

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Bindung von PKA an AKAP, die Verankerung des Komplexes an subzelluläre Kompartimente und die Bindung weiterer Interaktionspartner (Seite 5).
- Abb. 2: Aufbau eines Nephrons (Seite 13).
- Abb. 3: Modell von AQP1 (Seite 15).
- Abb. 4: Lokalisation von Aquaporinen im Nephron und im Sammelrohr (Seite 16).
- Abb. 5: Vergleich der Aminosäuresequenzen von AKAP18 $\alpha$ , AKAP18 $\beta$ , AKAP18 $\gamma$  und AKAP18 $\delta$  ((Seite 29).
- Abb. 6: Northern Blot zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von AKAP18 $\delta$  (Seite 31).
- Abb. 7: Detektion von immunreaktiven Proteinen in verschiedenen subzellulären Fraktionen von IMCD-Zellen mit dem Antikörper A18 $\delta$ 3, mit dem Präimmenserum und nach einer Peptidinhibition (Seite 34).
- Abb. 8: RII-Overlay mit Immunpräzipitaten aus IMCD-Zellen (Seite 36).
- Abb. 9: RII-Overlay und Western Blot mit cAMP-Agarose-Präzipitaten aus IMCD-Zellen (Seite 38).
- Abb. 10: FRET von AKAP18 $\delta$ -CFP nach RII $\alpha$ -YFP (Seite 40).
- Abb. 11: Effekt der Peptide S-Ht31 bzw. S-Ht31-P auf die FRET-Signale (Seite 42-43).
- Abb. 12: FRET-Messungen nach der Inkubation mit dem Peptid S-Ht31 bzw. S-Ht31-P (Seite 44).
- Abb. 13: Effekt der nicht membranpermeablen Peptide Ht31 und Ht31-P auf die FRET-Ratio (Seite 45).
- Abb. 14: Die Einführung eines Prolins in die RII-Bindungsdomäne von AKAP18 $\delta$ -CFP verringert die FRET-Ratio (Seite 46).

- Abb. 15: FRET-Messungen mit den Konstrukten AKAP18 $\delta$ -CFP bzw. AKAP18 $\delta$ -L308P-CFP und RII $\alpha$ -YFP (Seite 47).
- Abb. 16: FRET-Ratio zwischen AKAP18 $\delta$ -CFP und C-YFP (Seite 48).
- Abb. 17: Vergleich der Expressionsstärke von AKAP18 $\delta$  in der inneren Medulla und im restlichen Nierengewebe (Seite 50).
- Abb. 18: Die Stimulation der IMCD-Zellen mit AVP verringert die Afinität der Bindung von AKAP18 $\delta$  mit der PKA (Seite 51).
- Abb. 19: Densitometrische Auswertung der Signalstärken von RII $\beta$  und AKAP18 $\delta$  (Seite 52).

## 10.2 Abkürzungsverzeichnis

|      |                                                     |
|------|-----------------------------------------------------|
| AKAP | <i>protein kinase A anchoring protein</i>           |
| AQP  | Aquaporin                                           |
| AVP  | Arginin Vasopressin                                 |
| bp   | Basenpaar                                           |
| cAMP | Zyklisches Adenosinmonophosphat                     |
| cDNA | Komplimentäre DNA (complementary-DNA)               |
| DNA  | Desoxyribonukleinsäure (acid)                       |
| FRET | Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer               |
| GST  | Gluthathion S-Transferase                           |
| IMCD | <i>Inner medulla collecting duct</i>                |
| h    | Stunden                                             |
| kb   | Kilobasen                                           |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (messenger-ribonukleic acid) |
| PCR  | Polymerasekettenreaktion                            |
| PKA  | Proteinkinase A                                     |
| RNA  | Ribonukleinsäure (acid)                             |
| RACE | <i>Rapid amplification of cDNA ends</i>             |
| SDS  | Natruimdodecylphosphat                              |

### 10.3 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Henn V, Edemir B, Stefan E, Wiesner B, Lorenz D, Theilig F, Schmitt R, Vossebein L, Tamma G, Beyermann M, Krause E, Herberg FW, Valenti G, Bachmann S, Rosenthal W, Klussmann E. Identification of a novel A-kinase anchoring protein 18 isoform and evidence for its role in the vasopressin-induced aquaporin-2 shuttle in renal principal cells. *J Biol Chem.* 2004 Mar 22

Weitere Veröffentlichungen

#### Originalarbeiten

Klußmann, E., Edemir, B., Pepperle, B., Tamma, G., Klauschenz, E., Hundsrucker, C., Maric, K., Rosenthal, W. Ht31: The first protein kinase A anchoring protein to integrate protein kinase A and Rho signaling. *FEBS Lett* 2001, 507(3): 264-8.

