinierung von AQP2, eine

Reduktion der Proteinmenge und einen vermehrten Nachweis des Proteins im Zytosol (159).

Auch in anderen Organsystemen, wie zum Beispiel dem Nervensystem, sind die Ubiquitinierung und die damit verbundenen Abbauprozesse von klinischer Bedeutung. In vielen neurodegenerativen Erkrankungen konnten Ubiquitin-positive Protein-Aggregate nachgewiesen werden, was die besondere Bedeutung der (Fehl-)Regulation des Proteinabbaus in postmitotischen Neuronen unterstreicht (160). Auch die Langzeitpotenzierung, als Form der synaptischen Plastizität ein wichtiger Bestandteil von Lernprozessen, hängt wesentlich von korrekt regulierten, intrazellulären Proteinabbauprozessen ab. So führt eine Hemmung des proteosomalen Abbaus zu einem Verlust eben dieser synaptischen Plastizität (161).

Ein sinnvoller Ansatz, der über die reine Wissensakkumulation zum eigentlichen Ziel der wissenschaftlichen Forschung, nämlich der Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung bisher schlecht kontrollierbarer klinischer Bilder, führt, scheint ein zweigleisiger zu sein: Einerseits müssen in klassischen molekularbiologischen Versuchsreihen die genauen Charakteristika der bekannten Signalkaskaden und die Angriffspunkte an relevanten Steuerungsinstanzen genauer verstanden werden, andererseits sollten in proteomischen und systembiologischen Versuchsansätzen Stoffwechselregulationsstellen identifiziert werden, für die sich eine genauere Untersuchung lohnt.

4.3 Rolle der p38MAP-Kinase

Wir konnten in unserer Arbeit zeigen, dass die p38MAPK per Phosphorylierung durch die PKA inhibiert wird. Bei Hemmung von p38MAPK sinkt die Phosphorylierungsrate von AQP2 an S261 als Substrat der p38MAPK, was wiederum zu einer Abnahme der Polyubiquitinierung von AQP2 führt (92).

Yang et al. bestätigten, dass p38MAPK mit AQP2 co-lokalisiert und konnten durch Berechnung bedingter Wahrscheinlichkeiten die p38MAPK (Isoform Mapk14) als eine der Kinasen bestätigen, die AQP2 an S261 phosphorylieren (162). Ob p38MAPK AQP2 ausschließlich an S261 phosphoryliert, ist derzeit noch unklar. Es gibt Hinweise darauf, dass AQP2 an S256 nicht durch die p38MAPK phosphorylierbar ist (162). Da die

Phosphorylierung an S256 eine Voraussetzung für die Phosphorylierung an S269 darstellt (163), lässt sich vermuten, dass die p38MAPK auch nicht an der Phosphorylierung an S269 beteiligt ist. Hier besteht jedoch noch Forschungsbedarf, um Auswirkungen eines möglichen pharmakologischen Eingriffs in die Aktivität der p38MAPK abschätzen zu können.

Auch wenn die p38MAPK nach aktuellem Wissen spezifisch für die Aminosäure S261 ist, ist sie jedoch nicht die einzige Kinase, die AQP2 an S261 phosphoryliert. Auch andere MAPK wie *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) sowie die *cyclin-dependent kinase 18* sind nachweislich dazu in der Lage (72,164).

Cheung et al. identifizierten die Protein Phosphatase 2C (PPC2) als Gegenspieler der zuvor genannten Kinasen, indem sie AQP2-S261 AVP gesteuert dephosphoryliert. Jedoch erzielt die PPC2 ihre Wirkung nicht nur direkt durch die Dephosphorylierung an S261, sondern auch indirekt, indem sie die Aktivität der ERK und möglicherweise auch der p38MAPK moduliert (164).

Die Rolle der MAPK und auch der p38MAPK in der Entstehung von akutem und chronischem Nierenversagen, Nierenfibrose, diabetischer Nephropathie und Nierenkarzinomen ist vielfach untersucht. Unterschiedliche Autoren kommen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen, inwiefern eine Aktivierung der p38MAPK zu einer Entzündung mit folgender Apoptose respektive zu Prozessen der Regeneration und Zellheilung führt (165,166).

Es spricht jedoch vieles dafür, dass p38MAPK über Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B zu Zellalterung und Apoptose führt (167,168).

Auch in der Entstehung des Lithium-induzierten renalen Diabetes insipidus scheint die p38MAPK eine wichtige Rolle zu spielen. In IMCD Zellen führte eine Behandlung mit Lithium zu einer Aktivierung der ERK1/2 und der p38MAPK, was mit einer Zunahme der Phosphorylierung an AQP2-S261, einer vermehrten AQP2-Degradation und einem zunehmenden Wasserverlust einhergeht (123). Diese Erkenntnisse stimmen mit den Ergebnissen von Kaiser und Edemir überein, die zeigen konnten, dass Lithiumchlorid neben einer Reduktion der AQP2 mRNA auch eine Zunahme der lysosomalen Degradation verursacht (169). Möglicherweise handelt es sich hierbei jedoch um eine

andere Signalkaskade als die in unserer Arbeit beschriebene, da wir einen Abbau über das Proteasom beobachteten. Weiterführende Forschung, mit der Absicht gezielt auf die Aktivität der p38MAPK einzuwirken, könnte somit auch dabei helfen, den Lithium-induzierten renalen Diabetes insipidus, eine häufige unerwünschte Wirkung der Lithium-Therapie bei bipolaren, affektiven Störungen und Schizophrenien, zu kontrollieren.

In den vergangenen Jahren sind zunehmend die nicht-pathologischen, physiologischen Aspekte der Signalkaskade, die über p38MAPK zu einer Steuerung der Ubiquitinierung und so der Endozytose und Degradation von Proteinen führt, in den Fokus gerückt. Neuere Erkenntnisse beleuchten, wie p38MAPK auch in anderen Transmitter- und Regulationssystemen eine Rolle spielt. Der Gasotransmitter Hydrogensulfid scheint beispielsweise seine Urin-konzentrierende Wirkung über die cAMP-PKA-MAPK-Signalkaskade zu entfalten (170). Auch für die Glucocorticoide und die Sexualhormone wird diskutiert, dass sie ihre Auswirkung auf die Wasserhomöostase über Eingriffe in die p38MAPK Signalkaskade erzielen (171,172).

In den Hauptzellen des Sammelrohres hilft die p38MAPK unter anderem dabei, die Natrium-Konzentration stabil zu halten, indem sie den apikalen Na^+ -Einstrom durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC) bzw. den extrazellulären Transport über die Na^+ - K^+ -ATPase steuert (173).

4.4 Medikamente mit Wirkung auf den AQP2-Stoffwechsel

Medikamente, die in den p38MAPK-Stoffwechsel eingreifen, sind wenige bekannt. Empagliflozin ist ein selektiver Natrium-Glukose Co-Transporter Typ 2-(SGLT-2) Inhibitor, der in der Therapie des Typ 2-Diabetes mellitus eingesetzt wird (174). Vorteilhaft zeigt sich dabei insbesondere das kardio- und renoprotektive Wirkprofil, wodurch die Gruppe der SGLT2-Inhibitoren auch für die Therapie der Herz- und Niereninsuffizienz interessant werden (175,176). Dapagliflozin wurde als erster Vertreter dieser Gruppe durch die europäische Arzneimittelkommission im November 2020 zur Behandlung der Herzinsuffizienz zugelassen (177).

Chung et al. konnten im Tiermodell mit an Diabetes mellitus Typ 2 leidenden Ratten nachweisen, dass eine 12-wöchige Behandlung mit Empagliflozin zur Hochregulierung

des V₂R bei gleichzeitiger Abnahme der AQP2-Menge führt. Die Ergebnisse der Experimente suggerieren als Ursache für die Entkopplung der physiologischen Wechselwirkung eine vermehrte Phosphorylierung an AQP2-S261 unter anderem durch die p38MAPK mit den oben beschriebenen Folgen. Klinisch kommt es zu einer Zunahme der Diurese und Abnahme der systemischen Volumenretention, wodurch sich die vorteilhafte Wirkung bei Herzinsuffizienz-Patienten erklärt (178).

Die Gruppe der Vaptane sind AVP-Rezeptor-Antagonisten, die zur Behandlung der Hyponatriämie im Rahmen eines SIADH, einer Herzinsuffizienz oder einer Leberzirrhose zugelassen sind. Durch ihre Wirkung am Rezeptor beeinflussen Vaptane alle nachgeschalteten Signalwege (22). Auch zur Behandlung der autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) eignen sich die Vaptane. So zeigte in klinischen Studien eine Tolvaptan-Therapie Vorteile gegenüber der Placebo-Kontrolle bei Patienten mit ADPKD sowohl im Früh- als auch im Spätstadium der Erkrankung (179,180). In phosphoproteomischen Analysen konnte nachgewiesen werden, dass auch die Kinasen der MAP-Gruppe durch Vaptane in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Auch hier kommt es zu einer Zunahme der Diurese (181). Die Grenzen der klinischen Anwendung liegen in der Notwendigkeit der intensiven Kontrollen der Natriumblutkonzentrationen, der Gefahren der Lebertoxizität der Medikamente und der nach wie vor hohen Therapiekosten (179,180,182).

