

Compartmentalization of cAMP signaling in cardiac myocytes and in renal principal cells

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Katja Herrera Glomm aus Berlin**

**angefertigt am Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie Berlin
Oktober 2007**

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Petra Knaus
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Walter Rosenthal

Tag der Disputation: 15.04.2008

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die dem

Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt. Ich erkläre, dass

ich mich bisher nicht an einer anderen Einrichtung um einen Doktorgrad beworben

habe und keinen derartigen Titel besitze.

Berlin, 07.10.2007

Katja Herrera Glomm

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Herrn Professor Dr. Walter Rosenthal danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit am Leibnizinstitut für Molekulare Pharmakologie durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Enno Klussmann für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Zusammenarbeit und die Diskussionen während der Durchführung dieser Arbeit. Dank auch den Herz-Damen Theresa McSorley und Brigitte Lygren, Mitstreiterinnen in diesem Projekt.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Gruppe Signaltransduktion (es fällt mir schwer Namen hervorzuheben, ich danke und vermisse Euch alle), die mir während der Jahre am FMP immer mit Rat, Trost und ihrer Freundschaft geholfen haben. Vor allem Danke für den Spaß, den ich durch Euch bei der Arbeit hatte. Vielen Dank an Volker, Marta und Matthias für die große Geduld beim Korrigieren. Und natürlich Danke ich meiner Familie, die mir stets in allem Halt gegeben haben und immer für mich da waren.

Abbreviations	1
Summary.....	3
Zusammenfassung	4
1 Introduction	5
1.1 Compartmentalization of cellular signalling	5
1.2 Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate (cAMP) mediated signalling	5
1.3 Protein kinase A (PKA).....	7
1.4 Phosphodiesterases	8
1.4.1 PDE4D3.....	9
1.5 A-kinase anchoring proteins (AKAPs)	9
1.5.1 The AKAP18 family	13
1.6 Compartmentalization of cellular signaling in cardiac myocytes.....	15
1.6.1 Organization of the cardiac myocyte	15
1.6.2 Molecular mechanism of contractility.....	17
1.6.3 Adrenergic stimulation.....	18
1.6.4 Molecular regulation of the PLB-SERCA system.....	20
1.6.5 Sarcoplasmic Ca ²⁺ -ATPase (SERCA2).....	20
1.6.6 Phospholamban (PLB)	20
1.6.7 Regulatory features of the PLB-SERCA interaction	21
1.6.8 PDEs in cardiac myocytes	23
1.6.9 AKAPs in cardiac myocytes.....	23
1.6.10 PLB and AKAPs in heart failure	26
1.7 PKA anchoring in the kidney	29
1.7.1 Water channel trafficking in kidney cells: Aquaporins and water permeability	29
1.7.2 PKA-triggered AQP2 trafficking	29
1.7.3 AKAP18 δ and AQP2 trafficking	31
1.7.4 PDE4 and water reabsorption in the kidney	31
1.8 Aims	32
2 Materials and methods.....	33
2.1 Biochemistry.....	33
2.1.1 Heart homogenate preparation.....	33
2.1.2 Cardiac myocyte preparation.....	33

2.1.3 Cell lysis	34
2.1.4 RII-overlay.....	34
2.1.5 Western blot (WB)	35
2.1.6 Immunoprecipitation	37
2.1.7 cAMP pull down	37
2.1.8 Immunofluorescence microscopy	37
2.1.9 Immunogold electron microscopy (EM)	38
2.2 Plasmids and fusion proteins	39
2.2.1 Polymerase chain reaction (PCR)	39
2.2.2 Mutagenesis	40
2.2.3 AKAP18 δ constructs.....	41
2.2.4 PLB constructs.....	42
2.2.5 PDE4D3 constructs	43
2.2.6 Transfection of HEK293 cells.	43
2.3 Experiments performed at the University of Oslo	43
2.3.1 Heart sub-cellular fractionation	43
2.3.2 Peptide spot experiments.....	44
2.3.3 Protein expression and purification.....	44
2.3.4 siRNA	45
2.4 Experiments performed at the University of Padua.....	45
2.4.1 Ca ²⁺ imaging	45
2.5 Renal inner medullary collecting duct (IMCD) cells.....	46
2.5.1 Culture of primary rat inner medullary collecting duct (IMCD) cells.....	46
2.5.2 Substances for treatment of IMCD cells	47
2.5.3. Detection of AQP2, RI and RII subunits of PKA in IMCD cells by immunofluorescence microscopy	47
2.5.4 Immunoisolation of intracellular vesicles and preparation of sub-cellular fractions	48
3 Results	49
3.1 PKA compartmentalization in the heart	49
3.1.1 Localization of AKAP18 δ in cardiac tissue	49
3.1.2 Interaction between AKAP18 δ and PLB	58
3.1.3 Influence of AKAP18 δ on the Ca ²⁺ re-uptake in the heart.....	68
3.2 Interaction of AKAP18 δ and PDE4D3 in co-transfected HEK293 cells.....	70

