

## 4 Diskussion

Die Beteiligung von AKAPs an der Vasopressin-vermittelten Wasserrückresorption in den Sammelrohrzellen der Niere wurde von Klußmann et al. (1999) beschrieben. Bei dem *Screening* einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek zur Identifikation von an diesem Prozeß möglicherweise beteiligten AKAPs wurde der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Partialklon 2.1 isoliert.

### 4.1 Charakterisierung des *inserts* von Klon 2.1 (rHt31)

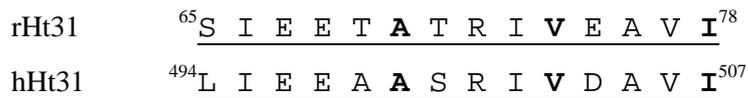
Das *insert* von Klon 2.1 ist 1747 bp lang und kodiert für einen durchgehenden offenen Leserahmen von 582 Aminosäuren. Da in der Sequenz kein Stopkodon vorhanden ist, konnten der Translationsstart und das -ende nicht bestimmt werden. Datenbankrecherchen ergaben Homologien zu dem C-Terminus des humanen AKAP hHt31 (67,7 % Identität, Carr et al. 1992a) und dem N-Terminus des humanen *breast cancer nuclear receptor-binding auxillary protein*, hBrx (78,2 % Identität, Rubino et al. 1998). Das AKAP hHt31 wurde aus einer Schilddrüsen-cDNA-Bibliothek isoliert und ist nur unvollständig charakterisiert. Es handelt sich um einen Partialklon (1015 Aminosäuren) mit ebenfalls unbekanntem Translationsanfang und -ende. Eine potentielle physiologische Funktion ist nicht bekannt. Aufgrund der über lange Sequenzabschnitte nahezu 100 %igen Aminosäureidentität besonders im C-Terminus des *inserts* von Klon 2.1 und hHt31 ist davon auszugehen, daß es sich bei dem vom *insert* von Klon 2.1 kodierten Protein um das Rattenorthologe r(rat)Ht31 zu hHt31 handelt. Die höhere Konservierung im C-terminalen Bereich (78,8 % Identität) läßt auf wichtige strukturelle und funktionelle Determinanten für beide Proteine in dieser Region schließen, die Unterschiede im N-terminalen Bereich (46,8 % Identität) könnten auf zusätzliche und/oder unterschiedliche Funktionen, wie z. B. die Bindung weiterer Proteine hindeuten. Bei den drei wichtigsten AKAPs des Zentralnervensystems von Rind (AKAP75), Ratte (AKAP150) und Mensch (AKAP79) handelt es sich ebenfalls um orthologe Proteine, die in den einzelnen Sequenzabschnitten unterschiedliche Aminosäureidentitäten aufweisen (Rubin 1994, Dodge und Scott 2000). Die Übereinstimmung zwischen AKAP75 und AKAP79 beträgt auf die gesamte Proteinlänge bezogen 76 %, der C-Terminus von

AKAP150 (96 Aminosäuren) weist zu AKAP79 mit 85 % eine wesentlich höhere Identität als der N-terminale Bereich (45 % Identität) auf. Diese Region könnte potentiell andere Funktionen als entsprechende Regionen in AKAP75 und AKAP79 übernehmen.

Eine weitere Homologie von rHt31 besteht wie bereits erwähnt zu hBrx. Die cDNA von hBrx wurde aus der Brustkrebszelllinie ZR-75-1 isoliert. Das kodierte Protein hat eine Länge von 1429 Aminosäuren und ein errechnetes Molekulargewicht von 168 kDa. Dem ersten Methionin gehen vier Stopkodons im Leserahmen voran. Die Detektion von einem ca. 170 kDa großen Protein in verschiedenen Geweben mit einem spezifischen Antikörper läßt darauf schließen, daß die gesamte kodierende Region von hBrx kloniert wurde. Dieses Protein bindet spezifisch an den Estrogenrezeptor und moduliert dessen Aktivität. Eine Assoziation mit den regulatorischen Untereinheiten der PKA ist nicht beschrieben (Rubino et al. 1998). Die hohe Identität von hHt31 (Aminosäuren 632-1015) und hBrx (Aminosäuren 1-384) von 98,7 % deutet darauf hin, daß es sich bei hBrx und hHt31 um Spleißvarianten handelt.

