

4 Diskussion

AVP ist das Schlüsselhormon bei der regulierten Wasserrückresorption in der Niere. Es induziert eine PKA-abhängige Umverteilung des Wasserkanals AQP2 aus intrazellulären Vesikeln in die apikale Plasmamembran renaler Hauptzellen, die molekulare Grundlage der AVP-vermittelten Wasserrückresorption. In der vorgelegten Arbeit wurde eine Methode zur Isolation von AQP2-tragenden Vesikeln etabliert. An den AQP2-tragenden Vesikeln konnten Proteine der AVP/cAMP-abhängigen Signaltransduktionskaskade, die bei der Umverteilung von AQP2 eine Rolle spielen, identifiziert werden: AKAP18 δ , PKA, PDE4D3 und RhoA.

4.1 Charakterisierung von immunisolierten AQP2-tragenden Vesikel

Um Proteine zu identifizieren, die mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert sind, wurden bisher Dichtegradienten oder differentielle Zentrifugationsverfahren angewendet (Liebenhoff *et al.*, 1995; Marples *et al.*, 1998). Außerdem wurde zwar eine Möglichkeit beschrieben, nach erfolgter Anreicherung von partikulären Fraktionen AQP2-tragende Vesikel mittels AQP2-Antikörper anzureichern. Es wurde aber nur eine unzureichende Qualitätskontrolle der Präparation vorgenommen (Marples *et al.*, 1998). Im Vergleich zu den oben angeführten Vesikelpräparationsmethoden wird in der vorliegenden Arbeit eine Methode beschrieben, mit der es möglich ist, spezifisch AQP2-tragende Vesikel in kurzer Zeit sowohl aus IMCD-Zellen als auch aus dem Nierengewebe von Ratten (Abb. 6) anzureichern. Die Kontrollversuche verdeutlichen, dass es nur zu geringfügiger Verunreinigung durch andere Kompartimente wie etwa Plasmamembran, Mitochondrien, Zytoskelett oder ER kommt (Abb. 6).

Die spezifische Anreicherung der AQP2-tragenden intrazellulären Vesikeln veranlasste uns dazu, eine genauere Charakterisierung der Vesikel vorzunehmen. Wie aus der Literatur bekannt, deutet der *Recycling*-Prozess und die AVP-abhängige Translokation von AQP2 in die Plasmamembran an, dass AQP2 auf verschiedenen Populationen von Vesikeln zu finden ist (Gustafson et al., 2000; Nejsun et al., 2004). Man kann sie in endozytotische und exozytotische Vesikel unterteilen, an denen jeweils unterschiedliche Proteine vorkommen, die deren Funktionen regulieren. Rab3a ist zum Beispiel auf exozytotischen Vesikeln angereichert, wobei es die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran mitreguliert (Südhof, 2004). Ein Marker für endozytotische Vesikel ist Rab5. Es ist an der Abschnürung von endozytotischen Vesikeln von der Plasmamembran beteiligt (Zerial und McBride, 2001).

Die AQP2-tragende vesikuläre Fraktion enthielt sowohl Rab3a- als auch Rab5-Proteine. Das Vorhandensein von endozytotischen und exozytotischen AQP2-tragenden Vesikeln bestätigt die Möglichkeit eines *Recycling*-Prozesses von AQP2 zwischen intrazellulären AQP2-Vesikeln und der Plasmamembran (Gustafson et al., 2000; Lu et al., 2004; Nejsun et al., 2004). Diese Methode könnte man verwenden, um verschiedene Vesikelpopulationen (z.B. exo- und endozytotische Vesikel) durch Einsatz entsprechender Antikörper aufzureinigen. Dadurch wäre es möglich die genaue Zusammensetzung der entsprechenden Vesikelpopulationen zu identifizieren, um sie dann miteinander zu vergleichen.

4.2 Beteiligung von PKA und AKAP-Proteinen an der regulierten Wasserrückresorption

4.2.1 Die PKA ist über AKAP-Proteine mit den AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert

Die Aktivierung der PKA und die nachfolgende Phosphorylierung des Wasserkanals AQP2 durch die katalytische PKA-Untereinheit ist der Auslöser für die Translokation von AQP2 in die Plasmamembran. Aus diesem Grund untersuchten wir, ob und welche PKA-Untereinheiten an AQP2-tragenden Vesikeln zu finden sind. Die Abb. 6C zeigt, dass katalytische und regulatorische PKA-Untereinheiten (RII α und RII β) mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert sind. In PKA-Aktivitätsmessungen der immunisolierten AQP2-tragenden Vesikel konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lande et al. (1996) PKA-Aktivität festgestellt werden (Abb. 7 und Abb. 16C).

AKAP-Proteine sind für die Verankerung der PKA am Wirkungsort und somit für die räumliche Kompartimentierung der cAMP-Signalkaskade verantwortlich. Klusmann et al. (1999) konnten anhand von Versuchen an IMCD-Zellen zeigen, dass die Verankerung der PKA an AKAP-Proteine eine Voraussetzung für die AVP-abhängige Translokation von AQP2 darstellt. Die PKA muss demnach in den Hauptzellen in unmittelbarer Umgebung ihres Substrates AQP2 an bestimmte subzelluläre Bereiche verankert sein, um eine spezifische AVP-abhängige Zellantwort zu ermöglichen. In PKA-Aktivitätsmessungen konnte bestätigt werden, dass das PKA-Holoenzym an den AQP2-tragenden Vesikeln gefunden werden kann. Durch Verwendung des Peptids Ht31 (Alto et al., 2003; Klusmann et al., 1999), welches die Bindung der PKA an AKAP-Proteine inhibiert, konnte gezeigt werden, dass die PKA über AKAP-Proteine an die AQP2-tragenden Vesikel verankert wird (Abb.7).

Es könnten demnach ein oder mehrere AKAP-Proteine für die Verankerung der PKA an die AQP2-tragenden Vesikel verantwortlich sein. Ein AKAP-Protein könnte ein 90 kDa AKAP-Protein unbekannter Identität sein, welches in aufgereinigten Endosomenpräparationen von Ratten IMCD-Zellen gefunden werden konnte (Jo et al., 2001). In der gleichen Arbeit konnten in RII-*Overlay*-Experimenten weitere AKAP-Proteine in der AQP2-haltigen Fraktion gefunden werden. In Übereinstimmung mit Jo et al. (Jo et al., 2001) konnte AQP2 nicht mit der PKA präzipitiert werden (s.u. AKAP18 δ). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass AQP2 nicht Teil eines Proteinkomplexes mit der PKA ist.

4.2.2 AKAP18 δ ist mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert und transloziert AVP-abhängig an die Plasmamembran

Als erstes bekanntes AKAP-Protein konnten wir AKAP18 δ an AQP2-tragenden Vesikeln identifizieren (Abb. 8 und Abb. 13A). AKAP18 δ könnte die PKA in räumlicher Nähe ihres Substrates AQP2 verankern.

