

## 1 Einleitung

Extrazelluläre Signale wie z. B. Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren regulieren ein breites Spektrum an zellulären Aktivitäten wie z.B. Ionenkanalaktivität, Sekretion, Zellwachstum und Zellteilung. Die extrazellulären Signale werden über Signaltransduktionssysteme schnell und präzise weitergeleitet, und es kommt zu einer spezifischen biologischen Antwort.

Interaktionen zwischen Proteinen stellen eine Voraussetzung für die spezifische Weiterleitung und Umsetzung von Informationen auf subzellulärer Ebene dar. Viele Proteininteraktionen werden über kurze Peptidmotive, die an modulare Bindungsdomänen binden, vermittelt. So binden z. B. poly-Prolin-Motive an die SH3-Domänen (Koch et al., 1991) und C-Terminale Tripeptid-Motive an PDZ-Domänen (Sheng und Sala, 2001). An der Weiterleitung der Signale sind sogenannte *scaffolding*- oder Gerüstproteine beteiligt. Ein Beispiel ist dabei die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK; Garrington und Johnson, 1999; Kolch, 2000). Zu den Gerüstproteinen der MAPK gehört die KSR (*kinase suppressor of Ras*; Downward, 1995), Grb10 (*growth factor receptor-binding-Protein 10*; Nantel et al., 1998) und MP1 (Mek Partner 1, (Schaeffer et al., 1998). Daneben sind auch für AKAP (s. u.) Funktionen als Gerüstproteine beschrieben.

Die zelluläre Antwort auf zahlreiche Hormone erfolgt durch die Aktivierung von Signalkaskaden, die den Phosphorylierungsstatus einer Vielzahl von Proteinen verändern (Glass und Krebs, 1979; Krebs, 1985). Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein reversibler Prozess, an dem zwei Klassen von Signalmolekülen beteiligt sind: Proteinkinasen, die die Phosphorylierungsreaktion katalysieren und Proteinphosphatasen, die eine Dephosphorylierung katalysieren (Krebs, 1985). Proteinkinasen wie die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) katalysieren die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste in bestimmten Konsensus-Sequenzen. Die Aktivität dieser Enzyme wird durch *second messenger* wie  $\text{Ca}^{2+}$ , Phospholipide, zyklisches Guanosin-monophosphat (cGMP) oder zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert. Viele der Proteinkinasen und *second messenger* treten in verschiedensten Organismen und Zelltypen auf und haben eine große Anzahl an potentiellen Substraten. Daher muß sicher gestellt werden, dass die Signale

spezifisch weitergeleitet werden. Eine Möglichkeit die Spezifität der zellulären Antwort auf ein Signalmolekül zu erhöhen, ist die Kompartimentierung der Enzyme durch die Assoziation mit Ankerproteinen, die sie in der Nähe ihrer Substrate lokalisieren. Ankerproteine, die in der Lage sind mehrere Enzyme gleichzeitig zu verankern werden als Gerüstproteine bezeichnet. Sie bilden so mögliche Punkte für die Integration verschiedener Signalwege und die präzise Weiterleitung eines Signals in der Signalkette (Pawson und Scott, 1997).

### **1.1 Aufbau und Funktion der PKA**

Einer der am besten untersuchten Signalwege ist der, der zur Aktivierung der PKA führt (Johnson et al., 2001; Skalegg und Tasken, 2001; Francis et al., 2002). Das inaktive PKA-Holoenzym ist ein Tetramer bestehend aus einem Dimer aus regulatorischen PKA-Untereinheiten und zwei katalytischen PKA-Untereinheiten. Die regulatorischen PKA-Untereinheiten haben eine N-terminale Dimerisierungs-Domäne, eine Bindungsstelle für die katalytische PKA-Untereinheit und zwei cAMP-Bindungsstellen (Corbin et al., 1978). Bei den Mamalia gibt es drei verschiedene katalytische PKA-Untereinheiten ( $C\alpha$ ,  $C\beta$  und  $C\gamma$ ; Uhler et al., 1986a; Uhler et al., 1986b; Beebe et al., 1990) und vier verschiedene regulatorische PKA-Untereinheiten ( $RI\alpha$ ,  $RI\beta$ ,  $RII\alpha$  und  $RII\beta$ ; Sandberg et al., 1987; Solberg et al., 1991; Scott et al., 1987; Jahnsen et al., 1986). Die regulatorischen PKA-Untereinheiten bilden neben Homodimeren auch Heterodimere aus. Entsprechend dem Vorhandensein von RI oder RII werden TypI-PKA (mit RI) und TypII-PKA (mit RII) unterschieden.

Die beiden vorherrschenden katalytischen Untereinheiten  $C\alpha$  und  $C\beta$  werden in den meisten Geweben exprimiert, hingegen ist die katalytische Untereinheit  $C\gamma$  ausschließlich im Testis zu finden (Beebe et al., 1990). Die regulatorischen Untereinheiten zeigen ebenfalls ein unterschiedliches Expressionsmuster. Während  $RI\alpha$  und  $RII\alpha$  ubiquitär in den Geweben vorkommen, ist die regulatorische Untereinheit  $RI\beta$  in erster Linie im Gehirn zu finden.  $RII\beta$  wird selektiv im Gehirn, im Fettgewebe, im neuroendokrinen Gewebe, in den Granulosazellen des Ovars und in den Sertoli-Zellen des Testis exprimiert (Erlichman et al., 1980; Stein et al., 1987).