#### 4.2 Kartierung der RII-Bindungsdomäne in rHt31

Mittels Konstruktion von Deletionsmutanten und Analyse selbiger im RII-*overlay* konnten die Aminosäuren 65-78 in rHt31 als RII-Bindungsdomäne identifiziert werden (Pepperle et al. 2000, Klußmann et al. 2001a). In dieser Region stimmen 10 von 14 Aminosäuren mit der RII-Bindungsdomäne des humanen AKAP hHt31 (Aminosäuren 494-507) überein (71,4 % Identität). Die Deletionsmutante, welche auch die angrenzenden Aminosäuren enthält (rHt31 1-313), zeigte dabei im RII-*overlay* das stärkste Signal. Carr et al. (1992a) konnten zeigen, daß insbesondere die Mutation Alanin<sup>512</sup> (entspricht Alanin<sup>83</sup> in rHt31) zu Prolin die RII-Bindung von hHt31 erheblich verringert und postulierten für die außerhalb der amphipatischen Helix liegenden Aminosäuren 508-513 von hHt31 eine stabilisierende Funktion für die allgemeine Struktur dieser Region. Dies könnte auch für die Aminosäuren 79-84 in rHt31 zutreffen und wäre eine mögliche Erklärung für die schwächeren Signale der Deletionsmutanten rHt31 1-80 und 66-313 im Vergleich zu rHt31 1-313 im RII-*overlay*. In Abb. 4.1 ist ein *alignment* der Bindungsdomänen von rHt31 und hHt31 dargestellt.



**Abb. 4.1: Alignment der RII-Bindungsdomänen von rHt31 (Aminosäuren 65-78) und hHt31 (Aminosäuren 494-507, Carr et al. 1992a).** Die Aminosäuren an den Konsensuspositionen 2, 6 und 10 einer amphipatischen Helix, denen Miki und Eddy (1999) eine Funktion als Determinanten für die Isoformspezifität der Bindungsdomäne zuweisen, sind fett hervorgehoben (vgl. 1.1.3).

### 4.3 Eine weitere RII-Bindungsdomäne befindet sich im C-Terminus von rHt31

Für den C-Terminus von rHt31 (Aminosäuren 281-576), der als separates Fusionsprotein exprimiert wurde, konnte im RII-*overlay* eine Bindung der RII-Untereinheiten nachgewiesen werden. Für diese, dem hHt31 homologe Region, ist keine RII-Bindungsdomäne beschrieben. In Zusammenarbeit mit der Abteilung NMR-unterstützte Strukturbiologie des FMP wurden durch ein *alignment* des C-Terminus von rHt31 mit den RII-Bindungsdomänen verschiedener AKAPs vier, potentiell eine amphipatische Helix oder eine der amphipatischen Helix ähnliche Struktur ausbildende Regionen identifiziert (Abb. 4.2, vgl. Abb. 3.8). Im RII-*overlay* konnte für die Mutante, welche die letzten 113 Aminosäuren von rHt31 enthält, eine spezifische Bindung der regulatorischen Untereinheiten nachgewiesen werden. Allerdings wurde eine RII-Bindung dieser Deletionsmutante (rHt31 470-582) im Vergleich zur Deletionsmutante rHt31 1-80 (Abb. 3.7) erst mit einer 10fachen Menge an aufgetragenem Fusionsprotein und nach längerer Exposition der Membran (10 Tage vs. ü. N.) beobachtet. Daher ist die zweite Bindungsdomäne im Bereich der Aminosäuren 470-582 wahrscheinlich weniger affin als die klassische RII/RI-Bindungsdomäne (Aminosäuren 65-78). Im Rahmen dieser Arbeit wurden für beide Interaktionen keine Bindungskonstanten bestimmt. Diesbezügliche Messungen werden aber z. Z. am Biacore in der Abteilung Peptidchemie des FMP durchgeführt.

Weiterhin ist die Existenz einer Bindungsdomäne im Bereich der Aminosäuren 281-470 nicht auszuschließen, da auch die Fusionsproteine der Mutanten rHt31 281-451 und rHt31 281-470 schwache Signale im RII-*overlay* zeigten. Da die potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus nicht genau der amphipatischen Helix der klassischen

RII-Bindungsdomäne von hHt31 entsprechen, ist das Peptid Ht31 möglicherweise für die Inhibition der RII-Bindung ungeeignet. Dies wäre eine Erklärung für die unvollständige Inhibition der Signale nach Präinkubation der RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31.