#### Buchbeitrag

Klussmann, E., Krause, E., Wiesner, B., Beyermann, M, EDEMIR, B., Bouchaala, C., Lorenz, D., Maric, K., Tamma, G., Valenti, G., and Rosenthal, W. Cyclic AMP-mediated aquaporin-2 translocation: identification of protein kinase A anchoring proteins and the role of the small GTPases of the Rho family. In: *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*. Eds. Hohmann, S., and Nielsen, S. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, London, UK. pp. 145-149, 2000.

#### Kurzmitteilungen und Poster

EDEMIR, B., Bouchaala, C., Klussmann, E., Maric, K., and Rosenthal, W. Cloning and characterization of a new splice variant of AKAP18 potentially involved in vasopressin-mediated water reabsorption. 41st Spring Meeting Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, March 21st-23rd. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, suppl. to 361 (4), abstr. 258, 2000.

Klussmann, E., Krause, E., Wiesner, B., Beyermann, M, EDEMIR, B., Bouchaala, C., Lorenz, D., Maric, K., Tamma, G., Valenti, G., and Rosenthal, W. Cyclic AMP-mediated aquaporin-2 translocation: identification of protein kinase A anchoring proteins and the role of the small GTPases of the Rho family. MIP conference, Göteborg, Sweden, July 1st – 5<sup>th</sup>, P25, 59, 2000.

Klussmann, E., Krause, E., Janek, K., EDEMIR, B., Bouchaala, C., Maric, K., and Rosenthal, W. Characterization of a new splice variant of AKAP18 and investigation of its potential involvement in vasopressin-mediated water reabsorption. 12<sup>th</sup> Protein kinase symposium, NO/cGMP signaling. Bad Brückenau, August 31<sup>st</sup> – September 3<sup>rd</sup>, 2000.

Klussmann, E., Krause, E., Janek, K., EDEMIR, B., Bouchaala, C., Maric, K., and Rosenthal, W. Characterization of a new splice variant of AKAP18: its potential involvement in vasopressin-mediated water reabsorption. Molecular Pharmacology: Towards New Diagnostic and Therapeutic Concepts. Fall Meeting of the German Society of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology and Sixth International Dahlem Symposium on "Cellular Signal Recognition and Transduction". September 27<sup>th</sup>-30<sup>th</sup>, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., suppl. to 362 (4-5), R28, abstr. 56, 2000.

Klussmann, E., EDEMIR, B., Pepperle, B., Tamma, G., Klauschenz, E., Maric, K., and Rosenthal, W. The protein kinase A anchoring protein Ht31 may function as an estrogen receptor cofactor involved in transcription regulation and/or as an activator of the small GTP-binding protein Rho. Protein phosphorylation and protein phosphatases. Marburg, July 8-12, 2001.

Klussmann, E., EDEMIR, B., Pepperle, B., Tamma, G., Henn, V., Klauschenz, E., Hundsrucker, C., Maric, K., and Rosenthal, W. The human protein kinase A anchoring protein Ht31 has a multi-domain architecture and is capable of integrating protein kinase A and Rho signals. 7th International Dahlem Symposium on "Cellular Signal Recognition and Transduction". Berlin, September 27<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2001.

EDEMIR, B., Rosenthal, W., and Klussmann, E. FRET-based imaging of AKAP-PKA interaction in living cells. Molecular biosensors in Neuroscience, Max-Delbrück-Communication-Center, Berlin-Buch, Germany. November 20 – 22, 2002

EDEMIR, B., Henn, V., Stefan, E., Schmitt, R., Storm, R., Rosenthal, W., and Klussmann, E. AKAP18 $\delta$  and AKAP18 $\epsilon$  are potentially involved in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into the plasma membrane of renal principal cells. Second International Göttingen Meeting on Protein and Membrane Transport in the Secretory Pathway. Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Germany, December 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup>, 2002.

Henn, V., Stefan, E., Schmitt, R., EDEMIR, B., Herberg, F. W., Beyermann, M., Krause, E., Bachmann, S., Rosenthal, W., and Klussmann, E.. Vasopressin-regulated water reabsorption involves the protein kinase A anchoring protein AKAP18 $\delta$ . World Congress of Nephrology, Berlin, Germany, June 8th-12<sup>th</sup> 2003

**Vorträge**

Pepperle, B., Klussmann, E., EDEMIR, B., Maric, K., and Rosenthal, W. Cloning and characterization of the rat homologue of the human protein kinase A anchoring protein HT31. 41st Spring Meeting Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, March 21<sup>st</sup>-23<sup>rd</sup>. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., suppl. to 361 (4), abstr. 251, 2000.