Wie AKAP18 δ an die AQP2-tragenden Vesikeln bindet, ist nicht bekannt. AKAP18 δ besitzt nicht die Membranankerdomänen von AKAP18 α und AKAP18 β . Allerdings zeigten Sequenzanalysen eine potentielle Myristoylierungsstelle, die möglicherweise für eine Membranbindung verantwortlich ist. Eine andere Möglichkeit ist die Verankerung von AKAP18 δ durch einen bis jetzt noch unbekanntem Interaktionspartner an die Vesikelmembran, wie es für AKAP18 γ schon vermutet wurde (Trotter et al., 1999). Eine Protein-Proteininteraktion könnte beispielsweise durch C-terminale Leuzinzipper-Motive vermittelt werden. Dieses Motiv ist in der AKAP18 δ Sequenz konserviert und möglicherweise notwendig für die Interaktion mit einem an AQP2-tragende Vesikel gebundenem Protein mit Leuzinzipper-bindendem Motiv. AKAP18 α interagiert über dieses Motiv mit dem L-Typ Ca²⁺-Kanal (Hulme et al., 2002).

Nach Behandlung mit AVP kotransloziert AKAP18 δ mit AQP2 an die Plasmamembran von IMCD-Zellen (Abb. 8C). Diese Beobachtung deutet auf eine Beteiligung von AKAP18 δ an der AQP2-Translokation hin. Zusätzlich zu AKAP18 δ sind aus der Literatur weitere Proteine bekannt, die mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert sind. Zum Beispiel das Motorprotein Dynein, das SNARE-Protein VAMP2 oder das SNAP25 assoziierte Protein Hrs-2 (Gouraud *et al.*, 2002; Marples *et al.*, 1998; Shukla *et al.*, 2001). Dynein und VAMP2 scheinen nur mit den Vesikeln assoziiert zu sein. Dynein ist am Transport von Vesikeln entlang von Mikrotubuli in die Plasmamembran beteiligt (Marples *et al.*, 1998). VAMP2 ist für die Fusion von AQP2-tragenden Vesikeln mit der Plasmamembran notwendig (Gouraud *et al.*, 2002). Hrs-2 ist das einzige Protein, welches sowohl an den Vesikeln als auch an der Plasmamembran gefunden werden kann. Hrs-2 ist möglicherweise an der Vesikelfusion beteiligt (Shukla *et al.*, 2001).

Keines dieser Proteine kotransloziert mit AQP2 in die Plasmamembran. AKAP18 δ ist möglicherweise nicht nur der Anker für die PKA, um die Phosphorylierung von AQP2 an der vesikulären Membran zu ermöglichen, sondern es könnte auch Funktionen bei der Translokation übernehmen oder als Gerüstprotein für weitere Komponenten der cAMP-Signalkaskade fungieren (s.u.).

4.3 PDE4 ist an der AVP-abhängigen Umverteilung von AQP2 beteiligt

4.3.1 Die Hemmung der PDE4-Familie steigert die AVP-abhängige Akkumulation von AQP2 in der Plasmamembran von IMCD-Zellen

Neben den AKAP-Proteinen und der PKA sind Phosphodiesterasen an der Kompartimentierung von cAMP-Signalen beteiligt. Die PDE4-Familie, die spezifisch cAMP hydrolysiert und dadurch das PKA-Signal terminiert (Conti *et al.*, 2003; Houslay *et al.*, 2003), ist an der Expressionsregulation von AQP2 beteiligt (Langzeitregulation; Frokiaer *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung der Phosphodiesterase 4D an der AVP-abhängigen Umverteilung von AQP2 festgestellt werden (Kurzzeitregulation).

In Abwesenheit von AVP hat die Inhibition der PDE4-Familie mit Rolipram, einem selektiven Hemmer dieser Subfamilie, keine feststellbare Auswirkungen auf die Lokalisation von AQP2. Das deutet daraufhin, dass die basale PDE4-Aktivität die Lokalisation von AQP2 nicht beeinflusst. Inhibition aller PDE4-Subtypen und nachfolgende Behandlung mit AVP bewirkt jedoch entweder eine gesteigerte Translokation von AQP2 in die Plasmamembran oder eine mögliche Inhibition des AVP-abhängigen *Recycling*-Prozesses von AQP2 (Abb. 9; Gustafson *et al.*, 2000; Nejsum *et al.*, 2004). Möglicherweise ist die PDE4 an der Endozytose von AQP2 beteiligt. Eine andere Erklärung wäre, dass durch selektive Inhibition von PDE4 in Umgebung von vesikulärem AQP2 eine gesteigerte AVP-abhängige AQP2-Translokation ermöglicht wird.

4.3.2 PDE4D3 transloziert AVP-abhängig in die Plasmamembran

Über Größenvergleich mit rekombinanter PDE4D3 in der SDS-PAGE und über RT-PCR konnten wir PDE4D3 und 9 als einzige in den IMCD-Zellen exprimierte PDE4D-Spleißvarianten identifizieren. Die beiden Spleißvarianten unterscheiden sich nur durch 15 Aminosäuren am N-Terminus. An AQP2-tragenden Vesikeln kann aber, nach ersten Versuchen mit einem PDE4D9-spezifischen Antikörper, nur PDE4D3 gefunden werden. Die PDE-Aktivitätsmessungen von AQP2-tragenden Vesikeln zeigten, dass die PDE4-Familie für mehr als 75% der cAMP-Hydrolyseaktivität an AQP2-tragenden Vesikeln verantwortlich ist (Abb. 17C). Dies verleitet uns zu der Annahme, dass der größte Teil der PDE4-Aktivität an den AQP2-tragenden Vesikeln von PDE4D3 stammt. Nach Behandlung mit AVP ist es auch PDE4D3, die mit dem Wasserkanal AQP2 in die Plasmamembran von IMCD-Zellen kotransloziert (Abb. 11). Diese Ergebnisse sprechen PDE4D3 eine Beteiligung an der Translokation von AQP2 zu. PDE4D3 scheint unter basalen Bedingungen an den AQP2-tragenden Vesikeln und nach Behandlung mit AVP an der Plasmamembran bei der Kompartimentierung der AVP-induzierten cAMP-Antwort beteiligt zu sein.

4.3.3 Überexpression von PDE4D3-GFP in IMCD-Zellen inhibiert die Translokation von AQP2

Die Überexpression von wildtypischer PDE4D3 in IMCD-Zellen verhindert die AVP-abhängige Translokation von AQP2 in die Plasmamembran. Durch die gesteigerte PDE4D3-Aktivität wird möglicherweise die AVP-abhängige Aktivierung der PKA in der Umgebung von AQP2 und somit die Phosphorylierung von AQP2, dem Auslöser für die Translokation, verhindert (Abb. 12). Bei Überexpression von katalytisch inaktiver PDE4D3 in AVP-behandelten IMCD-Zellen kommt es zwar tendenziell, wie bei Behandlung mit dem spezifischen PDE4-Hemmer Rolipram, zu einer gesteigerten AQP2-Akkumulation in der Plasmamembran von IMCD-Zellen (Abb. 12D). Die statistische Auswertung zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied. Die Überexpression einer weiteren langen PDE4-Isoform, der wildtypischen PDE4A10, hatte keine Auswirkung auf die AVP-abhängige Umverteilung von AQP2. PDE4A-Spleißvarianten werden in IMCD-Zellen exprimiert, können aber nicht an AQP2-tragenden Vesikeln gefunden werden.

