

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung in Deutsch

Die Translokation des intrazellulär an Vesikeln vorliegenden Wasserkanals Aquaporin-2 (AQP2) in die Plasmamembran von renalen Hauptzellen des Sammelrohrs ist die Voraussetzung für die durch Arginin-Vasopressin (AVP) regulierte Wasserrückresorption. Dieser Prozess wird durch kompartimentierte cAMP/Proteinkinase A (PKA) Signale ausgelöst. Die Identität von Proteinen an AQP2-tragenden Vesikeln, welche möglicherweise entscheidend die Translokation von AQP2 mitregulieren, ist bis dato noch nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit war es uns möglich eine neue Methode zur Isolierung AQP2-tragender Vesikel zu etablieren. An den Vesikeln konnten Proteine identifiziert werden, die an der AQP2-Translokation beteiligt sind:

(i) Es wurde gezeigt, dass die an AQP2-tragenden Vesikeln gefundene PKA über AKAP-Proteine verankert wird. Es wurde das AKAP-Protein AKAP18 δ identifiziert, welches die PKA in unmittelbarer Nähe ihrer Substrate AQP2, PDE4D3 und RhoA verankert.

(ii) Die Phosphodiesterasefamilie 4 (PDE4A-D) terminiert ein PKA-Signal durch die Hydrolyse von cAMP. Die selektive Inhibition der PDE4-Familie bewirkt eine gesteigerte AVP-abhängige Akkumulation von AQP2 in der Plasmamembran von renalen Hauptzellen des Sammelrohres. Als einzige PDE4-Isoform konnte an den AQP2-tragenden Vesikeln PDE4D3 identifiziert werden, wo es die über AKAP-Proteine verankerte PKA-Aktivität reguliert. Als Interaktionspartner von PDE4D3 konnte das AKAP-Protein AKAP18 δ gefunden werden. Nach Behandlung mit AVP kommt es zur Kotranslokation von AQP2 und die durch PKA phosphorylierte PDE4D3 in die Plasmamembran, wo sie möglicherweise an der Endozytose von AQP2 beteiligt ist.

(iii) Die kleine GTPase RhoA ist an der Regulation des F-Aktinzytoskeletts beteiligt. Unsere Daten deuten darauf hin, dass aktives RhoA (GTP-gebunden) an AQP2-tragenden Vesikeln und in der Plasmamembran von AVP-behandelten Hauptzellen gefunden werden kann. An den Vesikeln ist es möglicherweise daran

beteiligt die Aktinpolymerisation in Umgebung von AQP2 zu induzieren, einer physikalischen Barriere für verschiedene exozytotische Vesikeltypen. An der Plasmamembran von AVP-behandelten IMCD-Zellen spielt es unter Umständen entweder bei der Umgestaltung des kortikalen F-Aktins eine Rolle.

Zusammenfassend zeigen die Daten das Vorhandensein von Proteinen auf AQP2-tragenden Vesikeln, welche die intrazelluläre Lokalisation von AQP2 beeinflussen und die osmotische Wasserpermeabilität im Sammelrohr regulieren.

5.2 Summary in english

Translocation of water channel aquaporin-2 (AQP2)-bearing vesicles to the plasma membrane in renal collecting duct principal cells (AQP2 shuttle) constitutes the molecular basis of arginine-vasopressin (AVP)-regulated water reabsorption. The process is triggered by compartmentalized cAMP/protein kinase A (PKA)-dependent signals. PKA phosphorylates the water channel aquaporin-2 (AQP2) and thereby triggers its redistribution from intracellular vesicles into the plasma membrane. The vesicles bearing AQP2 are largely uncharacterized but are expected to contain proteins crucially involved in the AQP2 shuttle. A method to enrich AQP2-bearing vesicles had been established and proteins on AQP2-bearing vesicles, which are involved in the AQP2-shuttle had been identified:

(i) In the present work it had been demonstrated that AKAPs anchor the PKA to AQP2-bearing vesicles. AKAP18 δ which anchors PKA on the vesicles in proximity to its substrates AQP2, PDE4D3 and RhoA had been identified.

(ii) The enzymes of the phosphodiesterase family 4 (PDE4A-D) terminate PKA signaling by hydrolysis of cAMP. Their selective inhibition in primary cultured principal cells (IMCD-cells) increases the AVP-induced AQP2 shuttle. Only the splice variant PDE4D3 is located on AQP2-bearing vesicles where it controls AKAP-tethered PKA activity. The vesicles also contain PKA and the PKA anchoring protein AKAP18 δ , which interacts with PDE4D3. In response to AVP, PKA phosphorylated PDE4D3 co-translocates together with AQP2 to the plasma membrane, where it may be involved in the recycling of AQP2. Overexpression of catalytically active PDE4D3 prevents the AQP2 shuttle.

(iii) The small GTPase RhoA participates in the regulation of the F-actin cytoskeleton. Our data suggest that active RhoA is present on AQP2-bearing vesicles and in response to AVP at the plasma membrane of IMCD-cells. Vesicular RhoA may induce the polymerization of actin in the vicinity of the vesicles, which acts as a physical barrier for several types of exocytic vesicles. At the plasma membrane of AVP-treated IMCD cells it may play a role in the fusion of AQP2-bearing vesicles and/or in the remodelling of cortical F-actin. Taken together, we identified a novel, compartmentalized cAMP-dependent signal transduction system on AQP2-bearing vesicles that regulates the cellular localization of AQP2 and thus the osmotic water permeability of the renal collecting duct.