3.3 Protein kinase A type II activation is sufficient to control the cellular localization of the water channel aquaporin-2 in the kidney	72
3.3.1 Selective activation of PKA type II is sufficient to elicit the AQP2 shuttle in renal principal cells	72
3.3.2 AQP2, PKA types I and II reside on the same intracellular vesicles.....	74
3.3.3 Immunofluorescence microscopy	75
4 Discussion	77
4.1 Heart.....	77
4.1.1 AKAP18 δ is expressed in adult rat heart tissue.....	77
4.1.2 AKAP18 δ is expressed in neonatal rat heart tissue	78
4.1.3 Localization of AKAP18 δ to the SR.....	78
4.1.4 PLB co-precipitates with AKAP18 δ	79
4.1.5 PLB interacts directly with AKAP18 δ	79
4.1.6 Influence of PLB Ser16 phosphorylation on the AKAP18 δ binding.....	80
4.1.7 HEK293 cells overexpressing PLB mutants and AKAP18 δ -YFP	82
4.1.8 AKAP18 γ is expressed in rat heart	82
4.1.9 Influence of AKAP18 δ on the Ca ²⁺ re-uptake into the SR.....	83
4.2 Interaction of AKAP18 δ and PDE4D	86
4.3 Protein kinase A type II activation is sufficient to control the translocation of the water channel aquaporin-2 in the kidney	88
5 Annexes	90
5.1 Amino acid sequences, NCBI database entries	90
5.1.1 PLB	90
5.1.2 AKAP18 δ	90
5.1.3 PDE4D.....	90
5.2 References	91
5.3 Publication list Katja Herrera Glomm/Santamaria	104
5.4 Curriculum vitae Katja Herrera Glomm.....	105

Abbreviations

AC	adenylyl cyclase
AKAP	A kinase anchoring protein
ATP	adenosine triphosphate
[γ 32P]ATP	[γ 32P]-labeled adenosine 5'trisphosphate
AQP2	aquaporin-2
AVP	arginine-vasopressin
BSA	bovine serum albumin
C	catalytic subunit of PKA
Ca ²⁺	calcium
CaMKII	Calmoduline kinase
cAMP	cyclic 3'5' adenosine monophosphate
cGMP	cyclic guanidine monophosphate
C-terminal	carboxyl-terminal
cpm	counts per minute
CFP	cyan fluorescent protein
CREB	cAMP response element binding protein
cDNA	complementary DNA
cGMP	cyclic guanidine monophosphate
dbcAMP	dibutyl cAMP
D1ER	FRET-based Ca ²⁺ sensor
DEAE	diethyl amino ethyl
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl sulphoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide trisphosphate
DTT	dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	diamino ethane tetra acetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis (β -amino ethyl ether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ER	endoplasmatic reticulum
F-Actin	filamentous actin
FMP	Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie
FRET	fluorescence resonance energy transfer
FCS	fetal calf serum
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GPCR	G-protein coupled receptor
GST	glutathione S-transferase
GTP	guanidine triphosphate
G _i -protein	inhibitory GTP-binding protein
G _s -protein	stimulatory GTP- binding protein
HEK	Human embryo kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IBMX	isobutyl methyl xanthine

IP	immunoprecipitation
IMCD	inner medullary collecting duct
IgGH	immunoglobulin G – <i>heavy chain</i>
Km	Michealis-Menton constant
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
M	molar
mRNA	messenger RNA
NDI	nephrogenous diabetes insipidus
N-terminal	amino-terminal
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDE	phosphodiesterase
PGE2	prostaglandin E2
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PKD	protein kinase D
PLB	phospholamban
PH	Pleckstrin-homology domaine
PI3K	phosphoinositol 3-kinase
PKI	protein kinase inhibitory peptide
PLC	phospholipase C
POD	horseradish-peroxidase
PP	phosphatase
PVDF	polyvinyl dienfluorid-membrane
R	regulatory subunit of PKA
RII-overlay	PKA type II regulatory subunit radioactive assay
RACK	receptor for activated C kinase
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RhoA	small GTP-binding protein
SERCA	sarcoplasmic reticulum calcium ATPase
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate acrylamide electrophoresis
SR	sarcoplasmic reticulum
siRNA	small interfering RNA
SLB	standard lysis buffer
TBST	tris buffered saline with Tween20
YFP	yellow fluorescent protein
UCR	upstream conserved region
V2R	vasopressin V2-receptor
VSV	vesicular stomatitis virus
WB	Western blot