Es deutet alles darauf hin, dass die cAMP-Hydrolyse durch PDE4D3 an funktionell relevanten Orten von IMCD-Zellen für die Inhibition der Translokation von AQP2 verantwortlich ist. Der lokale Effekt der PDE4D3 an den AQP2-tragenden Vesikeln ist möglicherweise verantwortlich für die Inhibition der Translokation von AQP2. Erst durch die zielgerichtete Phosphodiesteraseaktivität der PDE4D3 in der Umgebung von AQP2 wird die AVP-abhängigen Phosphorylierung von AQP2 (s.u.) durch die PKA verhindert.

Das Vorhandensein auf AQP2-tragenden Vesikeln, die AVP-abhängige Translokation mit AQP2 und die Ergebnisse der Überexpression in IMCD-Zellen deuten darauf hin, dass mit PDE4D3 möglicherweise die Isoform identifiziert werden konnte, die für NDI in den DI+/+ Mäusen verantwortlich ist (Dousa, 1999). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse sowohl auf eine Beteiligung der PDE4D3 an der Langzeit- (Dousa, 1999; Frokiaer *et al.*, 1999) als auch an der Kurzzeitregulation (King *et al.*, 2004) von AQP2 hin.

4.3.4 Interaktion von PDE4D3 und AKAP18 δ

Zahlreiche Proteine wie etwa Myomegalin, AKAP450, mAKAP und β -Arrestin interagieren mit PDE4D3 und sind unter anderem dadurch an der Kompartimentierung von cAMP-abhängigen Signalwegen beteiligt (Dodge *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2002; Tasken *et al.*, 2001; Verde *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob bekannte Interaktionspartner von PDE4D3 an den AQP2-tragenden Vesikeln zu finden sind. Myomegalin und mAKAP werden in IMCD-Zellen nicht exprimiert. AKAP450 und β -Arrestin hingegen werden exprimiert, kommen aber nicht an AQP2-tragenden Vesikeln vor (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigte sich, dass PDE4D3 direkt mit AKAP18 δ interagiert (Abb. 14). Da PDE4D3 und AKAP18 δ an AQP2-tragenden Vesikeln gefunden werden können, liegt die Annahme nahe, dass AKAP18 δ neben der PKA auch die PDE4D3 an Vesikel verankert. Eine der Interaktionssequenzen überlappt mit der RII-Bindedomäne von AKAP18 δ (Abb. 14E und 14.F) und auch mit der von AKAP18 α und AKAP18 β (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise beeinflusst die

Bindung von PDE4D3 die Verankerung der PKA. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ein cAMP-Anstieg eine Dissoziation der RII-Untereinheit von AKAP18 δ verursacht (Henn *et al.*, 2004). Die Dissoziation der RII-Untereinheit könnte eventuell eine Bindung von PDE4D3 ermöglichen.

Umgekehrt kommt es zu einer direkten Interaktion von AKAP18 δ mit zwei Sequenzabschnitten von PDE4D3 am Beginn der katalytischen Domäne und an der C-terminal-lokaliserten ERK2-Bindungsstelle. Nach Einsicht in die Struktur der katalytischen Domäne von PDE4D (*Entrez Structure*; Chen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004) lässt sich erkennen, dass die potentiellen Interaktionsstellen in räumlicher Nähe an der Oberfläche des Proteins zu finden sind. ERK2-Phosphorylierung der PDE4D3 bewirkt eine Hemmung der PDE-Aktivität (Hoffmann *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 2000). Es zeigte sich, dass auch AKAP18 δ über das ERK2-Bindemotiv (FQF) mit PDE4D3 interagiert. Möglicherweise verhindert die Interaktion von AKAP18 δ mit PDE4D3 eine Bindung von ERK2.

Eine Beteiligung von ERK konnte bei der Langzeitregulation von AQP2 nachgewiesen werden. Eine Hemmung von ERK verhindert ein Ansteigen der Insulin-vermittelten AQP2-Expression (Bustamante *et al.*, 2005). Demnach wäre es möglich, dass durch Hemmung der PDE4D3 durch aktive ERK2 die Menge an cAMP für die AQP2-Expression gesteigert wird.

Die PDE4D3 bildet mit den zuvor genannten Interaktionspartnern Signalkomplexe. Beispielsweise reguliert der Komplex bestehend aus PKA, PDE4D3 und dem muskelspezifischen mAkap die Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors (negativer *feedback loop*; s. 1.6.1.1; Dodge *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung von PDE4D3 am S13 durch die PKA steigert die Affinität für das mAkap. Dadurch führt die Aktivierung der über mAkap verankerten PKA zu einer stärkeren Verankerung von PDE4D3, wodurch es zu einem schnelleren Abschalten des PKA-Signalweges durch Hydrolyse von cAMP kommt (Carlisle Michel *et al.*, 2004). Die Interaktion von PDE4D3 und AKAP18 δ hat möglicherweise einen ähnlichen Effekt. Die durch die PKA aktivierte PDE4D3 reguliert die PKA-Aktivität an den AQP2-tragenden Vesikeln und möglicherweise auch nach AVP-Behandlung an der Plasmamembran. In diesen beiden Kompartimenten ist AKAP18 δ wahrscheinlich der Interaktionspartner von PDE4D3. Nicht nur PDE4D3 interagiert mit AKAP-

Proteinen, sondern auch PDE4A. Asirvatham und Koautoren (Asirvatham et al. 2004) konnten die Bindung von AKAP149 und AKAP95 an PDE4A in T-Zellen beschreiben. Diese Arbeiten verdeutlichen, dass PDE über Bindung an AKAP-Proteine in der Nähe der PKA positioniert werden. Im Fall von PDE4D3 handelt es sich um das Kompartiment der AQP2-tragenden Vesikel.

