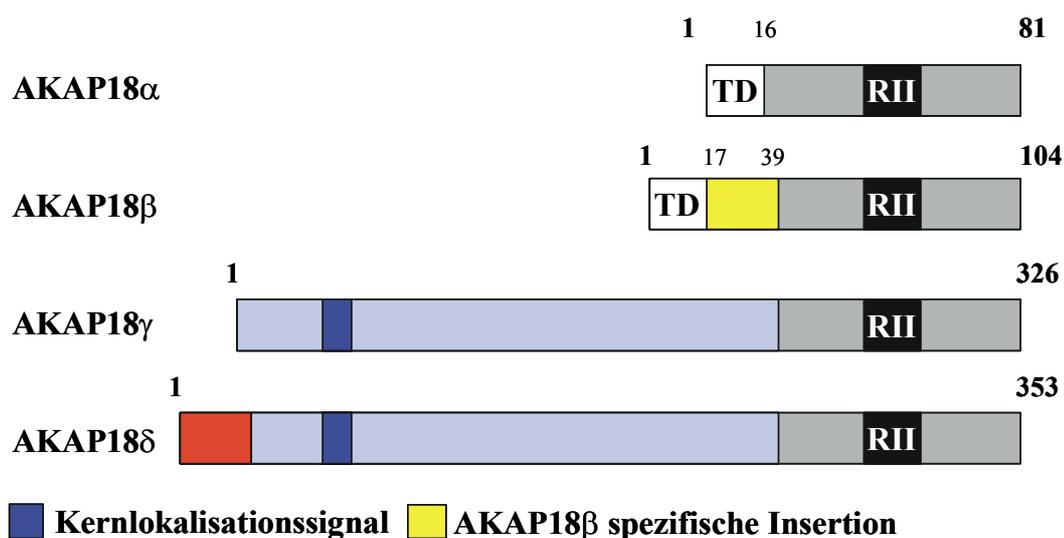


3 Ergebnisse

3.1 Klonierung einer neuen AKAP18-Isoform, AKAP18 δ

Durch die Isolierung von Klon 9.1 und dessen Vervollständigung mittels RACE-PCR (2.2.1.7) konnte eine neue AKAP18-Isoform, AKAP18 δ , kloniert werden. Aus der Ratten-Herz *Marathon-Ready*-cDNA-Bibliothek konnten 331 bp und aus der IMCD-Zellen-cDNA konnten 285 bp kloniert werden. Weitere RACE-PCR-Ansätze mit der Ratten-Herz *Marathon-Ready*-cDNA-Bibliothek bzw. mit der cDNA aus IMCD-Zellen brachten keine neuen Sequenzinformationen. AKAP18 δ ist mit 2975 bp um 331 bp länger als Klon 9.1. Das Startkodon, 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, siehe Anhang). Der vollständige Klon kodiert für ein Protein mit einer Länge von 353 Aminosäuren. Es ist um 27 Aminosäuren länger als AKAP18 γ . Damit scheint es sich bei AKAP18 δ um eine weitere AKAP18-Isoform zu handeln. Die Abb. 5 zeigt einen Vergleich von AKAP18 δ mit den anderen AKAP18-Isoformen.

5A)



5B)

AKAP18 δ	1	MERPAAGEIDANKCDHLSTRGEEGTGDLETSPVGLADLPFAAVDIQDDCG
AKAP18 γ	1	-----MSEEFANTMDSLVDMPFATVVDIQDDCG
AKAP18 β	1	-----
AKAP18 α	1	-----
AKAP18 δ	51	LPDVPQGNV PQGNPKRSKENRGDRNDHV <u>KKRKK</u> AKKDYQPNYFLSIPITN
AKAP18 γ	29	ITDEP-----QINLKRSQENEWVKSQV <u>KKRKK</u> KKKDYQPNYFLSIPITN
AKAP18 β	1	-----
AKAP18 α	1	-----
AKAP18 δ	101	KKITAGIKVLQNSILRQDNRLTKAMVGDGSFHITLLVMQLLNEDEVNIGT
AKAP18 γ	74	KEIIKGIKILQNAIIQQDERLAKAMVSDGSFHITLLVMQLLNEDEVNIGI
AKAP18 β	1	-----
AKAP18 α	1	-----
AKAP18 δ	151	DALLELKPFVEEILEGKHLTLPFHGIGTFQGQVGFVKLADGDHVSALLEI
AKAP18 γ	124	DALLELKPFIEELLQGKHLTLPFQIGTFGNQVGFVKLAEGDHVNSLLEI
AKAP18 β	1	-----
AKAP18 α	1	-----
AKAP18 δ	201	AETAKRTFQEKGILAGESRTFKPHLTFMKLSKAPMLWKKGVRKIEPGLYE
AKAP18 γ	174	AETANRTFQEKGILVGESRSFKPHLTFMKLSKSPWLRKNGVKKIDPDLYE
AKAP18 β	1	-----
AKAP18 α	1	-----
AKAP18 δ	251	QFIDHRFGEEILYQIDLCSMLKKKQSNQYHCESS-----I
AKAP18 γ	224	KFISHRFGEELIYRIDLCSMLKKKQSNQYHCESS-----I
AKAP18 β	1	-----MGQLCCFPFSRDEGKISELESSSSAVLQRYSKDIPSW
AKAP18 α	1	-----MGQLCCFPFSRDEGKISE-----
AKAP18 δ	287	VIGEKDRKEPEDAE <u>LVRLSKRLVENAVL</u> KAVQQYLEETQNKQPEGNSV
AKAP18 γ	260	-IGEKNGGEPDDAE <u>LVRLSKRLVENAVL</u> KAVQQYLEETQNKQPEGSSV
AKAP18 β	38	SSGEKNGGEPDDAE <u>LVRLSKRLVENAVL</u> KAVQQYLEETQNKQPEGSSV
AKAP18 α	19	----KNGGEPDDAE <u>LVRLSKRLVENAVL</u> KAVQQYLEETQNKQPEGSSV
AKAP18 δ	337	KAEEGDRNGDGSNNRK
AKAP18 γ	310	KTEAADQNGNDNENNRK
AKAP18 β	88	KTEAADQNGNDNENNRK
AKAP18	65	KTEAADQNGNDNENNRK

Abb. 5: Vergleich der Aminosäuresequenzen von AKAP18 α , AKAP18 β , AKAP18 γ und AKAP18 δ . A) Schematische Darstellung der AKAP18-Isoformen. Bereiche mit hoher Aminosäureidentität sind mit identischen Farben unterlegt. Mit TD sind die *targeting*-Domänen von AKAP18 α und AKAP18 β und mit RII die RII-Bindungsdomänen gekennzeichnet. B) Vergleich der Aminosäuresequenzen. Die RII-Bindungsdomänen sind fett und unterstrichen. Das Epitop des Antikörpers A18 δ 3 ist in roter Schrift hervorgehoben. Das Kernlokalisierungssignal bei AKAP18 γ (Brown et al., 2003) ist in blauer Schrift hervorgehoben.

Die C-Termini aller AKAP18-Isoformen weisen eine sehr hohe Aminosäureidentität auf. Die RII-Bindungsdomänen sind identisch. In den überlappenden Bereichen hat AKAP18 δ eine Aminosäureidentität zu AKAP18 α und zu AKAP18 β von 76,6 %, zu AKAP18 γ von 75 % und zu AKAP18 α aus der Maus von 100 %. N-terminal gibt es keine Übereinstimmung zwischen den ersten 11 Aminosäuren von AKAP18 γ und AKAP18 δ . Dies deutet daraufhin, dass die ersten 11 Aminosäuren von AKAP18 γ bzw. die ersten 33 Aminosäuren von AKAP18 δ auf verschiedenen Exonen liegen. Im Vergleich zu AKAP18 γ kommt es bei AKAP18 δ zu einer Insertion von 5 Aminosäuren (Aminosäuren 56-60) in dem überlappenden Bereich (Abb. 5A). Welche Funktion die Insertion in AKAP18 δ erfüllt, müsste noch genauer überprüft werden. Das Kernlokalisierungssignal bei AKAP18 γ (Brown et al., 2003) ist auch bei AKAP18 δ vorhanden.

3.2 Untersuchung der Expression der mRNA von AKAP18 δ in verschiedenen Geweben

Um zu überprüfen, in welchen Geweben AKAP18 δ exprimiert wird, wurde ein kommerziell erhältlicher Northern Blot mit poly-A⁺ mRNA aus verschiedenen Rattengeweben mit einem radioaktiv markierten PCR-Fragment der AKAP18 δ cDNA als Sonde (bp 20-164) hybridisiert. Die Qualität und Quantität der poly-A⁺ mRNA wurde mit einer β -Aktin-Hybridisierung überprüft.

