

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien und Chemikalien stammen, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland).

2.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

mRNA wurde entweder aus dem Gewebe der inneren Medulla von Rattennieren oder aus Rattenherzen präpariert. Nach reverser Transkription der mRNA in cDNA wurde über PCR überprüft, welche PDE4D-Spleißvarianten in der inneren Medulla vorhanden sind.

Nukleotidsequenzen der verwendeten *forward* und *reverse* Primer (Richter et al., 2005):

PDE4D3 *forward*: CAG AAG GCA TTC CTG GAT ATG

PDE4D8 *forward*: GCC ACA AGT GCC TCT TGC AGC

PDE4D9 *forward*: ATG AGC ATT ATT ATG AAG CCG

AQP2 *forward*: ATG TGG GAA CTC AGA TCC

PDE4D3/9 *reverse*: TGG CCA GTT TCT GGT AGG CCT C

PDE4D8 *reverse*: TCC AGA CAC CAG TCC AGC TCC TCC A

AQP2 *reverse*: C GCC TTG CTG CCG CGA GGC

Folgende Reagenzien wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß zusammengemischt:

Matritze: 1 µl cDNA

Oligonukleotide (*forward* und *reverse*): 20 nM

dNTP's: 20 nM

PCR-Puffer: 2,5 mM Tris-HCl (pH 8,4),

12,5 mM KCl,

0,19 mM MgCl₂

Taq-DNA-Polymerase: 5 Einheiten

Zugabe von H₂O (50 µl Endvolumen)

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Segmente	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96°C	4 Minuten
2	24	96°C	45 Sekunden
		62°C (-0,5°C pro Zyklus)	1 Minute
		72°C	2 Minuten
3	24	96°C	45 Sekunden
		50°C	1 Minute
		72°C	2 Minuten

Nach der PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte auf einem 1 % Acrylamidgel aufgetrennt.

2.3 Herstellung von katalytisch inaktiver PDE4D3 durch Mutagenese

Es wurde das QuikChange *in vitro* Mutagenesesystem von Stratagene (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Zwei komplementäre Oligonukleotide (*forward* und *reverse*) mit der Mutation für den Aminosäureaustausch D484A, flankiert durch die unmodifizierte Sequenz von PDE4D3 wurden synthetisiert (Biotex, Campus Berlin-Buch, Deutschland).

Nukleotidsequenzen der Primer für die Mutation zu PDE4D3-D484A

Forward: TGC ACT GTG CAG CCC TGA GCA ACC C

Reverse: GGG TTG CTC AGG GCT GCA CAG TGC A

Folgende Reagenzien wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß zusammengemischt:

Reaktionspuffer: 10 mM KCl,

10 mM (NH₄)₂SO₄,

20mM Tris-HCl (pH 8,8),

20 mM MgSO₄,

0,1% Triton X-100 ,

0,1 mg/ml BSA)

Oligonukleotid D484A-*forward* (125 ng)
 Oligonukleotid D484A-*reverse* (125 ng)
 PDE4D3-GFP (ds DNA-Plasmid) (50ng)
 2,5 Einheiten der *Pfu-Turbo*TM DNA-Polymerase
 1 µl dNTP Mix
 Zugabe von H₂O (50 µl Endvolumen)

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Segmente	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30 Sekunden
2	12	95°C	30 Sekunden
		55°C	1 Minute
		68°C	8 Minuten

Nach der PCR-Reaktion wurde ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* bei 37°C (New England BioLabs, Schwalbach, Deutschland) für 60 Minuten vorgenommen (Verdau der methylierten Stränge der Mutationsmatrize). Anschließend erfolgte die Transformation in XL1-blue *E.coli* Bakterien (laut Protokollangaben von Stratagene).

