

Aquaporin-2

Vasopressin-vermittelte Wasserrückresorption im Sammelrohr der Niere

SANDRINE BALTZER, ENNO KLUSMANN
MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN IN DER HELMHOLTZ-
GEMEINSCHAFT, BERLIN

Vasopressin-mediated water reabsorption from primary urine in the renal collecting duct is essential for regulating body water homeostasis and depends on the water channel aquaporin-2 (AQP2). Dysregulation of the process can cause water balance disorders. Here, we present cell-based high-throughput screenings to identify proteins and small molecules as tools to elucidate molecular mechanisms underlying the AQP2 control and as potential starting points for the development of water balance disorder drugs.

DOI: 10.1007/s12268-021-1544-1
© Die Autoren 2021

Die Nieren tragen durch ihre funktionellen Einheiten, die Nephrene, entscheidend zur Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts bei. Ein Nephron besteht aus dem Glomerulus (Nierenkörperchen) sowie einem

sich anschließenden tubulären System (Abb. 1A und B, [1]).

In den Glomeruli eines erwachsenen Menschen werden durch Ultrafiltration des Blutes täglich etwa 170 Liter Primärharn erzeugt. Dieser besteht zum Großteil aus Wasser, das rückresorbiert wird, sodass lediglich ungefähr zwei bis vier Liter konzentrierter Sekundärharn ausgeschieden werden. Dieser Prozess wird durch das antidiuretische Hormon (Arginin-

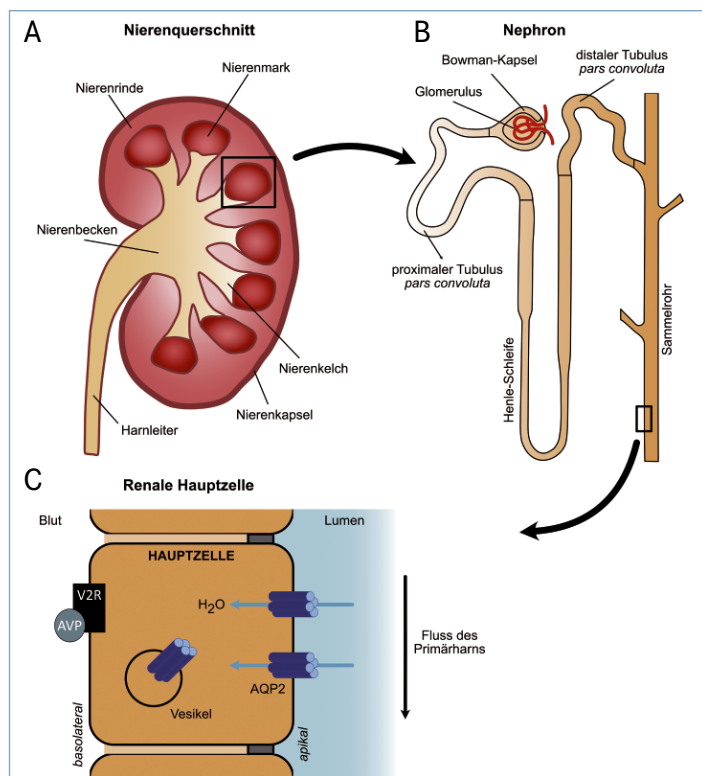
Vasopressin, AVP) reguliert. In ruhenden Zellen befindet sich das Wasserkanalprotein Aquaporin-2 (AQP2) auf intrazellulären Vesikeln. AVP stimuliert eine Signalkaskade, die einen Anstieg der Konzentration des sekundären Botenstoffs zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) sowie die Umverteilung von AQP2 und dessen Integration in die Plasmamembran bewirkt (Abb. 1C). Die Membraninsertion erhöht die osmotische Wasserpermeabilität des Sammelrohrs und erleichtert so die Wasserrückresorption aus dem Primärharn [1].