4.3.5 Funktion von PDE4D3 an AQP2-tragenden Vesikeln und an der Plasmamembran von IMCD-Zellen

In den *in vivo* PKA-Aktivitätsmessungen mit dem PKA-Reporter AKAR1 (Zhang et al., 2001) wurde gezeigt, dass AVP eine Aktivierung der PKA induziert, aber auch, dass in den ruhenden IMCD-Zellen hohe basale PKA-Aktivität vorhanden ist (Abb. 15). Ein mögliches Substrat für die basale PKA-Aktivität könnte zum einen die an die AQP2-tragenden Vesikel gebundene PDE4D3 und zum anderen auch AQP2 selbst (s.u.) sein. Denn neben der Translokation von AQP2 und AKAP18 δ kommt es auch zur AVP-abhängigen Translokation von durch die PKA phosphorylierter PDE4D3 in die Plasmamembran von IMCD-Zellen (Abb. 17). Es ist die PKA-Phosphorylierung von PDE4D3 am S54, die die katalytische Aktivität dieser Isoform um das zwei- bis dreifache steigert (Hoffmann et al., 1998). Keine andere Isoform oder Spleißvariante der PDE4-Familie wird durch PKA-Phosphorylierung in diesem Maße aktiviert (MacKenzie et al., 2002). Dieser Umstand erklärt u.a. die hohe PDE-Aktivität an den AQP2-tragenden Vesikeln (Abb. 16A). PDE4D3 ist demnach ein Substrat der unter basalen Bedingungen relativ hohen PKA-Aktivität.

Die PKA-Aktivitätsmessungen verdeutlichen, dass das inaktive PKA-Holoenzym unter basalen Bedingungen an den AQP2-tragenden Vesikeln gefunden werden kann (Abb. 7 und Abb. 16C). Selektive Inhibition der PDE4-Familie bewirkt eine Dissoziation der katalytischen PKA-Untereinheit von den AQP2-tragenden Vesikeln. Da die PDE4D3 die einzige auf den Vesikeln detektierbare PDE4 ist, deutet alles daraufhin, dass PDE4D3 an den AQP2-tragenden Vesikeln an der Kompartimentierung von cAMP beteiligt ist und dadurch die verankerte PKA-Aktivität reguliert.

Die basale PKA-Aktivität in den IMCD-Zellen reicht nicht aus, um AQP2 vollständig zu phosphorylieren und eine Translokation von AQP2 zu ermöglichen. Es müssen mindestens drei AQP2-Moleküle in einem AQP2-Tetramer phosphoryliert sein, um die Umverteilung zu induzieren (Kamsteeg et al., 2000). Das Vorhandensein von phosphoryliertem AQP2 unter basalen Bedingungen zeigt, dass durch die basale PKA-Aktivität ein oder zwei AQP2-Moleküle phosphoryliert werden (Nejsum et al., 2004). Aber erst nach Behandlung mit AVP überschreitet die cAMP-Menge den lokalen Schwellenwert an den AQP2-tragenden Vesikeln für die Translokation von AQP2 in die Plasmamembran. Die durch AVP induzierte erhöhte cAMP-Menge bewirkt ein Überwinden der cAMP-Hydrolyseaktivität von PDE4D3 und somit eine Aktivierung der PKA, die weitere AQP2-Monomere phosphoryliert und die Translokation auslöst.

Eine Konsequenz des AVP-induzierten Anstieges an cAMP ist die Akkumulation von PDE4D3 an der Plasmamembran von IMCD-Zellen. Die PKA-phosphorylierte Form von PDE4D3 transloziert zusammen mit AQP2 an die Plasmamembran. Der Anstieg der Menge von phosphorylierter PDE4D3 an der Plasmamembran verursacht eine gesteigerte cAMP-Hydrolyse, eine reduzierte PKA-Aktivität und möglicherweise auch ein Absinken der AQP2-Phosphorylierung. Es wurde aber gezeigt, dass für die Endozytose und für das konstitutive Recycling von AQP2 keine Dephosphorylierung von AQP2 notwendig ist (Lu et al., 2004; Nejsum et al., 2004). An diesen Prozessen sind allem Anschein nach weitere noch nicht identifizierte Proteine beteiligt, die durch die PKA reguliert werden. Daher nehmen wir an, dass PDE4D3 in der Plasmamembran von IMCD-Zellen indirekt an der Regulation der Funktion dieser Proteine beteiligt ist. Phosphoryliertes PDE4D3 spielt somit in diesem Kompartiment bei der Endozytose von AQP2 eine Rolle. Die Lokalisation der durch PKA phosphorylierten PDE4D3 an den Vesikeln und auch an der Plasmamembran ist notwendig für die Kompartimentierung der durch AVP induzierten cAMP-Antwort.