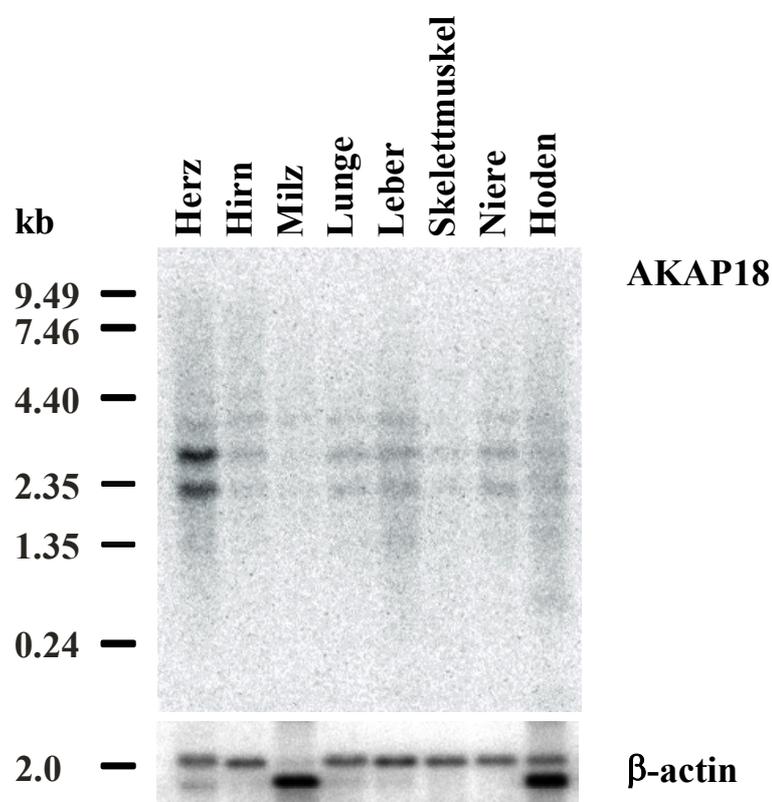


Abb. 6: Northern Blot zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von AKAP18δ. Eine kommerziell erhältliche Nylonmembran mit poly-A⁺ mRNA aus verschiedenen Geweben wurde mit einer ³²P-markierten cDNA-Sonde von AKAP18δ (bp 20-164 der AKAP18δ cDNA) und nach dem Entfernen der AKAP18δ-Sonde mit einer ³²P-markierten β-Actin-Sonde hybridisiert. Die Membran wurde auf einer Phosphoimagerplatte exponiert und die Signale anschließend mit dem Phosphoimager detektiert.

Der Northern Blot zeigt eine vergleichbare Expression von β-Aktin in den einzelnen Geweben (Abb. 6). Somit sind ähnliche Mengen an poly-A⁺ mRNA aus den jeweiligen Geweben eingesetzt worden. Mit der AKAP18δ-Sonde sind drei mRNAs bei ca. 2,3 kb, 3 kb und 4 kb in allen Geweben detektierbar. Die mRNA bei 3 kb entspricht in etwa der Länge der AKAP18δ-cDNA. Während es bei der mRNA von 4 kb nur geringe Unterschiede in der Stärke zwischen den einzelnen Geweben gibt, sind bei den mRNAs um 2,3 und 3 kb wesentliche Unterschiede feststellbar. Beide mRNAs sind im Herzen am stärksten exprimiert. In der Leber, Niere und im

Hoden ist die Signalstärke ähnlich, jedoch wesentlich schwächer als im Herzen. Im Hirn, in der Lunge und im Skelettmuskel sind die Signale wiederum schwächer als in den vorher genannten Geweben. In der Milz sind diese Signale nur noch schwach detektierbar.

Mit der verwendeten cDNA-Sonde sind drei mRNA detektierbar. Dies deutet daraufhin, dass es noch weitere AKAP18-Isoformen geben könnte. Dies wird durch bioinformatische Auswertungen des AKAP18-Gens auf Chromosom 6 (6q23) bestätigt. Die Auswertungen zeigen, dass es möglicherweise bis zu acht AKAP18-Isoformen geben könnte. Die Länge der vorhergesagten mRNA reichen von 1,04 kb bis 4,3 kb. Ob diese mRNA alle AKAP Eigenschaften nachweisen muss noch überprüft werden.

In einem *multiple tissue*-Northern Blot mit einem radioaktiv markierten cDNA Fragment von Klon 9.1 (bp 432-1105 der AKAP18 δ -cDNA) konnten sechs Signale (1,4 kb, 2 kb, 2,3 kb, 3 kb 4,4 kb und 7 kb) detektiert werden (Edemir, 1999). Diese cDNA-Sonde sollte alle bisher bekannten AKAP18-Isoformen detektieren. Bei dem *multiple tissue*-Northern Blot in Abb. 6 wurde ein AKAP18 δ spezifisches cDNA-Fragment (bp 20-164) verwendet. Das Ergebnis des Northern Blot zeigt aber erhebliche Unterschiede zu dem Blot mit der cDNA-Sonde aus Klon 9.1 auf. Es gibt keine eindeutigen Signale bei 1,4 kb, 2 kb, 4,4 kb und 7 kb, die mit der cDNA-Sonde aus Klon 9.1 detektiert werden konnten. Bei diesen Signalen könnte es sich um die mRNA von AKAP18 α , AKAP18 β und von weiteren bisher unbekanntem AKAP18-Isoformen handeln.

Der Northern Blot zeigt, dass es mehrere AKAP18-Isoformen gibt, die auch mit spezifischen cDNA-Sonden voneinander unterschieden werden können.

3.3 Charakterisierung von AKAP18 δ auf der Proteinebene

Um die Charakterisierung von AKAP18 δ auf der Proteinebene durchführen zu können, wurde ein affinitätsgereinigter Antikörper, gerichtet gegen die Aminosäuren 60-76 (A18 δ 3), eingesetzt. Der Antikörper A18 δ 3 ist gegen ein Epitop gerichtet, das zu 42 % identisch ist mit der AKAP18 γ Aminosäuresequenz (Abb. 5). Für die Charakterisierung des Antikörpers war es entscheidend AKAP18 δ als rekombinantes Protein vorliegen zu haben. AKAP18 δ wurde dazu als GST-

Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurde der GST-Anteil abgespalten. Das rekombinante AKAP18 δ diente in den folgenden Western Blot- und RII-Overlay-Experimenten als Positivkontrolle und als Größenreferenz.

3.3.1 Detektion von immunreaktiven Proteinen mit dem Antikörper A18 δ 3 in IMCD-Zellen

Um die Expression von AKAP18 δ auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden IMCD-Zellhomogenate, Proteine der löslichen (Z) und partikulären (M) IMCD-Zellfraktionen und Proteine aus IMCD-Zellfraktionen die angereichert für Zellmembranen (LS) bzw. intrazelluläre Vesikel (HS) sind, hergestellt. AQP2 wird nach AVP-Stimulation aus der HS-Fraktion in die LS-Fraktion umverteilt. Um eine mögliche Umverteilung von AKAP18 δ zu untersuchen, wurden die IMCD-Zellen mit AVP stimuliert und die gleichen Zellfraktionen hergestellt. Die Proteine und rekombinantes AKAP18 δ Protein wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese mit dem Antikörper A18 δ 3 detektiert.

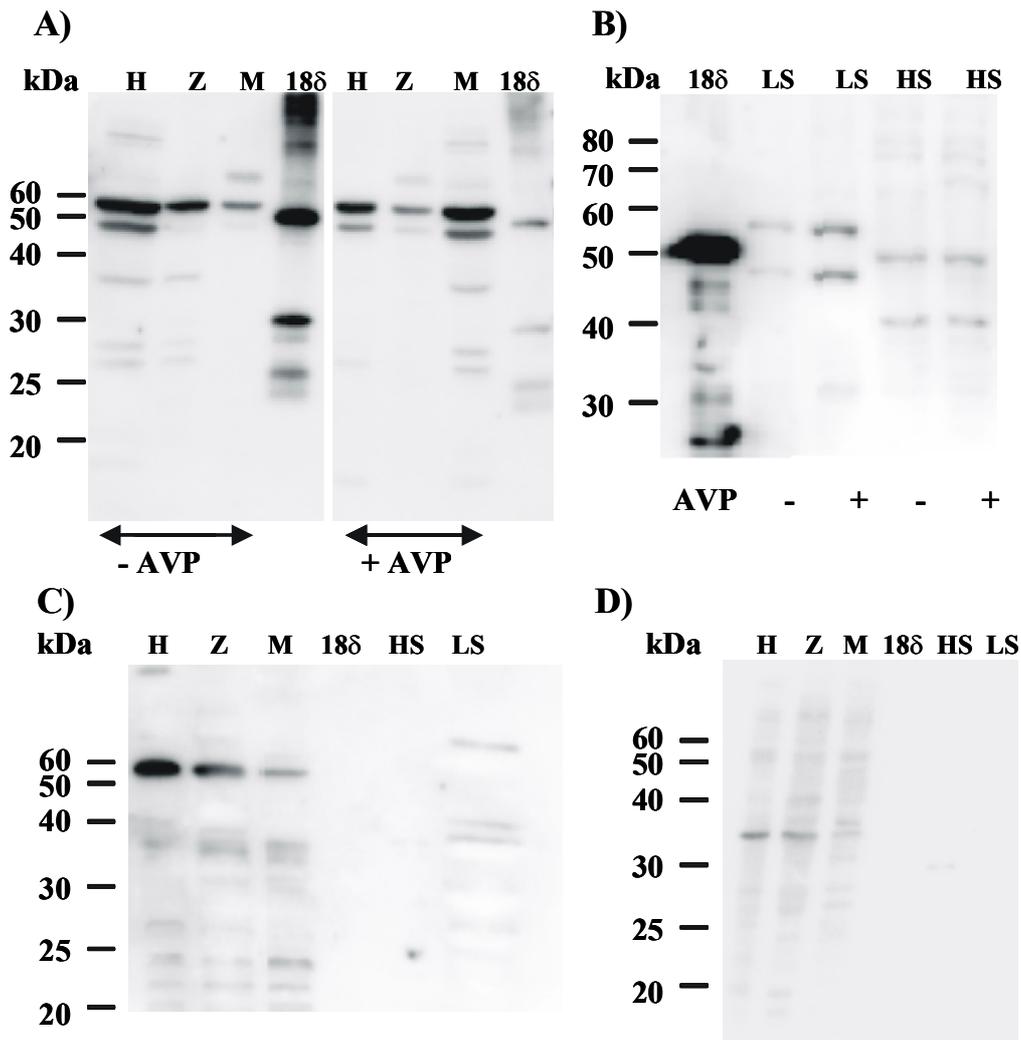


Abb. 7: Detektion von immunreaktiven Proteinen in verschiedenen subzellulären Fraktionen von IMCD-Zellen mit dem Antikörper A1883, mit dem Präimmunserum und nach einer Peptidinhibition. A) Proteine aus unstimulierten (-AVP) und stimulierten (+AVP) IMCD-Zellhomogenaten (H), löslichen (Z) und partikulären (M) Fraktionen bzw. B) aus Fraktionen angereichert für Zellmembranen (LS) bzw. intrazelluläre Vesikel (HS) wurden in einer SDS-PAGE (12 % Gel) aufgetrennt (40 µg pro Spur), auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem Antikörper A1883 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes AKAP188 (188) eingesetzt. C) Proteine aus IMCD-Zellhomogenat (H), Z-Fraktion, M-Fraktion, HS-Fraktion und LS-Fraktion (40 µg pro Spur) wurden mit rekombinantem AKAP188 (188) in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem Präimmunserum inkubiert. D) Proteine aus den selben Fraktionen wie in C wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde, nach der präinkubation mit dem Peptid gegen das immunisiert wurde, mit dem Antikörper A1883 inkubiert. A-D) Die PVDF-Membran wurde nach Inkubation mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (1:2000) in Lumi-Light Lösung inkubiert und die Signale am Lumi-Imager F1 detektiert.

