

## 5 Diskussion

### 5.1 AKAP18 $\delta$ , eine neue AKAP18-Isoform

AKAP18 $\delta$  stellt mit 353 Aminosäuren die bisher längste AKAP18-Isoform dar. Trotter et al. (1999) konnten zeigen, dass die anderen AKAP18-Isoformen unterschiedlich lokalisiert sind. Auch bei weiteren AKAP konnte gezeigt werden, dass diese in verschiedenen Isoformen vorkommen und diese unterschiedlich lokalisiert sind (1.2.3.1). AKAP18 $\delta$  könnte unter anderem dazu dienen, die PKA an andere subzelluläre Kompartimente als die anderen AKAP18-Isoformen zu verankern.

Die Ergebnisse des Northern Blot (Abb. 6) und vor allem die Auswertungen für das AKAP18-Gen durch bioinformatische Analysen deuten darauf hin, dass es acht AKAP18-Isoformen geben könnte. Ein Gen würde für mehrere AKAP18-Isoformen kodieren, über die eine große Diversität in der PKA-Lokalisation erreicht werden kann.

Von einigen AKAP ist bekannt, dass diese auch Bindungsstellen für weitere Interaktionspartner oder gar enzymatische Aktivitäten besitzen (1.2.4 und 1.2.5). Die AKAP18-Isoformen könnten Interaktionsstellen für andere Proteine, z. B. Kinasen und Phosphatasen, besitzen und als Multiproteinkomplexe vorkommen. Um zu überprüfen, ob AKAP18 $\delta$  auch andere Proteine bindet und an welche zellulären Kompartimente die PKA über AKAP18 $\delta$  lokalisiert ist, könnte z. B. ein *Yeast Two Hybrid-screening* mit AKAP18 $\delta$  als *bait* durchgeführt werden. Weiterhin könnte ein *Yeast Two Hybrid-screening* mit den anderen AKAP18-Isoformen als *bait* durchgeführt werden, um Unterschiede zwischen den AKAP18-Isoformen aufzeigen zu können. Erste Versuche in dieser Richtung führten zu keinem positiven Ergebnis.

### 5.2 AKAP18 $\delta$ -PKA Interaktion in lebenden Zellen

Die Ergebnisse der cAMP-Agarose-Präzipitation haben die Interaktion von AKAP18 $\delta$  mit den R-Untereinheiten und somit mit der PKA gezeigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass AKAP18 $\delta$  in den IMCD-Zellen als AKAP fungiert.

Mit Hilfe der FRET-Technik konnte die AKAP18 $\delta$ -PKA-Interaktion *in vivo* an lebenden Zellen gezeigt werden. In lebenden Zellen wurde die PKA-AKAP Interaktion mittels FRET erstmals von Ruehr et al. (1999) untersucht. Dabei wurden allerdings nur Fragmente der RII-Bindungsdomäne von Ht31 eingesetzt. Neben AKAP18 $\delta$  wurde FRET bisher für die Interaktion von AKAP79 mit der PKA und mit PP2B gezeigt (Oliveria et al., 2003). AKAP18 $\delta$  und AKAP79 sind die ersten AKAP, an denen die PKA-AKAP Interaktion mit Hilfe der FRET-Technik mit den vollständigen Proteinen dargestellt werden konnte. Der Effekt des Peptides S-Ht31 auf die PKA-AKAP Interaktion an lebenden Zellen konnte durch die FRET-Experimente mit AKAP18 $\delta$  gezeigt werden (Abb. 11A). Das Peptid-S-Ht31 vermindert das FRET zwischen AKAP18 $\delta$  und der PKA. Dies zeigt, dass das FRET zwischen AKAP18 $\delta$  und der PKA durch eine direkte Interaktion entsteht und diese über die RII-Bindungsdomäne vermittelt wird.

In weiteren FRET-Experimenten könnte untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen dem Peptid Ht31 und dem Peptid AKAP-is hinsichtlich des FRET gibt. Für AKAP-is konnte gezeigt werden, dass es an die RII-Untereinheiten mit einer viel höheren Affinität bindet als alle bisher bekannten AKAP (Alto et al., 2003). Es bindet an RII $\alpha$  mit einer  $K_D$  von  $0,45 \pm 0,07$  nM im Vergleich dazu bindet das Peptid Ht31 mit einer  $K_D$  von  $2,2 \pm 0,03$  nM (Alto et al., 2003). Die Verwendung von AKAP-is könnte eventuell zu einer schnelleren und effektiveren Inhibition der PKA-AKAP Interaktion führen.