FSC1/AKAP82 B (RI $\alpha$ )	<sup>335</sup> Y <b>A</b> N Q V <b>A</b> S D M <b>M</b> <sup>344</sup>
hHt31 (RII $\alpha$ > RI $\alpha$ )	<sup>494</sup> L I E E A <b>A</b> S R I <b>V</b> D A V <b>I</b> E Q <sup>509</sup>
rHt31	<sup>65</sup> S I E E T <b>A</b> T R I <b>V</b> E A V <b>I</b> K Q <sup>80</sup>
FSC1/AKAP82 A (dual)	<sup>217</sup> L S F Y <b>V</b> N R L <b>S</b> S L V <b>I</b> Q M <sup>232</sup>
rHt31 (I)	<sup>345</sup> E M E E E E M D S I T E V P A N <sup>360</sup>
rHt31 (II)	<sup>452</sup> S G E E Q R S S L M S L S E E H L E <sup>469</sup>
rHt31 (III)	<sup>471</sup> D Q R Q H H R M F D Q Q T C <sup>484</sup>
rHt31 (IV)	<sup>526</sup> A S A N L T E S I T E E N C N <sup>540</sup>
AKAP75 (RII $\beta$ )	<sup>393</sup> L I E T <b>A</b> S S <b>L</b> <b>V</b> K N A <b>I</b> Q L S I E <sup>410</sup>
AKAP <sub>CE</sub> (R <sub>CE</sub> (RI $\alpha$ ))	<sup>236</sup> L Y Q F <b>A</b> D R <b>F</b> <b>S</b> E L V <b>I</b> S E A L N <sup>253</sup>
S-AKAP84 (RII $\alpha$ > RI $\alpha$ )	<sup>344</sup> I K R A <b>A</b> F Q <b>I</b> <b>I</b> S Q V <b>I</b> S E A I E <sup>361</sup>

**Abb. 4.2: Alignment der vier potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 mit den Bindungsdomänen verschiedener AKAPs.** Die Bindungsdomänen von FSC1/AKAP82 (Miki und Eddy 1998 und 1999), hHt31 (Carr et al. 1992a), AKAP75 (Glanz et al. 1993), AKAP<sub>CE</sub> (Angelo und Rubin 1998 und 1999) und S-AKAP84 (Lin et al. 1995) wurden mit der klassischen Bindungsdomäne und den potentiellen Bindungsdomänen von rHt31 im C-Terminus verglichen. Die potentiellen Bindungsdomänen von rHt31 sind mit römischen Zahlen bezeichnet (vgl. Abb. 3.8). Fett hervorgehoben sind die Aminosäuren an den Konsensuspositionen 2, 6 und 10 einer amphipatischen Helix (Miki und Eddy 1999), vgl. 1.1.3 und Abb. 4.1. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die Isoformspezifität der Bindungsdomänen: FSC1/AKAP82, Bindungsdomäne B: RI $\alpha$ -spezifisch, FSC1/AKAP82, Bindungsdomäne A: dual-spezifische Bindungsdomäne, bindet sowohl RI- als auch RII-Untereinheiten, hHt31 und S-AKAP84: RII $\alpha$ -spezifische Bindungsdomäne, die mit geringerer Affinität auch die RI $\alpha$ -Untereinheiten bindet, AKAP75: RII $\beta$ -spezifisch, AKAP<sub>CE</sub>: spezifische Bindungsdomäne für die regulatorische Untereinheit von *C. elegans* (R<sub>CE</sub>, vergleichbar mit RI $\alpha$ ).

Bis heute sind drei AKAPs mit mehreren Bindungsdomänen für die PKA beschrieben. Das dual-spezifische AKAP FSC1/AKAP82 besitzt eine RI $\alpha$ -spezifische (B) und eine RI $\alpha$ /RII $\alpha$  dual-spezifische Bindungsdomäne (A), die beide Subtypen der regulatorischen Untereinheit mit gleicher Affinität bindet (Miki und Eddy 1998 und 1999). Die Spezifität der zweiten Bindungsdomäne in rHt31 muß noch genauer analysiert werden, da in dieser Arbeit nur die RII-, nicht jedoch die RI-Bindung untersucht wurde. Es könnte sich möglicherweise um eine RI-selektive Bindungsdomäne handeln, die mit

geringerer Affinität auch die RII-Untereinheiten bindet. Das AKAP rHt31 wäre so an der Regulation der spezifischen Wirkungen beider PKA-Subtypen beteiligt.