Der Antikörper A18 δ 3 detektiert eine Reihe von Proteinen (Abb. 7A). Proteine mit einem ähnlichen Molekulargewicht wie das des rekombinanten AKAP18 δ gibt es nur in den HS-Fractionen (Abb. 7B). Die stärksten Signale liegen bei ca. 55 kDa (Homogenat, Z- und M-Fraktion), bei ca. 47 kDa (Homogenat und Z-Fraktion) und bei ca. 65 kDa (HS-Fraktion). Es kommt zu keiner Umverteilung der detektierten Proteine nach AVP-Stimulation.

Da AQP2 ebenfalls in der HS-Fraktion angereichert ist (Klussmann et al. 1998) würde dies bedeuten, dass AKAP18 δ und AQP2 möglicherweise in den gleichen Fraktionen vorhanden sind.

Um die Spezifität der Signale zu überprüfen, wurde zum einen ein Western Blot mit dem Präimmenserum und zum anderen ein Western Blot nach einer Peptidinhibition, bei dem der Antikörper A18 δ 3 mit einem dem Epitop des Antikörpers entsprechenden Peptid präinkubiert wurde, durchgeführt. Bei diesen Western Blots wurden nur Proteine aus unstimulierten IMCD-Zellen eingesetzt.

Wie erwartet, reagierte das Präimmenserum nicht mit dem rekombinanten AKAP18 δ Protein (Abb. 7C). Auch in der HS-Fraktion sind keine Signale detektierbar. In der LS-Fraktion gibt es eine Reihe von Signalen zwischen ca. 25 und ca. 70 kDa, aber keines dieser Signale wurde im Western Blot mit dem Antikörper A18 δ 3 detektiert (Abb. 7A und Abb. 7B). Das Präimmenserum detektiert im Zellhomogenat, in der löslichen und partikulären Fraktion Proteine, die zwischen ca. 20 und 55 kDa liegen.

Nach der Peptidinhibition wird das rekombinante AKAP18 δ ebenso wenig detektiert wie Proteine in der LS- und HS-Fraktion (Abb. 7D). Dagegen reagiert der Antikörper A18 δ 3 nach der Präinkubation mit dem Peptid schwach mit einer Reihe von Proteinen im Homogenat und in der Z- und M-Fraktion. Es gibt kein Signal bei ca. 50 kDa, das der Größe von AKAP18 δ entsprechen könnte. Allerdings ist auch kein Signal bei ca. 55 kDa, wie mit dem Präimmenserum detektierbar. Bei den anderen Signalen könnte es sich um spezifische Signale handeln, da diese nach einer Peptidinhibition nicht mehr detektierbar sind. Da diese Signale aber kleiner sind als das rekombinante AKAP18 δ , stellen sie andere Proteine dar.

3.3.2 Immunpräzipitation von AKAP18 δ mit dem Antikörper A18 δ 3

Um zu überprüfen, ob eines der immunreaktiven Proteine, die der Antikörper in dem Western Blot (Abb. 7A/B) detektiert, ein AKAP darstellt, wurden Immunpräzipitationen von Proteinen aus IMCD-Zellen mit dem Antikörper A18 δ 3 und dem entsprechenden Präimmenserum durchgeführt. Die Präzipitate und rekombinantes AKAP18 δ wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit dieser wurde ein RII-Overlay durchgeführt. Die Signale wurden nach der Exposition der Membran auf einer Phosphoimagerplatte mit einem Phosphoimager detektiert. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Volker Henn durchgeführt.

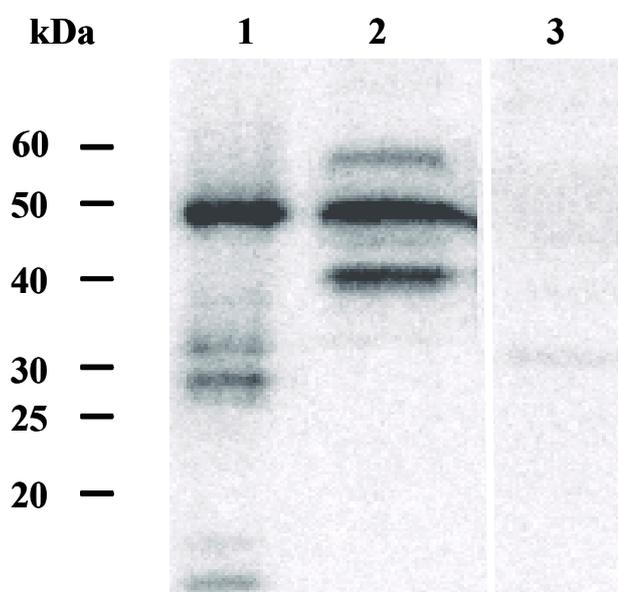


Abb. 8: RII-Overlay mit Immunpräzipitaten aus IMCD-Zellen. Aus IMCD-Zellen wurden Immunpräzipitate mit dem Antikörper A18 δ 3 (Spur 2) und dem entsprechenden Präimmenserum (Spur 3) hergestellt. Diese wurden mit rekombinantem AKAP18 δ (Spur 1) als Positivkontrolle in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde in einem RII-Overlay eingesetzt. Die RII-Bindenden Proteine wurden nach der Exposition der Membran (48 h) auf einer Phosphoimagerplatte mit einem Phosphoimager detektiert.

In dem Präzipitat mit dem Antikörper A18 δ 3 sind vier Signale bei ca. 55, 45, 50 und 38 kDa detektierbar. Das rekombinante AKAP18 δ hat die gleiche Größe wie das Protein bei ca. 50 kDa. Das ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei AKAP18 δ um das vollständige Protein handelt, und dass es in IMCD-Zellen exprimiert wird.

Der RII-Overlay zeigt auch die *in vitro*-AKAP-Funktion von AKAP18 δ . Da das Epitop des Antikörpers A18 δ 3 zu 42 % identisch mit AKAP18 γ ist, könnte das Signal bei 38 kDa AKAP18 γ von der Größe her entsprechen (Trotter et al., 1999). Die Signale bei ca. 55 und 45 kDa könnten weitere AKAP18-Isoformen darstellen.

Der RII-Overlay zeigt eindeutig, dass der Antikörper A18 δ 3 in der Lage ist, aus IMCD-Zellen AKAP zu präzipitieren. Einer der AKAP hat etwa das gleiche Molekulargewicht wie das rekombinante AKAP18 δ . Dieses AKAP stellt somit AKAP18 δ dar. Der RII-Overlay bestätigt außerdem, dass AKAP18 δ in den IMCD-Zellen exprimiert wird.

3.3.3 AKAP18 δ bindet die PKA *in vivo*

Der RII-Overlay mit den Immunpräzipitaten zeigt, dass AKAP18 δ die RII-Untereinheiten *in vitro* bindet (Abb. 8). Um zu untersuchen, ob AKAP18 δ auch tatsächlich als AKAP *in vivo* fungiert, wurden zwei Methoden eingesetzt. Die *in vivo* AKAP-Funktion sollte zuerst mit der klassischen cAMP-Agarose-Präzipitation, bei der die an die regulatorischen Untereinheiten der PKA gebundenen Proteine mit gereinigt werden, untersucht werden. Zum anderen sollte mit der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Technik eine Interaktion von AKAP18 δ mit PKA in lebenden Zellen gezeigt werden.

3.3.3.1 Kopräzipitation von AKAP18 δ mit den regulatorischen Untereinheiten der PKA

Mit cAMP-Agarose können die regulatorischen Untereinheiten der PKA und die daran gebundenen Proteine gereinigt werden. Als Ausgangsmaterial für die cAMP-Agarose-Präzipitation wurden Homogenate aus IMCD-Zellen verwendet. Als Negativkontrolle wurde die cAMP-Agarose-Präzipitation in Gegenwart von löslichem cAMP durchgeführt. Die cAMP-Agarose-Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Zunächst wurden die cAMP-Agarose-Präzipitate für einen RII-Overlay-Experiment eingesetzt. Als nächstes wurden die cAMP-Agarose-Präzipitate in einem Westen Blot-Experiment mit dem Antikörper A18 δ 3 eingesetzt. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Volker Henn durchgeführt.