Die Phosphorylierung der RII-Untereinheiten führt zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität an die RII-Bindungsdomänen von AKAP18 $\alpha$  und mAkap. AKAP18 $\alpha$  bindet RII $\alpha$  mit einer  $K_D$  von  $6,6 \pm 0,8$   $\mu$ M. Die RII $\alpha$  Phosphorylierung führt zu einer 250-fachen Erhöhung der Bindungsaffinität (Zakhary et al., 2000). Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu der verringerten AKAP18 $\delta$ -RII Interaktion in IMCD-Zellen nach AVP-Stimulation. Dies könnte daran liegen, dass Zakhary et al. (2000) die Bindungsaffinitäten nur mit der RII-Bindungsdomäne und nicht mit dem gesamten Protein bestimmt haben.

Die Einführung eines Prolins in die RII-Bindungsdomäne eines AKAP verhindert die Ausbildung einer amphipatischen Helix und somit die PKA-AKAP Interaktion. Mit Hilfe des FRET konnte dieser Effekt mit der Mutante AKAP18 $\delta$ -P-

CFP, mit einer Prolinsubstitution in der RII-Bindungsdomäne, für ein vollständiges AKAP in lebenden Zellen gezeigt werden. Ruehr et al. (1999) konnten mit Fragmenten von Ht31, die die RII-Bindungsdomäne in der wildtypischen Form oder mit Prolinsubstitutionen beinhalteten, zeigen, dass die Einführung von zwei Prolinen in die RII-Bindungsdomäne zu einer relativen Abnahme der FRET-Ratio im Vergleich mit dem Wildtyp von ca. 47% führt. Die Einführung eines Prolins in die RII-Bindungsdomäne von AKAP18 $\delta$  führt ebenfalls zu einer Abnahme von ca. 47% (Abb. 15).

Mittlerweile gibt es unterschiedliche Ansätze, bei der die FRET-Technik genutzt wird um verschiedene intrazelluläre Prozesse in lebenden Zellen zu untersuchen. Zhang et al. (2001) konstruierten ein chimäres Protein, genannt AKAR1, bestehend aus CFP, einem Peptid-Linker mit einer PKA-Phosphorylierungsstelle aus dem Protein 14-3-3 $\tau$  und YFP. Die Aktivierung der PKA führt zu einer Phosphorylierung des Peptid-Linkers in AKAR1. Es kommt zu einer Konformationsänderung in AKAR1, so dass der Abstand zwischen CFP und YFP verkleinert wird und somit zum FRET. Mit diesem Ansatz kann untersucht werden, ob ein Signal zur Aktivierung der PKA führt.

Mit dem oben beschriebenen Ansatz ist es möglich die Aktivierung der PKA durch ein bestimmtes Signal zu untersuchen. In dem folgenden Beispiel kann mit der FRET-Technik gezeigt werden in welchem Kompartiment die PKA über ein bestimmtes Signal aktiviert wird. Zaccolo und Pozzan (2000) konnten an neonatalen Kardiomyozyten, die mit R-CFP und C-YFP transfiziert wurden, dass die Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen-Rezeptor zu einem gezielten und konzentrierten cAMP in einem Umkreis von ca. 1  $\mu$ m um multiple Mikrodomänen und zur Aktivierung der PKA entlang der T-Tubuli führt. Dieses Model kann sicherlich auch auf andere Signalwege übertragen werden, bei der es zu einer Aktivierung der PKA kommt.

Mit dem oben beschriebenen Ansatz kann geklärt werden, in welchem Kompartiment die PKA aktiviert wird. Allerdings ist dabei ungeklärt, über welche AKAP die PKA verankert wird. Bei einem Versuch, bei dem AKAP18 $\delta$ -CFP und C-YFP (diese wurde freundlicherweise von M. Zaccolo zur Verfügung gestellt) eingesetzt wurden, konnte kein bzw. ein sehr geringes FRET beobachtet werden. Der Abstand zwischen AKAP18 $\delta$ -CFP und C-YFP scheint zu groß zu sein. Bei beiden

Proteinen sind CFP und YFP jeweils am C-Terminus lokalisiert. Eine Variation in der Lokalisation von CFP bzw. YFP könnte zu einer Änderung des Abstandes und zu einem FRET führen. Somit könnte dieser Ansatz dazu benutzt werden, zu zeigen, bei welchen Signalen die an AKAP18 $\delta$  lokalisierte PKA aktiviert wird.