2.4 Präparation von primär kultivierten Hauptzellen der inneren Medulla aus Rattennieren (IMCD-Zellen)

IMCD-Zellkulturen wurden von zwei bis drei Monate alten Wistarratten angelegt. Nach dem Herausschneiden der renalen inneren Medulla wurden diese in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄; pH 7,4) mit einem Rasiermesser zerkleinert. Anschließend wurde das zerkleinerte Gewebe mit den Enzymen Hyaluronidase (0,2 %) und Kollagenase (0,2 %) für 90 Minuten bei 37°C geschüttelt (350 U/min). Als Basis für das verwendete Medium diente *Dulbecco's modified eagels medium* (DMEM 5523). Zusätzlich wurden 4,5 % Glukose, Penizillin (0,5 U/ml), Streptomycin (0,5 µg/ml), Glutamin (2 mM), nicht essentielle Aminosäuren (1 %) und als Ersatz für fötales Kälberserum (FKS) Ultrosor (1 %) zugesetzt. Nach mehreren Wasch- und Resuspendierschritten (in PBS; 1200 x g Zentrifugation; 5 Minuten) wurden die Zellen in dem modifiziertem

600 mosmol/l DMEM Medium aufgenommen und auf Typ IV Kollagen beschichteten Kulturschalen (mit Deckgläschen) mit einer ungefähren Dichte von $7,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Nach einem und nach vier Tagen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Dem Kultiviermedium wurden 500 µM dibutyryl-cAMP für den Erhalt der Expression von AQP2 zugesetzt. Dibutyryl-cAMP wurde den Zellen 16 Stunden vor jedem Experiment entzogen. Die konfluenten Zellen wurden nach 5 bis 7 Tagen für die Experimente verwendet. Die Zellen wurden 15 Minuten mit Arginin-Vasopressin (100 nM AVP – synthetisiert von M. Beyermann; Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP)), Forskolin (1 mM), H89 (30 µM), 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX, 250 µM) und Rolipram (100 µM) behandelt.

2.5 Transfektion von IMCD- und HEK293-Zellen

IMCD-Zellen wurden unmittelbar vor dem Aussäen durch Verwendung eines AMAXA Nukleofektors und der Nukleofektorlösung 8653 mit der entsprechenden Plasmid-DNA transient transfiziert (Amaya, Köln, Deutschland). Ein Plasmid, das für den PKA-Reporter AKAR1 (Zhang et al., 2001) kodiert, wurde von Roger Tsien (Howard Hughes Medical Institute, University of California, San Diego, La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt. Plasmide, die für die Fusionsproteine bestehend aus dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) und PDE4D3 oder GFP und PDE4A10 kodieren, erhielten wir von unserem Kooperationspartnern George Baillie und Miles D. Houslay (Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, University Avenue, Glasgow G12 8QQ, Schottland; Stefan et al., in Vorbereitung).

Die Überexpression von PDE4D3-GFP und AKAP18δ-GFP erfolgte in HEK293-Zellen (ATCC, USA). Diese wurden auf 10 cm Petrischalen in DMEM-Medium mit 10 % FKS ausgesät. Nach Erreichen einer etwa 50 % Konfluenz wurden die Zellen transient, mit den entsprechenden Vektoren, mit FUGENE (laut Protokollvorgaben: Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) transfiziert. Lysate wurden wie in 2.9 beschrieben hergestellt.

2.6 Immunfluoreszenzexperimente

Nach Behandlung mit Agonisten und/oder Antagonisten wurden die IMCD-Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierlösung (100 mM Cacodylat, 100 mM Saccharose, 10 % Paraformaldehyd, 0,2 % Natronlauge) wurde für 15 Minuten auf die Zellen gegeben. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS. Anschließend wurden die IMCD-Zellen für fünf Minuten mit 0,1 % Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert. Es folgten wiederum zwei weitere Waschschriffe mit PBS in den Kulturschalen. Nach Überführung der Deckgläschen mit den fixierten Zellen (s.o.) auf Deckgläschenständer wurden diese noch dreimal zehn Minuten mit PBS gewaschen, um das Detergens Triton X-100 vollständig zu entfernen. Im Anschluss wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen 45 Minuten bei 37°C mit einem Erstantikörper inkubiert. Es folgten drei PBS Waschschriffe und die Inkubationsphase mit dem Zweitantikörper (37°C für 45 Minuten). Nach drei Waschschriffen mit PBS (10 Minuten) wurden die Deckgläschen auf Objektträger in Immu-mount (Thermo-Shandon, Pittsburgh, USA) eingebettet.