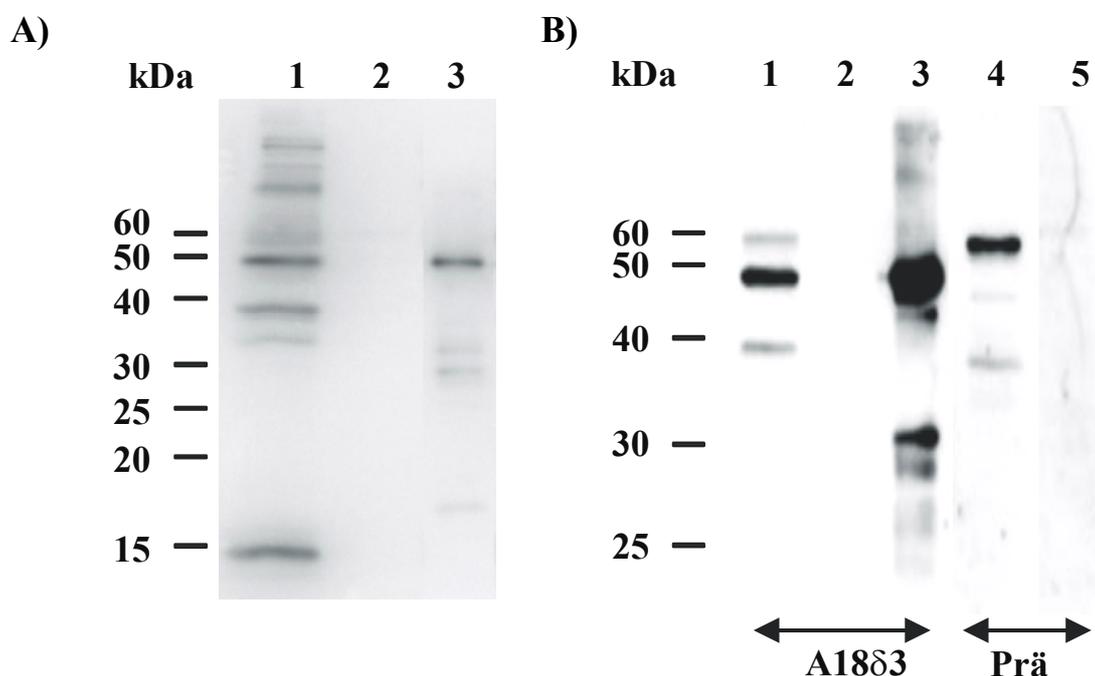


Abb. 9: RII-Overlay und Western Blot mit cAMP-Agarose-Präzipitaten aus IMCD-Zellen. A) Die RII-bindenden Proteine wurden über cAMP-Agarose-Präzipitation aus IMCD-Zellen präzipitiert (Spur 1). Als Negativkontrolle wurde die cAMP-Agarose-Präzipitation in Gegenwart von cAMP durchgeführt (Spur 2). Als Positivkontrolle wurde rekombinantes AKAP18 δ eingesetzt (Spur 3). Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde anschließend mit radioaktiv markierten RII-Untereinheiten inkubiert. Die Signale wurden nach Exposition der Membran (48 h) auf einer Phosphoimagerplatte mit einem Phosphoimager detektiert. B) Aus IMCD-Zellen wurden cAMP-Agarose-Präzipitate in Abwesenheit (Spur 1 und Spur 4) bzw. in Gegenwart von löslichem cAMP (Spur 2) gewonnen und mit rekombinanten AKAP18 δ (Spur 3 und Spur 5) in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und in einem Western Blot mit dem Antikörper A18 δ 3 bzw. dem entsprechenden Präimmunserum (PRÄ) inkubiert. Die PVDF-Membran wurde nach Inkubation mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (1:2000) in Lumi-Light Lösung inkubiert und die Signale anschließend am Lumi-Imager F1 detektiert.

Bei dem RII-Overlay (Abb. 9A) können in dem cAMP-Agarose-Präzipitat eine Reihe von AKAP zwischen ca. 14 kDa und über 100 kDa detektiert werden. Es ist auch ein relativ starkes Signal bei ca. 50 kDa, der ungefähren Größe von AKAP18 δ , vorhanden. In cAMP-Agarose-Präzipitaten, die in Gegenwart von cAMP hergestellt wurden, können keine AKAP detektiert werden.

Es stellt sich die Frage, ob eines der AKAP in Abb. 9A AKAP18 δ darstellt. Um dies zu überprüfen, wurden cAMP-Agarose-Präzipitate aus IMCD-Zellen und rekombinanten AKAP18 δ in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und in einem Western Blot mit dem Antikörper A18 δ 3 bzw. dem entsprechenden Präimmunserum inkubiert (Abb. 9B).

In dem cAMP-Agarose-Präzipitat aus IMCD-Zellen ist AKAP18 δ bei ca. 50 kDa mit dem Antikörper A18 δ 3 detektierbar (Abb. 9B). Mit dem Western Blot ist der Nachweis erbracht worden, dass AKAP18 δ in IMCD-Zellen die RII-Untereinheiten bindet und somit als AKAP *in vivo* fungiert. Auch ist ein Signal bei ca. 55 kDa detektierbar. Beide Signale sind nicht in dem cAMP-Agarose-Präzipitat, welches in Gegenwart von cAMP hergestellt wurde, und mit Präimmunserum detektierbar. Das Präimmunserum detektiert ein Signal bei ca. 55 kDa, welches geringfügig kleiner ist als das mit dem Antikörper A18 δ 3 detektierte Signal. Bei diesem Signal könnte es sich entweder um eine weitere AKAP18-Isoform oder um ein unspezifisches Signal handeln. Das Protein bei ca. 38 kDa könnte AKAP18 γ darstellen (Trotter et al., 1999).

3.4 Nachweis der AKAP18 δ -PKA Interaktion in lebenden Zellen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik

Als zweite Methode wurde die FRET-Technik gewählt, um die AKAP18 δ -PKA-Interaktion in lebenden Zellen zu untersuchen.

Für die FRET-Untersuchungen wurden HEK293-Zellen mit den für AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodierenden Vektoren transient transfiziert. Die Messungen erfolgten innerhalb von 24-48 h nach der Transfektion, da in diesem Zeitraum die Expression von AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP am stärksten war.

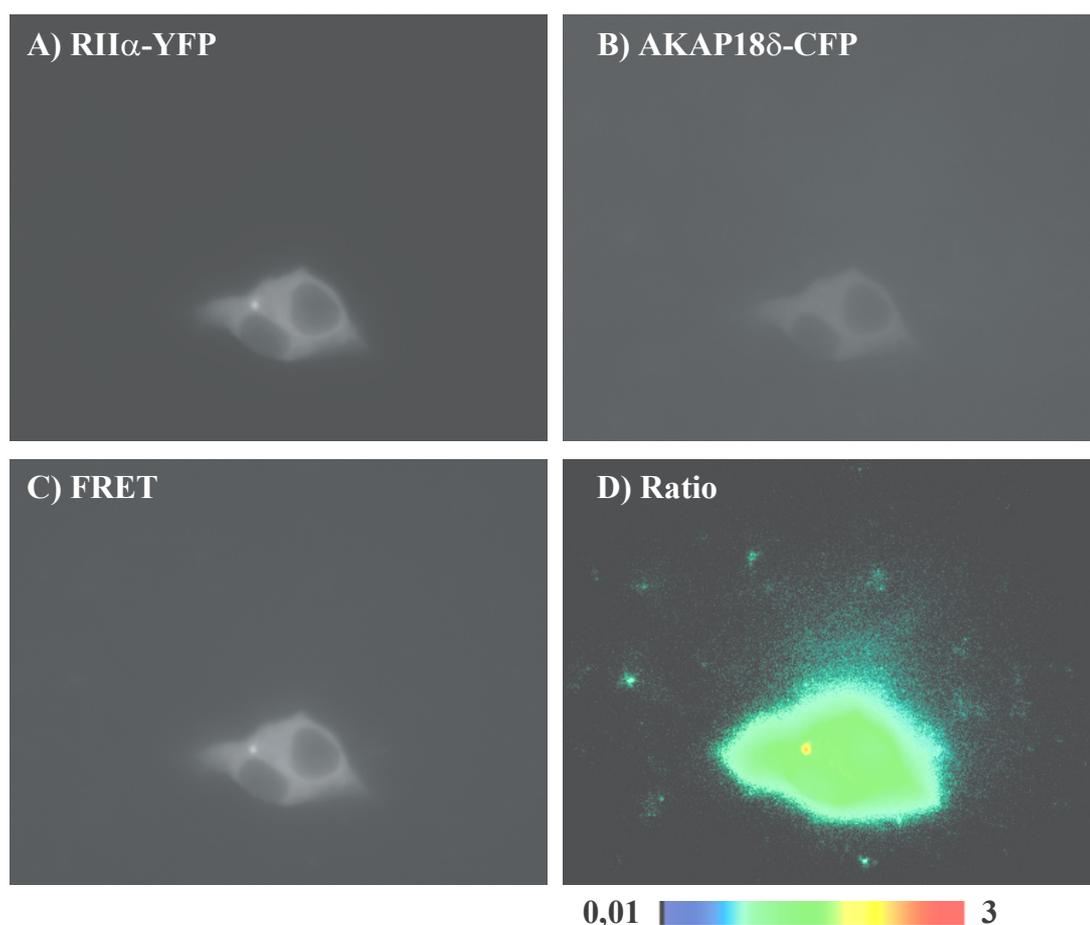


Abb. 10: FRET von AKAP18 δ -CFP nach RII α -YFP. HEK293-Zellen wurden mit den für AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodierenden Vektoren transient transfiziert. FRET-Messungen wurden 48 h nach der Transfektion durchgeführt. A) Die Emission von RII α -YFP (425 nm) . B) Emission von AKAP18 δ -CFP (480 nm). C) FRET-Emission (535 nm/ 480 nm). D) Ratio der Emission von C/B in einer Falschfarbendarstellung. Der Balken zeigt eine Zuordnung der Farben zu den Ratiowerten.