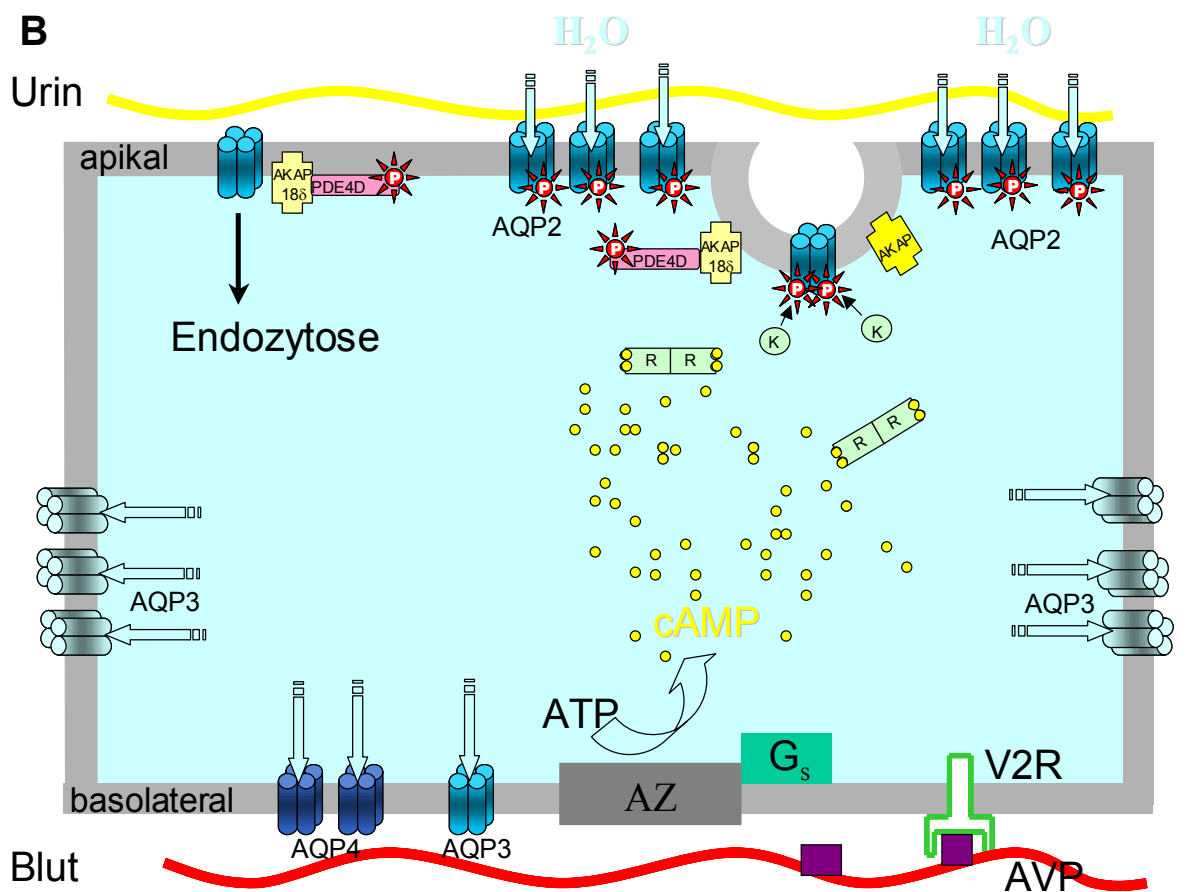
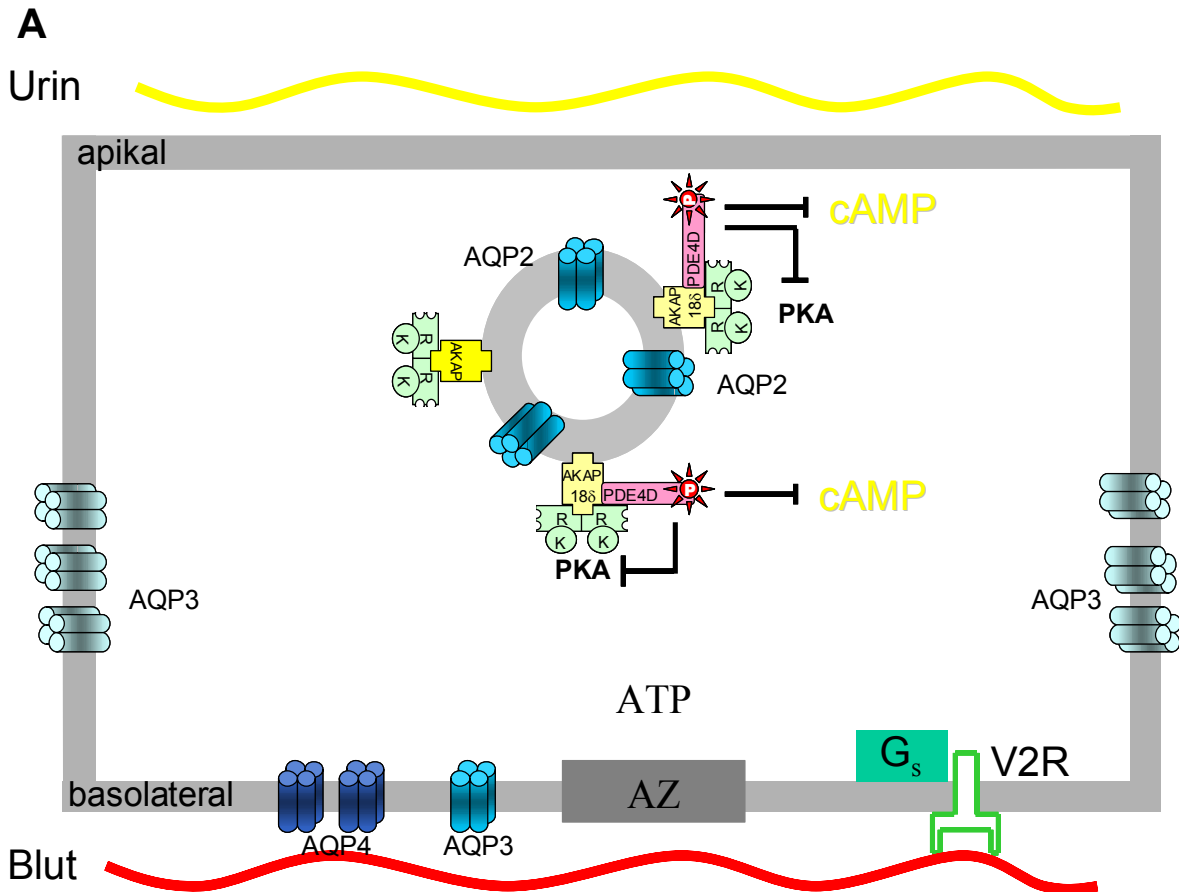


Abb. 19: Schematische Darstellung der AVP-abhängigen cAMP-Signalkaskade und die Funktion und Lokalisation von AKAP18 δ , PKA Typ II und PDE4D3. (A) In den unbehandelten IMCD-Zellen ist eine lokalisierte cAMP-abhängige Signalmaschinerie an AQP2-tragenden Vesikeln vorhanden. Sie besteht aus AKAP-Proteinen, darunter AKAP18 δ , welche die PKA (R für regulatorische und K für katalytische Untereinheit der PKA) und deren Substrat PDE4D3 verankern. Durch die basale PKA-Aktivität phosphoryliertes PDE4D3 begrenzt die Menge an cAMP in Nähe der AQP2-tragenden Vesikel, AKAP18 δ kompartimentiert die vesikuläre PKA-Aktivität. **(B)** Das Hormon Arginin-Vasopressin (AVP; wird im Hypothalamus synthetisiert) bindet an den in der basolateral Plasmamembran lokalisierten G-Protein gekoppelten Vasopressin V2-Rezeptor (V2R). Der Rezeptor aktiviert die G-Proteine, wobei G_s die Adenylatzyklase (AZ) aktiviert. Die Adenylatzyklase bildet aus ATP (Adenosintriphosphat) den *second messenger* cAMP, der an die regulatorische Untereinheit der PKA bindet. Die über AKAP-Proteine an die AQP2-tragenden Vesikel verankerte PKA (siehe 1.5.2) wird aktiviert. Nach Bindung von cAMP dissoziieren die katalytischen Untereinheiten und phosphorylieren ihre Substrate, unter anderem AQP2. Es folgt die Kotranslokation von AQP2 und von PKA phosphorylierter PDE4D3 an die apikale Plasmamembran. Die Wasserrückresorption aus dem Sammelrohr in die Hauptzellen erfolgt durch AQP2. Das Wasser verlässt die Hauptzellen durch AQP3 und AQP4. An der Plasmamembran ist PDE4D3 möglicherweise an der Internalisierung oder auch am *Recycling* des Wasserkanals AQP2 beteiligt.

4.4 Beteiligung von RhoA an der AQP2-Translokation

4.4.1 RhoA kommt an AQP2-tragenden Vesikeln vor

Neben PDE4D3 konnte RhoA, ein weiteres PKA-Substrat, an AQP2-tragenden Vesikeln detektiert werden (Abb. 18). Zusätzlich konnte die Kolo-kalisation von RhoA und AQP2 in ruhenden IMCD-Zellen durch Elektronenmikroskopie bestätigt werden (Elektronenmikroskopie in Stefan et al., eingereicht). RhoA ist eine kleine GTPase, welche unter anderem an der Regulation der subzellulären Verteilung von AQP2 beteiligt ist (Klussmann et al., 2001; Tamma et al., 2001; Tamma et al., 2003; Tamma et al., 2003). Wahrscheinlich ist die GTP-gebundene Form (aktiv) mit den Vesikeln assoziiert. Dort könnte RhoA an der Aktinpolymerisation in unmittelbarer Umgebung von AQP2 beteiligt sein. F-Aktin könnte eine Barriere für die Translokation von AQP2 in die Plasmamembran bilden (Gasman *et al.*, 2003; Qualmann *et al.*, 2003). Das vesikuläre RhoA könnte durch AVP-abhängige PKA-Phosphorylierung inaktiviert und von dort durch zytosolisches RhoGDI entfernt werden. Wie in den Arbeiten von Enno Klussmann und Grazia Tamma gezeigt wurde, hemmt aktives RhoA die AVP-abhängige Translokation von AQP2 in die Plasmamembran von IMCD-Zellen. Die RhoA-Aktivität nimmt nach Behandlung mit AVP ab (Klussmann et al., 2001; Tamma et al., 2001; Tamma et al., 2003a; Tamma et al., 2003b).