Bei der Suche nach anderen Wirkstoffen, die gezielt in den V₂R-AQP2-Stoffwechsel eingreifen, hat sich eine große Schwierigkeit herauskristallisiert: die gut verstandene Signalkaskade über cAMP und PKA ist keineswegs spezifisch für die Hauptzellen der Sammelrohre, sondern kommt ubiquitär in allen Organen vor.

Ansätze, insbesondere zur Steuerung der cAMP-Konzentration, gibt es viele. Hormone wie Calcitonin, Glukagon, Sekretin und Serotonin, die über eigene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die cAMP-Konzentration beeinflussen, oder Phosphodiesterase-Hemmer, die den cAMP-Abbau hemmen, zeigen jeweils im Zellmodell gute Wirksamkeiten, sind *in vivo* jedoch entweder mit zu vielen Nebenwirkungen behaftet oder die erhoffte klinische Wirkung geht in den komplexen Prozessen des Gesamtorganismus verloren.

Einzig die Prostaglandin E2 Antagonisten Indometacin und die nicht steroidalen Antirheumatika (NSAR) werden bereits in der Therapie des NDI eingesetzt, haben jedoch bei eingeschränkter Wirksamkeit ein teilweise therapie-limitierendes Nebenwirkungsprofil (183).

Wenn man die cAMP-PKA-Signalkaskade verlässt und versucht, alternative Steuerungsmechanismen von AQP2 zu beeinflussen, finden sich einige vielversprechende Kandidaten.

Der PDE5-Hemmer Sildenafil verändert nicht die cAMP-, sondern die cGMP-Konzentration. Auch durch cGMP gesteuerte Signalwege kommt es zu einer Vermehrung von AQP2 in der Zellmembran, so dass Sildenafil als gut bekanntes Medikament mit einem überschaubaren Nebenwirkungsprofil zur Therapie des angeborenen NDI in Frage kommt (184). Eine kleine klinische Studie aus dem Jahr 2020 konnte jedoch an zwei erwachsenen Patienten mit NDI keine Verbesserung der Wasserrückresorption aus dem Primärharn feststellen (185), und auch in gesunden Probanden konnte diese Wirkung nicht beobachtet werden (186).

Metformin als Aktivator der Adenosin-Monophosphat-Kinase führt ebenfalls zur Phosphorylierung von AQP2 und dessen Einbau in die Zellmembran (187). Auch Metformin ist ein lange-eingesetztes und bekanntes Medikament. Bisher hat sich noch keine eindeutige klinische Wirksamkeit gezeigt, jedoch sind bis dato auch keine umfänglichen Studien erfolgt (183).

Für die Statine wurde gezeigt, dass sie die Endozytose von AQP2 im Sammelrohr hemmen und dadurch die Verfügbarkeit in der Zellmembran erhöhen (188). Der antidiuretische Effekt konnte in einer kleinkalibrigen Studie mit gesunden Probanden nachgewiesen werden (186).

Eine der großen Schwächen der bisher verfügbaren Pharmaka, von denen einige hier exemplarisch aufgeführt sind, ist die fehlende Selektivität. Weder besteht eine Selektivität für einzelne Signalkaskaden, noch besteht eine Selektivität für die Hauptzellen des Sammelrohres. Hierdurch lassen sich zahlreiche und in der Regel therapielimitierende

unerwünschte Nebenwirkungen nicht verhindern. Häufig lässt sich die *in vitro* Wirkung nicht in eine klinisch sichtbare *in vivo* Wirkung überführen.

Neben den bereits im Gebrauch befindlichen Vaptanen bieten Statine ein vielversprechendes Wirkprofil. Sie führen im Mausmodell zu einer Reduktion der Diurese und einem Anstieg der Urin-Osmolarität (22). In gesunden Probanden konnte ein moderater antidiuretischer Effekt nach Behandlung mit Simvastatin erzielt werden (186), jedoch bestätigte sich diese Beobachtung in einer doppel-blinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie, in der die Wirkung von Atorvastatin auf Lithium-induzierten NDI überprüft wurde, bisher nicht (189).

4.5 Aspekte der Entwicklung neuer Therapeutika

Große Hoffnungen werden in die Entwicklung von Medikamenten gesetzt, die gezielt in Protein-Protein-Interaktionen eingreifen. Kandidaten hierfür sind niedermolekulare Verbindungen – „kleine Moleküle“ -, die zellartselektiv in Signalkaskaden eingreifen können. Durch ihre geringe Größe von nur wenigen hundert Dalton können Sie durch Zellmembranen gelangen und auch unabhängig von Transportersystemen intrazellulär ihre Wirkung entfalten (190).

Proteine interagieren häufig durch relative große Kontaktflächen. Hierin liegt eine der Schwierigkeiten im Design von kleinen Molekülen (22). Einerseits müssen die kleinen Moleküle groß genug sein, um ausreichend Kontaktfläche zwischen den Proteinen abzudecken, damit die Bindung gebrochen wird, andererseits müssen sie klein genug sein, um eine gute Membranpermeabilität zu gewährleisten.

Als Alternative zu einer direkten Wirkung auf Proteininteraktion besteht die Möglichkeit einer allosterischen Modulation. Ein großer Vorteil allosterischer Modulation liegt darin, dass die Liganden nicht die Eigenschaften der Bindungspartner imitieren müssen, um physiologische Bindungen zu beeinflussen oder zu brechen. Jedoch sind noch zu wenige allosterische Bindungsstellen identifiziert, um zeitnah relevante Fortschritte in diesem Bereich der Pharmaentwicklung erwarten zu können (191).

2011 wurde durch Christian et al. ein kleines Molekül beschrieben, das die Interaktion zwischen der PKA und AKAP18 δ unterbrechen kann. Das Molekül 3,3'-diamino-4,4'-

dihydroxydiphenylmethane (FMP-API-1) und sein Derivat FMP-API-1/27 binden an die regulatorische Untereinheit der PKA und verhindern so eine Bindung der PKA an AKAP18 δ . Weiterhin führt FMP-API-1 zu einer Aktivierung der PKA (192).

In Mäusen, in denen die AVP-Wirkung durch Tolvaptan-Behandlung aufgehoben wurde (und somit ein NDI simuliert wurde), konnten FMP-API-1 und seine Derivate eine Urinkonzentrierende Wirkung erzielen. Ando et al. schlossen, dass für NDI-Formen, die mit einer Funktionsstörung des V₂R einhergehen, kleine Moleküle somit einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung neuer Therapeutika darstellen (193). Auch wenn eine vermeintliche Gewebe- und Zellartselektivität von FMP-API-1/27 beobachtet wurde, müssen weitere Untersuchungen die Auswirkung von FMP-API-1 und seinen Derivaten auf andere Organsysteme insbesondere das Herz beleuchten. Ob Moleküle, die neben einer erwünschten Hemmung der AKAP-PKA-Interaktion zusätzlich das ubiquitär vorkommende Enzym PKA aktivieren, als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapeutika dienen, bleibt abzuwarten.

In modernen Hochdurchsatz-Screenings können unzählige Moleküle auf ihre chemische Eignung für einen bestimmten Zweck untersucht werden. Bogum et al. führten 2013 ein Screening von 16'671 Molekülen durch. Nach mehreren Selektionsschritten konnten schlussendlich zwei Moleküle identifiziert werden, die eine Umverteilung von AQP2 in die Zellmembran inhibierten. (194)

Eines dieser Moleküle zeigt eine strukturelle Ähnlichkeit zum Antimykotikum Fluconazol, so dass die Wirkungen von Fluconazol auf AQP2 weiter untersucht wurden. Anders als die von Bogum et al. identifizierten Moleküle verringert Fluconazol die Menge von AQP2 in der Zellmembran von IMCD Zellen nicht, sondern erhöht sie. Fluconazol verursacht eine Hemmung der kleinen GTPase RhoA, was, wie zuvor beschrieben, zu einer De-Polymerisation des F-Aktin und einer Verlagerung von AQP2 in die Zellmembran führt (69). Weiterhin verringert Fluconazol die Menge von pS261-AQP2 und somit dessen Polyubiquitinierung. Über diesen Mechanismus könnte die Zunahme der AQP2 Menge erklärt werden. Bei Mäusen, die mit Fluconazol behandelt wurden, kam es zu einer Abnahme der Urinausscheidung und einer Zunahme der Urin-Osmolalität. Auch eine Vorbehandlung mit Tolvaptan, wodurch ein NDI simuliert wird, verhinderte die Wirkung von Fluconazol nicht.