Die Messungen zeigen, dass es zu einem FRET zwischen AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kommt. Die durchschnittliche FRET-Ratio beträgt $1,35 \pm 0,1$. Dies spricht dafür, dass es zu einer Interaktion zwischen AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP in HEK293-Zellen kommt. Die Fluoreszenz von AKAP18 δ -CFP-als auch die RII α -YFP-Fluoreszenz sprechen für eine intrazelluläre Lokalisation der beiden Fusionsproteine in HEK-293 Zellen. Dies deutet darauf hin, dass AKAP18 δ ebenso wie AKAP18 γ (Trotter et al., 1999) intrazellulär lokalisiert ist. Obwohl auch bei AKAP18 δ das Kernlokalisationsignal, welches zur Lokalisation von AKAP18 γ in

den Zellkern führt (Brown et al., 2003), vorhanden ist (Abb 5), ist eine Lokalisation von AKAP18 δ -CFP im Zellkern nicht zu beobachten.

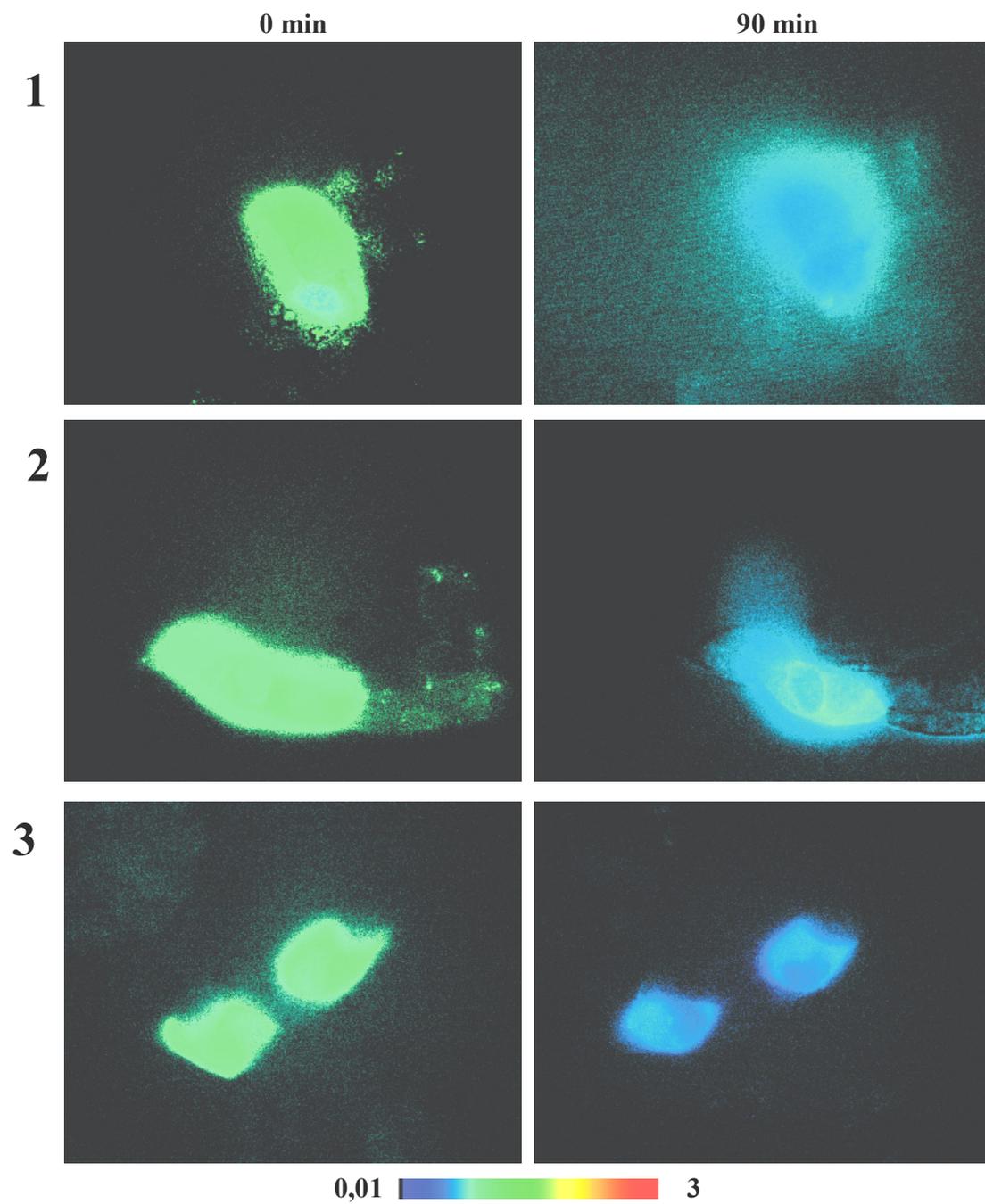
3.4.1 Überprüfung der Spezifität der FRET-Signale

Das stearatgekoppelte Peptid S-Ht31 ist in der Lage, die Zellmembran zu überwinden und die PKA-AKAP-Interaktion zu stören (1.2.2). Um zu überprüfen, ob die FRET-Signale tatsächlich eine Interaktion zwischen AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP darstellen und ob diese über die RII-Bindungsdomäne hergestellt wird, wurde dieses Peptid bei FRET-Messungen eingesetzt.

3.4.2 Effekte der Peptide S-Ht31 und S-Ht31P auf die FRET-Signale

HEK293-Zellen wurden mit den für AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodierenden DNAs transient transfiziert. Die FRET-Messungen erfolgten 24-48 h nach der Transfektion. HEK293-Zellen wurden nach der ersten FRET-Messung (0 min) mit dem Peptid S-Ht31 bzw. SHt31-P (100 μ M) inkubiert und die FRET-Messungen wurden nach 90 min wiederholt.

11 A)



11 B)

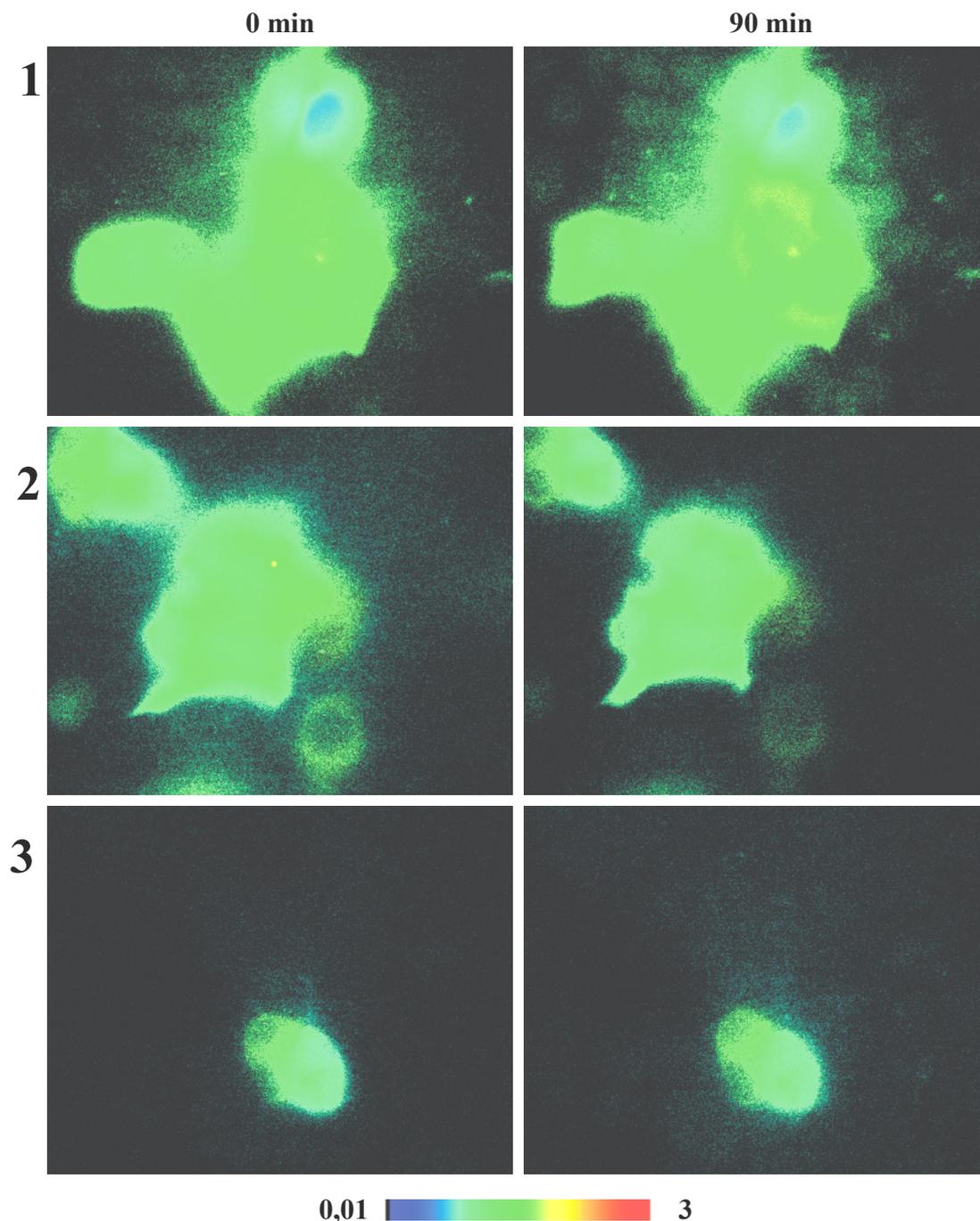


Abb. 11: Effekt der Peptide S-Ht31 bzw. S-Ht31-P auf die FRET-Signale. Der Effekt des Peptides S-Ht31 (A) bzw. S-Ht31-P (B) an drei Beispielen. HEK293-Zellen wurden mit den für AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodierenden Vektoren transient transfiziert. Die FRET-Messungen erfolgten 24-48 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden nach der ersten FRET-Messung (0 min) mit dem membranpermeablen Peptid S-Ht31 (A), das die PKA-AKAP Interaktion unterbindet, bzw. S-Ht31-P, das die PKA-AKAP Interaktion nicht unterbindet, inkubiert. Die FRET-Ratio vor der Inkubation und nach 90 min sind hier in Falschfarben dargestellt. Der Farbbalken zeigt eine Zuordnung der Farben zu den FRET-Ratio.