2.7 Detektion von AQP2, AKAP18 δ , RhoA und den PDE4-Subtypen in IMCD-Zellen

AQP2 wurde durch Verwendung eines Kaninchen Antiserums (1:600; Liebenhoff und Rosenthal, 1995) und eines Cy3-konjugierten anti-Kaninchen-Zweitantikörpers (Dianova, Hamburg, Deutschland) detektiert.

Für Doppelfärbungen von AQP2 und AKAP18 δ wurden ein polyklonaler anti-AQP2-Antikörper aus Ziege (1:100 Santa Cruz, Kalifornien, USA) und der affinitätsgereinigte A18 δ 4 Antikörper verwendet (s. 2.8; Henn et al., 2004). Als Zweitantikörper dienten der Cy3-konjugierte anti-Ziege und Cy5-konjugierte anti-Kaninchen-Antikörper. PDE4A-D wurden unter Verwendung von Schafantikörpern (jeder 1:500; Shepherd et al., 2004) und Cy3-konjugierten anti-Schaf-Zweitantikörpern detektiert. Für Doppelfärbungen von AQP2 und PDE4D3 wurde der polyklonale Kaninchen anti-AQP2-Antikörper (1:600; s.o.) und der monoklonale Maus anti-PDE4D-Antikörper (1:100; ICOS Corporation, Bothell, WA, USA) verwendet. Sie wurden durch Cy3-konjugierte anti-Kaninchen- und Cy5-konjugierte anti-Maus-Zweitantikörper visualisiert (alle Dianova).

Phosphoryliertes PDE4 (p-PDE4) wurde mit dem phospho-spezifischen anti-PDE4-Antikörper aus Kaninchen (1:600; MacKenzie *et al.*, 2002) und als Zweitantikörper mit dem Cy5- (bei Doppelfärbungen) oder Cy2-konjugiertem (bei Tripelfärbungen) anti-Kaninchen-Zweitantikörpern gefärbt. Für Doppelfärbungen von AQP2 und RhoA wurde der polyklonale anti-AQP2-Antikörper aus Kaninchen (1:600; s.o.) und der monoklonale anti-RhoA-Antikörper aus Maus (1:100; Santa Cruz, Kalifornien, USA) verwendet. Sie wurden durch Cy3-konjugierte anti-Kaninchen- und Cy5-konjugierte anti-Maus-Zweitantikörper visualisiert. Alle Zweitantikörper (Dianova) wurden in einer Verdünnung von 1:600 eingesetzt. Für die Quantifizierung der Effekte von AVP, IBMX und/oder Rolipram wurde das Verhältnis der intrazellulären Fluoreszenz zur Plasmamembranfluoreszenz von AQP2, PDE4D3, p-PDE4, AKAP18 δ oder RhoA bestimmt (Henn *et al.*, 2004; Klussmann *et al.*, 2001; Tamma *et al.*, 2003). Die Immunfluoreszenzmikroskopie von IMCD-Zellen wurde an einem *Laserscanning-Mikroskop* (LSM 510, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt.

2.8 Immunisolierung von intrazellulären Vesikeln

Anti-AQP2-Antikörper (s. 2.7) und zwei Antikörper die AKAP18 δ erkennen wurden im Kaninchen hergestellt (Henn *et al.*, 2004). Der A18 δ 4-Antikörper erkennt die ersten 33 Aminosäuren von AKAP18 δ , er ist AKAP18 δ -spezifisch. Der A18 δ 3-Antikörper erkennt sowohl AKAP18 δ als auch AKAP18 γ , er wurde hergestellt gegen die Peptide 60-76 der Sequenz von AKAP18 δ . Die Antiseren wurden durch Chromatographie über die für die Immunisierung verwendeten Peptide, gekoppelt an Thiopropyl Sepharose 6B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland), aufgereinigt. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden an *Eupergit C1Z Methacrylat microbeads* (Roehm Pharma, Darmstadt, Deutschland) gebunden (Burger *et al.*, 1989). Sie wurden als AQP2AB-*beads*, A18 δ 3AB-*beads* und A18 δ 4AB-*beads* bezeichnet. Nicht abgesättigte Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit Glyzin blockiert. Die Kontroll-*beads* wurden nur mit Glyzin beschichtet (Glyzin-*beads*).