Damit steht Fluconazol potenziell als Therapeutikum für NDI-Formen, die durch fehlendes Ansprechen auf AVP gekennzeichnet sind, zur Verfügung (195).

Die Umnutzung (*repurposing*) von bereits zugelassenen Medikamenten bietet große Vorteile. Es muss keine neue, teure Entwicklung mit aufwändigen klinischen Studien erfolgen und die Sicherheit der Präparate ist erprobt und bekannt (196,197).

Am Beispiel von Fluconazol - einem bis dato als Antimykotikum eingesetzten Medikament - und dessen Wirkung auf AQP2 lässt sich aufzeigen, wie

- durch molekularbiologische Forschung potenzielle Angriffspunkte für neue Therapeutika identifiziert,
- durch Hochdurchsatz-Screening für diese Angriffspunkte passende chemische Verbindungen gefunden und
- durch kreatives Vergleichen mit bekannten und erprobten Molekülen zugelassene Medikamente für neue Indikationen umgenutzt werden können.

Natürlich beschränkt sich dies keineswegs auf die Umnutzung bereits zugelassener Wirkstoffe, sondern eröffnet zahlreiche Möglichkeiten für das gezielte Design neuer Wirkstoffe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bis dato unbekannter Mechanismus nachgewiesen, der mittelfristig die Menge von AQP2 in den Sammelrohrzellen der Niere erhöht. In darauf aufbauenden Experimenten konnte gezeigt werden, welche Enzyme an dieser Signalkaskade beteiligt sind. Die Erkenntnisse dieser Arbeit wurden durch zahlreiche andere Arbeitsgruppen bestätigt und weiter im Detail erforscht.

Fluconazol, einer der vielversprechendsten Kandidaten für ein Therapeutikum des bisher schwer zu behandelnden NDI, scheint seine Wirkung unter anderem durch die Signalkaskade zu erzielen, die mit Hilfe dieser Arbeit identifiziert wurde.

Aus klinischer Perspektive lässt sich festhalten, dass nach wie vor, trotz intensiver Grundlagenforschung und Entschlüsselung vieler Aspekte und Faktoren des AQP2-Stoffwechsels, wirksame Therapeutika zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Fehlregulation des Wasserhaushaltes einhergehen, fehlen. Zwar existieren Wirkstoffe bzw. Substanzen, die im Zell- oder im Mausmodell nachweislich in die Regulation der

Wasserhomöostase durch Erhöhung der Menge von AQP2 in der Zellmembran eingreifen, jedoch gibt es bisher nur Fallbeschreibungen oder kleinkalibrige Studien, die diese Wirkungen in Patienten überprüfen. Eine Verbesserung der Lebensqualität oder der Symptome konnte nicht erreicht werden (198).

An dieser Stelle besteht zukünftig Handlungsbedarf. Erfolgsversprechende Wirkstoffkandidaten müssen in größeren Patientenkollektiven in klinischen Studien erprobt werden und neue Wirkstoffe müssen entwickelt werden, um Patienten mit Krankheiten wie dem nephrogenen Diabetes insipidus, fortgeschrittener Herzinsuffizienz, Leberzirrhose oder dem Syndrom inadäquater ADH-Sekretion Behandlungsmöglichkeiten anbieten zu können.

5 Literaturverzeichnis

1. Lippert H. Lehrbuch Anatomie. Vol. 8. Auflage. Elsevier GmbH; 2011.
2. Knepper MA, Brooks HL. Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hy.* 2001;10(5):655–9.
3. Golenhofen K. Physiologie heute. Vol. 2. Auflage. Urban&Fischer; 2000.
4. Sabolic I, Valenti G, Verbavatz JM, Hoek ANV, Verkman AS, Ausiello DA, Brown D. Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney. *Am J Physiol-cell Ph.* 1992;263(6):C1225–33.
5. Matsuzaki T, Yaguchi T, Shimizu K, Kita A, Ishibashi K, Takata K. The distribution and function of aquaporins in the kidney: resolved and unresolved questions. *Anat Sci Int.* 2017;92(2):187–99.
6. Ingelfinger JR, Knepper MA, Kwon T-H, Nielsen S. Molecular Physiology of Water Balance. *New Engl J Medicine.* 2015;372(14):1349–58.
7. Nielsen S, Frøkiær J, Marples D, Kwon T-H, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the Kidney: From Molecules to Medicine. *Physiol Rev.* 2002;82(1):205–44.
8. Herold G, Mitarbeiter. Innere Medizin. Köln: Eigenverlag; 2018.
9. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. *Science.* 1992;256(5055):385–7.
10. Kozono D, Yasui M, King LS, Agre P. Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest.* 2002;109(11):1395–9.
11. Bai L, Fushimi K, Sasaki S, Marumo F. Structure of Aquaporin-2 Vasopressin Water Channel. *J Biol Chem.* 1996;271(9):5171–6.
12. Noda Y, Sasaki S. Molecular Mechanisms and Drug Development in Aquaporin Water Channel Diseases: Molecular Mechanism of Water Channel Aquaporin-2 Trafficking. *J Pharmacol Sci.* 2004;96(3):249–54.
13. Hall JE, Mathias RT. The Aquaporin Zero Puzzle. *Biophys J.* 2014;107(1):10–5.
14. Calvanese L, Pellegrini-Calace M, Oliva R. In silico study of human aquaporin AQP11 and AQP12 channels. *Protein Sci.* 2013;22(4):455–66.
15. Verkman AS. Aquaporins. *Curr Biol.* 2013;23(2):R52–5.
16. Eriksson UK, Fischer G, Friemann R, Enkavi G, Tajkhorshid E, Neutze R. Subangstrom Resolution X-Ray Structure Details Aquaporin-Water Interactions. *Science.* 2013;340(6138):1346–9.
17. Schnermann J, Chou C-L, Ma T, Traynor T, Knepper MA, Verkman AS. Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice. *Proc National Acad Sci.* 1998;95(16):9660–4.

18. Ecelbarger CA, Terris J, Frindt G, Echevarria M, Marples D, Nielsen S, Knepper MA. Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol-renal*. 1995;269(5):F663–72.
19. Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Knepper MA, Nielsen S. Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol-renal*. 1995;269(6):F775–85.
20. Roudier N, Ripoche P, Gane P, Pennec PYL, Daniels G, Cartron J-P, Bailly P. AQP3 Deficiency in Humans and the Molecular Basis of a Novel Blood Group System, GIL. *J Biol Chem*. 2002;277(48):45854–9.
21. Fushimi K, Uchida S, Harat Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature*. 1993;361(6412):549–52.
22. Vukićević T, Schulz M, Faust D, Klussmann E. The Trafficking of the Water Channel Aquaporin-2 in Renal Principal Cells—a Potential Target for Pharmacological Intervention in Cardiovascular Diseases. *Front Pharmacol*. 2016;7:23.
23. Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PMT, Kohan DE. Collecting Duct Principal Cell Transport Processes and Their Regulation. *Clin J Am Soc Nephro*. 2015;10(1):135–46.
24. Valtin H, Schroeder HA. Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro strain). *Am J Physiology-legacy Content*. 1964;206(2):425–30.
25. Valtin H, Edwards BR. GFR and the concentration of urine in the absence of vasopressin. *Berliner-Davidson re-explored*. *Kidney Int*. 1987;31(2):634–40.
26. Li C, Wang W, Summer SN, Cadnapaphornchai MA, Falk S, Umenishi F, Schrier RW. Hyperosmolality In Vivo Upregulates Aquaporin 2 Water Channel and Na-K-2Cl Co-Transporter in Brattleboro Rats. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(6):1657–64.
27. Sheen MR, Kim J-A, Lim SW, Jung J-Y, Han K-H, Jeon US, Park S-H, Kim J, Kwon HM. Interstitial tonicity controls TonEBP expression in the renal medulla. *Kidney Int*. 2009;75(5):518–25.
28. Hasler U, Jeon US, Kim JA, Mordasini D, Kwon HM, Féraille E, Martin P-Y. Tonicity-Responsive Enhancer Binding Protein Is an Essential Regulator of Aquaporin-2 Expression in Renal Collecting Duct Principal Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(6):1521–31.
29. Lam AKM, Ko BCB, Tam S, Morris R, Yang JY, Chung SK, Chung SSM. Osmotic Response Element-binding Protein (OREBP) Is an Essential Regulator of the Urine Concentrating Mechanism. *J Biol Chem*. 2004;279(46):48048–54.
30. Stegbauer J, Gurley SB, Sparks MA, Woznowski M, Kohan DE, Yan M, Lehrich RW, Coffman TM. AT1 Receptors in the Collecting Duct Directly Modulate the Concentration of Urine. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(12):2237–46.
31. Bustamante M, Hasler U, Kotova O, Chibalin AV, Mordasini D, Rousselot M, Vandewalle A, Martin P-Y, Féraille E. Insulin potentiates AVP-induced AQP2 expression