Das *Drosophila* Protein DAKAP550 enthält zwei Domänen (B1 und B2), welche jeweils beide Isoformen der regulatorischen Untereinheit Typ II (RII $\alpha$ /RII $\beta$ ) binden, wobei die B1-Domäne eine 20fach höhere RII-Bindungsaffinität als die B2-Domäne aufweist. Nach Deletion der B1-Domäne wurde nur noch 5-10 % RII-Bindungsaktivität, vermittelt durch die B2-Domäne, beobachtet (Han et al. 1997). Auch diese Konstellation wäre für rHt31 denkbar. Die physiologische Rolle einer niedrig affinen RII-Bindungsdomäne im C-Terminus müßte allerdings noch untersucht werden. Da die Konzentration der PKA in intakten Zellen wesentlich höher als beim RII-*overlay* ist (einige Studien gehen von mikromolaren intrazellulären Konzentration aus (Burton et al. 1997)), könnte diese Domäne die reversible, zeitweilige Akkumulation der PKA an bestimmten intrazellulären Strukturen vermitteln und so zur Regulation der Enzymaktivität beitragen.

Ebenfalls zwei Bindungsdomänen für die RII $\alpha$ -Untereinheit sind für die Spleißvarianten des AKAPs CG-NAP (Yotiao, AKAP350, AKAP450) beschrieben (Takahashi et al. 1999). Die kürzere, N-terminale Spleißvariante Yotiao exprimiert nur eine Domäne, während die längeren Spleißvarianten beide Bindungsdomänen aufweisen. Diese Situation ist auch für rHt31/hHt31 und seine Spleißvarianten vorstellbar.

#### 4.4 hBrx als potentielles AKAP

Aufgrund der hohen Aminosäureidentität von 85 % im Bereich der Aminosäuren 269-384 von hBrx und Aminosäuren 470-582 von rHt31 wäre es möglich, daß auch hBrx die regulatorischen Untereinheiten der PKA bindet. Allerdings konnte für die Deletionsmutante hBrx 84-378, die alle vier potentiellen Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 enthält, eine RII-Bindung im RII-*overlay* nicht eindeutig nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden die kommerziell erworbenen bovinen RII-Untereinheiten, ein Mix aus RII $\alpha$ - und RII $\beta$ -Untereinheiten (Promega), eingesetzt. Die Bindung der RII-Untereinheiten durch hBrx wurde nicht untersucht. In unserer Arbeitsgruppe konnten inzwischen die RII $\alpha$ - und RII $\beta$ -Untereinheiten als GST-Fusionsproteine exprimiert und im RII-*overlay* statt der kommerziellen regulatorischen Untereinheiten verwendet

werden. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß die hBrx-Mutante 84-378 sowohl die RII $\alpha$ - als auch die RII $\beta$ -Untereinheiten spezifisch bindet. Daher könnte es sich bei hBrx auch um ein AKAP handeln.