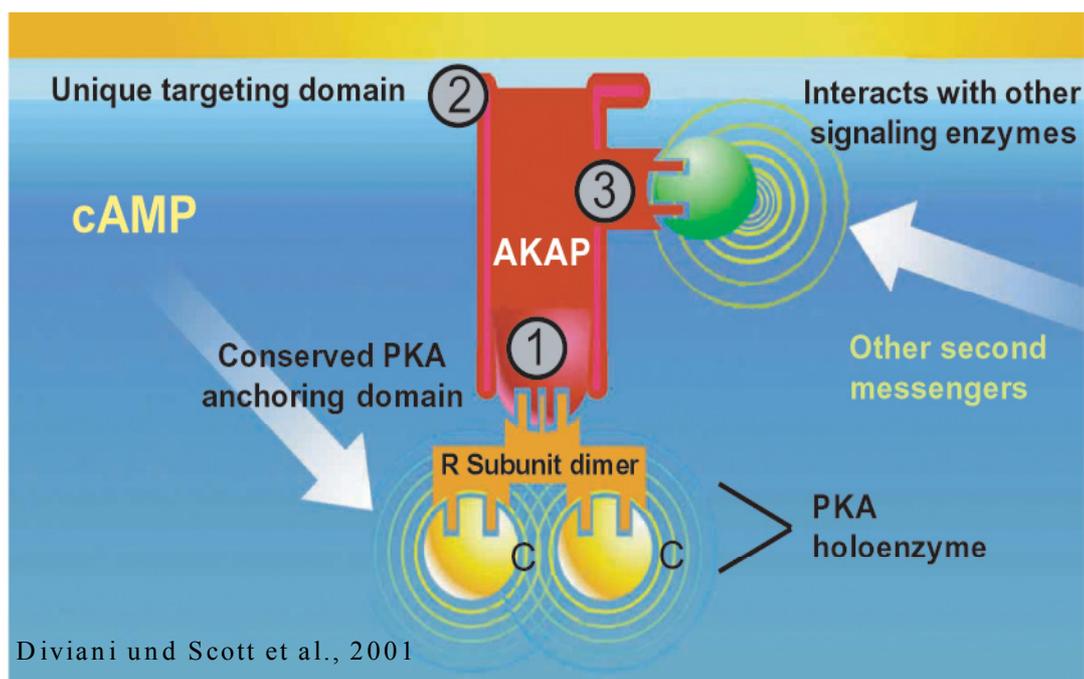
Die katalytischen Untereinheiten unterscheiden sich kaum in Bezug auf die Substratspezifität und die Interaktion mit den regulatorischen Untereinheiten (Taylor et al., 1990; Gamm et al., 1996), die vier regulatorischen Untereinheiten hingegen weisen sowohl hinsichtlich der cAMP-Affinität als auch in der Verteilung innerhalb der Zelle Unterschiede auf (Corbin et al., 1975; Taylor et al., 1990; Taskén et al., 1997). So ist das TypI-PKA-Holoenzym hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert, während in einigen Geweben bis zu 75 % des TypII-PKA-Holoenzym an subzellulären Strukturen verankert sind (Corbin et al., 1975; Scott, 1991).

Die Aktivierung der PKA wird durch die Bindung von je zwei cAMP-Molekülen an die regulatorischen Untereinheiten hervorgerufen (Taylor et al., 1990; Tasken et al., 1997; Skalegg und Tasken, 2001). Die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten führt zu einer Verringerung der Bindungsaffinität zwischen den regulatorischen und den katalytischen Untereinheiten und bewirkt die Dissoziation der katalytischen Untereinheiten vom Dimer aus regulatorischen Untereinheiten. Die freigesetzten katalytischen Untereinheiten können ihre Substrate an den Aminosäuren Serin oder Threonin, die unter anderem in einem der folgenden Motive vorliegen, phosphorylieren: R-R-X-S/T, K-R-X-X-S/T, R-X-X-S/T, X-R-X-S/T, R-K-X-S/T u. a. (Kennelly und Krebs, 1991; Shabb, 2001). Da diese Motive in zahlreichen Proteinen vorhanden sind, sichern Signalterminierungsmechanismen (z. B. Desensibilierung von Rezeptoren; Aktivierung von Phosphodiesterasen) die Reduktion des cAMP-Spiegels und somit auch die Reduktion der PKA-Aktivität (Beavo et al., 1994; Mons et al., 1995). Desweiteren führt die stärkere Expression der regulatorischen gegenüber den katalytischen Untereinheiten zur schnellen Reorganisation des Holoenzym bei Absinken des cAMP-Spiegels (Amieux et al., 1997).

## 1.2 Proteinkinase A-Ankerproteine

Die Assoziation der PKA mit intrazellulären Kompartimenten wird über Proteinkinase A-Ankerproteine (AKAP) vermittelt (Colledge und Scott, 1999; Schillace und Scott, 1999; Smith and Scott, 2002; Felicielo et al., 2001, Alto et al., 2002). Das erste AKAP wurde bei einer RII-Untereinheitenreinigung über eine Affinitätschromatographie mit cAMP-Sepharose mitgereinigt. Dieses assoziierte Protein, auf Nitrozellulosefilter transferiert, behielt die Eigenschaft der RII-Untereinheitenbindung bei (Lohmann et al., 1984). Auf dieser Tatsache beruht die Standardtechnik zur Detektion von AKAP, die RII-*overlay*-Technik. Sie ist ein modifizierter Western Blot, bei dem statt eines primären Antikörpers radioaktiv markierte RII-Untereinheiten als Sonde eingesetzt werden (Carr und Scott, 1992; Hausken et al., 1998). Mit dieser Methode und vermehrt mit der *Yeast Two-Hybrid*-Technik (Cricking und Beyaert, 1999) konnten etwa 50 verschiedene AKAP mit Molekulargewichten zwischen 15 und 450 kDa aus verschiedenen Geweben isoliert werden (Colledge und Scott 1999; Schillace und Scott, 1999; Felicielo et al., 2001 ).

Die meisten AKAP haben zwei charakteristische Eigenschaften. Sie besitzen zum einen eine funktionell konservierte Domäne, welche für die Bindung an die R-Untereinheiten verantwortlich ist (R-Bindungsdomäne bzw. *anchoring* Domäne), und zum anderen eine Domäne bzw. ein Motiv, welche für die Assoziation des PKA-AKAP-Komplexes mit subzellulären Kompartimenten verantwortlich ist (*targeting* Domäne). In Abb. 1 ist schematisch die Funktion der AKAP dargestellt.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Bindung von PKA an AKAP, die Verankerung des Komplexes an subzelluläre Kompartimente und die Bindung weiterer Interaktionspartner.** Die meisten AKAP besitzen zwei Bindungsdomänen. Die für die Bindung der R-Untereinheiten der PKA verantwortliche Domäne wird hier mit *anchoring domain* (1) bezeichnet. Mit *targeting domain* (2) ist die Region bezeichnet, die für die Interaktion mit unterschiedlichen Zellkompartimenten verantwortlich ist. Darüberhinaus gibt es AKAP, die weitere Interaktionspartner wie z. B. weitere Kinasen oder Phosphatasen binden (3). (*R Subunit Dimer* = *Dimer aus RII-Untereinheiten der PKA*; *C* = *katalytische Untereinheit der PKA*)

### 1.2.1 Strukturelle Eigenschaften der PKA-Bindung an AKAP

Die Domäne der RII-Untereinheiten, die für die Interaktion mit AKAP verantwortlich ist, wurde mit Hilfe von Deletionsmutanten und chimären Proteinen bestimmt (Luo et al., 1990). Dabei zeigte sich, dass die RII-Untereinheiten für die Bindung an AKAP als Dimer vorliegen müssen und dass die N-terminalen 30 Aminosäuren der RII-Untereinheiten sowohl für die Dimerisierung als auch für die AKAP Bindung erforderlich sind (Scott et al., 1990; Hausken et al., 1994). Schon die Deletion der Aminosäuren 1-5 verhindert die Bindung an AKAP, hat aber keine Auswirkung auf die Dimerisierung der RII-Untereinheiten (Hausken et al., 1994). Diese Tatsache führte dazu, dass die Aminosäuren Isoleuzin an den Positionen 3 und 5 als essentiell für die Bindung an AKAP identifiziert werden konnten (Hausken et

al., 1994; Hausken et al., 1996). Weitere an AKAP bindende Regionen liegen zwischen den Aminosäuren 11-25 jeder RII-Untereinheit (Li und Rubin, 1995). Der N-terminale Bereich, der R-Untereinheiten der für Dimerisierung und für die AKAP-Bindung (*docking*) verantwortlich ist, wird auch als D/D-Domäne bezeichnet.