Aus Homogenaten der inneren Medulla von Ratten oder Homogenaten von IMCD-Zellen wurden die Vesikel immunisoliert. Das Gewebe aus der inneren Medulla von Rattennieren wurde im Homogenisierungspuffer (250 mM Saccharose, 3 mM Imidazol, pH 7,5) homogenisiert. Nach Zentrifugation (3,000 x g, 4 °C, 15 Minuten) erhält man den postnukleären Überstand (PNÜ). Die Nuclei und Zelldebris wurden

verworfen. Der PNÜ wurde mit den entsprechenden Antikörper-*beads* und den Glyzin-*beads* am Rotator inkubiert (45 min, 4 °C). Die *beads* wurden über einen Sacharosegradienten (0.8 M in destilliertem H₂O) abzentrifugiert (3,000 x g, 4 °C, 5 Minuten), danach fünfmal in PBS resuspendiert und abzentrifugiert (3,000 x g, 4 °C, 5 Minuten). Die erhaltenen *beads* wurden im Probenbuffer resuspendiert und für Western Blot-Experimente (s. 2.9) verwendet.

Die IMCD-Zellen wurden in zwölf 60 mm (6 x 10⁶ Zellen pro Platte) Kulturschalen in jeweils 5 ml Kulturmedium ausgesät (s. 2.4). Mit AVP behandelte (6 Platten; 100 nM, 15 Minuten) und unbehandelte Zellen (6 Platten) wurden zweimal mit PBS gewaschen und im Homogenisierungspuffer von den Kulturschalen abgeschabt. Die Vesikelisolation wurde in der Folge analog der beschriebenen Vesikelisolierung aus dem Gewebe vorgenommen.

2.9 Western Blot-Experimente

Für die Western Blot-Versuche wurden die Proteine nach SDS-PAGE auf Immobilon-P PVDF-Membranen transferiert. Die Membranen wurden eine Stunde im Blockierbuffer geblockt (5 % Trockenmilchpulver gelöst in TBST: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4). AQP2 wurde durch Verwendung eines Kaninchenantiserums (s.o.; 1:2,500) und Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen F(ab)₂-Fragmenten (POD) als Zweitantikörper (Dianova) detektiert. PDE4D-Isoformen wurden mit Erstantikörpern vom Schaf (s. 2.6; 1:5,000) und POD-gekoppelten anti-Schaf-Zweitantikörpern (Dianova) detektiert. RI α , RII α , RII β , und die katalytischen PKA-Untereinheiten wurden durch Verwendung von kommerziell erwerblichen monoklonalen Erstantikörpern (Verdünnung 1:2000; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) und POD-gekoppelten anti-Maus-Zweitantikörper (Dianova) detektiert. Die Antikörper gegen Calreticulin, Calnexin (Dianova) und α -Tubulin (Oncogene Research Product, Calbiochem, Cambridge, MA, USA) wurden in der Verdünnung 1:100 eingesetzt. Als Zweitantikörper wurden POD-gekoppelte anti-Maus-Antikörper eingesetzt. AQP4 (Biotrend Chemikalien) wurde in der Verdünnung 1:500 verwendet. Als Zweitantikörper wurden POD-gekoppelte anti-Kaninchen-Antikörper eingesetzt. Rt31 wurde mit einem affinitätsgereinigten Kaninchen-Antikörper gegen die Aminosäuren 369-383 (Verdünnung 1:100; Klusmann *et al.*, 2001) detektiert.