Klussmann, E., Krause, E., Wiesner, B., Beyermann, M, EDEMIR, B., Bouchaala, C., Lorenz, D., Maric, K., Tamma, G., Valenti, G., and Rosenthal, W. Cyclic AMP-mediated aquaporin-2 translocation: identification of protein kinase A anchoring proteins and the role of the small GTPases of the Rho family. MIP conference, Göteborg, Sweden, 1. - 5.7.2000.

Klussmann, E., Krause, E., Janek, K., EDEMIR, B., Bouchaala, C., Maric, K., and Rosenthal, W. Characterization of a new splice variant of AKAP18 and investigation of its potential involvement in vasopressin-mediated water reabsorption. 12<sup>th</sup> Protein kinase symposium, NO/cGMP signaling. Bad Brückenau, August 31<sup>st</sup> – September 3<sup>rd</sup>, 2000.

Klussmann, E., Pepperle, B., EDEMIR, B., Bouchaala, C., Maric, K., and Rosenthal, W. The Protein kinase A anchoring protein HT31, the Rho GEF factor Proto-Lbc and the breast cancer auxillary protein Brx are encoded by a single gene. 42nd Spring Meeting Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, March 13th-15th. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., suppl. to 363 (4), abstr. 250, 2001.

**10.4 Sequenz der AKAP18δ cDNA**

Die Nukleotidsequenz von AKAP18δ. Das Start-Kodon, flankiert von der Kozak-Konsensussequenz (GCCATGG; Kozak, 1996) liegt bei bp 57-59. Das Stopkodon liegt bei bp 1116-1118 gefolgt von einem Polyadenylierungssignal (bp 2938-2945).

```

1  aattcagcgg cgccttaatt ctagcgggcc cgcgcctctg ccttcgcgcc gcgaccatgg
61  agcgccccgc cgcgggagaa atagatgcc aataagtgtga tcatttatca agaggagagg
121 aagggacggg ggacctggag accagccctg taggttctct ggcagacctg ccgtttctgt
181 ccgtagacat tcaagatgac tgtggactcc ctgatgtacc tcaaggaaat gtacctcaag
241 gaaacccaaa gagaagcaaa gaaaatagag gcgacaggaa tgatcacgtg aagaagagga
301 agaaggccaa gaaagattat caaccaact atttctgtc cattccaatc accaacaaaa
361 agattacagc tggaattaa gtcttgcaaa attcgatact gagacaggat aatcgattga
421 ccaaagccat ggtcggcgac ggctcctttc acatcacctt gctagtgtatg cagctattaa
481 acgaagatga agtaaacata ggtaccgacg cgcttttggg actgaagccg ttcggtgagg
541 agatccttga ggggaagcat ctgactttgc ccttcacgg gattggcact ttccaaggtc