Die dreidimensionale Struktur des N-Terminus (Aminosäuren 1-44) der regulatorischen Untereinheit RII $\alpha$  wurden mit Hilfe der NMR-Technik (*nuclear magnetic resonance*) ermittelt (Newlon et al., 1997; Newlon et al., 1999; Newlon et al., 2001). Zwei dieser RII $\alpha$  N-Termini bilden ein dicht gepacktes, antiparalleles, dimeres vier-Helix-Bündel vom X-Typ. Weitere NMR-Untersuchungen von RII $\alpha$ -Dimeren in Assoziation mit der *anchoring*-Domäne von Ht31 bzw. AKAP79 zeigten die dreidimensionale Struktur der Interaktion. Diese Daten weisen auf direkte Helix-Helix-Kontakte der hydrophoben Aminosäuren hin (s.u.), die den Kontakt zwischen AKAP und der PKA vermitteln (Newlon et al., 2001).

Die Affinität, mit der die RII-Untereinheiten an die PKA binden hängt unter anderem davon ab, ob die RII-Untereinheiten phosphoryliert sind. Die RII-Untereinheiten besitzen eine Phosphorylierungsstelle an Position 95 (Serin). Eine Autophosphorylierung führt zu einer bis zu 16 bzw. 250-Fach höheren Bindungsaffinität zu Peptiden mit den RII-Bindungsdomänen von mAKAP bzw. AKAP15/18 (Zakhary et al., 2000).

Die meisten bis heute identifizierten AKAP binden vornehmlich an die RII-Untereinheiten. Es gibt aber auch einige sog. dualspezifische AKAP (D-AKAP). Diese binden neben den RII-Untereinheiten auch RI-Untereinheiten (Huang et al., 1997a; Huang et al., 1997b; Banky et al., 1998; Angelo und Rubin, 1998). Das AKAP<sub>CE</sub> aus *Caenorhabditis elegans* ist das bisher einzige bekannte AKAP welches nur an die RI-Untereinheiten bindet (Angelo und Rubin, 2000). Analysen mit Hilfe der NMR-Technik zeigten, dass auch der N-Terminus der RI $\alpha$ -Untereinheiten (Aminosäuren 1-61) eine vier-Helix-Bündel Formation vom Typ X, ähnlich der Struktur der RII $\alpha$ -Untereinheiten ausbildet (Banky et al., 2000). Ein Unterschied zwischen den RI $\alpha$ - und RII $\alpha$ -Untereinheiten besteht in der Sekundärstruktur im Bereich der neun N-terminalen Aminosäuren. Bei den RI $\alpha$ -Untereinheiten bilden sie eine  $\alpha$ -helikale Struktur, bei den RII $\alpha$ -Untereinheiten eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aus. Dieser strukturelle Unterschied könnte zu Unterschieden in der Bindungsaffinität

zwischen der Bindung von AKAP an RI-Untereinheiten bzw. RII-Untereinheiten führen.

### **1.2.2 Strukturelle Eigenschaften der RII-Bindungsdomäne bei AKAP**

Bei der RII-Bindungsdomäne von AKAP (Abb.1) handelt es sich um eine konservierte Domäne innerhalb dieser Proteinfamilie. Für das AKAP Ht31 konnte als erstes gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine amphipatische Helix handelt (Carr et al., 1992a). Die Notwendigkeit dieser amphipatischen Helix für die Bindung der RII-Untereinheiten konnte anhand von Experimenten gezeigt werden, bei denen die Aminosäure Prolin an verschiedenen Stellen der Aminosäuresequenz eingeführt wurde. Prolin verhindert die Ausbildung einer Helix, wodurch die Fähigkeit verloren geht, die RII-Untereinheiten zu binden (Carr et al. 1992a). Synthetische Peptide mit der Sequenz der amphipatischen Helixregion von Ht31 inhibieren die Bindungen von AKAP an die RII-Untereinheiten (Scott, 1997; Lester und Scott, 1997). Die Kopplung dieser Peptide an Stearatreste (S-Ht31) oder deren Myristylierung macht sie membranpermeabel (Scott, 1997; Lester und Scott, 1997b; Vijayaraghavan et al., 1997). Durch die Inkubation von Zellen mit diesen Peptiden ist es möglich, die PKA-AKAP-Bindung intrazellulär zu inhibieren und die Bedeutung der PKA-Verankerung für bestimmte zelluläre Funktionen zu untersuchen. Das Peptid Ht31 inhibiert sowohl die Bindung der RII-Untereinheiten als auch der RI-Untereinheiten an AKAP. Durch bioinformatische Analysen konnten Peptide, AKAP-in silico (AKAP-is), entwickelt werden, die an die R-Untereinheiten mit einer viel höheren Affinität als jedes bisher beschriebene AKAP binden (Alto et al., 2003). Ausgehend von D-AKAP2 konnten Burns-Hammurro et al. (2003) Peptide synthetisieren, die entweder die Bindung der RII-Untereinheiten oder der RI-Untereinheiten an AKAP inhibieren. Dabei konnte gezeigt werden welche, strukturellen Eigenschaften der RI- bzw. der RII-Bindung zu Grunde liegen: Für die RII-AKAP-Bindung liegt der Interaktion eine hydrophobe Wechselwirkung zu Grunde (Newlon et al., 2001). Für die RI-D-AKAP2-Interaktion ist eine höhere Anzahl an geladenen Aminosäuren in der R-Bindungsdomäne von D-AKAP2 entscheidend (Burns-Hammurro et al., 2003). Ausserdem konnte an trunkierten R-Bindungsdomänen von D-AKAP2 gezeigt werden, dass für die RI-Bindung die minimale Region länger ist als für die RII-Bindung. Substitutionen von Aminosäuren innerhalb der R-Bindungsdomäne von D-AKAP2 führten zur

spezifischen Abnahme der RI- bzw. RII-Bindung. So führt z. B. der Austausch A13L in der R-Bindungsdomäne zu einer Inhibition der RI-Bindung, während der Austausch V21W die Bindung an RII inhibiert (Burns-Hammurro et al., 2003). Somit ist es möglich gezielt die Bindung von AKAP an die TypI- bzw. TypII-PKA zu inhibieren.