Summary

β -Adrenergic stimulation regulates cardiac contractility through a cyclic adenosine monophosphate (cAMP)- and protein kinase A (PKA)- dependent signaling pathway. Kinase anchoring proteins (AKAPs) anchor PKA to its substrates and contribute to the specificity of signaling by compartmentalizing PKA and other signaling molecules [Wong, Scott 04]. This study shows that AKAP18 δ is expressed in rat cardiac myocytes. There it interacts with phospholamban (PLB), a protein regulating the sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase (SERCA). The complex of SERCA, PLB, AKAP18 δ and PKA is localized to the sarcoplasmic reticulum (SR) where AKAP18 δ serves as a scaffold that coordinates PKA phosphorylation of PLB and thereby is involved in the regulation of β -adreno receptor-induced increase in Ca^{2+} re-uptake into the SR.

Additionally AKAP18 δ interacts directly with the phosphodiesterase PDE4D. PDE4D is expressed in cardiac myocytes and renal principal cells. In co-transfected HEK293 cells the interaction of these two proteins is confirmed and the binding site mapped to residue 201 and 301 of AKAP18 δ .

In renal principal cells this interaction appears to be involved in the regulation of vasopressin mediated water reabsorption. Compartmentalized cAMP/PKA signaling regulates water reabsorption in renal principal cells. Phosphorylation of aquaporin-2 (AQP2) by PKA triggers the redistribution of AQP2 from intracellular vesicles to the plasma membrane. Depending on the presence of regulatory RI or RII subunits, PKA is designated type I or II. Both PKA types are located on AQP2-bearing vesicles. However, selective activation of PKA type II is sufficient to induce the AQP2 translocation.

Zusammenfassung

Der β -adrenerge Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Herzfunktion. Dieser Signalweg umfasst die Aktivierung von zyklischem Adenosin Monophosphat (cAMP) und der Protein Kinase A (PKA). A Kinase Ankerproteine (AKAPs) verankern die PKA an ihrem Substrat und erhöhen dadurch die Spezifität verschiedener Signalwege durch Kompartimentalisierung der PKA in der Zelle. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß das Ankerprotein AKAP18 δ in Herzmuskelzellen der Ratte exprimiert wird. AKAP18 δ interagiert mit Phospholamban (PLB), einem Protein verantwortlich für die Regulierung der Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Der Signalkomplex aus den Proteinen PLB, SERCA, AKAP18 δ und PKA ist im Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) lokalisiert. AKAP18 δ fungiert als Gerüst für die Phosphorylierung des PLB und ist somit an der Regulierung des β -adreno-Rezeptor induzierten Anstiegs der Ca^{2+} Aufnahme des SRs beteiligt.

AKAP18 δ interagiert auch mit der Phosphodiesterase PDE4D. Diese wird sowohl in Herzmuskelzellen, sowie auch in den Hauptzellen des Sammelrohres in der Niere exprimiert. In dieser Arbeit wird die Interaktion der beiden Proteine in HEK293 Zellen bestätigt, und die Bindungsstelle für PDE4 in AKAP18 δ lokalisiert. Diese Interaktion scheint an der Regulierung der Arginin-Vasopressin (AVP) induzierten Wasserrückresorption in den renalen Hauptzellen des Sammelrohrs beteiligt zu sein.

Kompartimentalisierung des cAMP/PKA Signalweges ist eine Voraussetzung für die Wasserrückresorption in renalen Hauptzellen des Sammelrohrs. Die Phosphorylierung des Wasserkanals Aquaporin-2 (AQP2) durch die PKA löst eine Umverteilung des Wasserkanals von intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran aus. Je nach Art der regulatorischen Untereinheiten wird die PKA in Typ I und Typ II unterteilt. Beide PKA Typen sind mit den AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß allein eine Aktivierung der PKA Typ II ausreicht, um die AQP2 Umverteilung einzuleiten.