```

601 aggttggtt tgtgaagctg gcagacggag atcacgtcag tgcctcctg gagatagcag  
661 agactgcaaa aaggacattt caggaaaaag gcatcctggc tggagaaagc agaactttta  
721 agcctcacct gacctttatg aagctgtcca aagcaccaat gctctggaag aagggagtga  
781 gaaaaataga gcctggattg tatgagcaat ttatcgacca cagatttga gaagaaatac  
841 tgtaccaaata agatctctgc tccatgctga agaaaaaaca gagcaatggt tattaccact  
901 gcgagtcttc gatcgtgatc ggtgagaag accgaaagga gcctgaggat gctgaactgg  
961 tcaggctcag taagaggctg gtggagaacg ccgtgctcaa ggctgtccag cagtacctag  
1021 aagagacaca gaacaaaaag cagccggggg aggggaactc cgtcaaagct gaggagggag  
1081 atcggaatgg cgatggcagt gataacaacc ggaagtgaga gctgaaccg gtccgctgcc  
1141 cctccgctaa gtcgcagact gactcgcaat gtgctagtga agtgccttgt tcaagccctg  
1201 gagatcacct agtgattgac gcgattgatg agttcggttt tgctgcgaca caacagaaaa  
1261 gaatgggggtg ctgggaccag cagaaggaat tactttacag aagaacaaca cgcacaaggg  
1321 ggagccggca cttcgggccc ctgcccact caaagggcag agggagagga ctggctcggc  
1381 acagaatact gttctgccgt ttacattgct tcgatccttt gactacttta tctgagggca  
1441 aaacttgcac acagctatca agtgctaagt tcactttgtc actggtgaaa tgaccatgag  
1501 tatagtgagt ccacaatggt tctgtttgt ccccccatg tgcttttacc acacagtgat  
1561 ctttatttac agtaaattga gttttgtgta aattatata atttttggca aatgcaatct  
1621 tttctatgaa atgtgggtaa tgttgtaaag gtttttgagc cttattttga taaagtcaat  
1681 tgccatattt aatgtcctcc gttgatattt gtactttaaa tgtatcatat aattttcccc  
1741 cttaggcaag aaaccagttg gaaccaaga ctttaattaac gaagcttgc accgagaaag  
1801 gatggagctg aagtccaaag tgaacagat caaagaactt ttgttaaagc ctgagacca  
1861 ggccaagatt agaaaggagc tttttgaaag aagagttttt aataatggtg acccaactga  
1921 tttcaacatg actttgccat agctctccgc tgctgttacg cttgctcaca tgtttatgaa  
1981 ctctcagccc gttaaatagc tctttgtgta gtaaccaaag tgttcttacg gtctctacaa  
2041 agcccacaaa ccaacattgg taaggnacta acaacaacta acaacttctt gccaaagaaa  
2101 acgtattttt gccttatcgt ggtcaccatc atcacctca tcacgtcat caccacnta  
2161 aaattgagtt ttagaatggt ctttttggtg tcttactcat tttatataaa aacttcttaa  
2221 ttagctgttg taagatgttc catgggtcct tgcagataat attatatata tatatatata  
2281 tacacacata tatgtacata tatatacata tatatacaca tatactcaca cacttttaaa  
2341 aatcctttat agacaaaaac agcaaaaaca aataaaacca acaacagtat tctaagggtc  
2401 acctgcctcc tgttgatgtg gtcctgttac ttcaaaggaa gcattgtccg ggccagtcca  
2461 gtctcaaggt ctttttgctg agcgtttgag tgcttattga ggatcagcac ttgaacagac  
2521 attagtaagc gtaatcgttg tagtcacggg ttcagaatgt tttatactat ctatattctc  
2581 tctttcattg atgaagtaca gtttgctttt ttttttaatt ttttatttct tcgtgaacag  
2641 tgttcagggt tcctatttcc tactctctga agatgagccc aagcctgcgt tcttcacggt  
2701 ttgagttagt tgcaactggt cttttgtaaa cgagcattct tgagtgttat ttgggtagtc  
2761 actttaaaat tgctgctact aatagatgat ggggaaagaa agtgattaga gattaaatat  
2821 ataactatct occagtccag tctgctcgtg gatttttggc tatttcttct cactgggtaa  
2881 atgatgatt aattcatgat gtattccttt atacgtacct acgttttcat gcgtcataat  
2941 aaagtactc tttcctctaa aaaaaaaaa aaaaa

### **10.5 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Münster, den 07.09.2003

Bayram Edemir

## 10.6 Danksagung

An dieser Stelle sei allen, die direkt oder indirekt am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, herzlichst gedankt. Im einzelnen sind das:

Dr. Enno Klußmann für seine Diskussionbereitschaft und seine konstruktive Kritik bei der Planung und Durchführung der Experimente. Und für seine konstruktive Kritik an dem Entwurf der Dissertation.

Dr. Volker Henn für seine Kooperation bei der Durchführung den cAMP-Agarose- und Immuno-Präzipitationen.

Dr. Uli Müller für seine Diskussionsbereitschaft.

Prof.Dr. Randolf Menzel für die freundliche und bereitwillige Übernahme der Begutachtung und Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie der FU Berlin.

Prof. Dr. Walter Rosenthal für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit. Für die konstruktive Kritik, die Anregungen und dem Interesse am Fortschritt meiner Arbeit.

Und ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Rosenthal am FMP-Berlin.



### 10.7 Lebenslauf

Vorname: Bayram

Nachname: Edemir

Geboren: 23.10.1970 in Kars/Türkei

1978-1982 Goethe Grundschule, Bottrop

1982-1992 Vestisches Gymnasium, Bottrop

10.1992-03.1993 Bauingenieurstudium Ruhr-Uni Bochum

04.1993-01.2000 Biologiestudium FU Berlin

seit 01.2000 Doktorarbeit am Forschungsinstitut für Molekulare  
Pharmakologie, Berlin und FU Berlin