4.4.2 RhoA wird nach AVP-Behandlung an die Plasmamembran von IMCD-Zellen rekrutiert

Nach Behandlung mit AVP reichern sich AQP2 und RhoA in der Plasmamembran von IMCD-Zellen an. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es noch unklar, woher das nach AVP-Behandlung in der Plasmamembran befindliche RhoA stammt. Eine Erklärung ist, dass ein Teil des zytosolischen, GDP-gebundenen (inaktiven) RhoA nach AVP-Behandlung aktiviert und an die Plasmamembran der IMCD-Zellen rekrutiert wird (Abb. 18B und 18C zeigen die partielle Umverteilung).

Obwohl es zu einem Anstieg der RhoA-Aktivität an der Plasmamembran kommt, induziert AVP ein Absinken der Aktivität von RhoA in IMCD-Zellen (Tamma et al., 2003). In Übereinstimmung dazu sinkt die Menge des zellulären F-Aktins nach AVP-

Behandlung von Epithelzellen (Ding et al., 1991). Auch in IMCD-Zellen kommt es zu einem Umbau des kortikalen F-Aktins (Simon et al., 1993; Valenti et al., 2000). Diese gegensätzlichen Aussagen können durch die von RhoA regulierten lokalen Ereignisse an der Plasmamembran wie etwa der Positionierung der Vesikel an den Andockstellen erklärt werden (Qualmann *et al.*, 2003).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest zwei Populationen von RhoA-Proteinen in den Hauptzellen der Niere vorliegen:

- (i) An den AQP2-tragenden Vesikeln ist RhoA möglicherweise unter basalen Bedingungen aktiv; es könnte durch die AVP-abhängige Phosphorylierung durch die PKA inhibiert werden. An den AQP2-tragenden Vesikeln spielt es möglicherweise eine Rolle bei der Polymerisation von F-Aktin, einer Barriere für die Translokation von AQP2.
- (ii) Im Gegensatz dazu ist möglicherweise aktives RhoA an der Plasmamembran notwendig für die Fusion von AQP2-tragenden Vesikeln mit der Plasmamembran. Es könnte die Vesikel an bestimmten Orten der Plasmamembran positionieren, um eine zielgerichtete Exozytose zu ermöglichen.

Rho1 aus der Hefe, ein Mitglied der RhoA Familie, ist Bestandteil des Exocystkomplexes, der die Fusion exozytotischer Vesikel mit der Plasmamembran reguliert (Novick und Guo, 2002). Eine weitere Funktion von aktivem RhoA an der Plasmamembran könnte das Umgestalten des kortikalen F-Aktins für die Bildung von endozytotischen Vesikeln sein (Qualmann und Mellor, 2003).

In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass kürzlich ein direkter Interaktionsspartner von AQP2 identifiziert wurde. SPA-1 (Signal-induziertes Proliferation-assoziiertes Gen-1) ist ein sogenanntes GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für die kleine GTPase Rap1, welche wiederum RhoA aktiviert und somit die Aktinpolymerisierung induziert. Die direkte Bindung von Spa-1 an AQP2 wurde von Noda und Koautoren beschrieben (Noda et al., 2004).

In SPA-1 *knockout*-Mäusen konnte festgestellt werden, dass die Translokation von AQP2 nicht mehr stattfindet. Behandlung mit Forskolin steigert die Menge an AQP2 in der Plasmamembran von AQP2-exprimierenden MDCK-Zellen. Diesen Effekt hemmt das dominant-negative Rap1. Es ist nicht bekannt, ob AVP Spa-1 reguliert. Es ist aber vorstellbar, dass eine AVP-abhängige Aktivierung von Spa-1 zur Inhibition des vesikulären RhoA beiträgt.

4.4.3 Beteiligung von Rt31 an der AQP2-Translokation

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Sequenz von Rt31 aufgeklärt. Auf Basis dieser Sequenzinformationen konnten wir feststellen, dass es die gleiche modulartige Struktur wie AKAP-Lbc/Ht31 besitzt (Diviani et al., 2001; Klusmann et al., 2001). Es bindet RhoA in IMCD-Zellen (Klusmann et al., 2001). Rt31 besitzt auch eine PKA-Bindungsdomäne. AKAP-Lbc/Ht31 besitzt eine Doppelfunktion als AKAP-Protein und RhoGEF. Diviani et al. (2004) zeigten, dass die RhoGEF Aktivität von AKAPLbc durch PKA-Phosphorylierung und die Bindung eines 14-3-3 Proteins inhibiert wird. Demnach ist Rt31 ein Kandidat für die Koordination von PKA- und RhoA-Aktivitäten im Zusammenhang mit der Translokation von AQP2. Obwohl Rt31 eine Pleckstrin Homologie (PH) Domäne besitzt und dadurch mit Lipiddoppelschichten assoziiert sein könnte, konnte es nicht an den AQP2-tragenden Vesikeln gefunden werden (Abb. 18A). Es wäre aber trotzdem möglich, dass AVP-abhängige Phosphorylierung von Rt31 im Zytosol die Depolymerisierung von F-Aktin und daher die subzelluläre Verteilung von AQP2 beeinflusst.