### 1.2.3 Lokalisation des PKA-AKAP-Komplexes über die *targeting*-Domäne

Die sogenannte *targeting*-Domäne ist ein weiteres Charakteristikum von AKAP (Abb.1). Sie vermittelt die Bindung des PKA-AKAP-Komplexes an subzelluläre Kompartimente. Diese Region ist weder in ihrer Aminosäuresequenz noch in ihrer Struktur konserviert. Obwohl von vielen AKAP die subzelluläre Lokalisation bekannt ist, konnte nur bei wenigen AKAP aufgeklärt werden, wie diese erreicht wird.

#### 1.2.3.1 Variation der *targeting*-Domäne durch alternatives Spleissen

Als Beispiel, wie durch alternatives Spleissen eine unterschiedliche Lokalisation des PKA-AKAP-Komplexes erreicht wird, soll die AKAP18-Familie dargestellt werden.

Als erstes AKAP aus der AKAP18-Familie wurde AKAP15 aus der Maus identifiziert (Gray et al., 1997). AKAP15 bzw. die an AKAP15 gebundene PKA ist unter anderem an der Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen L-Type- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und an der Regulierung von  $\text{Na}^{2+}$ -Kanälen im Gehirn beteiligt (Gray et al., 1997; Tibbs et al. 1998; Cantrell et al., 2003). Mit AKAP18 konnte das Humanhomologe zu AKAP15 kloniert werden (Fraser et al., 1998). Auch für AKAP18 konnte gezeigt werden, dass es an der Regulierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen beteiligt ist. Außerdem konnte für AKAP18 eine Beteiligung an der GLP-1-vermittelten Insulinsekretion in der pankreatischen Zelllinie RINm5F gezeigt werden (Fraser et al. 1998). Da es sich bei AKAP15 und AKAP18 vermutlich um die gleichen AKAP handelt die aus verschiedenen Spezies stammen, werden sie im weiteren als AKAP18 $\alpha$  bezeichnet.

AKAP18 $\alpha$  ist an der Zellmembran lokalisiert. Für diese Lokalisation sind die zehn N-Terminalen Aminosäuren verantwortlich. Glyzin an der Position zwei ist myristyliert und die Cysteine an den Positionen fünf und sechs palmitoyliert (Gray et

al., 1998; Fraser et al., 1998). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass AKAP18 $\alpha$  über ein Leuzin-Zipper-Motiv direkt an Ca<sup>2+</sup>-Kanäle bindet (Hulme et al., 2002).

Durch alternatives Spleissen werden zwei weitere Mitglieder der AKAP18 Familie generiert. Diese werden als AKAP18 $\beta$  und AKAP18 $\gamma$  bezeichnet (Trotter et al. 1999). Bei AKAP18 $\beta$  kommt es im Vergleich zu AKAP18 $\alpha$  nach der Aminosäure 16 zu einer Insertion von 23 Aminosäuren. Diese führt dazu, dass AKAP18 $\beta$  in polarisierten Zellen an der apikalen Zellmembran lokalisiert wird (Trotter et al., 1999). AKAP18 $\alpha$  und AKAP18 $\beta$  lokalisieren somit PKA an der Plasmamembran. AKAP18 $\gamma$  ist im Unterschied zu AKAP18 $\alpha$  bzw. AKAP18 $\beta$  nicht an der Plasmamembran lokalisiert, sondern zytosolisch (Trotter et al. 1998). Brown et al. (2003) konnten zeigen, dass AKAP18 $\gamma$  in Oozyten und in HEK293-Zellen auch im Zellkern lokalisiert ist. Für die Lokalisation im Zellkern sind die Aminosäuren 52-56 verantwortlich. Die Substitution dieser Aminosäuren verhinderte die Lokalisation von AKAP18 $\gamma$  in den Zellkern (Brown et al. 2003). Brown et al. (2003) zeigten außerdem, dass AKAP18 $\gamma$  neben den RII-Untereinheiten auch die RI-Untereinheiten bindet und dass die RI-Bindungsstelle die RII-Bindungsstelle integriert. Da die RII-Bindungsstelle innerhalb der AKAP18 Familie identisch ist, binden wahrscheinlich auch die anderen AKAP18-Isoformen die RI-Untereinheiten.

Neben den AKAP18-Isoformen gibt es noch weitere AKAP, die durch alternatives Spleissen eine Variation in der PKA-Lokalisation erreichen. So wird über alternatives Spleissen die Familie von S-AKAP84, AKAP121 und die D-AKAP1-Isoformen generiert. Bei gleicher RII-Bindungsdomäne sind Isoformen unterschiedlich in der Zelle lokalisiert. So sind S-AKAP84 und AKAP121 an der äußere Mitochondrienmembran lokalisiert (Lin et al., 1995; Chen et al., 1997). Die D-AKAP1-Isoformen werden an die Mitochondrien oder am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Huang et al., 1997a; 1999). Von AKAP-KL sind sechs Isoformen beschrieben. Auch diese besitzen die gleiche RII-Bindungsdomäne (Dong et al., 1998). Für die einzelnen AKAP-KL-Isoformen wurde die subzelluläre Verteilung bisher nicht bestimmt. Darüber hinaus gibt es auch AKAP-Spleissvarianten, die unterschiedliche RII-Bindungsdomänen besitzen. So kodiert ein Gen sowohl für drei AKAP350-Isoformen, AKAP350 (Schmidt et al., 1999), AKAP450 (Witczak et al., 1999) und CG-NAP (Takahashi et al., 1999) als auch für

das AKAP Yotiao (Lin et al., 1998). Während die AKAP350-Isoformen identische RII-Bindungsdomänen besitzen, hat Yotiao eine andere RII-Bindungsdomäne (Lin et al., 1998; Schmidt et al., 1999; Witczak et al., 1999). AKAP350 ist an Zentrosomen lokalisiert (Schmidt et al., 1999; Witczak et al., 1999), Yotiao hingegen an neuronalen Synapsen (Lin et al., 1998).

Diese Ergebnisse zeigen, wie durch alternatives Spleissen eine Variation in der intrazellulären Lokalisation der PKA erreicht werden kann. Die Kompartimentierung der PKA über AKAP, die durch die *targeting*-Domäne vermittelt wird, stellt, neben der Tatsache, dass verschiedene PKA-Holoenzyme in einer Zelle vorkommen, einen zusätzlichen Faktor für die Spezifität der zellulären Antwort dar.