Über die physiologische Bedeutung dieser Funktion von hBrx kann im Moment nur spekuliert werden. So könnte hBrx die PKA in der Nähe ihres Substrates, dem Estrogenrezeptor (ER) verankern (Chen et al. 1999). Dieses sowohl zytoplasmatisch als auch im Kern lokalisierte Protein gehört wie andere Steroidhormonrezeptoren zur Familie der Transkriptionsfaktoren. Nach Bindung des Liganden transloziert der Rezeptor in den Kern und moduliert als Homo- oder Heterodimer durch Bindung an EREs (*estrogen-response elements*) in der Promotorregion die Transkription estrogen-sensitiver Gene (Beato 1989, Beato et al. 1995, Tsai und O'Malley 1994). Chen et al. (1999) zeigten, daß die PKA durch Phosphorylierung die Dimerisierung und damit die DNA-Bindung des ER reguliert. Die Dimerisierung des ER wird durch eine liganden-unabhängige Domäne in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) bzw. durch eine liganden-abhängige Domäne in der Liganden-Bindungsdomäne (LBD) vermittelt. In Abwesenheit von Estrogen inhibiert die Phosphorylierung von Serin<sup>236</sup> in der DBD ebenso wie die Überexpression der katalytischen Untereinheit oder eine endogene PKA-Aktivierung die Dimerisierung und damit die DNA-Bindung. Dieser Effekt wird in Anwesenheit des Liganden überwunden, die Dimerbildung wird dann über die ligandenabhängige Domäne in der LBD vermittelt. Das Protein hBrx transloziert mit dem ER in den Kern und verstärkt ligandenabhängig die ER-vermittelte Genaktivierung (Rubino et al. 1998). Handelt es sich bei hBrx um ein AKAP, könnte der aktivierte hBrx-Estrogenrezeptor-Komplex auch eine cAMP-vermittelte Transkription durch Kotransport der PKA oder auch nur der RII-Untereinheiten in den Kern initiieren. Srivastava et al. (1998) konnten zeigen, daß die RII $\beta$ -Untereinheit an sogenannte „*cAMP-responsive elements*“ (CREs) in der Regulatorregion von cAMP-abhängigen Genen bindet und selbst als Transkriptionsfaktor fungiert. Neben der Phosphorylierung und damit Aktivierung des CRE-Bindeproteins (CREB) durch die katalytische Untereinheit der PKA ist dies eine weitere, CREB-unabhängige Möglichkeit der Regulation cAMP-abhängiger Gene in Eukaryonten.

#### 4.5 Untersuchung der mRNA-Expression von rHt31

Northern Blot Analysen von Gesamt-RNA aus der Rattenniere mit einer rHt31-spezifischen cDNA-Sonde ergaben in der inneren Medulla der Niere und im restlichen Nierengewebe ohne innere Medulla zwei Signale von ca. 9,5 kb und ca. 11 kb (Edemir, Diplomarbeit 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden in einem *multiple tissue* Northern Blot mit poly-A<sup>+</sup>-mRNA aus verschiedenen Geweben der Ratte im Herzen ebenfalls zwei mRNAs dieser Größenordnung (ca. 9 kb und größer 9 kb) und im Skelettmuskel eine ca. 9 kb große mRNA detektiert (Abb. 3.3). Da stark unterschiedliche RNA-Mengen aufgetragen wurden, können keine endgültigen Aussagen zur gewebespezifischen Expression einer rHt31-mRNA getroffen werden. Die in diesem Northern Blot erhaltenen Befunde stimmen auch nicht mit den Western Blot-Ergebnissen überein. Mit dem Antikörper 1965, gerichtet gegen ein Epitop in rHt31, hHt31 und hBrx wurden auch in subzellulären Fraktionen von Leber und Hoden der Ratte und in verschiedenen Nierenzelllinien immunreaktive Proteine detektiert (Abb. 3.24 und 3.23, vgl. auch 4.7). Die fehlenden Signale in der Niere beim *multiple tissue* Northern Blot könnten aber auch mit einer selektiven Anreicherung von rHt31-mRNA in der inneren Medulla und einer geringeren Expression in der Gesamtniere erklärt werden.

Nach Abschluß der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurde in unserer Arbeitsgruppe die mRNA-Expression von hHt31 in einem humanen *multiple tissue* Northern Blot (Herz, Hirn, Placenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas, Clontech, Heidelberg) untersucht. In allen Geweben außer im Hirn konnte mit einer hHt31-spezifischen Sonde eine mRNA größer 9,5 kb detektiert werden. Weiterhin wurden im Herzen, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas mehrere kürzere mRNA-Transkripte nachgewiesen, was auf die Existenz einer Vielzahl von Spleißvarianten von hHt31 hindeutet.

#### 4.6 Die subzelluläre Verteilung von rHt31, hHt31 und hBrx in verschiedenen Geweben und Zelllinien

Rubino et al. (1998) konnten mit einem gegen eine C-terminale Sequenz von hBrx gerichteten Antikörper ein ca. 170 kDa großes Protein in verschiedenen Brustkrebszelllinien und im humanen Brustdrüsengewebe sowohl im Zytosol als auch im Kern nachweisen. In dieser Arbeit wurden mit dem gegen rHt31/hHt31 und hBrx gerichteten Antikörper 1965 in allen subzellulären Fraktionen von ZR-75-1- und MCF-7-Zellen bei ca. 170-180 kDa immunreaktive Proteine detektiert. Es könnte sich um hBrx und Spleißvarianten handeln. Im RII-*overlay* wurde für ein ca. 170 kDa großes immunreaktives Protein in der partikulären Fraktion der ZR-75-1-Zellen eine Bindung der RII-Untereinheiten nachgewiesen, in der löslichen Fraktion konnten in dieser Größe keine Signale detektiert werden.