- in cultured renal collecting duct principal cells. *Am J Physiol-renal*. 2005;288(2):F334–44.
32. Terashima Y, Kondo K, Oiso Y. Administration of oxytocin affects vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 gene expression in the rat. *Life Sci*. 1999;64(16):1447–53.
33. Li C, Wang W, Summer SN, Westfall TD, Brooks DP, Falk S, Schrier RW. Molecular Mechanisms of Antidiuretic Effect of Oxytocin. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(2):225–32.
34. Joo KW, Jeon US, Kim G-H, Park J, Oh YK, Kim YS, Ahn C, Kim S, Kim SY, Lee JS, Han JS. Antidiuretic action of oxytocin is associated with increased urinary excretion of aquaporin-2. *Nephrol Dial Transpl*. 2004;19(10):2480–6.
35. Boone M, Deen PMT. Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Archiv*. 2008;456(6):1005–24.
36. Tamma G, Wiesner B, Furkert J, Hahm D, Oksche A, Schaefer M, Valenti G, Rosenthal W, Klusmann E. The prostaglandin E2 analogue sulprostone antagonizes vasopressin-induced antidiuresis through activation of Rho. *J Cell Sci*. 2003;116(16):3285–94.
37. Rieg T, Vallon V. ATP and adenosine in the local regulation of water transport and homeostasis by the kidney. *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiology*. 2009;296(2):R419–27.
38. Vallon V, Rieg T. Regulation of renal NaCl and water transport by the ATP/UTP/P2Y2 receptor system. *Am J Physiol-renal*. 2011;301(3):F463–75.
39. Boone M, Kortenoeven MLA, Robben JH, Tamma G, Deen PMT. Counteracting vasopressin-mediated water reabsorption by ATP, dopamine, and phorbol esters: mechanisms of action. *Am J Physiol-renal*. 2011;300(3):F761–71.
40. Tamma G, Carmosino M, Svelto M, Valenti G. Bradykinin Signaling Counteracts cAMP-Elicited Aquaporin 2 Translocation in Renal Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(10):2881–9.
41. Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol-renal*. 2002;282(5):F777–84.
42. Bouley R, Hasler U, Lu HAJ, Nunes P, Brown D. Bypassing Vasopressin Receptor Signaling Pathways in Nephrogenic Diabetes Insipidus. *Semin Nephrol*. 2008;28(3):266–78.
43. Ge Y, Ahn D, Stricklett PK, Hughes AK, Yanagisawa M, Verbalis JG, Kohan DE. Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 alters vasopressin regulation of urine osmolality. *Am J Physiol-renal*. 2005;288(5):F912–20.
44. Verney EB. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc Royal Soc Lond Ser B Biological Sci*. 1947;135(878):25–106.
45. Hayashi M, Sasaki S, Tsuganezawa H, Monkawa T, Kitajima W, Konishi K, Fushimi K, Marumo F, Saruta T. Expression and distribution of aquaporin of collecting duct are regulated by vasopressin V2 receptor in rat kidney. *J Clin Invest*. 1994;94(5):1778–83.

46. Yamamura Y, Ogawa H, Yamashita H, Chihara T, Miyamoto H, Nakamura S, Onogawa T, Yamashita T, Hosokawa T, Mori T, Tominaga M, Yabuuchi Y. Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist. *Brit J Pharmacol.* 1992;105(4):787–91.
47. Yamamura Y, Ogawa H, Chihara T, Kondo K, Onogawa T, Nakamura S, Mori T, Tominaga M, Yabuuchi Y. OPC-21268, an orally effective, nonpeptide vasopressin V1 receptor antagonist. *Science.* 1991;252(5005):572–4.
48. West D van, Del-Favero J, Aulchenko Y, Oswald P, Souery D, Forsgren T, Sluijs S, Bel-Kacem S, Adolfsson R, Mendlewicz J, Duijn CV, Deboutte D, Broeckhoven CV, Claes S. A major SNP haplotype of the arginine vasopressin 1B receptor protects against recurrent major depression. *Mol Psychiatr.* 2004;9(3):287–92.
49. Dema A, Perets E, Schulz MS, Deák VA, Klusmann E. Pharmacological targeting of AKAP-directed compartmentalized cAMP signalling. *Cell Signal.* 2015;27(12):2474–87.
50. Taylor SS, Zhang P, Steichen JM, Keshwani MM, Kornev AP. PKA: Lessons learned after twenty years. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Proteins Proteom.* 2013;1834(7):1271–8.
51. Stefan E, Wiesner B, Baillie GS, Mollajew R, Henn V, Lorenz D, Furkert J, Santamaria K, Nedvetsky P, Hundsrucker C, Beyermann M, Krause E, Pohl P, Gall I, MacIntyre AN, Bachmann S, Houslay MD, Rosenthal W, Klusmann E. 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.* 2007;18(1):199–212.
52. Martin NP, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Regulation of V2 Vasopressin Receptor Degradation by Agonist-promoted Ubiquitination. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45954–9.
53. Lutz W, Sanders M, Salisbury J, Kumar R. Internalization of vasopressin analogs in kidney and smooth muscle cells: evidence for receptor-mediated endocytosis in cells with V2 or V1 receptors. *Proc National Acad Sci.* 1990;87(17):6507–11.
54. Kojro E, Postina R, Gilbert S, Bender F, Krause G, Fahrenholz F. Structural requirements for V2 vasopressin receptor proteolytic cleavage. *Eur J Biochem.* 1999;266(2):538–48.
55. Klusmann E, Maric K, Rosenthal W. Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Special Issue on Water Transport Across Biological Membranes. *Rev Physiol Bioch P.* 2008;141:33–95.
56. Nedvetsky PI, Stefan E, Frische S, Santamaria K, Wiesner B, Valenti G, Hammer JA, Nielsen S, Goldenring JR, Rosenthal W, Klusmann E. A Role of Myosin Vb and Rab11-FIP2 in the Aquaporin-2 Shuttle. *Traffic.* 2007;8(2):110–23.
57. Szperl AM, Golachowska MR, Bruinenberg M, Prekeris R, Thunnissen A-MW, Karrenbeld A, Dijkstra G, Hoekstra D, Mercer D, Ksiazek J, Wijmenga C, Wapenaar MC, Rings EH, IJzendoorn SC van. Functional Characterization of Mutations in the

- Myosin Vb Gene Associated With Microvillus Inclusion Disease. *J Pediatr Gastr Nutr.* 2011;52(3):307–13.
58. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Hasegawa T. Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(2):197–209.
59. Jahn R, Scheller RH. SNAREs — engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2006;7(9):631–43.
60. Burkhardt P, Hattendorf DA, Weis WI, Fasshauer D. Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide. *Embo J.* 2008;27(7):923–33.
61. Procino G, Barbieri C, Tamma G, Benedictis LD, Pessin JE, Svelto M, Valenti G. AQP2 exocytosis in the renal collecting duct – involvement of SNARE isoforms and the regulatory role of Munc18b. *J Cell Sci.* 2008;121(12):2097–106.
62. Yang S, Fletcher WH, Johnson DA. Regulation of cAMP-dependent protein kinase: Enzyme activation without dissociation. *Biochemistry-us.* 1995;34(19):6267–71.
63. Smith FD, Esseltine JL, Nygren PJ, Veessler D, Byrne DP, Vonderach M, Strashnov I, Evers CE, Evers PA, Langeberg LK, Scott JD. Local protein kinase A action proceeds through intact holoenzymes. *Science.* 2017;356(6344):1288–93.
64. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. Camp-Dependent Protein Kinase: Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1990;59(1):971–1005.
65. Skroblin P, Grossmann S, Schäfer G, Rosenthal W, Klusmann E. Chapter Five Mechanisms of Protein Kinase A Anchoring. *Int Rev Cel Mol Bio.* 2010;283:235–330.
66. Götz F, Roske Y, Schulz MS, Autenrieth K, Bertinetti D, Faelber K, Zühlke K, Kreuchwig A, Kennedy EJ, Krause G, Daumke O, Herberg FW, Heinemann U, Klusmann E. AKAP18:PKA-R11 α structure reveals crucial anchor points for recognition of regulatory subunits of PKA. *Biochem J.* 2016;473(13):1881–94.
67. Henn V, Edemir B, Stefan E, Wiesner B, Lorenz D, Theilig F, Schmitt R, Vossebein L, Tamma G, Beyermann M, Krause E, Herberg FW, Valenti G, Bachmann S, Rosenthal W, Klusmann E. 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.* 2004;279(25):26654–65.
68. Klusmann E, Maric K, Wiesner B, Beyermann M, Rosenthal W. Protein Kinase A Anchoring Proteins Are Required for Vasopressin-mediated Translocation of Aquaporin-2 into Cell Membranes of Renal Principal Cells. *J Biol Chem.* 1999;274(8):4934–8.
69. Klusmann E, Tamma G, Lorenz D, Wiesner B, Maric K, Hofmann F, Aktories K, Valenti G, Rosenthal W. An Inhibitory Role of Rho in the Vasopressin-mediated Translocation of Aquaporin-2 into Cell Membranes of Renal Principal Cells. *J Biol Chem.* 2001;276(23):20451–7.