Die Inkubation der HEK293-Zellen mit dem membranpermeablen Peptid S-Ht31 führt zu einer starken Reduzierung des FRET-Signals zwischen AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP. Durch die Inkubation der Zellen mit dem Peptid S-Ht31 wird die Stärke der Signale erheblich verringert. Sie fällt von einem Mittelwert von $1,35 \pm 0,1$ auf $0,6 \pm 0,01$ ab. Dieses Ergebnis zeigt, dass die FRET-Signale eine direkte Interaktion zwischen AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP.

Die Inkubation mit dem membranpermeablen Peptid S-Ht31-P führt zu keiner Verringerung in der FRET-Ratio (Abb. 11B). Die mittlere FRET-Ratio aus 5 Messungen beträgt zum Zeitpunkt 0 min $1,42 \pm 0,18$. Nach 90 min Inkubation mit dem Peptid S-Ht31-P beträgt die mittlere FRET-Ratio $1,46 \pm 0,26$. Die Abb. 12A und B fassen die Ergebnisse von sechs (S-Ht31) bzw. fünf (S-Ht31-P) unabhängigen FRET-Messungen zusammen.

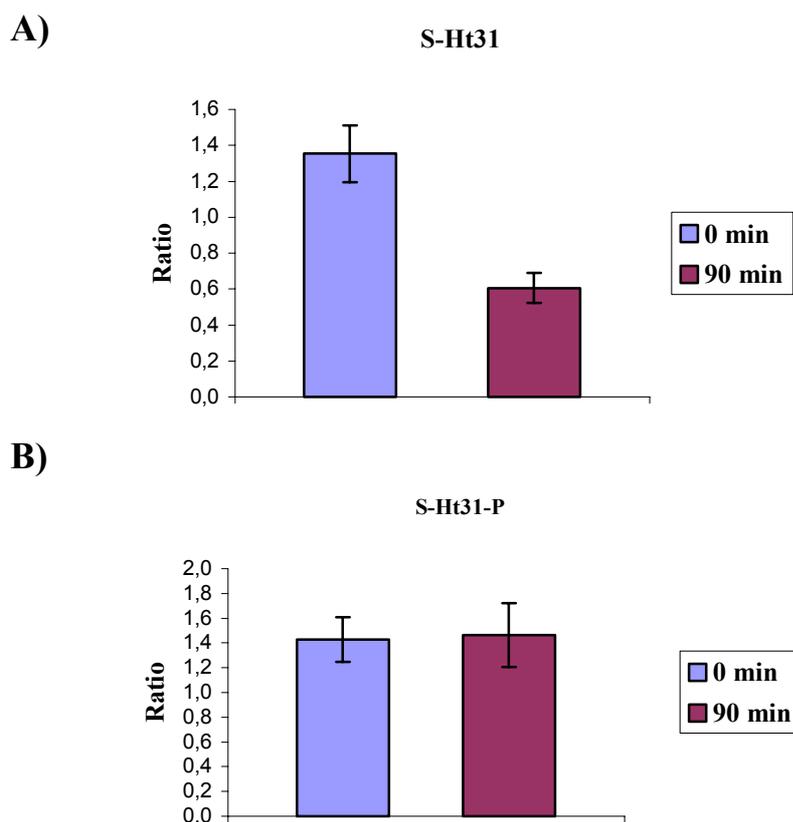


Abb. 12: FRET-Messungen nach der Inkubation mit dem Peptid S-Ht31 bzw. S-Ht31-P. HEK293-Zellen wurden mit den für AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodierenden Vektoren transient transfiziert. FRET-Messungen erfolgten 24-48 h nach der Transfektion. Nach der ersten FRET-Messung (0 min) wurden die Zellen mit dem membranpermeablen Peptid S-Ht31 (14 A; 100 μ m) bzw. S-Ht31-P (14B; 100 μ m) inkubiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der FRET-Signale vor der Inkubation (0 min) und nach 90 min Inkubation mit den Peptiden (13 A) n = 6; 13 B) n = 5).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die mit dem Peptid S-Ht31 erzielte Verringerung der FRET-Ratio durch die Störung der AKAP18 δ -CFP/RII α -YFP Interaktion erreicht wurde. Das Ergebnis zeigt auch, dass die AKAP18 δ -CFP/RII α -YFP Interaktion über eine RII-Bindungsdomäne vermittelt wird.

Als weitere Kontrolle wurden die FRET-Messungen in Gegenwart der nicht stearatgekoppelten Peptide Ht31 und Ht31-P durchgeführt. Diese Peptide haben im zellfreien System oder nach Mikroinjektion in Zellen die gleichen Eigenschaften auf die PKA-AKAP-Interaktion wie S-Ht31 bzw. S-Ht31-P. Sie sind jedoch nicht membranpermeabel und sollten daher auch keinen Einfluss auf die AKAP18 δ -CFP-RII α -YFP Interaktion in HEK293-Zellen haben. Die FRET-Messungen wurden wie für die membranpermeablen Peptide beschrieben durchgeführt.

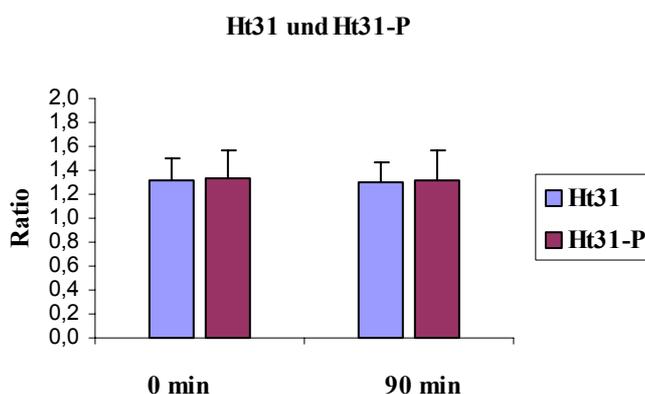


Abb. 13: Effekt der nicht membranpermeablen Peptide Ht31 und Ht31-P auf die FRET-Ratio. HEK293-Zellen wurden mit den für AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodierenden Vektoren transient transfiziert. Die FRET-Messungen erfolgten 24-48 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden nach der ersten FRET-Messung (0 min) mit dem nicht membranpermeablen Peptid Ht31-P bzw. Ht31-P (jeweils 100 μ m) inkubiert. Darstellung der Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Vor der Inkubation (0 min) mit dem Peptid Ht31 beträgt die FRET-Ratio $1,31 \pm 0,18$ und nach 90 min Inkubation $1,34 \pm 0,25$. Die FRET-Ratio vor der Inkubation der Zellen mit dem Peptid Ht31-P beträgt $1,34 \pm 0,15$ und nach der Inkubation (90 min) $1,31 \pm 0,22$. Die Peptide Ht31 und Ht31-P haben wie erwartet keinen Einfluss auf die FRET-Ratio und somit auf die AKAP18 δ -CFP-RII α -YFP Interaktion. Das Ergebnis bestätigt, dass die Peptide Ht31 oder Ht31-P nicht in der Lage sind, die Zellmembran zu passieren.

3.4.3 Die Einführung eines Prolins in die RII-Bindungsdomäne von AKAP18 δ -CFP und der Effekt auf die FRET-Ratio.

Die RII-Bindungsdomäne von AKAP18 δ konnte durch RII-Overlay Experimente mit rekombinanten Proteinen kartiert werden (Aminosäuren 301-314) (Edemir, 1999). Um die FRET-Spezifität zu untersuchen und die RII-Bindungsdomäne *in vivo* zu kartieren, wurde bei AKAP18 δ -CFP in der RII-Bindungsdomäne Leuzin 308 gegen ein Prolin, dass die Bildung der amphipatischen Helix und somit die AKAP Funktion stört, ausgetauscht. Um den Effekt der Mutation auf die FRET-Ratio zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit den für AKAP18 δ -L308P-CFP und RII α -YFP kodierenden Vektoren transient transfiziert. FRET-Messungen wurden wie beschrieben durchgeführt (2.2.7).