Zum Nachweis von RhoA (Santa Cruz, Kalifornien, USA; Verdünnung 1:1000) und RhoGDI (Transduction Laboratories; Verdünnung 1:2000) wurden monoklonale Mausantikörper verwendet. Die monoklonalen Antikörper gegen Rab3A (Cl 42.2; Matteoli et al., 1991) und Rab5 (Cl 62.2; Fischer et al., 1994) wurden uns von Dr. R. Jahn (Abteilung für Neurobiologie, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Verdünnung 1:1000). Für die Detektion von GFP und GST wurde ein polyklonaler Kaninchenantikörper verwendet (Verdünnung 1:2000). Für alle Zweitantikörper wurde die Verdünnung 1:2500 verwendet. Die Signale wurden nach 5 Minuten Inkubation mit der Lumi-Light Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics) sichtbar gemacht.

2.10 Immunpräzipitation und Herstellung von Lysaten

Für die Immunpräzipitationen (IP) wurden entweder Homogenate oder Lysate der inneren Medulla von Rattennieren, IMCD-Zellen oder HEK293-Zellen verwendet. Die IMCD-Zellen wurden in zwölf 60 mm Kulturschalen (je 6×10^6 Zellen) in jeweils 5 ml Kulturmedium ausgesät (s. 2.4). Mit AVP behandelte (6 Kulturschalen, 100 nM, 15 Minuten) und unbehandelte IMCD-Zellen (6 Kulturschalen) wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die HEK293-Zellen wurden nicht behandelt. Die Präparation von Homogenaten wurde wie in 2.8 beschrieben durchgeführt. Als Puffer für die Lysate wurde der Standardlysispuffer (SLP) verwendet (10 mM K_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Triton X-100). Pro innerer Medulla wurden 500 μ l SLP verwendet, pro 60 mm Schale mindestens 150 μ l SLP. Nach dem Abschaben der Zellen in SLP wurden sowohl diese, als auch das Rattengewebe durch Verwendung eines Potters (Potter S, Braun Biotech International) homogenisiert (10 mal bei 1250 rpm). Die Lysate wurden bei $24000 \times g$ für 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und pro durchgeführter Immunpräzipitation wurden 1,8 mg Protein A-Sepharose (Sigma) und etwa 1-2 μ g des entsprechenden Antikörpers eingesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei $4^\circ C$ auf einem Rotator wurden die Proben je fünfmal mit dem entsprechenden Lysis- oder Homogenisierungspuffer gewaschen. Nach Zugabe von Probenpuffer wurden die Proben für Western Blot-Experimente verwendet.

2.11 Peptidsynthese auf Zellulosemembranen

Peptidsequenzen mit einer Länge von 25 Aminosäuren wurden durch automatisierte Synthese mit einem AutoSpot-Roboter ASS 222 (Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln, Deutschland) auf Whatman 50 Zellulosemembranen synthetisiert (Abteilung Peptidchemie, FMP). Seitenkettenschutzgruppen wurden durch Zugabe von Trifluoressigsäure in Dichlormethan entfernt.

Von den entsprechenden Proteinen wurde die gesamte Aminosäuresequenz N-terminal beginnend als 25mere auf Zellulosemembranen synthetisiert (mit jeweils 20 überlappenden Aminosäuren). Im Anschluß wurden die Membranen nach einem einstündigen Blockierschritt im Blockierbuffer (5 % Trockenmilchpulver in TBST: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) mit Lysaten von transfizierten HEK293-Zellen (s. 2.10) oder mit GST-Fusionsproteinen für die Dauer von einer Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde nach drei Waschschritten mit TBST das Western Blot-Experiment (s. 2.9) durchgeführt.

