



Doctoral Thesis

## Unraveling PKD1-dependent cellular and molecular mechanisms in Diabetes

**Author(s):**

Gehart, Helmuth

**Publication Date:**

2013

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009943137> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH Nr. 20988

# Unraveling PKD1-dependent cellular and molecular mechanisms in Diabetes

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN  
der  
ETH ZÜRICH

vorgelegt von  
Helmuth Gehart

Mag. rer. nat., Universität Wien

geboren am 9. Februar 1984  
von  
Österreich

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. Ruedi Aebersold  
Prof. Dr. Romeo Ricci  
Prof. Dr. Christian Wolfrum

2013

### 3 Summary

Regulated secretion of insulin from pancreatic beta cells is a pivotal process that controls glucose homeostasis and thereby energy balance. While most attention has been drawn to distal steps of insulin exocytosis, i.e. vesicle fusion with the plasma membrane, mechanisms underlying correct formation of secretory granules are still poorly elucidated. My work unveiled a secretory granule quality control checkpoint at the trans-Golgi-network (TGN), which ensures the biogenesis of functional transport carriers. We found two proteins, Protein Kinase D (PKD) and its novel target Arfaptin-1, at the center of this system. Arfaptin-1 is a BAR-domain containing protein and known interactor of ADP ribosylation factors (ARFs). BAR domains can prevent membrane fission through their ability to shield necks of budding vesicles from fission-inducing factors. We demonstrate that PKD phosphorylates Arfaptin-1 at Serine 132, which disrupts the ability of Arfaptin-1 to inhibit the activity of ARF, an important component of the vesicle scission machinery. The physiological significance of this regulatory mechanism is evidenced by loss of glucose-stimulated insulin secretion due to granule scission defects in beta cells expressing non-phosphorylatable Arfaptin-1. Accordingly, depletion of Arfaptin-1 leads to generation of small non-functional secretory granules due to premature fission. To study the role of this mechanism in physiology and disease, we generated conditional PKD1 knockout mice that lack PKD1 in beta cells using a Pdx1 promoter driven Cre recombinase. Pdx1Cre PKD1 fl/fl mice confirm the importance of PKD for proper insulin release and become progressively more glucose intolerant due to reduced insulin secretory capacity. Interestingly, the secretory defect in Pdx1Cre PKD1 fl/fl animals is partially compensated by an increase in beta cell mass and improvement in insulin sensitivity. Overall, my work establishes the essential role of PKD signaling in insulin release and provides the basis for potential novel therapeutic approaches in treatment of Type II Diabetes.

## 4 Zusammenfassung

Regulierte Sekretion von Insulin in pankreatischen Beta-Zellen ist ein lebenswichtiger Prozess, der Glucose-Homöostase und Energiehaushalt reguliert. Während das Augenmerk zumeist auf die distalen Schritten der Insulin Exozytose, wie z.B. Vesikelfusion mit der Plasmamembran, gerichtet ist, sind die Mechanismen, die einer korrekten Insulin-Granula Entstehung zugrunde liegen, immer noch unzureichend verstanden. Meine Arbeit enthüllte einen Qualitätskontrollmechanismus im Trans-Golgi-Netzwerk, der die Generierung von funktionellen Insulin-Transportvesikeln sicherstellt. Wir fanden zwei Proteine, Protein Kinase D (PKD) und ihr neu identifiziertes Substrat Arfaptin-1, im Zentrum dieses Kontrollmechanismus. Arfaptin-1 enthält eine BAR-Domäne und ist ein bekannter Interaktionspartner von ADP Ribosylierungsfaktoren (ARFs), die Vesikelgenerierung und Abschnürung kontrollieren. BAR Domänen können das Abschnüren von Membranen durch Binden an den Vesikelhals und Schutz desselbigen vor Faktoren, die die Abschnürung begünstigen, verhindern. Wir zeigen, dass PKD Arfaptin-1 an Serin 132 phosphoryliert, was die Fähigkeit des letzteren ARFs zu binden und inhibieren, blockiert. Die physiologische Signifikanz dieses Regulationsmechanismus zeigt sich durch den Verlust der Glucose-stimulierten Insulinsekretion aufgrund von Vesikelabschnürungsdefekten in Beta-Zellen, die nichtphosphorylierbares Arfaptin-1 exprimieren. Dementsprechend führt der Knockdown von Arfaptin-1 in Beta-Zellen zur Entstehung von kleinen, nicht-funktionellen sekretorischen Granula aufgrund von verfrühter Abschnürung. Um die physiologische Rolle dieses Mechanismus besser zu verstehen, generierten wir konditionelle PKD1 knockout Mäuse, die kein PKD1 in Beta-Zellen exprimieren. Diese Pdx1Cre PKD1 fl/fl Mäuse bestätigen die Wichtigkeit von PKD für die Ausschüttung von Insulin, da sie in zunehmendem Maß Glucose intolerant werden, was auf ihre reduzierte Fähigkeit Insulin zu sekretieren zurückzuführen ist. Interessanterweise, wird der sekretorische Defekt in Pdx1Cre PKD1 fl/fl Mäusen partiell durch eine Zunahme der Beta-Zell Masse und eine verbesserte Insulinsensitivität kompensiert. Insgesamt zeigt meine Arbeit die essentielle Rolle von PKD in der Insulinsekretion und legt den Grundstein für potentielle neue therapeutische Ansätze in der Behandlung von Typ II Diabetes.