70. Szaszák M, Christian F, Rosenthal W, Klusmann E. Compartmentalized cAMP signalling in regulated exocytic processes in non-neuronal cells. *Cell Signal*. 2008;20(4):590–601.
71. Okutsu R, Rai T, Kikuchi A, Ohno M, Uchida K, Sasaki S, Uchida S. AKAP220 colocalizes with AQP2 in the inner medullary collecting ducts. *Kidney Int*. 2008;74(11):1429–33.
72. Dema A, Faust D, Lazarow K, Wippich M, Neuenschwander M, Zühlke K, Geelhaar A, Pallien T, Hallscheidt E, Eichhorst J, Wiesner B, Černecká H, Popp O, Mertins P, Dittmar G, Kries JP von, Klusmann E. Cyclin-Dependent Kinase 18 Controls Trafficking of Aquaporin-2 and Its Abundance through Ubiquitin Ligase STUB1, Which Functions as an AKAP. *Cells*. 2020;9(3):673.
73. Vale RD, Reese TS, Sheetz MP. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*. 1985;42(1):39–50.
74. Schroer TA. DYNAMACTIN. *Annu Rev Cell Dev Bi*. 2004;20(1):759–79.
75. Marples D, Schroer TA, Ahrens N, Taylor A, Knepper MA, Nielsen S. Dynein and dynactin colocalize with AQP2 water channels in intracellular vesicles from kidney collecting duct. *Am J Physiol-renal*. 1998;274(2):F384–94.
76. Marples D, Barber B, Taylor A. Effect of a dynein inhibitor on vasopressin action in toad urinary bladder. *J Physiology*. 1996;490(3):767–74.
77. Huber F, Schnauß J, Rönicke S, Rauch P, Müller K, Fütterer C, Käs J. Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Adv Phys*. 2013;62(1):1–112.
78. Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci*. 2015;128(11):2009–19.
79. Tamma G, Klusmann E, Maric K, Aktories K, Svelto M, Rosenthal W, Valenti G. Rho inhibits cAMP-induced translocation of aquaporin-2 into the apical membrane of renal cells. *Am J Physiol-renal*. 2001;281(6):F1092–101.
80. Simon H, Gao Y, Franki N, Hays RM. Vasopressin depolymerizes apical F-actin in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol-cell Ph*. 1993;265(3):C757–62.
81. Nedvetsky PI, Tamma G, Beulshausen S, Valenti G, Rosenthal W, Klusmann E. Aquaporins. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(190):133–57.
82. Isobe K, Jung HJ, Yang C-R, Claxton J, Sandoval P, Burg MB, Raghuram V, Knepper MA. Systems-level identification of PKA-dependent signaling in epithelial cells. *Proc National Acad Sci*. 2017;114(42):E8875–84.
83. Arthur J, Huang J, Nomura N, Jin WW, Li W, Cheng X, Brown D, Lu HJ. Characterization of the putative phosphorylation sites of the AQP2 C terminus and their role in AQP2 trafficking in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol-renal*. 2015;309(8):F673–9.

84. Christensen BM, Zelenina M, Aperia A, Nielsen S. Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V2-receptor agonist/antagonist treatment. *Am J Physiol-renal*. 2000;278(1):F29–42.
85. Moeller HB, MacAulay N, Knepper MA, Fenton RA. Role of multiple phosphorylation sites in the COOH-terminal tail of aquaporin-2 for water transport: evidence against channel gating. *Am J Physiol-renal*. 2009;296(3):F649–57.
86. Bradford D, Raghuram V, Wilson JLL, Chou C-L, Hoffert JD, Knepper MA, Pisitkun T. Use of LC-MS/MS and Bayes' theorem to identify protein kinases that phosphorylate aquaporin-2 at Ser256. *Am J Physiol-cell Ph*. 2014;307(2):C123–39.
87. Tamma G, Lasorsa D, Trimpert C, Ranieri M, Mise AD, Mola MG, Mastrofrancesco L, Devuyst O, Svelto M, Deen PMT, Valenti G. A Protein Kinase A–Independent Pathway Controlling Aquaporin 2 Trafficking as a Possible Cause for the Syndrome of Inappropriate Antidiuresis Associated with Polycystic Kidney Disease 1 Haploinsufficiency. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(10):2241–53.
88. Moeller HB, Knepper MA, Fenton RA. Serine 269 phosphorylated aquaporin-2 is targeted to the apical membrane of collecting duct principal cells. *Kidney Int*. 2009;75(3):295–303.
89. Wang P-J, Lin S-T, Liu S-H, Kuo K-T, Hsu C-H, Knepper MA, Yu M-J. Vasopressin-induced serine 269 phosphorylation reduces Sipa111 (signal-induced proliferation-associated 1 like 1)-mediated aquaporin-2 endocytosis. *J Biol Chem*. 2017;292(19):7984–93.
90. Moeller HB, Aroankins TS, Slengerik-Hansen J, Pisitkun T, Fenton RA. Phosphorylation and ubiquitylation are opposing processes that regulate endocytosis of the water channel aquaporin-2. *J Cell Sci*. 2014;127(14):3174–83.
91. Tamma G, Robben JH, Trimpert C, Boone M, Deen PMT. Regulation of AQP2 localization by S256 and S261 phosphorylation and ubiquitination. *Am J Physiol-cell Ph*. 2011;300(3):C636–46.
92. Nedvetsky PI, Tabor V, Tamma G, Beulshausen S, Skroblin P, Kirschner A, Mutig K, Boltzen M, Petrucci O, Vossenkämper A, Wiesner B, Bachmann S, Rosenthal W, Klusmann E. Reciprocal Regulation of Aquaporin-2 Abundance and Degradation by Protein Kinase A and p38-MAP Kinase. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(10):1645–56.
93. Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, Shakin-Eshleman SH. The Amino Acid Following an Asn-X-Ser/Thr Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core Glycosylation Efficiency. *Biochemistry-us*. 1998;37(19):6833–7.
94. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. Vol. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag; 2003.
95. Moeller HB, Olesen ETB, Fenton RA. Regulation of the water channel aquaporin-2 by posttranslational modification. *Am J Physiol-renal*. 2011;300(5):F1062–73.
96. Gao C, Higgins PJ, Zhang W. AQP2: Mutations Associated with Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus and Regulation by Post-Translational Modifications and Protein-Protein Interactions. *Cells*. 2020;9(10):2172.

97. Hendriks G, Koudijs M, Balkom BWM van, Oorschot V, Klumperman J, Deen PMT, Sluijs P van der. 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.* 2004;279(4):2975–83.
98. Marr N, Bichet DG, Hoefs S, Savelkoul PJM, Konings IBM, Mattia FD, Graat MPJ, Arthus M-F, Lonergan M, Fujiwara TM, Knoers NVAM, Landau D, Balfe WJ, Oksche A, Rosenthal W, Müller D, Os CHV, Deen PMT. Cell-Biologic and Functional Analyses of Five New Aquaporin-2 Missense Mutations that Cause Recessive Nephrogenic Diabetes Insipidus. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(9):2267–77.
99. Faßhauer M. Einfluss von Hormonen auf die Genexpression [Internet]. Einfluss von Hormonen auf die Genexpression. 2003 [cited 2020 Dec 19]. Available from: https://www.bisp.de/SharedDocs/Downloads/Publikationen/Rote_Reihe_kompletter_download/2003_07_Gendoping_Artikel/2003_07_Fasshauer.pdf?__blob=publicationFile&v=1
100. DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc National Acad Sci.* 1994;91(19):8984–8.
101. Yasui M, Zelenin SM, Celsi G, Aperia A. Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements. *Am J Physiol-renal.* 1997;272(4):F443–50.
102. Sandoval PC, Claxton JS, Lee JW, Saeed F, Hoffert JD, Knepper MA. Systems-level analysis reveals selective regulation of Aqp2 gene expression by vasopressin. *Sci Rep-uk.* 2016;6(1):34863.
103. Kaang B-K, Kandel ER, Grant SGN. Activation of cAMP-Responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in aplysia sensory neurons. *Neuron.* 1993;10(3):427–35.
104. Tchapyjnikov D, Li Y, Pisitkun T, Hoffert JD, Yu M-J, Knepper MA. Proteomic profiling of nuclei from native renal inner medullary collecting duct cells using LC-MS/MS. *Physiol Genomics.* 2010;40(3):167–83.
105. Kortenoeven MLA, Trimpert C, Brand M van den, Li Y, Wetzels JFM, Deen PMT. In mpkCCD cells, long-term regulation of aquaporin-2 by vasopressin occurs independent of protein kinase A and CREB but may involve Epac. *Am J Physiol-renal.* 2012;302(11):F1395–401.
106. Radin MJ, Yu M, Stoedkilde L, Miller RL, Hoffert JD, Frokiaer J, Pisitkun T, Knepper MA. Aquaporin-2 regulation in health and disease. *Vet Clin Path.* 2012;41(4):455–70.
107. Bartel DP. MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281–97.
108. Merchante C, Brumos J, Yun J, Hu Q, Spencer KR, Enríquez P, Binder BM, Heber S, Stepanova AN, Alonso JM. Gene-Specific Translation Regulation Mediated by the Hormone-Signaling Molecule EIN2. *Cell.* 2015;163(3):684–97.