#### 1.2.4 AKAP integrieren mehrere Signaltransduktionswege

Die ursprüngliche Funktion von AKAP war die oben beschriebene Lokalisation der PKA über die *targeting*-Domäne in der unmittelbaren Nähe ihres Substrates. Die Abb. 1 zeigt, dass einige AKAP nicht nur die PKA an intrazelluläre Kompartimente lokalisieren, sondern auch weitere Signalwege integrieren können. Sie fungieren somit als Gerüstproteine.

AKAP79 (Carr et al., 1992b) ist ein Beispiel für ein AKAP, für das neben den klassischen AKAP Eigenschaften (s. o.) weitere Funktionen als Gerüstprotein beschrieben wurden. AKAP79 bindet neben der PKA auch die Proteinkinase C (PKC) und die Proteinphosphatase 2B (PP2B) (Coghlan et al., 1995; Klauck et al., 1996). An AKAP79 gebunden ist PP2B inaktiv (Kashishian et al., 1998). Die Abspaltung von Phospholipiden aus der Zellmembran führt zu einer Dissoziation des AKAP79/PP2B-Komplexes und zur Aktivierung der PP2B (Faux und Scott, 1999). Durch AKAP79 wird PP2B, ähnlich wie die PKA, in unmittelbarer Nähe ihrer Substrate lokalisiert. Auch die PKC ist an AKAP79 gebunden inaktiv (Klauck et al., 1996;). Ein Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration oder von Phospholipiden führt zu einer Dissoziation des AKAP79/PKC Komplexes und zur Aktivierung der PKC (Dell'Acqua et al., 1998; Faux und Scott, 1999). Die physiologische Relevanz des AKAP79-Komplexes konnte an trächtigen Ratten gezeigt werden. Die Phospholipase C (PLC) wird durch die PKA phosphoryliert und dadurch inhibiert. Dies führt zur Relaxation des Uterus (Dodge et al. 1999). Dabei ist die PKA

wahrscheinlich über AKAP79 an der Plasmamembran lokalisiert. Bei trächtigen Ratten nimmt die an AKAP79 gebundene PKA und mit ihr die PLC-Inhibition ab. Gleichzeitig steigt die an AKAP79 gebundene Konzentration von PP2B stark an (Dodge et al., 1999b). Somit könnte PP2B die PLC dephosphorylieren und dadurch aktivieren.

AKAP79 integriert nicht nur verschiedene Signaltransduktionsenzyme, sondern ist auch Bestandteil eines größeren Signalkomplexes, die verschiedene Effektoren enthalten. So konnte gezeigt werden, dass AKAP79 mit dem  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor ( $\beta$ 2-AR) assoziiert ist (Fraser et al., 2000). Der  $\beta$ 2-AR aktiviert über die G-Proteine  $G_{\alpha s}$  und  $G_{\alpha i}$  die MAP-kinase Signalkaskade (Daaka et al., 1997). Daneben ist AKAP79 auch an der Bildung des Glutamat-Rezeptor-Signalkomplexes beteiligt. Der Rezeptor wird über eine PKA-Phosphorylierung aktiviert. Über Proteine aus der MAGUK-Familie, PSD-95 und SAP97, die an AKAP79 binden ist der AKAP79-PKA-Komplex in unmittelbarer Nähe des Glutamat-Rezeptors lokalisiert (Colledge et al., 2000).

AKAP79 ist nur ein Beispiel für ein AKAP, das neben der klassischen AKAP-Funktion noch weitere Funktionen als Gerüstprotein aufweist. Auch von weiteren AKAP sind Funktionen als Gerüstproteine beschrieben. So konnte für AKAP220 gezeigt werden, dass es neben der PKA auch die Proteinphosphatase-1 (PP1) bindet (Schillace et al., 1999). Gebunden an AKAP220 ist die PP1 inaktiv, was die Vermutung nahe legt, dass AKAP220 eine Rolle bei der PP1-Inaktivierung spielt (Schillace et al., 1999).

Auch das AKAP Yotiao bindet die PP1 (Westphal et al., 1999). Allerdings ist die PP1 an Yotiao gebunden aktiv. Yotiao interagiert mit dem NMDA-Rezeptor (Lin et al., 1998). Dieser wird über die an Yotiao gebundene PKA phosphoryliert und dadurch aktiviert (Westphal et al., 1999). Über die an Yotiao gebundene PP1 wird der NMDA-Rezeptor dephosphoryliert und dadurch inaktiviert.

### 1.2.5 Einige AKAP besitzen eigene enzymatische Eigenschaften

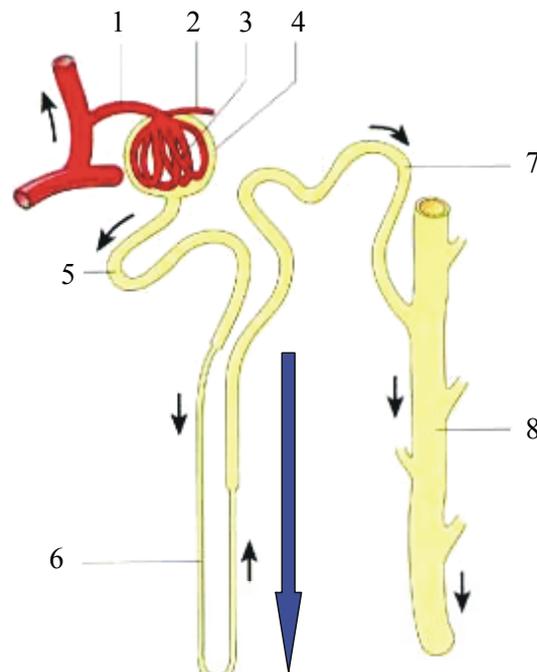
Neben ihrer Funktion als Anker- oder Gerüstproteine verfügen einige AKAP auch über eine enzymatische Aktivität.

Das AKAP Ht31/Rt31 enthält die Sequenzen des Östrogenrezeptor-Kofaktors Brx und des Rho-GEF (*guanidine exange factor*) Proto-Lbc (Klussmann et al. 2001a). Die kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie sind an der Regulation des F-Aktinzytoskeletts sowie an endo- und exozytotischen Prozessen beteiligt (Tapon und Hall, 1997; van Aelst und D'Souza, 1997; Sander und Collard, 1999). Ht31/Rt31 hat neben einer AKAP-Funktion potentiell auch eine Rho-GEF-Funktion. Daneben besitzt Ht31/Rt31 ein potentielles Zinkfinger-Motiv und könnte darüber hinaus eine Rolle bei der Genregulation spielen. Für AKAP-Lbc konnte eine Rho-GEF Aktivität nachgewiesen werden. Die Aminosäuresequenz von Ht31/Rt31 unterscheidet sich nur geringfügig von AKAP-Lbc (Diviani et al., 2001). Daher ist anzunehmen, dass auch Ht31/Rt31 über eine Rho-GEF Aktivität verfügt. Diese beiden AKAP verfügen neben der PKA-Kompartimentierung auch über eine enzymatische Funktion.