Störungen des Wasserhaushalts

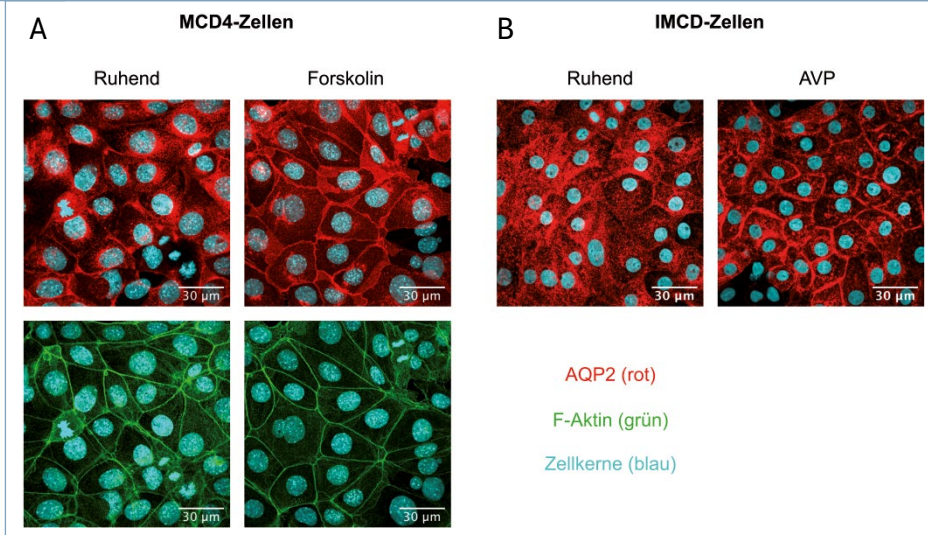
Fehlregulationen der AVP-vermittelten AQP2-Umverteilung können eine gesteigerte oder eine gehemmte Wasserrückresorption verursachen.

Bei Patienten mit einem erhöhten AVP-Plasmaspiegel, wie es beispielsweise bei Herzinsuffizienz, einer Leberzirrhose oder dem Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (SIADH) der Fall ist, befindet sich AQP2 hauptsächlich in der Plasmamembran. Hierdurch erfolgt eine übermäßige Wasserrückresorption im renalen Sammelrohr und es kann in der Folge zu einer Störung des Elektrolythaushalts kommen [2].

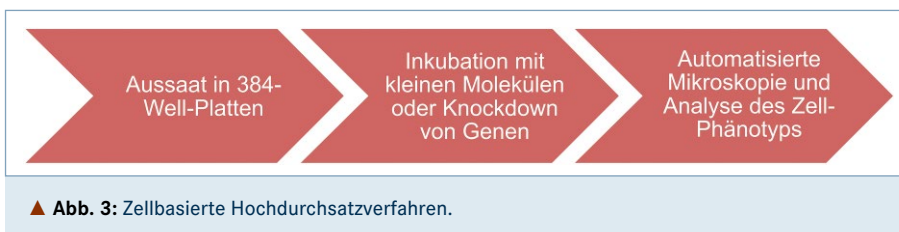
Demgegenüber handelt es sich beim Diabetes insipidus (DI) um ein Krankheitsbild mit einer gehemmten Wasserrückresorption. Klinisch äußert sich dies u. a. durch die Ausscheidung großer Mengen hypotonen Urins (bis zu 20 Liter am Tag; Polyurie) und ein gesteigertes Durstgefühl (Polydipsie). Bei Patienten mit DI ist die AVP-vermittelte Wasserrückresorption gehemmt – entweder weil das entsprechende Hormon fehlt oder weil die Antwort darauf durch Mutationen der Gene gestört ist, die den Vasopressinrezeptor oder das AQP2 codieren. Ebenso kann DI beispielsweise im Zuge einer Lithiumtherapie bei bipolaren Störungen erworben werden [3].



◀ **Abb. 1:** A, Schematischer Querschnitt der Niere. B–C, Schematischer Aufbau des Nephrons und der Hauptzelle des renalen Sammelrohrs.



◀ **Abb. 2:** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von **A**, immortalisierten MCD4- und **B**, primären IMCD-Zellen vor und nach Stimulation mit Forskolin bzw. AVP. AQP2 (rot) wurde mit einem spezifischen primären und einem farbstoffgekoppelten sekundären Antikörper detektiert. F-Aktin wurde mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin sichtbar gemacht. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt.



Bisher können nicht alle Störungen des Wasserhaushalts effizient behandelt werden. Dies verdeutlicht die Relevanz der Aufklärung molekularer Mechanismen, die zur Kontrolle der AVP-vermittelten AQP2-Umverteilung und somit Wasserrückresorption beitragen. Hochdurchsatzscreenings können dabei helfen, relevante molekulare Mechanismen und beteiligte Proteine aufzudecken und kleine Moleküle zu identifizieren, die als potenzielle Ausgangsmoleküle zur Entwicklung neuartiger Wirkstoffe dienen können. Denkbar sind Substanzen, die die AQP2-Umverteilung in die Plasmamembran unabhängig von AVP entweder hemmen oder fördern, um die jeweils vorliegende Störung des Wasserhaushalts zu kompensieren [4].