2.12 RII-Overlay-Analysen

Die RII-*Overlay*-Analysen wurden durch Verwendung von radioaktiv markierten RII β PKA-Untereinheiten durchgeführt (Bregman et al., 1989; Klussmann et al., 1999). Als Blockierpuffer für RII-*Overlay*-Analysen wurden 5 % Trockenmilch in PBS gelöst und 0,1 % FKS und 0,02 % Azid zugesetzt. Die Membranen wurden vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In PBS gequollenes Sephadex G 50 Material (Pharmacia) wurde in eine durch eine Glaskugel verschlossene 10ml Einmalpipette gegossen. Zum Setzen des Säulenbettes wurden 50 ml PBS verwendet. Der Reaktionsansatz (500 μ l) bestehend aus 15 μ g der regulatorischen RII β Untereinheit, 2 μ g der katalytischen Untereinheit der PKA (Promega, Madison, USA), 25 mM Kaliumphosphat, 10 μ M cAMP, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM Dithiothreit und 0,1 μ M [³²P] ATP (75 μ Ci) wurden für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Endkonzentration von ATP wurde durch Zugabe von ATP auf 10 μ M eingestellt. Der Ansatz wurde weitere 50 Minuten auf Eis inkubiert. Dextranblau wurde hinzugegeben und durch Abtrennen der freien Nukleotide über die Sephadexsäule wurde die Reaktion abgestoppt.

Von der blauen Fraktion, die mit der gleichen Geschwindigkeit wie die regulatorische Untereinheit wandert, wurde die spezifische Aktivität in cpm (*counts per million*) pro μg Protein bestimmt. 10^5 cpm/ml Blockierlösung wurden über Nacht mit einer Membran inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen viermal mit dem Blockierpuffer und zweimal mit PBS jeweils für die Dauer von 15 Minuten gewaschen. Es folgte die Exposition auf einer Phosphoimagerplatte und Detektion mit dem Phosphoimager Storm 830 (Amersham Biosciences).

2.13 PDE-Aktivitätsmessungen

AQP2-tragende Vesikel wurden wie in 2.8 beschrieben aus dem Gewebe der inneren Medulla von Rattennieren isoliert. Die Phosphodiesterase-Aktivitätsmessungen hat George Baillie nach Modifikation einer Zweischriftmethode nach Thompson et al. (1971), wie in Marchmont et al. (Marchmont und Houslay, 1980) beschrieben, im Labor von Miles D. Houslay in Glasgow durchgeführt. Die Messungen wurden mit und ohne Rolipram ($10 \mu\text{M}$) vorgenommen, um den PDE4-Aktivitätsanteil zu bestimmen.

2.14 PKA-Aktivitätsmessungen

Die PKA-Aktivitätsmessungen wurden durch Verwendung des *PKA assay* Reagenziensatzes von Upstate (Lake Placid, USA) bestimmt. In den Versuchen wurden die Peptide Ht31 (inhibiert die Verankerung der PKA an AKAP-Proteine; Peptid besteht aus der amphipatischen Helix von AKAP-Lbc/Ht31; Alto et al., 2003) und das inaktive Kontrollpeptid Ht31-P eingesetzt. Die AQP2-tragenden Vesikel wurden, wie es in 2.8 beschrieben ist, bis zum dritten Waschschrift präpariert. Danach rotierten die an AQP2AB-beads gebundenen AQP2-tragenden Vesikel für die Dauer von 30 Minuten in der An- und Abwesenheit der Peptide Ht31 ($100 \mu\text{M}$) oder Ht31-P ($100 \mu\text{M}$). Es folgten drei weitere Waschschrift mit PBS. Die Präparation von AQP2-tragenden Vesikeln, isoliert aus unbehandelten oder aus Rolipram ($30 \mu\text{M}$; 30 Minuten) behandelten IMCD-Zellen, wurde wie in 2.8 beschrieben durchgeführt.