109. Eliasson L, Regazzi R. Micro(RNA) management and mismanagement of the islet. *J Mol Biol.* 2019;432(5):1419–28.
110. Kim J-E, Jung HJ, Lee Y-J, Kwon T-H. Vasopressin-regulated miRNAs and AQP2-targeting miRNAs in kidney collecting duct cells. *Am J Physiol-renal.* 2015;308(7):F749–64.
111. Leitch V, Agre P, King LS. Altered ubiquitination and stability of aquaporin-1 in hypertonic stress. *Proc National Acad Sci.* 2001;98(5):2894–8.
112. Wilson JLL, Miranda CA, Knepper MA. Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clin Exp Nephrol.* 2013;17(6):751–64.
113. Sakai M, Yamamoto K, Mizumura H, Matsumoto T, Tanaka Y, Noda Y, Ishibashi K, Yamamoto T, Sasaki S. Phosphorylation profile of human AQP2 in urinary exosomes by LC–MS/MS phosphoproteomic analysis. *Clin Exp Nephrol.* 2020;24(9):762–9.
114. Jung HJ, Kwon T-H. Molecular mechanisms regulating aquaporin-2 in kidney collecting duct. *Am J Physiol-renal.* 2016;311(6):F1318–28.
115. Lee Y-J, Lee J-E, Choi H-J, Lim J-S, Jung HJ, Baek M-C, Frøkiær J, Nielsen S, Kwon T-H. E3 ubiquitin-protein ligases in rat kidney collecting duct: response to vasopressin stimulation and withdrawal. *Am J Physiol-renal.* 2011;301(4):F883–96.
116. Kamsteeg E-J, Hendriks G, Boone M, Konings IBM, Oorschot V, Sluijs P van der, Klumperman J, Deen PMT. Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel. *Proc National Acad Sci.* 2006;103(48):18344–9.
117. Fujiwara TM, Bichet DG. Molecular Biology of Hereditary Diabetes Insipidus. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):2836–46.
118. Pfäffle R, Holl R. Leitlinien Kinder- und Jugendmedizin. E Endokrinologie Konsensusfindung Endokrinologie. 2015;E12.1-E12.4.
119. Christ-Crain M, Bichet DG, Fenske WK, Goldman MB, Rittig S, Verbalis JG, Verkman AS. Diabetes insipidus. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):54.
120. Maghnie M. Diabetes insipidus. *Horm Res Paediat.* 2003;59(Suppl 1):42–54.
121. Marques P, Gunawardana K, Grossman A. Transient diabetes insipidus in pregnancy. *Endocrinol Diabetes Amp Metabolism Case Reports.* 2015;2015(1):150078.
122. Balanescu S, Rutishauser J. Diabetes insipidus: Differentialdiagnostik und Therapie. *Swiss Medical Forum.* 2010;10(07):123–8.
123. Trepiccione F, Pisitkun T, Hoffert JD, Poulsen SB, Capasso G, Nielsen S, Knepper MA, Fenton RA, Christensen BM. Early targets of lithium in rat kidney inner medullary collecting duct include p38 and ERK1/2. *Kidney Int.* 2014;86(4):757–67.
124. Chapman IM. MSD Manual - Central Diabetes insipidus [Internet]. MSD Manual - Central Diabetes insipidus. 2019 [cited 2020 Dec 29]. Available from: <https://www.msmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/pituitary-disorders/central-diabetes-insipidus>

125. Hechanova LA. MSD Manual - Nephrogenic Diabetes insipidus [Internet]. MSD Manual - Nephrogenic Diabetes insipidus. 2020 [cited 2020 Dec 29]. Available from: <https://www.msmanuals.com/professional/genitourinary-disorders/renal-transport-abnormalities/nephrogenic-diabetes-insipidus>
126. Schoot TS, Molmans THJ, Grootens KP, Kerckhoffs APM. Systematic review and practical guideline for the prevention and management of the renal side effects of lithium therapy. *Eur Neuropsychopharm*. 2020;31:16–32.
127. Ingelfinger JR, Sterns RH. Disorders of Plasma Sodium — Causes, Consequences, and Correction. *New Engl J Medicine*. 2015;372(1):55–65.
128. Fenske W, Allolio B. The Syndrome of Inappropriate Secretion of Antidiuretic Hormone: Diagnostic and Therapeutic Advances. *Horm Metab Res*. 2010;42(10):691–702.
129. Schrier RW. Pathogenesis of Sodium and Water Retention in High-Output and Low-Output Cardiac Failure, Nephrotic Syndrome, Cirrhosis, and Pregnancy. *New Engl J Medicine*. 1988;319(17):1127–34.
130. Nielsen S, Terris J, Andersen D, Ecelbarger C, Frøkiær J, Jonassen T, Marples D, Knepper MA, Petersen JS. Congestive heart failure in rats is associated with increased expression and targeting of aquaporin-2 water channel in collecting duct. *Proc National Acad Sci*. 1997;94(10):5450–5.
131. Ouyang S, Chen W, Zeng G, Lei C. Aquaporin-2 expression in the kidney and urine is elevated in rats with monocrotaline-induced pulmonary heart disease. *J Int Med Res*. 2020;48(1):0300060519894448.
132. Lütken SC, Kim SW, Jonassen T, Marples D, Knepper MA, Kwon T-H, Frøkiær J, Nielsen S. Changes of renal AQP2, ENaC, and NHE3 in experimentally induced heart failure: response to angiotensin II AT1 receptor blockade. *Am J Physiol-renal*. 2009;297(6):F1678–88.
133. Bao L-Z, Shen M, Qudirat H, Shi J-B, Su T, Song J-W, Wang Z-K, Zhao X-X, Jing Q, Zheng X, Guo Z-F. Obestatin ameliorates water retention in chronic heart failure by downregulating renal aquaporin 2 through GPR39, V2R and PPAR γ signaling. *Life Sci*. 2019;231:116493.
134. Zheng H, Liu X, Katsurada K, Patel KP. Renal denervation improves sodium excretion in rats with chronic heart failure: effects on expression of renal ENaC and AQP2. *Am J Physiol-heart C*. 2019;317(5):H958–68.
135. Ishikawa S. Hyponatremia Associated with Heart Failure: Pathological Role of Vasopressin-Dependent Impaired Water Excretion. *J Clin Medicine*. 2015;4(5):933–47.
136. John S, Thuluvath PJ. Hyponatremia in cirrhosis: Pathophysiology and management. *World J Gastroentero*. 2015;21(11):3197–205.
137. Maric K, Oksche A, Rosenthal W. Aquaporin-2 expression in primary cultured rat inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol-renal*. 1998;275(5):F796–801.

138. Liebenhoff U, Rosenthal W. Identification of Rab3-, Rab5a- and synaptobrevin II-like proteins in a preparation of rat kidney vesicles containing the vasopressin-regulated water channel. *Febs Lett.* 1995;365(2–3):209–13.
139. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
140. Alken M, Rutz C, Köchl R, Donalies U, Oueslati M, Furkert J, Wietfeld D, Hermosilla R, Scholz A, Beyermann M, Rosenthal W, Schüle R. The signal peptide of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1 promotes receptor expression but is not essential for establishing a functional receptor. *Biochem J.* 2005;390(2):455–64.
141. Daly JW. Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview. *Adv Cyclic Nucl Prot.* 1984;17:81–9.
142. Posternak Th, Sutherland EW, Henion WF. Derivatives of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Biochim Biophys Acta.* 1962;65(3):558–60.
143. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 2000;351(1):95.
144. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol.* 1977;36(1):59–72.
145. Sobell HM. Actinomycin and DNA transcription. *Proc National Acad Sci.* 1985;82(16):5328–31.
146. Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, Liu JO. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol.* 2010;6(3):209–17.
147. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 1998;8(10):397–403.
148. Hoffert JD, Nielsen J, Yu M-J, Pisitkun T, Schleicher SM, Nielsen S, Knepper MA. Dynamics of aquaporin-2 serine-261 phosphorylation in response to short-term vasopressin treatment in collecting duct. *Am J Physiol-renal.* 2007;292(2):F691–700.
149. Li W, Ye Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(15):2397–406.
150. Fenton RA, Moeller HB, Hoffert JD, Yu M-J, Nielsen S, Knepper MA. Acute regulation of aquaporin-2 phosphorylation at Ser-264 by vasopressin. *Proc National Acad Sci.* 2008;105(8):3134–9.
151. Hoffert JD, Chou C-L, Knepper MA. Aquaporin-2 in the “-omics” Era. *J Biol Chem.* 2009;284(22):14683–7.
152. Khositseth S, Pisitkun T, Slentz DH, Wang G, Hoffert JD, Knepper MA, Yu M-J. Quantitative Protein and mRNA Profiling Shows Selective Post-Transcriptional Control of Protein Expression by Vasopressin in Kidney Cells. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(1):M110.004036.

