

**Klonierung und Charakterisierung einer neuen  
AKAP18-Isoform, AKAP18 $\delta$ , und ihre mögliche  
Beteiligung an der AVP-vermittelten AQP2-  
Translokation**

**Im Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie  
der Freien Universität eingereichte Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde**

**vorgelegt von Bayram Edemir**

**angefertigt am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie  
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter Rosenthal**

**Berlin, September 2003**

**Gutachter: Prof. Dr. Walter Rosenthal**  
**Prof. Dr. Uli Müller**

**Tag der Disputation: 11.03.2004**

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufbau und Funktion der PKA.....	2
1.2	Proteinkinase A-Ankerproteine.....	4
1.2.1	Strukturelle Eigenschaften der PKA-Bindung an AKAP.....	5
1.2.2	Strukturelle Eigenschaften der RII-Bindungsdomäne bei AKAP.....	7
1.2.3	Lokalisation des PKA-AKAP-Komplexes über die <i>targeting</i> -Domäne.....	8
1.2.3.1	Variation der <i>targeting</i> -Domäne durch alternatives Spleissen,.....	8
1.2.4	AKAP integrieren mehrere Signaltransduktionswege.....	10
1.2.5	Einige AKAP besitzen eigene enzymatische Eigenschaften.....	12
1.3	Wasserrückresorption in der Niere.....	13
1.3.1	Aquaporine.....	14
1.3.2	Vasopressin-gesteuerte AQP2-Regulation in der Niere.....	16
1.4	Zielsetzung.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Materialien.....	21
2.1.1	Materialien und Reagenzien.....	21
2.1.2	<i>Primer</i> für PCR und Sequenzierungen.....	21
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Molekularbiologische Techniken.....	21
2.2.1.1	Plasmid-DNA-Isolierungen.....	21
2.2.1.2	DNA-Spaltung mit Hilfe von Restriktionsenzymen.....	22
2.2.1.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	22
2.2.1.4	Sequenzierung von DNA.....	22
2.2.1.5	Datenbankrecherche.....	22
2.2.1.6	Northern Blot.....	22
2.2.1.7	RACE-PCR.....	23
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	24
2.2.2.1	Herstellung von Glutathion S-Transferase-Fusionsproteinen.....	24
2.2.3	Herstellung von Zellfraktionen aus IMCD-Zellen.....	24
2.2.4	Western Blot.....	25
2.2.5	Immunpräzipitation und cAMP-Agarose Präzipitation.....	25
2.2.6	RII-Overlay.....	26

2.2.7	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik .....	26
3	Ergebnisse .....	29
3.1	Klonierung einer neuen AKAP18-Isoform, AKAP18 $\delta$ .....	29
3.2	Untersuchung der Expression der mRNA von AKAP18 $\delta$ in verschiedenen Geweben .....	31
3.3	Charakterisierung von AKAP18 $\delta$ auf der Proteinebene .....	33
3.3.1	Detektion von immunreaktiven Proteinen mit dem Antikörper A18 $\delta$ 3 in IMCD-Zellen .....	34
3.3.2	Immunpräzipitation von AKAP18 $\delta$ mit dem Antikörper A18 $\delta$ 3 .....	37
3.3.3	AKAP18 $\delta$ bindet die PKA <i>in vivo</i> .....	38
3.3.3.1	Kopräzipitation von AKAP18 $\delta$ mit den regulatorischen Untereinheiten der PKA .....	38
3.4	Nachweis der AKAP18 $\delta$ -PKA-Interaktion in lebenden Zellen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik .....	40
3.4.1	Überprüfung der Spezifität der FRET-Signale .....	42
3.4.2	Effekte der Peptide S-Ht31 und S-Ht31P auf die FRET-Signale .....	42
3.4.3	Die Einführung eines Prolins in die RII-Bindungsdomäne von AKAP18 $\delta$ -CFP und der Effekt auf die FRET-Ratio. ....	47
3.4.4	Zwischen AKAP18 $\delta$ -CFP und C-YFP kommt es zu keinem FRET .....	49
3.5	Die Expression von AKAP18 $\delta$ ist in der inneren Medulla der Niere stärker als im restlichen Nierengewebe. ....	50
3.6	Die Stimulation der IMCD-Zellen mit AVP verringert die Affinität von AKAP18 $\delta$ zur PKA. ....	52
4	Klonierung und Charakterisierung der Ht31/Rt31 cDNA .....	54
5	Diskussion .....	55
5.1	AKAP18 $\delta$ , eine neue AKAP18-Isoform .....	55
5.2	AKAP18 $\delta$ -PKA Interaktion in lebenden Zellen .....	55
5.3	Expression von AKAP18 $\delta$ in der Niere .....	58
5.4	AVP verringert die Interaktion zwischen AKAP18 $\delta$ und den RII-Untereinheiten in IMCD-Zellen .....	59

5.5	Die Rolle von AKAP18 $\delta$ bei der Langzeit- und Kurzzeitregulation von AQP2 .....	60
6	Ausblick.....	63
7	Zusammenfassung .....	64
8	Abstract.....	65
9	Literatur .....	66
10	Anhang.....	83
10.1	Abbildungsverzeichnis.....	83
10.2	Abkürzungsverzeichnis.....	84
10.3	Veröffentlichungen .....	85
10.4	Sequenz der AKAP18 $\delta$ cDNA .....	87
10.5	Erklärung .....	89
10.6	Danksagung .....	90
10.7	Lebenslauf.....	91