Die in beiden Versuchsansätzen bei 3000 x g sedimentierten AQP2AB- und Glyzin-beads wurden in je 10 µl ADB (*assay dilution buffer*; 100 mM MOPS, pH 7,2, 125 mM β-Glyzerophosphat, 25 mM EGTA, 5 mM Natrium-Orthovanadat, 5 mM Dithiotreitol) resuspendiert. Danach wurden 10 µl der Kinaseinhibitoren (Proteinkinase C-Peptid und Calmodulinkinase-Inhibitor) beigefügt. Bei der Negativkontrolle wurden 10 µl des PKA Inhibitorpeptids PKI (1 µM) dazugemischt. In der Folge wurden je 5 µl cAMP (2 µM) und Kemptide (10 µM; PKA-Substrat) zugegeben. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Es wurden jedem Ansatz Magnesium (8 mM), ATP (75 µM) und 10µCi von [γ - 32 P]-ATP (3000 Ci/mmol) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30°C für die Dauer von 10 Minuten (bei 700 rpm im Heizblock) inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden kurz abzentrifugiert und vom Überstand wurden 25 µl auf nummerierte P81 Phosphorzellulosequadrate aufgetropft. Diese wurden im Anschluss drei mal mit 0,75 % Phosphorsäure gewaschen (jeweils 5 Minuten am Schüttler). Abschließend folgte ein Waschschrift mit Azeton. Die Zellulosequadrate wurden in ein Szintillationsgefäß transferiert und die cpm (*counts per million*) wurden im Flüssigszintillator (Perkin Elmer, Boston, USA) gemessen.

2.15 Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) Messungen

IMCD-Zellen wurden wie in 2.5 beschrieben mit dem PKA-Reporter AKAR1 transient transfiziert (Zhang *et al.*, 2001). AKAR1 ist ein Fusionsprotein bestehend aus CFP und YFP. Dazwischen liegen die Sequenzen, die für eine PKA-Phosphorylierungsstelle und einen Phosphoprotein-bindenden Abschnitt (vom 14-3-3 Protein) kodieren (Abb. 15A). Die Phosphorylierung der PKA-Konsensussequenz bewirkt eine Konformationsänderung. Dies führt zu einem Anstieg des Fluoreszenzresonanz-Energietransfers (=FRET). FRET wurde am *Laserscanning*-Mikroskop gemessen (LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

CFP wurde bei 458 nm und YFP bei 514 nm angeregt. Die Fluoreszenzemission von CFP wird bei 464-494 nm und von YFP bei 535-644 nm gemessen. FRET wurde durch Anregung des CFP und durch die Messung der Emission des YFP bestimmt.

Um den Effekt von Agonisten und Antagonisten (s. 2.4) auf das FRET-Signal zu quantifizieren, wurden die Veränderungen der PKA-Aktivität in Zeitserien verfolgt. Über den Zeitraum von 15 Minuten wurde nach jeder Minute jeweils ein FRET-Signal aufgenommen. Nach der ersten Messung erfolgte die Zugabe von AVP, H89, und/oder Rolipram. Für den Kontrollversuch wurden die Zellen 30 Minuten mit dem PKA-Inhibitor H89 vorbehandelt. Die FRET-Signale wurden quantifiziert. Die Fluoreszenzintensitäten ganzer Zellen wurden bestimmt und die Veränderungen der relativen FRET-Signale über die Zeit im Diagramm dargestellt (Abb. 15C).

Die Bilder werden für eine bessere Darstellung des FRET-Signals in Falschfarben dargestellt. Die Farben beschreiben die Veränderung der ersten 128 Schritte einer 8-bit Grauskala (0-255).

Für die Bestimmung des FRET-Verhältnisses (FRET-*ratio*: YFP- zu CFP-Emmission) wurden die FRET-Messungen an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit der Openlab 2.25 Software (Improvision, Coventry, England) vorgenommen. CFP wurde bei 425 nm und YFP wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die Emissionen von CFP wurden bei 480/30 nm und von YFP wurden bei 535/26 nm gemessen. FRET von CFP zu YFP wurde durch Anregung des CFP und durch Messung der von YFP emittierten Fluoreszenz bestimmt.

Das maximale FRET-Signal des Systems wurde durch Verwendung eines Fusionsproteins bestehend aus CFP und YFP bestimmt (Henn *et al.*, 2004). Die Hintergrundfluoreszenz von Bereichen ohne Zellen wurde abgezogen. Das Verhältnis von 535 nm/480 nm >0.63 wurde entsprechend als positives FRET-Signal definiert. Als Negativkontrolle wurden CFP und YFP als Einzelproteine exprimiert (Kotransfektion von pECFP-N1 und pEYFP-N1 (beide BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)).