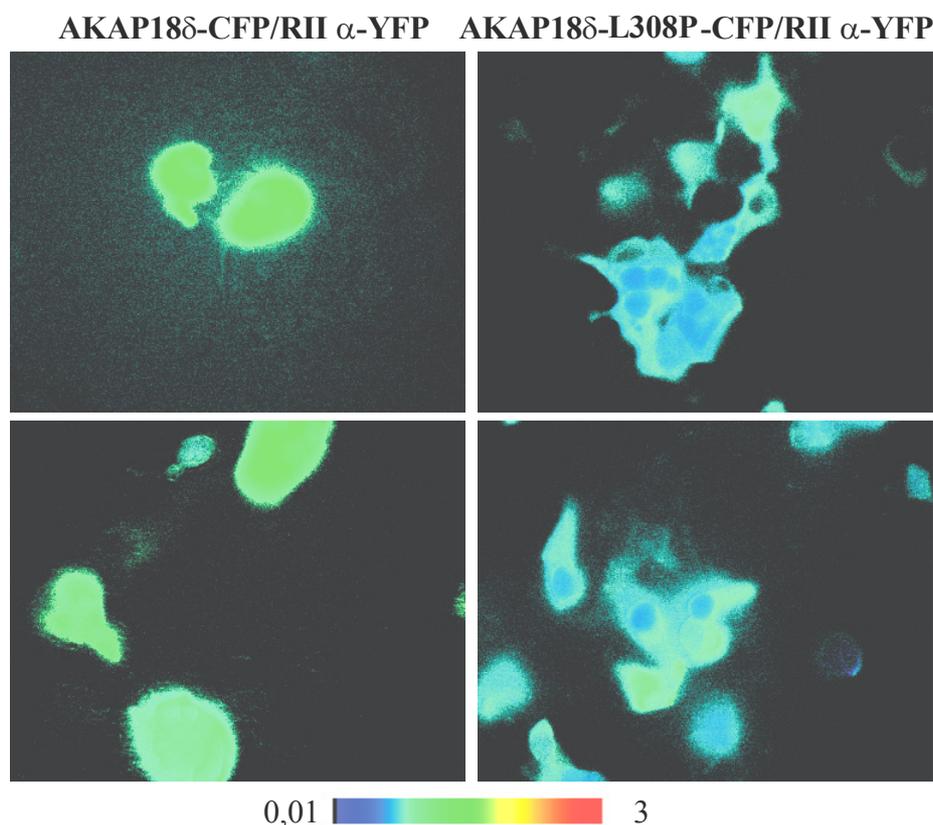


Abb. 14: Die Einführung eines Prolins in die RII-Bindungsdomäne von AKAP18 δ - CFP verringert die FRET-Ratio. HEK293-Zellen wurden mit den für AKAP18 δ -CFP bzw. AKAP18 δ -L308P-CFP und RII α -YFP kodierenden Vektoren transient transfiziert. Die FRET-Messungen erfolgten 24-48 h nach der Transfektion. Die linke Spalte zeigt in Falschfarben an drei Beispielen die FRET-Ratio von AKAP18 δ -CFP und die rechte Spalte an drei Beispielen die FRET-Ratio von AKAP18 δ -L308P-CFP. Der Farbbalken zeigt eine Zuordnung der Farben zu den FRET-Ratio.

Der Austausch des Leuzin 308 in der RII-Bindungsdomäne von AKAP18 δ -CFP durch ein Prolin führt zu einer Verringerung der FRET-Ratio. Die Ergebnisse von fünf unabhängigen FRET-Messungen sind in der Abb. 15 dargestellt.

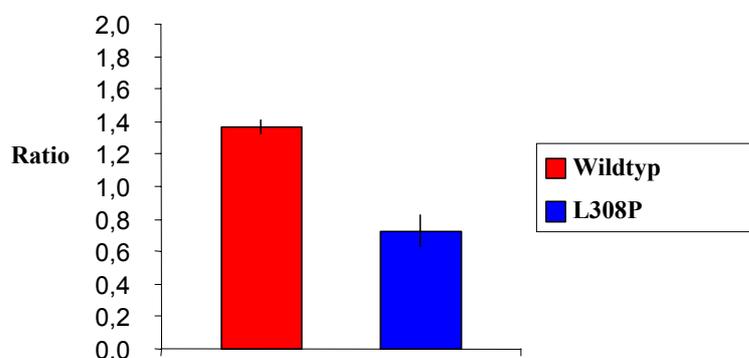


Abb. 15: FRET-Messungen mit den Konstrukten AKAP18 δ -CFP bzw. AKAP18 δ -L308P-CFP und RII α -YFP. HEK293-Zellen wurden mit den für AKAP18 δ -CFP bzw. AKAP18 δ -L308P-CFP und RII α -YFP kodierenden Vektoren transient co-transfiziert. FRET-Messungen erfolgten 24-48 h nach der Transfektion. Die Mittelwerte der FRET-Messungen für AKAP18 δ -CFP (Wildtyp) sind in rot dargestellt die Mittelwerte für AKAP18 δ -L308P-CFP(Prolinmutante) sind in blau dargestellt (n = 5).

Die Einführung des Prolins in der RII-Bindungsdomäne führt zu einer Verringerung der FRET-Ratio auf $0,72 \pm 0,09$. Die FRET-Ratio ist damit um 43% geringer als die FRET-Ratio mit dem wildtypischen AKAP18 δ -CFP ($1,36 \pm 0,02$). Dass die FRET-Ratio nicht den Wert hat, der durch die Inkubation mit dem Peptid S-Ht31 erzielt wird, könnte daran liegen, dass nur ein Prolin in die RII-Bindungsdomäne eingeführt wurde und somit die Bildung einer amphipatischen Helix nicht vollkommen unterdrückt werden kann. Bei den Peptiden Ht31-P und S-Ht31-P sind zwei Proline vorhanden, die eine Ausbildung der amphipatischen Helix verhindern (Carr et al., 1992a).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die RII-Bindungsdomäne von AKAP18 δ die Aminosäure 308 beinhaltet. Durch die FRET-Messungen mit der AKAP18 δ -CFP Mutante kann weiterhin ausgeschlossen werden, dass es eine zweite RII-Bindungsdomäne von AKAP18 δ gibt, die eine ähnliche Affinität besitzt wie die hier beschriebene.

3.4.4 Zwischen AKAP18 δ -CFP und C-YFP kommt es zu keinem FRET

Die Ergebnisse der FRET-Experimente zeigen, dass es zu einer Interaktion zwischen AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kommt. Mit Hilfe von FRET-Experimenten konnten Zacollo und Pozzan (2002) an neonatalen Kardiomyzyten zeigen, wo es in der Zelle durch die Aktivierung des β -adrenergen-Rezeptors zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration und somit zur Aktivierung der PKA kommt. Dabei wurden die regulatorischen Untereinheiten (RII-CFP) und katalytischen Untereinheiten (C-YFP) der PKA bei FRET-Messungen verwendet. Damit konnten die Autoren zeigen, dass die Stimulation des β -adrenergen-Rezeptors zu einem Anstieg cAMP-Konzentration und somit zur Aktivierung der PKA führt.

Mit Hilfe dieser Konstrukte war es möglich zu untersuchen, an welchen subzellulären Bereichen ein Signal zur Aktivierung der PKA führt. Mit dem von Dr. Manuela Zacollo zur Verfügung gestellten C-YFP sollte überprüft werden, ob es zu einem FRET zwischen AKAP18 δ -CFP und C-YFP kommt. Falls es zu einem FRET kommt, wäre es möglich in einem ähnlichen Ansatz wie bei Zacollo und Pozzan (2002) zu überprüfen, bei welchen extrazellulären Signalen die an AKAP18 δ gebundene PKA aktiviert wird.

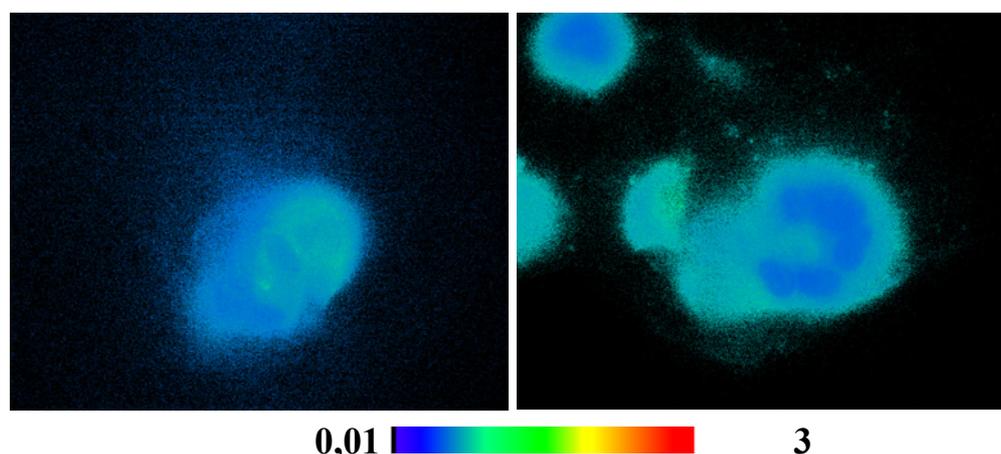


Abb. 16: FRET-Ratio zwischen AKAP18 δ -CFP und C-YFP. HEK293-Zellen wurden mit den für AKAP18 δ -CFP und C-YFP kodierenden Vektoren transient transfiziert. FRET-Messungen wurden 48 h nach der Transfektion durchgeführt. Die Bilder zeigen die FRET-Ratio zwischen AKAP18 δ -CFP und C-YFP in einer Falschfarben Darstellung. Der Balken zeigt eine Zuordnung der Farben zu den Ratiowerten.

Die FRET-Ratio zwischen AKAP18 δ -CFP und C-YFP beträgt $0,65 \pm 0,02$. Die FRET-Ratio ist um ca. 48 % geringer als zwischen AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP, aber leicht höher als die FRET-Ratio zwischen AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP nach der Inkubation mit dem Peptid S-Ht31 (Abb. 11B). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Abstand zwischen AKAP18 δ -CFP und C-YFP zu groß ist um ein FRET hervorzurufen.