153. Sandoval PC, Slentz DH, Pisitkun T, Saeed F, Hoffert JD, Knepper MA. Proteome-Wide Measurement of Protein Half-Lives and Translation Rates in Vasopressin-Sensitive Collecting Duct Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(11):1793–805.
154. Pickering CM, Grady C, Medvar B, Emamian M, Sandoval PC, Zhao Y, Yang C-R, Jung HJ, Chou C-L, Knepper MA. Proteomic profiling of nuclear fractions from native renal inner medullary collecting duct cells. *Physiol Genomics*. 2016;48(2):154–66.
155. Fenton RA, Murali SK, Moeller HB. Advances in aquaporin-2 trafficking mechanisms and their implications for treatment of water balance disorders. *Am J Physiol-cell Ph*. 2020;319(1):C1–10.
156. Deshpande V, Kao A, Raghuram V, Datta A, Chou C-L, Knepper MA. Phosphoproteomic identification of vasopressin V2 receptor-dependent signaling in the renal collecting duct. *Am J Physiol-renal*. 2019;317(4):F789–804.
157. Trimpert C, Wesche D, Groot T de, Rodriguez MMP, Wong V, Berg DTM van den, Cheval L, Ariza CA, Doucet A, Stagljar I, Deen PMT. NDFIP allows NEDD4/NEDD4L-induced AQP2 ubiquitination and degradation. *Plos One*. 2017;12(9):e0183774.
158. Wu Q, Moeller HB, Stevens DA, Sanchez-Hodge R, Childers G, Kortenoeven MLA, Cheng L, Rosenbaek LL, Rubel C, Patterson C, Pisitkun T, Schisler JC, Fenton RA. CHIP Regulates Aquaporin-2 Quality Control and Body Water Homeostasis. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(3):936–48.
159. Murali SK, Aroankins TS, Moeller HB, Fenton RA. The Deubiquitylase USP4 Interacts with the Water Channel AQP2 to Modulate Its Apical Membrane Accumulation and Cellular Abundance. *Cells*. 2019;8(3):265.
160. Tai H-C, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(11):826–38.
161. Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T, Nägerl UV. A Balance of Protein Synthesis and Proteasome-Dependent Degradation Determines the Maintenance of LTP. *Neuron*. 2006;52(2):239–45.
162. Yang C-R, Raghuram V, Emamian M, Sandoval PC, Knepper MA. Deep proteomic profiling of vasopressin-sensitive collecting duct cells. II. Bioinformatic analysis of vasopressin signaling. *Am J Physiol-cell Ph*. 2015;309(12):C799–812.
163. Hoffert JD, Fenton RA, Moeller HB, Simons B, Tchapyjnikov D, McDill BW, Yu M-J, Pisitkun T, Chen F, Knepper MA. Vasopressin-stimulated Increase in Phosphorylation at Ser269 Potentiates Plasma Membrane Retention of Aquaporin-2. *J Biol Chem*. 2008;283(36):24617–27.
164. Cheung PW, Ueberdiek L, Day J, Bouley R, Brown D. Protein phosphatase 2C is responsible for VP-induced dephosphorylation of AQP2 serine 261. *Am J Physiol-renal*. 2017;313(2):F404–13.
165. Ahad A, Ahsan H, Mujeeb Mohd, Siddiqui WA. Gallic acid ameliorates renal functions by inhibiting the activation of p38 MAPK in experimentally induced type 2 diabetic rats and cultured rat proximal tubular epithelial cells. *Chem-biol Interact*. 2015;240:292–303.

166. Luo F, Shi J, Shi Q, Xu X, Xia Y, He X. Mitogen-Activated Protein Kinases and Hypoxic/Ischemic Nephropathy. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(3):1051–67.
167. Wu KK. Control of Mesenchymal Stromal Cell Senescence by Tryptophan Metabolites. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):697.
168. Liles JT, Corkey BK, Notte GT, Budas G, Lansdon EB, Hinojosa-Kirschenbaum F, Badal SS, Lee M, Schultz BE, Wise S, Pendem S, Graupe M, Castonguay L, Koch KA, Wong MH, Papalia GA, French DM, Sullivan T, Huntzicker EG, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ, Altuhaifi T, Yang H, Fogo AB, Breckenridge DG. ASK1 contributes to fibrosis and dysfunction in models of kidney disease. *J Clin Invest*. 2018;128(10):4485–500.
169. Kaiser M, Edemir B. Lithium Chloride and GSK3 Inhibition Reduce Aquaporin-2 Expression in Primary Cultured Inner Medullary Collecting Duct Cells Due to Independent Mechanisms. *Cells*. 2020;9(4):1060.
170. Luo R, Hu S, Liu Q, Han M, Wang F, Qiu M, Li S, Li X, Yang T, Fu X, Wang W, Li C. Hydrogen sulfide upregulates renal AQP-2 protein expression and promotes urine concentration. *Faseb J*. 2019;33(1):469–83.
171. Cheema MU, Irsik DL, Wang Y, Miller-Little W, Hyndman KA, Marks ES, Frøkiær J, Boesen EI, Norregaard R. Estradiol regulates AQP2 expression in the collecting duct: a novel inhibitory role for estrogen receptor α . *Am J Physiol-renal*. 2015;309(4):F305–17.
172. Chen M, Cai H, Klein JD, Laur O, Chen G. Dexamethasone increases aquaporin-2 protein expression in ex vivo inner medullary collecting duct suspensions. *Front Physiol*. 2015;6:310.
173. Wang Y-B, Leroy V, Maunsbach AB, Doucet A, Hasler U, Dizin E, Hernandez T, Seigneux S de, Martin P-Y, Féraillé E. Sodium Transport Is Modulated by p38 Kinase–Dependent Cross-Talk between ENaC and Na,K-ATPase in Collecting Duct Principal Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(2):250–9.
174. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Inzucchi SE, Investigators E-RO. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New Engl J Medicine*. 2015;373(22):2117–28.
175. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, Januzzi J, Verma S, Tsutsui H, Brueckmann M, Jamal W, Kimura K, Schnee J, Zeller C, Cotton D, Bocchi E, Böhm M, Choi D-J, Chopra V, Chuquiure E, Giannetti N, Janssens S, Zhang J, Juanatey JRG, Kaul S, Rocca H-PB-L, Merkely B, Nicholls SJ, Perrone S, Pina I, Ponikowski P, Sattar N, Senni M, Seronde M-F, Spinar J, Squire I, Taddei S, Wanner C, Zannad F, Investigators E-RT. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *New Engl J Med*. 2020;383(15):1413–24.
176. Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, Chertow GM, Greene T, Hou F-F, Mann JFE, McMurray JJV, Lindberg M, Rossing P, Sjöström CD, Toto RD, Langkilde A-M, Wheeler DC, Investigators D-CTC and. Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *New Engl J Med*. 2020;383(15):1436–46.