Diese AKAP sind Proteine, die PKA- und Rho-Signalwege integrieren können. Daher sind Sie sehr interessant in Hinblick auf die Vasopressin vermittelte Aquaporin-2-Translokation (s. u.). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Translokation von Aquaporin-2 sowohl AKAP als auch Rho beteiligt sind (Klussmann et al., 1999; Klussmann et al., 2001a). AKAP-Lbc und/oder Ht31/Rt31 könnten somit bei der Aquaporin-2-Translokation als AKAP und als Rho-GEF fungieren.

### 1.3 Wasserrückresorption in der Niere

Die Niere spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Wasserhomöostase. Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, an dem sich fünf Hauptabschnitte funktionell und morphologisch unterscheiden lassen.



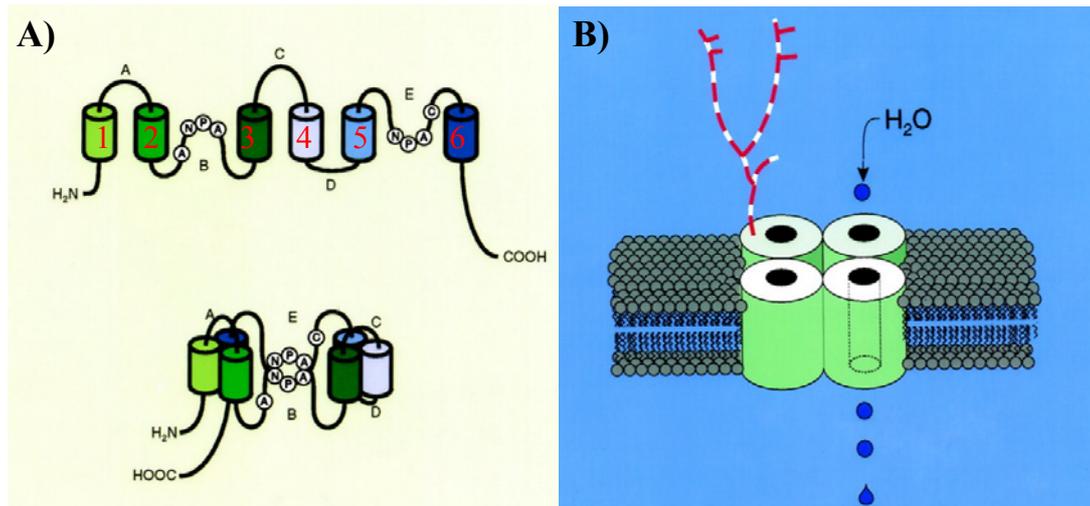
**Abb. 2: Aufbau eines Nephrons.** Über das *Vas afferens* (1) fließt das Blut in das Glomerulum (3), welches sich in der Bowman-Kapsel (4) befindet und dann weiter über das *Vas efferens*. Im Glomerulum wird der Primärharn gebildet. Dieser fließt weiter in Pfeilrichtung durch den proximalen Tubulus (5), die Henle-Schleife (6) und den distalen Tubulus (7) in das Sammelrohr (8) und anschließend in die Harnblase. Zwischen der Henle-Schleife und dem Interstitium wird über das Gegenstromprinzip ein osmotischer Gradient (blauer Pfeil) aufgebaut. Die schwarzen Pfeile zeigen die Fließrichtung des Urins an.

Das Glomerulum befindet sich am Anfang des Nephrons, an das sich der proximale Tubulus, die Henle-Schleife und der distale Tubulus anschließen. Mehrere distale Tubuli münden in das Sammelrohr. Die Bildung des Harns beginnt mit der glomerulären Filtration des Blutes, durch die beim Menschen etwa 180 Liter Primärharn pro Tag erzeugt werden. Ausgeschieden werden schließlich nur 1,5-2 Liter Endharn pro Tag. Innerhalb des Nephron kommt es also zu einer massiven Wasserrückresorption. Treibende Kraft bei der Wasserrückresorption und der

Konzentration des Urins ist ein osmotischer Gradient, der zwischen dem Interstitium und dem Sammelrohr besteht. Die Wasserrückresorption wird durch eine gesteigerte Wasserpermeabilität einzelner Nephronsegmente erleichtert. Diese wiederum wird durch Wasserkanäle (Aquaporine) erreicht, die sich in den apikalen und zum Teil in den basolateralen Zellmembranen bestimmter Nierenepithelzellen befinden. Agre und Mitarbeiter entdeckten den ersten Wasserkanal in der Zellmembran von Hämatozyten (Agre et al., 1993). Bis heute konnten elf Aquaporine identifiziert werden (AQP0-AQP10). Homologe Proteine wurden aber auch bei Amphibien, Insekten, Pflanzen und Bakterien gefunden (King und Agre, 1996, Echevarria und Ilundain, 1998).