### 5.3 Expression von AKAP18 $\delta$ in der Niere

In einem Northern Blot-Experiment konnte gezeigt werden, dass in der inneren Medulla mehr AKAP18 $\delta$  mRNA nachzuweisen ist als im restlichen Nierengewebe (Edemir, 1999). Mit Hilfe der cAMP-Agarose-Präzipitation konnte dies nun auch auf der Proteinebene bestätigt werden (Abb. 19). Die Western Blot-Analysen zeigen, dass AKAP18 $\delta$  in IMCD-Zellen in der HS-Fraktion angereichert ist (Abb. 7B). In dieser Fraktion sind auch die AQP2-haltigen Vesikel lokalisiert (Klussmann et al., 1999). AKAP18 $\delta$  hat mit AQP2 wesentliche Merkmale gemeinsam: Zum einen die stärkere Expression in der inneren Medulla und zum anderen die Anreicherung in der HS-Fraktion. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von AKAP18 $\delta$  bei der AQP2-Translokation hin. Durch immunhistologische Untersuchungen an Schnitten der inneren Medulla konnte gezeigt werden, dass die mit dem Antikörper 1963 (gerichtet gegen Aminosäuren 341-353 von AKAP18 $\delta$ ) detektierten Proteine und AQP2 (Edemir et al., 2000; Bouchalla, Diplomarbeit 2001) die gleiche Verteilung aufweisen. In beiden Fällen wurden die Epithelzellen der Sammelrohre von den Antikörpern detektiert. Das Epitop des Antikörpers 1963 ist in allen AKAP18-Isoformen enthalten. Daher konnte nichts darüber ausgesagt werden, welche AKAP18-Isoform bzw. -Isoformen der Antikörper detektiert hat. Die Experimente wurden mit dem Antikörper A18 $\delta$ 3 in Kooperation mit Roland Schmitt (Charité, Berlin) wiederholt. Dabei wurde die Expression von AKAP18 $\delta$  in verschiedenen Abschnitten des Nephrons untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Nephronabschnitte in denen AKAP18 $\delta$  und AQP2 exprimiert werden, weitestgehend übereinstimmen (Edemir et al., 2002). So beginnt die Expression von AQP2 im kortikalen Sammelrohr und erreicht das Expressionsmaximum in der Papille. Die Expression von AKAP18 $\delta$  beginnt im Sammelrohr in der inneren Medulla und erreicht das Maximum der Expression ebenfalls in der Papille. Dieses zeigt, dass die Expression von AKAP18 $\delta$  in der

inneren Medulla auf das Sammelrohrepithel beschränkt ist. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von AKAP18 $\delta$  bei der AQP2-Translokation. Die AQP2-Expression wird unter anderem über die Osmolalität reguliert (Storm et al. 2002). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für AKAP18 $\delta$  denkbar und könnte das ähnliche Expressionsmuster von AQP2 erklären.

#### **5.4 AVP verringert die Interaktion zwischen AKAP18 $\delta$ und den RII-Untereinheiten in IMCD-Zellen**

Im Vergleich zu cAMP-Agarose-Präzipitaten aus unstimulierten IMCD-Zellen war die AKAP18 $\delta$ -Menge in Präzipitaten aus mit AVP stimulierten IMCD-Zellen um ca. 50% geringer (Abb. 19). Dies deutet daraufhin, dass AVP in den IMCD-Zellen zu einer teilweisen Dissoziation zwischen AKAP18 $\delta$  und den RII-Untereinheiten der PKA führt. Von der PKA sind die Mechanismen, die zur Dissoziation des Holoenzym führen und deren funktionelle Bedeutung bekannt. Diese Daten jedoch deuten auf eine komplette Dissoziation des AKAP18 $\delta$ -PKA-Komplexes hin. Welche physiologische Bedeutung eine komplette Dissoziation hat und welche Mechanismen daran beteiligt sind kann nur vermutet werden.

Eine mögliche Funktion könnte sein, dass die von AKAP18 $\delta$  dissoziierten R-Untereinheiten wieder an die katalytischen Untereinheiten binden. Die PKA wird durch die Bindung der R-Untereinheiten an die katalytischen Untereinheiten inhibiert (Francis et al., 2002). Die R-Untereinheiten binden über Substrat ähnliche Sequenzen (RRXSX) oder Pseudosubstrat Sequenzen (RRXAX) an die katalytische Domäne der PKA und blockieren dadurch die Substratbindung.