177. Agency EM. EMA drug approval Dapagliflozin [Internet]. EMA drug approval Dapagliflozin. 2020 [cited 2021 Feb 20]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/forxiga-epar-product-information_de.pdf
178. Chung S, Kim S, Son M, Kim M, Koh ES, Shin SJ, Ko S-H, Kim H-S. Empagliflozin Contributes to Polyuria via Regulation of Sodium Transporters and Water Channels in Diabetic Rat Kidneys. *Front Physiol.* 2019;10:271.
179. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, Perrone RD, Krasa HB, Ouyang J, Czerwiec FS, Investigators T 3:4 T. Tolvaptan in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *New Engl J Medicine.* 2012;367(25):2407–18.
180. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Perrone RD, Koch G, Ouyang J, McQuade RD, Blais JD, Czerwiec FS, Sergeeva O, Investigators RT. Tolvaptan in Later-Stage Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *New Engl J Medicine.* 2017;377(20):1930–42.
181. Hoffert JD, Pisitkun T, Saeed F, Wilson JL, Knepper MA. Global analysis of the effects of the V2 receptor antagonist satavaptan on protein phosphorylation in collecting duct. *Am J Physiol-renal.* 2014;306(4):410–21.
182. Watkins PB, Lewis JH, Kaplowitz N, Alpers DH, Blais JD, Smotzer DM, Krasa H, Ouyang J, Torres VE, Czerwiec FS, Zimmer CA. Clinical Pattern of Tolvaptan-Associated Liver Injury in Subjects with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Analysis of Clinical Trials Database. *Drug Safety.* 2015;38(11):1103–13.
183. Cheung PW, Bouley R, Brown D. Targeting the Trafficking of Kidney Water Channels for Therapeutic Benefit. *Annu Rev Pharmacol.* 2019;60(1):1–20.
184. Assadi F, Sharbaf FG. Sildenafil for the Treatment of Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus. *Am J Nephrol.* 2015;42(1):65–9.
185. Hinrichs GR, Mortensen LA, Bistrup C, Dieperink HH, Jensen BL. Treatment of nephrogenic diabetes insipidus patients with cGMP-stimulating drugs does not mitigate polyuria or increase urinary concentrating ability. *Kidney Int Reports.* 2020;5(8):1319–25.
186. Bech AP, Wetzels JFM, Nijenhuis T. Effects of sildenafil, metformin, and simvastatin on ADH-independent urine concentration in healthy volunteers. *Physiological Reports.* 2018;6(7):e13665.
187. Klein JD, Wang Y, Blount MA, Molina PA, LaRocque LM, Ruiz JA, Sands JM. Metformin, an AMPK activator, stimulates the phosphorylation of aquaporin 2 and urea transporter A1 in inner medullary collecting ducts. *Am J Physiol-renal.* 2016;310(10):F1008–12.
188. Procino G, Barbieri C, Carosino M, Tamma G, Milano S, Benedictis LD, Mola MG, Lazo-Fernandez Y, Valenti G, Svelto M. Fluvastatin modulates renal water reabsorption in vivo through increased AQP2 availability at the apical plasma

membrane of collecting duct cells. *Pflügers Archiv - European J Physiology*. 2011;462(5):753.

189. Soh JF, Beaulieu S, Trepiccione F, Linnaranta O, Torres-Platas G, Platt RW, Renaud S, Su C, Mucsi I, D'Apolito L, Mulsant BH, Levinson A, Saury S, Müller D, Schaffer A, Dols A, Low N, Cervantes P, Christensen BM, Herrmann N, Rajji T, Rej S. A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot trial of atorvastatin for nephrogenic diabetes insipidus in lithium users. *Bipolar Disord*. 2021;23(1):66–75.

190. Yang NJ, Hinner MJ. Site-Specific Protein Labeling, *Methods and Protocols*. *Methods Mol Biology*. 2014;1266:29–53.

191. Meijer FA, Gevel IAL de, Vries RMJM de, Brunsveld L. Allosteric small molecule modulators of nuclear receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 2019;485:20–34.

192. Christian F, Szaszák M, Friedl S, Drewianka S, Lorenz D, Goncalves A, Furkert J, Vargas C, Schmieder P, Götz F, Zühlke K, Moutty M, Göttert H, Joshi M, Reif B, Haase H, Morano I, Grossmann S, Klukovits A, Verli J, Gáspár R, Noack C, Bergmann M, Kass R, Hampel K, Kashin D, Genieser H-G, Herberg FW, Willoughby D, Cooper DMF, Baillie GS, Houslay MD, Kries JP von, Zimmermann B, Rosenthal W, Klussmann E. Small Molecule AKAP-Protein Kinase A (PKA) Interaction Disruptors That Activate PKA Interfere with Compartmentalized cAMP Signaling in Cardiac Myocytes*. *J Biological Chem*. 2011;286(11):9079–96.

193. Ando F, Mori S, Yui N, Morimoto T, Nomura N, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Kondo Y, Kagechika H, Uchida S. AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Commun*. 2018;9(1):1411.

194. Bogum J, Faust D, Zühlke K, Eichhorst J, Moutty MC, Furkert J, Eldahshan A, Neuenschwander M, Kries JP von, Wiesner B, Trimpert C, Deen PMT, Valenti G, Rosenthal W, Klussmann E. Small-Molecule Screening Identifies Modulators of Aquaporin-2 Trafficking. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(5):744–58.

195. Vukićević T, Hinze C, Baltzer S, Himmerkus N, Quintanova C, Zühlke K, Compton F, Ahlborn R, Dema A, Eichhorst J, Wiesner B, Bleich M, Schmidt-Ott KM, Klussmann E. Fluconazole Increases Osmotic Water Transport in Renal Collecting Duct through Effects on Aquaporin-2 Trafficking. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(5):795–810.

196. Verbalis JG. An Antifungal for Antidiuresis? *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(5):717–8.

197. Baltzer S, Klussmann E. Small molecules for modulating the localisation of the water channel aquaporin-2—disease relevance and perspectives for targeting local cAMP signalling. *Naunyn-schmiedeberg's Archives Pharmacol*. 2019;392(9):1049–64.

198. Mortensen LA, Bistrup C, Jensen BL, Hinrichs GR. A mini-review of pharmacological strategies used to ameliorate polyuria associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol-renal*. 2020;319(5):F746–53.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sven Beulshausen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Vasopressin kontrolliert die Proteinmenge des Wasserkanals Aquaporin-2 durch Hemmung des proteosomalen Abbaus (*Vasopressin controls Aquaporin-2 abundance by the inhibition of proteasomal degradation*) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung).

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (*International Committee of Medical Journal Editors*; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sven Beulshausen hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Nedvetsky PI, Tamma G, Beulshausen S, Valenti G, Rosenthal W, Klussmann E., Regulation of aquaporin-2 trafficking, Handbook of experimental pharmacology, 2009

Beitrag im Einzelnen:

Eine im Rahmen einer Semesterarbeit durchgeführte Literaturrecherche wurde in das Kapitel 2 *AQP-Trafficking* und dessen Unterkapitel eingearbeitet.

Publikation 2: Pavel I Nedvetsky, Vedrana Tabor, Grazia Tamma, Sven Beulshausen, Philipp Skroblin, Aline Kirschner, Kerim Mutig, Mareike Boltzen, Oscar Petrucci, Anna Vossenkämper, Burkhard Wiesner, Sebastian Bachmann, Walter Rosenthal, Enno Klussmann, Reciprocal regulation of aquaporin-2 abundance and degradation by protein kinase A and p38-MAP kinase, Journal of the American society of Nephrology, 2010

Beitrag im Einzelnen:

Ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der Publikation 2 verwertet. Konkret entstammen die Abbildungen 1 A, B, C, D, E; 2 C, D; 3 A, B; 4 A, B, C, D; 6 A, B; 7 A, B; 8 A, B, H dieser Dissertation. Die zu den Abbildungen gehörigen Experimente wurden von Herrn Beulshausen selbstständig und eigenverantwortlich durchgeführt. Am Studiendesign und der Verfassung des Publikationstextes war Herr Beulshausen nicht beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Publikationen in Co-Autorschaft

1. Nedvetsky PI, Tamma G, Beulshausen S, Valenti G, Rosenthal W, Klussmann E.

Aquaporins. Regulation of aquaporin-2 trafficking.

Handb Exp Pharmacol. 2009;(190):133–57. PubMed PMID: 19096775

2. Nedvetsky PI, Tabor V, Tamma G, Beulshausen S, Skroblin P, Kirschner A, Mutig K., Boltzen M., Petrucci O., Vossenkämper A., Wiesner B., Bachmann S., Rosenthal W., Klussmann E.

Reciprocal Regulation of Aquaporin-2 Abundance and Degradation by Protein Kinase A and p38-MAP Kinase.

J Am Soc Nephrol. 2010;21(10):1645–56. PubMed PMID: 20724536

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei PD Dr. Enno Klusmann und Dr. Pavel Nedvetsky bedanken. Einerseits, weil sie mir das Thema überlassen haben und mich während der Arbeit im Labor hervorragend angeleitet und mich geduldig geführt haben, andererseits möchte ich ihnen aber noch viel mehr danken, dass sie mich nach der langen Pause noch so konsequent in der Verfassung der Monographie unterstützt haben. Ich möchte Danny für die vielen Ideen, Anmerkungen und hilfreichen Gespräche, die mir wertvollen Input gegeben haben, Haiko für die Hilfe beim Erstellen der Grafiken und Alexandra für die letzten Feinheiten danken. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich über die Jahre immer wieder daran erinnern haben, wie wichtig es ist, ein derartiges Projekt zu beenden.

Ganz besonders möchte ich meiner Frau Julia und unseren beiden Kindern dafür danken, dass sie mir die Zeit, Kraft und Ruhe geschenkt haben, diese Arbeit zu verfassen.