Modellsysteme der cAMP-vermittelten AQP2-Umverteilung

Für das phänotypische Screening der cAMP- bzw. AVP-vermittelten AQP2-Umverteilung stehen verschiedene Zellmodelle zur Verfügung (**Abb. 2**). Immortalisierte Mauszellen des Sammelrohrs (*medullary collecting duct cells*; MCD4-Zellen), die stabil humanes AQP2 exprimieren [5], können über viele Wochen in Kultur gehalten werden. Da sie keinen Vasopressinrezeptor exprimieren, erfolgt die Stimulation der cAMP-Synthese stattdessen durch die Aktivierung von membranständigen Adenylzyklen mittels Forskolin (Fsk). Darüber hinaus stehen Primärzellen aus den Sammelrohren von Ratten

(*inner medullary collecting duct cells*; IMCD-Zellen) zur Verfügung. Deren endogene Expression des Vasopressinrezeptors ermöglicht den Einsatz von AVP zur Stimulation der AQP2-Umverteilung [6].

Zellbasierte Screening-Strategien

In der Vergangenheit konnten verschiedene zellbasierte Hochdurchsatzverfahren bereits erfolgreich eingesetzt werden, um regulatorische Mechanismen der AQP2-Umverteilung aufzuklären [6, 7].

Zellbasierte bzw. phänotypische Screening-Strategien unterscheiden sich von *in vitro*-Strategien insofern, als dass statt einer konkreten zellulären Zielstruktur (Target) ganze zelluläre Mechanismen oder phänotypische Merkmale der Zellen im Vordergrund stehen. Während sich *in vitro*-Screenings meist auf die Verwendung rekombinanter Proteine stützen, um so beispielsweise Protein-Protein- oder Protein-Substanz-Interaktionen zu untersuchen, werden bei zellbasierten Ansätzen fixierte oder aber auch lebende Zellen mikroskopisch analysiert [4]. So ist es möglich, Bildmaterial ganzer Zellkulturen mittels automatisierter Mikroskope aufzunehmen und zu analysieren.

Im konkreten Fall der AQP2-Umverteilung beruht die Unterscheidung von ruhenden und stimulierten Zellen auf klar differenzierbaren zellulären Phänotypen. So befindet sich der Wasserkanal in ruhenden Zellen vorwiegend in den perinukleären Bereichen

und transloziert erst im Zuge einer Stimulation und einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in die Plasmamembran. Dies kann durch Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen, gegen AQP2-gerichteten Antikörpern sichtbar gemacht werden (**Abb. 2**). Werden nun im Zuge eines Screenings die Zellen mit kleinen Molekülen behandelt [6] oder werden bestimmte Gene herabreguliert [7], lässt sich der Effekt auf die AQP2-Lokalisation unmittelbar durch den Vergleich zwischen ruhenden und stimulierten Kontrollzellen untersuchen (**Abb. 3**).

Um kleine Moleküle zu identifizieren, die die cAMP-vermittelte AQP2-Umverteilung modulieren, wurden im Hochdurchsatzverfahren 17.700 Substanzen der ChemBioNet-Bibliothek auf ihre Effekte in MCD4-Zellen hin untersucht [6]. Mittels automatisierter Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die AQP2-Lokalisation in den Zellen erfasst. Auf Basis des peripheren F-Aktin-Zytoskeletts und der Zellkerne konnten die Plasmamembran- sowie perinukleären Bereiche definiert und darin die AQP2-Signalintensität bestimmt werden. Das Screening führte zur Identifikation von 17 kleinen Molekülen, die konzentrationsabhängig die AQP2-Umverteilung hemmen – darunter 4-Acetyldiphyllin, ein selektiver Blocker vakuolärer H⁺-ATPasen. Die Studie ebnete auch den Weg für die Identifizierung des Antimykotikums Flukonazol als Auslöser der AQP2-Membranlokalisierung unabhängig von AVP [8].