Die Phosphorylierung der Aminosäure 54 in RII $\alpha$  durch CDK1 während der Mitose führt zu einer Dissoziation von RII $\alpha$  von AKAP95 (Landsverk et al., 2001). CDK1 wird während der Mitose aktiviert. Während der Kultivierung der IMCD-Zellen kommt es zu keiner Mitose. Somit wird CDK1 nicht aktiviert und kann nicht für die Dissoziation von AKAP18 $\delta$  von den R-Untereinheiten verantwortlich sein. Im Falle einer Mitose bei den IMCD-Zellen müsste die Dissoziation von AKAP18 $\delta$  von den R-Untereinheiten auch in unstimulierten IMCD-Zellen vorkommen, so dass keine Unterschiede mehr zu erkennen wären.

Die Analyse der Aminosäuresequenz von AKAP18 $\delta$  zeigt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die PKA, PKC und die Kaseinkinase 2. Somit könnte die Dissoziation von AKAP18 $\delta$  und R-Untereinheiten durch Phosphorylierung von AKAP18 $\delta$  durch eine der oben genannten Kinasen hervorgerufen werden. Durch AVP wird die PKA aktiviert, so dass eine Phosphorylierung über die PKA am wahrscheinlichsten ist. Eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die PKA befindet sich 25 Aminosäuren N-Terminal von der RII-Bindungsdomäne von AKAP18 $\delta$ . Die Phosphorylierung der RII-Untereinheiten durch CDK1 an den Aminosäuren 54 und 69 führt zur Veränderung der elektrostatischen Eigenschaften in unmittelbarer Nähe der Dimerisations- und AKAP-Bindedomäne. Dadurch wird die Bindung von AKAP inhibiert (Morikis et al., 2002). Eine Phosphorylierung von AKAP18 $\delta$  in unmittelbarer Nähe zu der RII-Bindungsdomäne könnte eine ähnliche elektrostatische Veränderung hervorrufen, die eine Bindung von AKAP18 $\delta$  an die RII-Untereinheiten verhindert. Zur Zeit wird in verschiedenen Ansätzen versucht, eine Phosphorylierung von AKAP18 $\delta$  nach AVP Stimulation der IMCD-Zellen nachzuweisen.

Durch die Verwendung von AKAP18 $\delta$ CFP und RII $\alpha$ -YFP könnte in FRET-Experimenten der Effekt von AVP auf die AKAP18 $\delta$ -R-Interaktion bestätigt werden, und es könnte gezeigt werden in welchen Bereichen die Stimulation der IMCD-Zellen durch AVP zu einer Dissoziation zwischen AKAP18 $\delta$ -CFP und RII $\alpha$ -YFP führt. Leider ist es nicht möglich, die IMCD-Zellen mit herkömmlichen Reagenzien zu transfizieren. Zur Zeit werden weitere Möglichkeiten überprüft IMCD-Zellen über virale Transfektionssysteme zu transfizieren. Auch könnten die FRET-Experimente, ähnlich wie bei Zaccolo und Pozzan (2002), mit den regulatorischen und katalytischen PKA-Untereinheiten als FRET-Konstrukte durchgeführt werden. Damit wäre es möglich, die Kompartimente zu identifizieren an denen die PKA über AVP aktiviert wird.

## **5.5 Die Rolle von AKAP18 $\delta$ bei der Langzeit- und Kurzzeitregulation von AQP2**

Die Dissoziation von AKAP18 $\delta$  von den R-Untereinheiten legt die Vermutung nahe, dass AKAP18 $\delta$  an der AVP-vermittelten Signalkaskade beteiligt

ist. Wie bereits erwähnt, wird über AVP neben der Translokation von AQP2 an die Zellmembran (Kurzzeitregulation) auch die AQP2-Expression reguliert (Langzeitregulation). In beiden Fällen kommt es zu einer Aktivierung der PKA. Somit könnte AKAP18 $\delta$  an der Langzeitregulation und/oder der Kurzzeitregulation beteiligt sein.

An Mäusen, die eine aktivierende Mutation für die cAMP-Phosphodiesterase trugen, konnte gezeigt werden, dass diese keine antidiuretische Antwort nach AVP-Stimulation zeigten. Diese Mäuse hatten eine reduzierte AQP2-Expression (Frokiaer et al., 1999). Daneben war auch die Lokalisation von AQP2 in der Zellmembran verringert. Auf dem AQP2-Gen gibt es im 5'-Bereich ein *cAMP response element* (Uchida et al., 1994). Die Aktivierung der PKA führt zur Phosphorylierung des *cAMP response element binding protein* (CREBP), welches an die DNA bindet und die Transkription des AQP2-Gens erhöht. In der AKAP18 $\delta$  Aminosäuresequenz (Abb. 5) gibt es ein Motiv, welches bei AKAP18 $\gamma$  für die Lokalisation im Zellkern verantwortlich ist (Brown et al. 2003). Somit könnte AKAP18 $\delta$  an der Expression von AQP2 beteiligt sein, indem sie die PKA in der Nähe des CREBP verankert. Ob AKAP18 $\delta$  an der AVP-vermittelten AQP2-Expression beteiligt ist, könnte an AKAP18 $\delta$  *knock-out* Mäusen untersucht werden. Eine weitere Methode wäre ein *knock-down* von AKAP18 $\delta$  mittels *RNA-interference* (RNAi, Tuschl, 2001). Dabei werden doppelsträngige RNA (dsRNA)-19-21-merer oder -Vektoren in Zellen transfiziert. Die dsRNA interagiert spezifisch mit der Ziel-mRNA und führt zur dessen Degradation. Somit ist eine Translation des Zielproteins nicht möglich (*knock-down*).

Die Beteiligung von AKAP18 $\delta$  an der AVP-vermittelten AQP2-Expression ist eine Möglichkeit, aber vieles spricht dafür, dass AKAP18 $\delta$  an der Translokation von AQP2 an die Zellmembran beteiligt ist. In immunisolierten AQP2-haltigen Vesikelfractionen konnte neben der PKA auch mehrere AKAP nachgewiesen werden (Henn et al., 2002). Auch konnte mit dem Antikörper A18 $\delta$ 3 AQP2 präzipitiert werden. Dies deutet daraufhin, dass eine AKAP18-Isoform die PKA an die AQP2-haltigen Vesikel verankert. Ob AKAP18 $\delta$  an den AQP2-haltigen Vesikel lokalisiert ist und, wenn ja, direkt an die Vesikelmembran bindet oder die Bindung über ein anderes Protein vermittelt wird, muss noch untersucht werden. Die Lokalisation von

AKAP18 $\alpha$  an der Zellmembran wird über Myristylierung an Position zwei und Palmitoylierung an den Positionen fünf und sechs vermittelt (Gray et al., 1998; Fraser et al., 1998). Diese Aminosäuren sind nicht in der AKAP18 $\delta$ -Sequenz vorhanden. Dennoch gibt es innerhalb der Aminosäuresequenz von AKAP18 $\delta$  mehrere potentielle Myristylierungstellen, über die AKAP18 $\delta$  an die Membran der AQP2-haltigen Vesikel binden könnte. AKAP18 $\alpha$  besitzt darüber hinaus ein Leuzin-Zipper Motiv, über das es an spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle bindet (Hulme et al., 2002). Dieses Motiv kommt in allen AKAP18-Isoformen vor. Über dieses Motiv könnte AKAP18 $\delta$  Proteine, die sich an AQP2-haltigen Vesikeln befinden, oder direkt an AQP2 binden.

An AQP2-haltigen Vesikel konnten eine Reihe von Proteinen detektiert werden die als potentielle Interaktionspartner von AKAP18 $\delta$  in Betracht kommen. Die Vesikel werden wahrscheinlich über Mikrotubuli zur Zellmembran transportiert (Marples et al., 1998). Dabei wird über die Motorproteine Dynein und Dynactin die Interaktion zwischen den AQP2-haltigen Vesikeln und den Mikrotubuli und deren Transport an die Zellmembran vermittelt (Marples et al., 1995). Die Depolymerisierung des Actin-Filaments führt zu einer Translokation von AQP2 an die Zellemembran, so dass der Transport über die Actin-Filamente ausgeschlossen werden kann (Klussmann et al., 2001b). Außerdem konnte VAMP2 an AQP2-haltigen Vesikeln detektiert werden (Nielsen et al., 1995). VAMP2 gehört zu dem SNAP/SNARE System (Rothmann, 1994). Es wird vermutet, dass über VAMP2 die Fusion der AQP2-haltigen Vesikel mit der Zellmembran vermittelt wird (Gourand et al., 2002). Doch bei keinem dieser Proteine führt AVP zu einer Ko-Translokation an die Zellmembran.

Welche Rolle AKAP18 $\delta$  bei der Translokation spielt, kann nur vermutet werden. So könnte AKAP18 $\delta$  die Phosphorylierung vermitteln, die den Transport an die Zellmembran einleitet oder die für den Einbau von AQP2 in die Zellmembran verantwortlich ist.