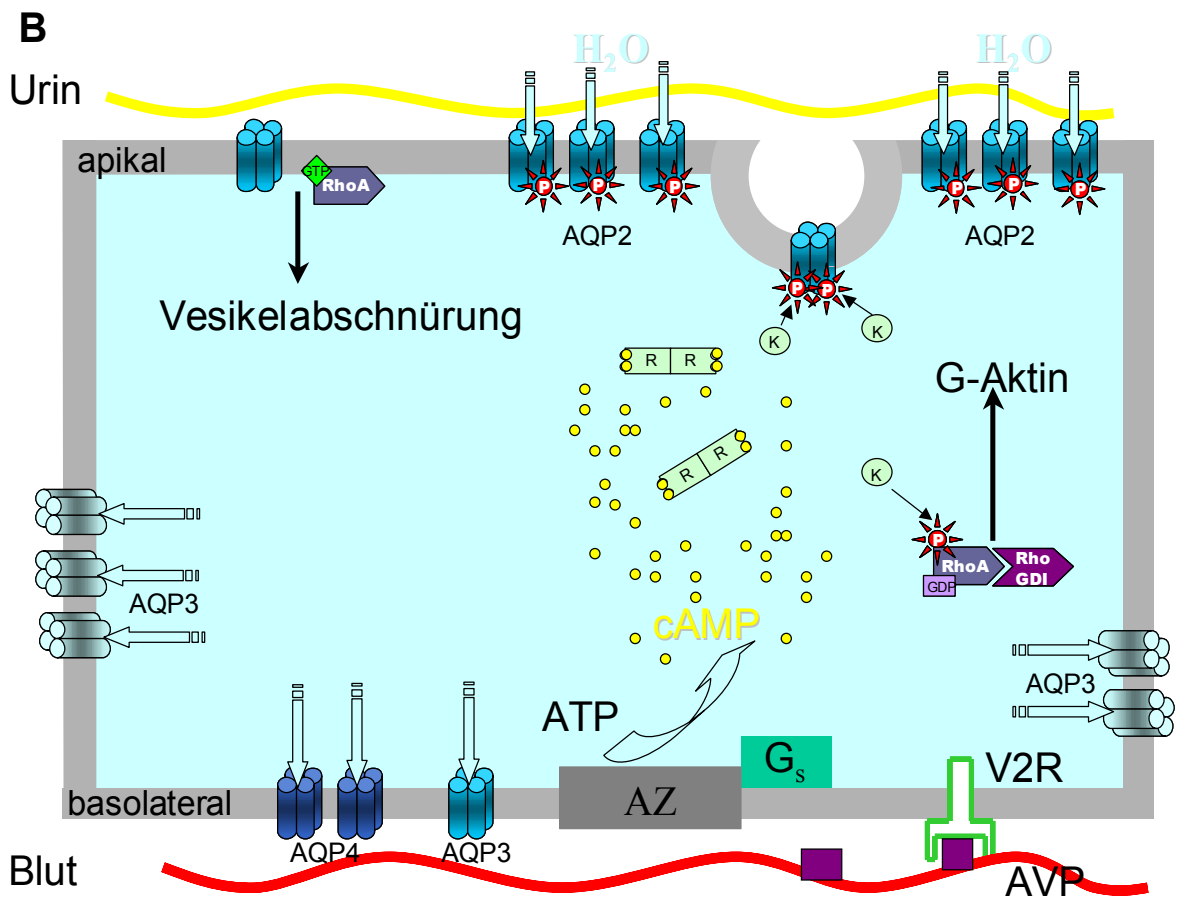
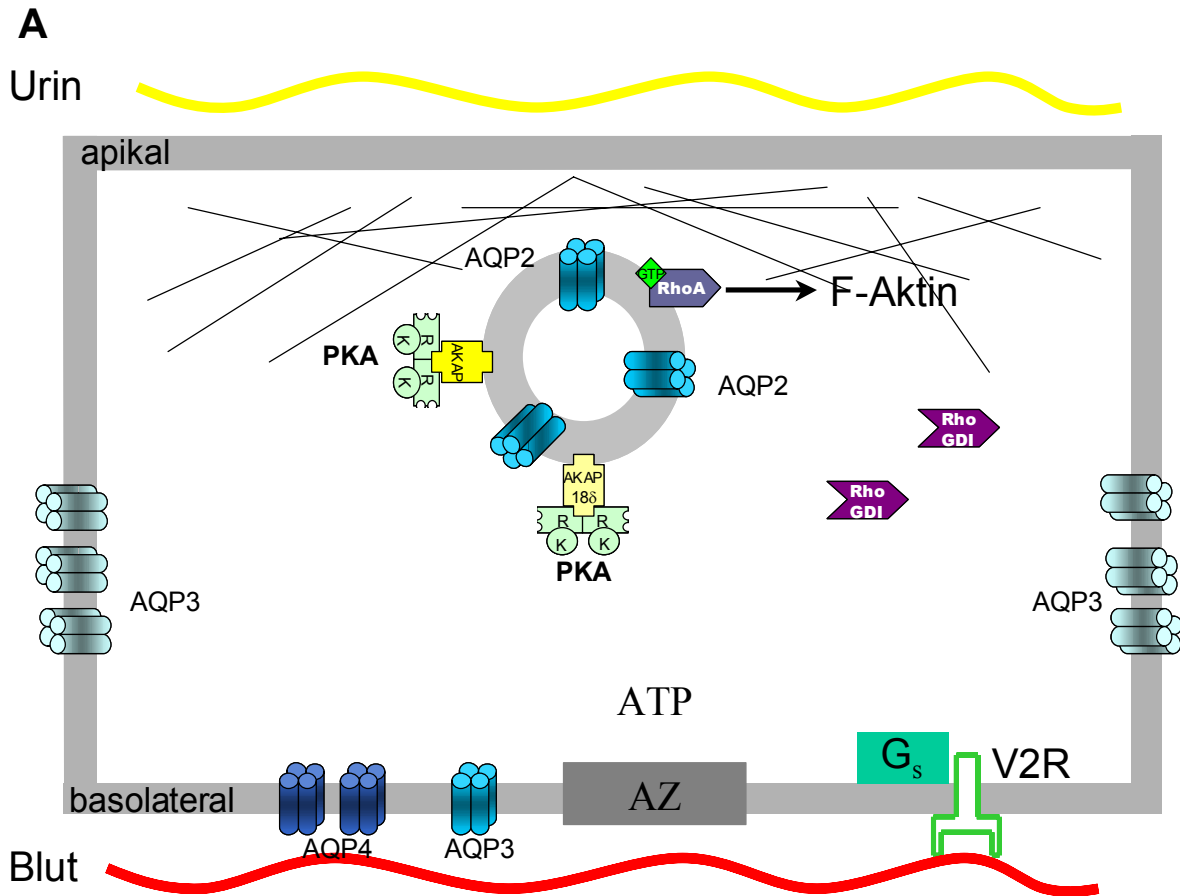


Abb. 20: Modell zur Rolle von RhoA und RhoGDI bei der AVP-abhängigen cAMP-Signalkaskade. (A) In unbehandelten IMCD-Zellen ist eine lokalisierte cAMP-abhängige Signalmaschinerie auf AQP2-tragenden Vesikeln vorhanden. Die Signalkette involviert AKAP-Proteine, welche die PKA (R für regulatorische und K für katalytische Untereinheit der PKA) verankern, und deren Substrat RhoA. Vesikuläres RhoA ist wahrscheinlich unter basalen Bedingungen aktiv. Es induziert die F-Aktin (filamentös) Polymerisation, eine Barriere für die Translokation von AQP2. RhoA wird durch die AVP-abhängige PKA-Phosphorylierung inhibiert. **(B)** Die über AKAP-Proteine an die AQP2-tragenden Vesikeln verankerte PKA wird durch AVP aktiviert (s. Abb. 19). Nach Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit der PKA dissoziieren die katalytischen Untereinheiten und phosphorylieren ihre Substrate, unter anderem AQP2 und eventuell auch RhoA. RhoGDI könnte für die Entfernung des durch PKA phosphorylierten RhoA aus den AQP2-Vesikeln verantwortlich sein. Es kommt zum Umbau von F-Aktin (filamentös) zu G-Aktin (globulär). Es folgt die Translokation von AQP2 in die apikale Plasmamembran. Die Wasserrückresorption aus dem Sammelrohr in die Hauptzellen erfolgt durch AQP2. Das Wasser verlässt die Hauptzellen durch AQP3 und AQP4. An der Plasmamembran (nach AVP-Behandlung) von IMCD-Zellen ist aktives RhoA möglicherweise entweder notwendig für die Fusion der AQP2-tragenden Vesikel mit der Plasmamembran oder es wirkt mit an der Positionierung der AQP2-tragenden Vesikeln mit spezifischen Andockorten an der Plasmamembran.