In einer weiteren Studie wurde mithilfe eines Kinom-weiten Screenings die Absicht verfolgt, bisher unbekanntes, an der AQP2-Umverteilung beteiligte Kinasen zu identifizieren [7]. Hierfür wurden 719 Kinase-verwandte Gene mittels siRNA in MCD4-Zellen herabreguliert und die Effekte auf die Lokalisation von AQP2 mithilfe eines automatisierten Mikroskops untersucht. Bei der Bildana-

lyse fand ein *machine learning*-Algorithmus Anwendung, der bestimmte Phänotypen anhand der Anzahl perinukleärer „AQP2-Sprenkel“ erkennt. Die verwendete Protein-kinase-siRNA-Bibliothek beinhaltet den Großteil des humanen Kinoms. Es konnten 13 Kandidaten identifiziert werden, deren siRNA-vermittelte Herabregulierung die cAMP-abhängige AQP2-Umverteilung zur Plasmamembran inhibierte, darunter die Zyklin-abhängige Kinase 18 (CDK18). Ausgehend von diesem Screening konnte ein bislang unbekannter Multiproteinkomplex identifiziert werden, dessen Akteure im Zusammenspiel als Signalosom die Lokalisation und Menge des Wasserkanals kontrollieren.

Relevanz und Perspektiven

In Hochdurchsatzverfahren können tausende von Proteinen und Molekülen in Zellsystemen getestet werden. Dies ermöglicht nicht nur die Erforschung relevanter molekularer Mechanismen, sondern ebnet gegebenenfalls auch den Weg zur Entwicklung neuer Wirkstoffe. Für die biologische Validierung sowie Target-Identifizierung von Molekülen sind im Anschluss sekundäre Screenings, auch orthogonale Screenings genannt, sowie biochemische und molekularbiologische Untersuchungen notwendig. Hierfür sind Primärzellen als Modellsysteme oftmals unabdingbar [4].

Zudem ist es erforderlich, kleine Moleküle, die sich im Hochdurchsatzverfahren als potent herausgestellt haben, mittels reiterativer Zyklen medizinalchemisch weiterzuentwickeln, um beispielsweise die Selektivität und Affinität gegenüber dem Target oder die Bioverfügbarkeit zu erhöhen [4]. Auf diese Weise optimierte Wirk-

stoffe können als molekulare Werkzeuge dienen oder aber zukünftig zu Arzneimittelkandidaten weiterentwickelt werden. ■

Literatur

- [1] Vukićević T, Schulz M, Faust D et al. (2016) The trafficking of the water channel aquaporin-2 in renal principal cells – a potential target for pharmacological intervention in cardiovascular diseases. *Front Pharmacol* 7: 23
- [2] Schrier R (2006) Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. *J Am Soc Nephrol* 17: 1820–1832
- [3] Christ-Crain M, Bichet DG, Fenske WK et al. (2019) Diabetes insipidus. *Nat Rev Dis Primers* 5: 54
- [4] Baltzer S, Klussmann E (2019) Small molecules for modulating the localisation of the water channel aquaporin-2 – disease relevance and perspectives for targeting local cAMP signalling. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 392: 1049–1064
- [5] Iolascon A, Aglio V, Tamma G et al. (2007) Characterization of two novel missense mutations in the *AQP2* gene causing nephrogenic diabetes insipidus. *Nephron Physiol* 105: 33–41
- [6] Bogum J, Faust D, Zühlke K et al. (2013) Small-molecule screening identifies modulators of aquaporin-2 trafficking. *J Am Soc Nephrol* 24: 744–758
- [7] Dema A, Faust D, Lazarow K et al. (2020) Cyclin-dependent kinase 18 controls trafficking of aquaporin-2 and its abundance through ubiquitin ligase STUB1, which functions as an AKAP. *Cells* 9: 673
- [8] Vukićević T, Hinze C, Baltzer S et al. (2019) Fluconazole increases osmotic water transport in renal collecting duct through effects on aquaporin-2 trafficking. *J Am Soc Nephrol* 30: 795–810

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. Enno Klussmann
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)
Robert-Rössle-Straße 10
D-13125 Berlin
enno.klussmann@mdc-berlin.de

AUTOREN



Sandrine Baltzer

2012–2015 Bachelorstudium Molekulare Biotechnologie an der TU Dresden.
2015–2018 Masterstudium Molecular Life Science an der Universität zu Lübeck.
Seit 2018 Promotion am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin in der Gruppe von Dr. E. Klussmann.



Enno Klussmann

1985–1988 Bachelorstudium Genetics am Queen Mary College, University of London, UK. 1988–1992 Biologiestudium an der Universität Marburg. Dort 1996 Promotion. 2005 Habilitation Pharmakologie und Toxikologie an der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Seit 2014 Gruppenleiter am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer