

**Beteiligung von cAMP-abhängigen
Signaltransduktionskomponenten bei der Vasopressin-
regulierten Umverteilung von Aquaporin-2 in renalen
Hauptzellen**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

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

von
Eduard Stefan
geboren am 11. November 1976 in Lienz (Österreich)

angefertigt am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie

Berlin 2005

Gutachter: 1. Prof. Dr. Walter Rosenthal
2. Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Tag der Disputation: 18.05.05

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, am 07.03.2005

Eduard Stefan

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen	4
1 Einleitung	7
1.1 Aufbau und Funktion der Niere	7
1.2 Struktur und Funktion von Wasserkanälen	9
1.3 Molekularer Mechanismus der Translokation von AQP2 (<i>AQP2-Shuttle</i>)	10
1.4 Ursachen für Veränderungen des AVP-regulierten Wasserhaushaltes	13
1.5 Proteinkinase A (PKA) und A-Kinaseankerproteine (AKAP) spielen eine Rolle bei der Translokation von AQP2	15
1.5.1 PKA	15
1.5.2 AKAP-Proteine	16
1.5.2.1 AKAP18	17
1.5.2.2 Die Verankerung der PKA an AKAP-Proteine stellt eine Voraussetzung für die AVP-induzierte Umverteilung von AQP2 dar	18
1.6 Phosphodiesterasen	19
1.6.1 Phosphodiesterase 4	19
1.6.1.1 Interaktionspartner von PDE4	20
1.6.1.2 Zusammenhang zwischen PDE4 und der regulierten Wasserrückresorption	23
1.7 Die Beteiligung von RhoA an der AVP-abhängigen Umverteilung von AQP2	24
1.8 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Materialien und Reagenzien	27
2.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.3 Herstellung von katalytisch inaktiver PDE4D3 durch Mutagenese	28
2.4 Präparation von primär kultivierten Hauptzellen der inneren Medulla aus Rattennieren (IMCD-Zellen)	29
2.5 Transfektion von IMCD- und HEK293-Zellen	30
2.6 Immunfluoreszenzexperimente	31
2.7 Detektion von AQP2, AKAP18 δ , RhoA und den PDE4-Subtypen in IMCD-Zellen	31
2.8 Immunisolierung von intrazellulären Vesikeln	32
2.9 Western Blot-Experimente	33
2.10 Immunpräzipitation und Herstellung von Lysaten	34
2.11 Peptidsynthese auf Zellulosemembranen	35
2.12 RII- <i>Overlay</i> -Analysen	35
2.13 PDE-Aktivitätsmessungen	36
2.14 PKA-Aktivitätsmessungen	36
2.15 Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) Messungen	37

3	Ergebnisse	39
3.1	Vesikelisolierung.....	39
3.1.1	AQP2-tragende Vesikel wurden durch Verwendung von anti-AQP2-Antikörpern isoliert	39
3.1.2	Die GTPasen Rab3a und Rab5 kommen auf AQP2-tragenden Vesikelpräparationen vor	40
3.1.3	PKA Typ II Untereinheiten kommen auf AQP2-tragenden Vesikelpräparationen vor	40
3.2	Lokalisation von AKAP-Proteinen	42
3.2.1	AKAP-Proteine sind für die Verankerung der PKA an AQP2-tragende Vesikel verantwortlich	42
3.2.2	AQP2, PKA und AKAP18 δ kolokalisieren auf den gleichen Vesikeln	43
3.2.3	AQP2 und AKAP18 δ sind vor und nach Behandlung mit AVP in IMCD-Zellen kolokalisiert	43
3.3	Funktion von PDE4 in IMCD-Zellen	47
3.3.1	Die Inhibition von PDE4 steigert die AVP-abhängige Translokation von AQP2 in die Plasmamembran von IMCD-Zellen	47
3.3.2	Nach Behandlung mit AVP kotransloziert PDE4D mit AQP2 an die Plasmamembran von IMCD-Zellen.....	49
3.3.3	PDE4D3 reguliert die Lokalisation von AQP2 in IMCD-Zellen	53
3.3.4	PDE4D3, PKA, AKAP-Proteine und AQP2 kommen an den gleichen Vesikeln vor	56
3.3.5	Interaktion von AKAP18 δ mit PDE4D3	57
3.3.6	FRET-Messungen zur Visualisierung lokaler PKA-Aktivitäten in IMCD-Zellen.....	62
3.3.7	PDE4-Aktivität an AQP2-tragenden Vesikeln	65
3.3.8	Inhibition der PDE4D3 durch Rolipram senkt die PKA-Aktivität an AQP2-tragenden Vesikeln	65
3.3.9	AVP-abhängige Umverteilung von PKA-phosphorylierter PDE4D3 ...	68
3.4	Lokalisation von RhoA.....	71
3.4.1	RhoA ist mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert.....	71
3.4.2	AQP2 und RhoA sind in IMCD-Zellen kolokalisiert und translozieren nach Behandlung mit AVP in die Plasmamembran	71
4	Diskussion	74
4.1	Charakterisierung von immunisolierten AQP2-tragenden Vesikel	74
4.2	Beteiligung von PKA und AKAP-Proteinen an der regulierten Wasserrückresorption.....	76
4.2.1	Die PKA ist über AKAP-Proteine mit den AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert.....	76
4.2.2	AKAP18 δ ist mit AQP2-tragenden Vesikeln assoziiert und transloziert AVP-abhängig an die Plasmamembran	77
4.3	PDE4 ist an der AVP-abhängigen Umverteilung von AQP2 beteiligt.....	79
4.3.1	Die Hemmung der PDE4-Familie steigert die AVP-abhängige Akkumulation von AQP2 in der Plasmamembran von IMCD-Zellen ..	79
4.3.2	PDE4D3 transloziert AVP-abhängig an die Plasmamembran.....	80
4.3.3	Überexpression von PDE4D3-GFP in IMCD-Zellen inhibiert die Translokation von AQP2.....	80
4.3.4	Interaktion von PDE4D3 und AKAP18 δ	81

4.3.5	Funktion von PDE4D3 an AQP2-tragenden Vesikeln und an der Plasmamembran von IMCD-Zellen.....	83
4.4	Beteiligung von RhoA an der AQP2-Translokation	87
4.4.1	RhoA kommt an AQP2-tragenden Vesikeln vor.....	87
4.4.2	RhoA wird nach AVP-Behandlung an die Plasmamembran von IMCD-Zellen rekrutiert.....	87
4.4.3	Beteiligung von Rt31 an der AQP2-Translokation	89
4.5	Modellvorstellung.....	92
4.6	Ausblick	93
5	Zusammenfassung.....	95
5.1	Zusammenfassung in Deutsch	95
5.2	<i>Summary in english</i>	97
6	Referenzen	98
7	Anhang	107
7.1	Veröffentlichungen.....	107
7.2	Posterpräsentation.....	108
7.3	Danksagungen.....	109
7.4	Lebenslauf	110

Abkürzungen

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
[γ ³² P]ATP	[γ ³² P]-markiertes Adenosin 5'-Triphosphat
ADB	<i>assay dilution buffer</i>
AKAP	Proteinkinase A-Ankerprotein
AQP2	Aquaporin-2
AQP2-g	glykosyliertes AQP2
AQP2-ng	nicht-glykosyliertes AQP2
AQP3	Aquaporin-3
AQP4	Aquaporin-4
AKAR1	A-Kinasereporter 1
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
AZ	Adenylatzyklase
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (fötales Kälberserum)
CFP	zyan-fluoreszierendes Protein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cpm	<i>counts per minute</i>
CRE	cAMP <i>responsive</i> Element
CREB	cAMP <i>responsive</i> Elementbindeprotein
C-Terminus	Carboxylterminus
COX IV	Zytochromoxidase C Untereinheit IV
dbcAMP	dibuturyl-cAMP
DH	<i>dbl-homology Domäne</i>
DI +/- Mäuse	Mäuse mit nephrogenen Diabetes insipidus
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleotid-Gemisch
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungen

ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FKS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FMP	Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GDI	Guanindissoziationsinhibitor
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
Gi-Protein	inhibitorisches GTP-bindendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
Gs-Protein	stimulatorisches GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosin 5'-Triphosphat
HEK293	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin
IgG _H	Immunglobulin G – schwere Kette (<i>heavy chain</i>)
IMCD	<i>inner medullary collecting duct</i>
K	katalytische Untereinheit der Proteinkinase A
Kda	Kilodalton
NDI	nephrogener Diabetes insipidus
N-Terminus	Aminoterminus
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
PH	Pleckstrin- <i>homology</i> Domäne
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PKI	Proteinkinase Inhibitorpeptid
PLC	Phospholipase C

Abkürzungen

POD	Meerrettich-Peroxidase
PP	Phosphatase
PSD	postsynaptische Dichteproteine
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membranen
R	regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A
RhoA	kleines GTP-bindendes Protein der Rho-Familie
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
S-Ht31	Stearat-gekoppeltes Peptid (abgeleitet von der Sequenz des AKAP-Proteins Ht31)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLP	Standardlysispuffer
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor</i>
SPA-1	Signal-induziertes Proliferation-assoziiertes Gen-1
V2R	Vasopressin V2-Rezeptor
UCR	<i>upstream conserved regions (UCR1, UCR2)</i>
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
YFP	gelb (<i>yellow</i>)-fluoreszierendes Protein