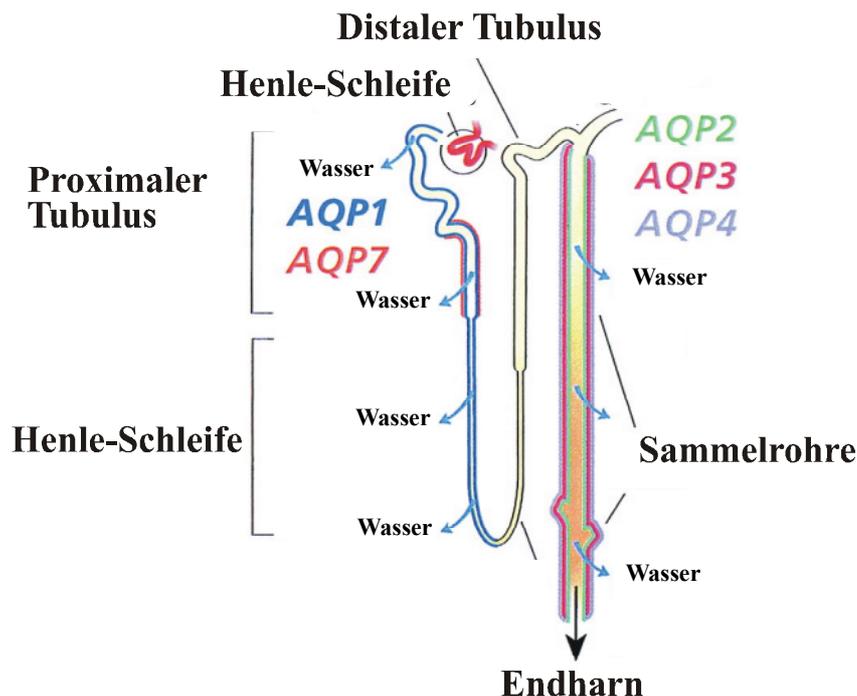
### **1.3.1 Aquaporine**

Die Aquaporine besitzen sechs transmembranäre Domänen, wobei die ersten drei und die letzten drei Domänen *tandem repeats* bilden und in einer Orientierung von 180° zueinander vorliegen. Dadurch ist es möglich, daß die zwei Arginin-Prolin-Alanin (NPA)-Motive, die zwischen den transmembranären Domänen 2 und 3 sowie zwischen den Domänen 5 und 6 vorkommen (siehe Abb. 2), sich nach innen falten und eine Pore bilden (Cheng et al., 1997). Die Aquaporine AQP1, AQP2 und AQP4 sind in der Zellmembran als Tetramere organisiert (Van Hoek et al., 1998; Verbavatz et al., 1993; Yang et al., 1996). In der Abb. 2 ist das postulierte Modell von AQP1 dargestellt (aus Nielsen et al., 2002).



**Abb. 3: Modell von AQP1.** A) Alle Aquaporine, wie hier beispielhaft AQP1, weisen sechs transmembranäre Domänen (1-6) mit zwei Arginin-Prolin-Alanin (NPA)-Motiven auf. Eine wasserdurchlässige Pore wird durch die extrazellulär gelegene hydrophile Schleife B und das erste NPA Motiv, sowie durch die intrazellulär gelegene hydrophile Schleife E und das zweite NPA Motiv gebildet (unten). Die N- ( $\text{NH}_2$ ) und C-Termini ( $\text{COOH}$ ) von AQP2 liegen intrazellulär. B) AQP1 liegt als Tetramer in der Zellmembran vor, wobei an eines der AQP1-Monomere ein Glycanrest angehängt ist (Nielsen et al., 2002).

In der Niere spielen fünf verschiedene Aquaporine, AQP1-4 und AQP7, eine Rolle bei der Wasserrückresorption (Abb. 4). AQP1 wird vornehmlich im proximalen Tubulus und im absteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert (Agre et al., 1993). AQP2 befindet sich in intrazellulären Vesikeln und in der apikalen Zellmembran von Prinzipalzellen des Sammelrohres (Nielsen et al., 1993). AQP3 kommt vornehmlich in der lateralen Membran von Prinzipalzellen des Sammelrohres vor, während AQP4 gleichmäßig in der lateralen und basalen Membran von Prinzipalzellen verteilt ist (Terris et al., 1995). AQP7 scheint wie AQP1 im proximalen Tubulus exprimiert zu sein (Ishibashi et al., 1997). Als weiteres Aquaporin konnte AQP6 in der Niere nachgewiesen werden. AQP6 wurde in den interkalierenden Zellen des Sammelrohres in intrazellulären Vesikeln entdeckt und ist wahrscheinlich nicht an der Wasserreabsorption beteiligt (Yasui et al., 1999).



**Abb. 4: Lokalisation von Aquaporinen im Nephron und im Sammelrohr.** AQP1 (blau) und AQP7 (rot) kommen entlang des proximalen Tubulus vor. AQP1 kommt weiter im absteigenden Ast der Henle-Schleife vor. AQP2 (grün), AQP3 (dunkelrot) und AQP4 (hellblau) sind entlang des Sammelrohres lokalisiert. Die blauen Pfeile kennzeichnen Nephronabschnitte, in denen Wasserrückresorption stattfindet (Adaptiert aus Nielsen et al., 2002).

### 1.3.2 Vasopressin-gesteuerte AQP2-Regulation in der Niere

Über das Hormon Arginin-Vasopressin (antidiuretisches Hormon, AVP) wird die Expression (Langzeitregulation) und die Translokation (Kurzzeitregulation) von AQP2 und somit die Wasserrückresorption in den Prinzipalzellen der renalen Sammelrohre gesteuert. Das im Hypothalamus synthetisierte Vasopressin bindet an den in der basolateralen Zellmembran der Prinzipalzellen lokalisierten Vasopressin-2-Rezeptor (V2R), einen heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Birnbaumer et al., 1992). Die Bindung von Vasopressin aktiviert V2R und führt über die Kopplung an das G-Protein  $G_s$  zur Stimulation der Adenylzyklase. Diese synthetisiert cAMP, das wiederum die PKA aktiviert.

Die AVP-induzierte Langzeit-AQP2-Expression wurde unter anderem an immortalisierten kortikalen Prinzipalzellen aus dem Sammelrohr der Maus untersucht (Hasler et al., 2002). Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen ergaben, dass die Zugabe von physiologischen Konzentrationen von AVP

sowohl die AQP2-mRNA-Transkription, als auch die Proteinexpression induzierten. Die Wirkung von AVP auf die AQP2-Expression folgt einem V2R-abhängigen Signalweg, weil Deamino-8-D-arginine-Vasopressin (dDAVP), ein V2R-Agonist, die selbe Wirkung hatte wie AVP (DiGiovanni et al., 1994). Der V2R-Antagonist SR121463B hatte eine entgegengesetzte Wirkung. Zusätzlich konnte für Forskolin und zyklisches 8-bromo-cAMP (dbcAMP) die gleiche Wirkung auf die AQP2-Expression nachgewiesen werden (Hasler et al., 2002).

Untersuchungen an primär kultivierten Prinzipalzellen aus der inneren Medulla des Sammelrohres der Rattenniere (IMCD-Zellen, Maric et al., 1998) zeigten, dass außer AVP auch die Osmolalität und die Zusammensetzung des extrazellulären Mediums starke Stimulatoren der AQP2-mRNA und Proteinsynthese sind. So zeigte sich, dass in Gegenwart von dbcAMP Natriumchlorid und Sorbitol eine starke Zunahme der AQP2-Expression herbeiführten (Storm et al., 2002). Die Konzentration von Harnstoff hatte keine Wirkung auf die Expression. Dabei scheint es sich um ein AVP-unabhängigen Signalweg zu handeln. Da es im Bereich des AQP2-Promotors eine potentielle Bindungsstelle für das *tonicity-responsive element binding protein* (TonEBP; Miyakawa et al., 1999) gibt, könnte TonEBP an dem AVP-unabhängigen Signalweg beteiligt sein.