4.5 Modellvorstellung

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ein Modell ableiten: Es war uns möglich, die wesentlichen Komponenten eines lokalen cAMP-abhängigen Signaltransduktionskomplexes an AQP2-tragenden Vesikeln zu identifizieren. Bestandteile dieses Komplexes in unmittelbarer Umgebung von AQP2, an den Vesikeln und in der Plasmamembran von IMCD-Zellen sind AKAP-Proteine, eines davon ist AKAP18 δ , die PKA und die PKA-Substrate PDE4D3 und RhoA. Die genannten Proteine sind beteiligt an der Regulation der zellulären Lokalisation von AQP2. Durch das an die Vesikel verankerte cAMP-abhängige Proteinnetzwerk ist es möglich, die PKA zu den ausgewählten benachbarten Substraten zu dirigieren. Die an den AQP2-tragenden Vesikeln lokalisierte PDE4D3 kompartimentiert unter basalen Bedingungen die vesikuläre PKA-Aktivität. PDE4D3 begrenzt die basale Menge an cAMP und grenzt dieses Kompartiment vor anderen cAMP-abhängigen Signalkaskaden ab, die eine unbeabsichtigte Translokation von AQP2, durch Aktivierung der vesikulären PKA, induzieren würden.

Bindung von AVP an den G-Protein gekoppelten Vasopressin V2-Rezeptor bewirkt die Dissoziation der G-Proteine, wobei G_s die Adenylatzyklase aktiviert. cAMP wird gebildet, es diffundiert in die Zelle, bindet an die PKA, die über AKAP-Proteine (AKAP18 δ) mit den AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert ist. Durch die erhöhte cAMP-Menge wird die cAMP-Hydrolyseaktivität der mit den AQP2-tragenden Vesikeln assoziierten PDE4D3 überwunden und die vesikuläre PKA wird aktiviert. Es kommt zur PKA-abhängigen Phosphorylierung des Wasserkanals AQP2 und zu dessen Rekrutierung in die Plasmamembran. Parallel dazu wird möglicherweise durch PKA-Phosphorylierung das vesikuläre aktive RhoA, welches durch Induktion der Polymerisation von F-Aktin die Translokation von AQP2 hemmt, inaktiviert. Neben AQP2 translozieren die Proteine AKAP18 δ und dessen Interaktionspartner PDE4D3 in die Plasmamembran von IMCD-Zellen. In diesem Kompartiment scheint PDE4D3 an der Endozytose von AQP2 beteiligt zu sein.

4.6 Ausblick

Außer der Reninsekretion in juxtaglomerulären Nierenzellen (Schweda und Kurtz, 2004) ist die AVP-abhängige Translokation das einzige Beispiel für einen ausschließlich durch cAMP regulierten exozytotischen Prozess (Lorenz *et al.*, 2003). Es gibt andere exozytotische Prozesse, wie etwa die Protonensekretion in den gastrischen Parietalzellen, die durch Erhöhung von cAMP- oder Ca^{2+} -Mengen reguliert werden. AKAP-Proteine scheinen in diesem Zusammenhang an einer Reihe von cAMP-kontrollierten Prozessen beteiligt zu sein: AKAP18 δ an der AQP2-Translokation, das AKAP-Protein Ezrin an der Protonensekretion (Dransfield *et al.*, 1997) und AKAP18 α an der Insulinsekretion (Fraser *et al.*, 1998). Die Rolle von AKAP-Proteinen an der Reninsekretion wurde noch nicht untersucht.

Die Fehlregulation dieser Prozesse verursacht eine Reihe von Krankheiten, darunter nephrogenen Diabetes insipidus, Hypertonie, Ulcus duodenum und Diabetes mellitus. Der pharmakologische Eingriff in die Funktion spezifischer AKAP-Proteine könnte ein Konzept für die Behandlung der oben beschriebenen Krankheiten sein. Durch das Identifizieren von spezifischen Peptiden, welche selektiv entweder die Typ I oder Typ II PKA vom dualspezifischen AKAP-Protein D-AKAP2 entkoppeln (Burns-Hamuro *et al.*, 2003) oder durch die Entdeckung von AKAP_{IS} (Alto *et al.*, 2003), einem Peptid, welches generell die Interaktion zwischen AKAP-Proteinen und der PKA hemmt, gibt es schon Ansätze um cAMP-Signalketten zu modulieren. Durch ein Aufbrechen der PKA-AKAP Komplexe würden demzufolge auch die Funktionen der PKA-Substrate beeinflusst werden.

(i) Durch den Einsatz spezifischer Peptide, die durch Aufbrechen von Proteininteraktionen selektiv in den AVP-vermittelten Signalweg eingreifen, wäre eine Modulation des Phosphorylierungsstatus von vesikulärem und auch plasmamembranständigem RhoA, PDE4D3 und natürlich auch AQP2 möglich. Ziel wäre die zweckbestimmte Veränderung der Lokalisation von AQP2. Die Peptide, die

eine Aktivierung der AVP-abhängigen Signalkaskade unterbinden würden, wären als Aquaretika einsetzbar und man könnte z.B. spezifisch Wasserretention (Ödeme), bedingt durch ungenügende renale Wasserausscheidung, behandeln.

(ii) Durch die Verwendung von *small interfering* Ribonukleinsäuren (siRNA) ist es möglich spezifisch die Expression von Proteinen zu hemmen. Dadurch könnte man die genaue Funktion der cAMP-Signalkomponenten, die mit den AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert sind, herausfinden.

(iii) Ein weiterer Ansatzpunkt wäre eine zielgerichtete Modulation von PKA-, PDE4D3- oder RhoA-Aktivitäten. Ein pharmakologischer Eingriff in die Funktion der mit den Vesikeln assoziierten Proteine wäre eine Möglichkeit NDI-Patienten zu behandeln. Neben der Verwendung von generellen Inhibitoren könnten niedermolekulare Liganden identifiziert werden, die die Funktion dieser Proteine aktivieren oder hemmen. Dadurch wäre es möglich, unabhängig von einer funktionierenden AVP-abhängigen Signalkaskade die Translokation von AQP2 in die Plasmamembran zu induzieren, um die osmotische Wasserrückresorption zu steigern.