3.5 Die Expression von AKAP18 δ ist in der inneren Medulla der Niere stärker als im restlichen Nierengewebe.

Bei einer Northern Blot Untersuchung zur Expression von Klon 9.1 (Edemir, 1999) in der inneren Medulla der Niere und im restlichen Nierengewebe zeigte sich, dass die detektierten Signale in der inneren Medulla stärker sind als im restlichen Nierengewebe (Edemir, 1999). Um dies auch auf der Proteinebene zu überprüfen, wurden cAMP-Agarose-Präzipitate aus der inneren Medulla und dem restlichen Nierengewebe wie beschrieben hergestellt (2.2.5), mit rekombinanten AKAP18 δ als Molekulargewichtsreferenz in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde mit einem anti-RII β -Antikörper und anschließend mit dem Antikörper A1883 inkubiert. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Dr. Volker Henn durchgeführt.

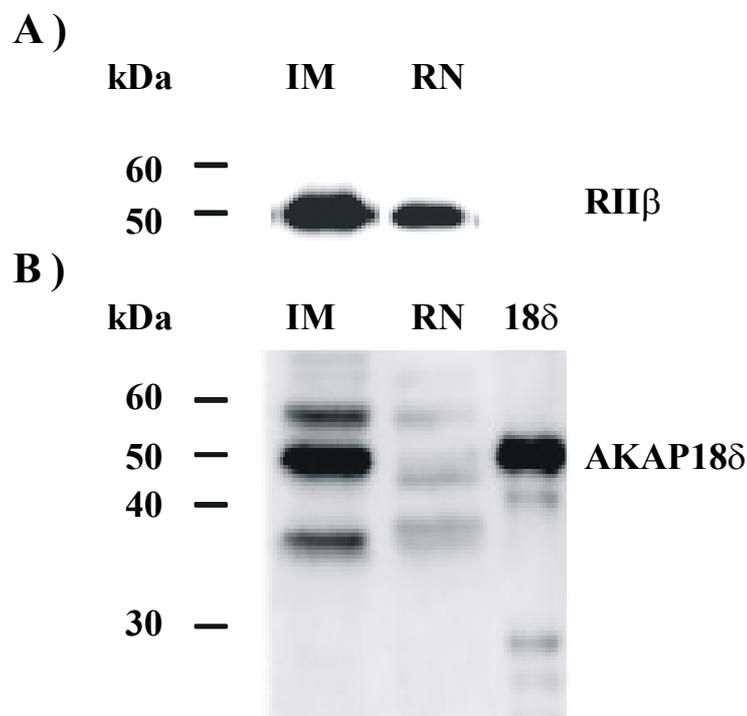


Abb. 17: Vergleich der Expressionsstärke von AKAP18 δ in der inneren Medulla und im restlichen Nierengewebe. Aus der inneren Medulla (IM) und aus restlichen Nierengewebe (RN) wurden cAMP-Agarose-Präzipitate hergestellt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Marker wurde rekombinantes AKAP18 δ eingesetzt (18 δ). A) Die PVDF-Membran wurde als erstes mit einem anti-RII β -Antikörper inkubiert. B) Der anti-RII β -Antikörper wurde entfernt und die PVDF-Membran wurde anschließend mit dem Antikörper A18 δ 3 inkubiert. Die PVDF-Membran wurde nach Inkubation mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (1:2000) in Lumi-Light Lösung inkubiert und die Signale anschließend am Lumi-Imager F1 detektiert.

Die Abb. 17A zeigt, dass die RII β -Untereinheit in beiden cAMP-Agarose-Präzipitaten vorhanden sind. AKAP18 δ kann hauptsächlich in dem cAMP-Agarose-Präzipitat aus der inneren Medulla detektiert werden (Abb. 17B). In dem cAMP-Agarose-Präzipitat aus dem restlichen Nierengewebe ist ein sehr schwaches Signal von AKAP18 δ vorhanden. Dieses Ergebnis unterstützt die Aussagen des Northern Blot und zeigt, dass AKAP18 δ in der Niere hauptsächlich in der inneren Medulla exprimiert wird.

Die vornehmliche Expression von AKAP18 δ in der inneren Medulla deutet auf eine spezifische Funktion in diesem Bereich hin. Auch AQP2 wird vornehmlich in der inneren Medulla exprimiert.

3.6 Die Stimulation der IMCD-Zellen mit AVP verringert die Affinität von AKAP18 δ zur PKA.

In Western-Blot-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die PKA und eventuell AKAP18 δ an AQP2-haltigen Vesikeln lokalisiert ist (Henn et al. 2003). Es stellt sich die Frage, ob und wenn ja welchen Einfluss die Stimulation der IMCD-Zellen auf AKAP18 δ hat. Aus unstimulierten und stimulierten IMCD-Zellen wurden cAMP-Agarose-Präzipitate hergestellt. Diese wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde mit dem anti-AKAP18 δ -Antikörper A18 δ 3 inkubiert. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Volker Henn durchgeführt.

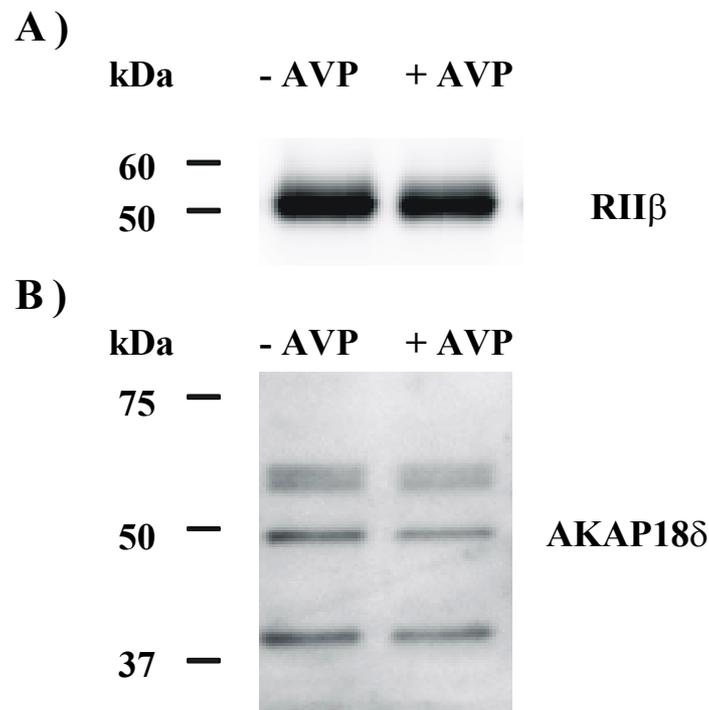


Abb. 18: Die Stimulation der IMCD-Zellen mit AVP verringert die Affinität der Bindung von AKAP18 δ mit der PKA. Aus unstimulierten (- AVP) und stimulierten (+ AVP) IMCD-Zellen wurden cAMP-Agarose-Präzipitate hergestellt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. A) Die PVDF-Membran wurde mit einem anti-RII β -Antikörper inkubiert. B) Der anti-RII β -Antikörper wurde entfernt und die PVDF-Membran wurde mit dem anti-AKAP18 δ -Antikörper A18 δ 3 inkubiert. Die PVDF-Membranen wurden nach Inkubation mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (AKAP18 δ) bzw. anti-Maus-Antikörper (RII β) in Lumi-Light Lösung inkubiert die Signale und anschließend am Lumi-Imager F1 detektiert.

Die densitrometrische Auswertung der Signalstärken ergab, dass in dem cAMP-Agarose-Präzipitat aus stimulierten IMCD-Zellen das Signal von AKAP18 δ schwächer ist als in dem Präzipitat aus unstimulierten IMCD-Zellen. Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt und die Signalstärken wurden jeweils densitrometrisch ausgewertet. Die für AKAP18 δ erhaltenen Werte wurden auf die Signalstärken von RII β und AKAP18 δ normalisiert.

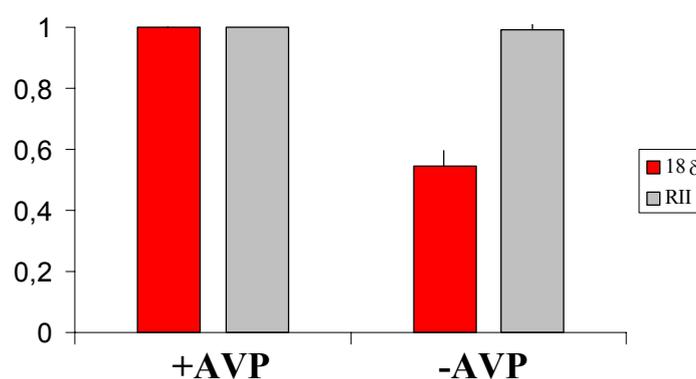


Abb. 19: Densitrometrische Auswertung der Signalstärken von RII β und AKAP18 δ . Die Signalstärken wurden auf die Werte aus unstimulierten IMCD-Zellpräzipitaten normalisiert (1). Die relative Signalstärke aus den cAMP-Agarose-Präzipitaten aus stimulierten IMCD-Zellen (2) bezieht sich auf die normalisierten Werte.

Die Stärke der RII β -Signale bleibt nach AVP-Stimulation annähernd gleichstark (99 ± 4 %). Für AKAP18 δ dagegen verringert sich die Signalstärke um $54,6 \pm 4,7$ %.

Dieses Ergebnis zeigt, dass AVP die AKAP18 δ -PKA Interaktion verringert. Die molekulare Grundlage, die der AVP-vermittelten Verringerung der Interaktion zwischen AKAP18 δ und PKA zu Grunde liegt, kann nur vermutet werden. In der Aminosäuresequenz von AKAP18 δ gibt es eine Reihe von potentiellen Phosphorylierungstellen. AVP könnte eine Phosphorylierung von AKAP18 δ induzieren und diese somit zu einer verringerten Affinität zur PKA führen.