Bei der Kurzzeitregulation induziert AVP die Translokation von AQP2 an die Zellmembran. AQP2 liegt in den Prinzipalzellen in intrazellulären Vesikeln vor. Die Aktivierung von V2R und somit der PKA über AVP leitet die Translokation der AQP2-haltigen Vesikel zur apikalen Zellmembran ein (Nielsen et al., 1993). Dabei fusionieren die AQP2-haltigen Vesikel mit der Zellmembran (Lorenz et al., 2003). Durch AQP2 in der Zellmembran kann Wasser aus dem hypotonen Urin des Sammelrohrlumens in die Prinzipalzellen rückresorbiert werden. Das Wasser gelangt anschließend durch die in der basolateralen Zellmembran lokalisierten AQP3 und AQP4 in das Interstitium. Störungen dieses Systems führen zum nephrogenen Diabetes insipidus, einer Krankheit, die sich durch eine massive Ausscheidung von Wasser (bis zu 30 Liter pro Tag) auszeichnet (Oksche und Rosenthal, 1999). Dem angeborenen nephrogenen Diabetes insipidus liegen entweder Mutationen des V2-Rezeptorgens oder des AQP2-Gens zugrunde (Rosenthal et al., 1992, Deen et al., 1994, Oksche und Rosenthal, 1998 und 1999; Rosenthal et al., 1998). Dem angeborenen zentralen Diabetes insipidus liegen Störungen der Hormonsynthese

zugrunde. Es gibt neben diesen angeborenen auch erworbene Formen des zentralen Diabetes insipidus (Oksche und Rosenthal, 1998 und 1999). Die erworbene Form des zentralen Diabetes insipidus können durch neurochirurgische Eingriffe im Bereich der Hypophyse, Hirntraumen, Tumoren der Adenohypophyse oder Metastasen ausgelöst werden. Seltene Ursachen sind chronische Infektionen wie die Sarkoidose und die Histiozytosen (Oksche und Rosenthal, 1998 und 1999).

In gereinigten AQP2-haltigen Vesikeln konnte eine endogene PKA-Aktivität nachgewiesen werden (Lande et al., 1996). Dieser Befund legte die Vermutung nahe, dass die PKA möglicherweise über AKAP an den Vesikeln verankert ist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass unterschiedliche AKAP in IMCD-Zellfraktionen, angereichert mit AQP2-haltigen Vesikeln oder mit Zellmembranen, enthalten sind (Klußmann et al., 1999). AQP2 ist selbst ein Substrat der PKA in diesem System. Es wird an der Aminosäure Serin an der Position 256 phosphoryliert (Katsura et al., 1995; Lande et al., 1996). Maric et al. (1998) etablierten ein Primärzellkulturmodell von Prinzipalzellen aus der inneren Medulla der Rattenniere (IMCD-Zellen), welches es ermöglicht, die AQP2-Translokation zu untersuchen. In diesen Zellen wird die Translokation von AQP2 durch die Präinkubation der Zellen mit dem Peptid S-Ht31 (Punkt 1.2.2), einer membranpermeablen Form des Peptids Ht31, stark inhibiert, die katalytische Aktivität der PKA wurde dagegen nicht beeinflusst (Klußmann et al., 1999). Diese Daten zeigen, dass nicht nur die Aktivität der PKA, sondern auch ihre Verankerung an spezifischen subzellulären Kompartimenten über AKAP für die AQP2-Translokation von entscheidender Bedeutung ist. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in IMCD-Zellen die PKA in einem Komplex mit Proteinphosphatase 2b (PP2B), PKC $\zeta$  und einem bisher unbekanntem AKAP vorkommt (Jo et al., 2001). Es wird vermutet, dass durch ein AKAP die PKA an die AQP2-haltigen Vesikel verankert und dies für die Phosphorylierung von AQP2 erforderlich ist. Die PP2B könnte eine Dephosphorylierung und somit *recycling* von AQP2 bewirken.

Die Bedeutung der AQP2-Phosphorylierung ist noch nicht geklärt. Lande et al. (1996) konnten keine Unterschiede in Bezug auf die Wasserrückresorption zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem AQP2 feststellen. Kuhawara et al. (1995) zeigten jedoch Unterschiede hinsichtlich der Funktion zwischen Wildtyp-AQP2 und der Mutante S256A, bei der die Aminosäure Serin an Position 256 gegen Alanin ausgetauscht wurde. Die Mutante von AQP2 hatte eine um ca. 50% geringere Permeabilität für Wasser als das wildtypische AQP2. Der molekulare Mechanismus der Translokation ist noch weitestgehend unbekannt.

Genauere Kenntnisse über die Signalkaskade, die durch die Aktivierung von V2R in den Prinzipalzellen initiiert wird, könnten dazu beitragen Therapien für Patienten mit nephrogenem Diabetes insipidus zu entwickeln. Dies trifft insbesondere für Patienten mit inaktivierenden Mutationen im V2R-Gen zu. Durch die Kenntnis von weiteren Proteinen innerhalb der Signalkette die zur AQP2-Translokation führt, könnte durch die Aktivierung der Proteine über einen alternativen Signalweg die AQP2-Translokation erreicht werden.

## 1.4 Zielsetzung

Um AKAP zu isolieren, die potentiell an der AQP2-Translokation beteiligt sind, sollte mit der RII-Overlay Technik eine Uni-ZAP XR Rattennieren-cDNA-Expressionsbibliothek (Stratagene, Heidelberg) nach AKAP durchmustert werden. Dabei wurden zwei Klone (Klon 9.1 und Klon 2.1), die für AKAP kodieren, isoliert (Edemir, 1999). Bei beiden Klonen handelte es sich um Partialklone. Klon 9.1 hatte einen offenen Leserahmen von 261 Aminosäuren ohne Stopkodon am 5'-Ende und eine sehr hohe Aminosäuresequenzidentität mit AKAP18 $\alpha$  ( Gray et al., 1997; Frazer et al., 1998), AKAP18 $\beta$  und vor allem AKAP18 $\gamma$  (Trotter et al., 1999). In einem Northern Blot konnte gezeigt werden, dass die Expression von Klon 9.1 in der inneren Medulla stärker ist als im restlichen Nierengewebe (Edemir, 1999).

Zielsetzung war es:

- mittels RACE-PCR die fehlenden 5'-cDNA-Fragmente von Klon 9.1 zu klonieren und mittels Northern Blot die gewebespezifische Expression zu untersuchen
- mit Hilfe eines Antikörpers die Expression des AKAP in den IMCD-Zellen zu untersuchen
- im weiteren die AKAP Funktion mit Hilfe von cAMP-Agarose-Präzipitationen und der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Technik nachzuweisen
- mit Hilfe des spezifischen Antikörpers sollte die Expression in der inneren Medulla und im restlichen Nierengewebe auf der Proteinebene untersucht werden
- in weiteren Experimenten die mögliche Beteiligung des AKAP an der AQP2-Translokation zu überprüfen