Die im Northern Blot mit der rHt31-cDNA-Sonde detektierten mRNAs in der Größenordnung von 9-11 kb könnten für ca. 330-400 kDa große Proteine kodieren. Ein immunreaktives Protein dieser Größenordnung konnte in den löslichen, partikulären und nukleären Fraktionen der Brustkrebszelllinien ZR-75-1 und MCF-7 mit dem gegen rHt31/hHt31 und hBrx gerichteten Antikörper 1965 nachgewiesen werden. Die Signale waren in den löslichen Fraktionen etwas intensiver als in den partikulären und den Kernfraktionen. Bei diesem Protein könnte es sich um das, möglicherweise in verschiedenen subzellulären Fraktionen vorkommende, AKAP hHt31 handeln. Für hHt31 wurde bisher nur die zytosolische Lokalisation beschrieben (Colledge und Scott 1999). Ebenfalls in der löslichen Zellfraktion nachgewiesen wurden eine Spleißvariante von AKAP18 (AKAP18 $\gamma$ , Trotter et al. 1999) und das DAKAP550 von *Drosophila* (Han et al. 1997). Ein weiteres *Drosophila*-AKAP (DAKAP200) ist sowohl in der zytosolischen Fraktion als auch in der partikulären Zellfraktion vorhanden (Li et al. 1999). Die Stimulation von Granulosazellen mit FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) führt zur Translokation der RII $\alpha$ -Untereinheiten aus der partikulären in die zytosolische Fraktion und zur Expression eines vorwiegend zytosolisch lokalisierten 80 kDa großen AKAPs (Carr et al. 1993).

Das einzige bisher bekannte im Zellkern lokalisierte AKAP ist AKAP95, das neben der Verankerung eines PKA-Signalkomplexes an den Chromosomen während der Mitose an der Regulation der Chromosomenstruktur beteiligt ist (Coghlan et al. 1994, Eide et al. 1998, Collas et al. 1999, Steen et al. 2000). Im Bereich der Aminosäuren 1-76 (1-86)

und 274-322 von hBrx und in den homologen Sequenzbereichen von rHt31 und hHt31 könnten zwei Zinkfinger motive, welche eine DNA-Bindung vermitteln, vorhanden sein. Die Struktur von drei GST-Fusionsproteinen, die diesen Sequenzbereich beinhalten, wird z. Z. mittels NMR untersucht.

Weiterhin wurden mit dem gegen rHt31/hHt31 und hBrx gerichteten Antikörper 1965 in verschiedenen subzellulären Fraktionen von Geweben der Ratte (Hoden, Herz und Leber) sowie einiger Nierenzelllinien und der humanen Brustkrebszelllinien ZR-75-1 und MCF7 spezifisch immunreaktive Proteine in der Größenordnung von ca. 35 bis größer 120 kDa nachgewiesen, deren Identität jedoch unbekannt ist. Es könnte sich sowohl um Spleißvarianten von rHt31/hHt31 und hBrx als auch um proteolytische Spaltprodukte dieser Proteine handeln. Weiterhin können posttranslationale Modifikationen zur Vielfalt der detektierten Banden beitragen.

Das Vorkommen einer Vielzahl von Spleißvarianten ist für verschiedene AKAPs bekannt (Dong et al. 1998, Schmidt et al. 1999, Takahashi et al. 1999, Witczak et al. 1999, Trotter et al. 1999). Alternatives Spleißen führt zur Expression von AKAPs mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation und/oder zu Proteinen, die im gleichen Kompartiment zusätzliche Bindungspartner rekrutieren. So sind für AKAP18 drei Spleißvarianten beschrieben, die an der Plasmamembran verankert bzw. zytosolisch lokalisiert sind (Trotter et al. 1999). Durch Spleißen eines Gens auf Chromosom 7q entstehen verschiedene AKAP350/450-verwandte Proteine (auch als CG-NAP bezeichnet) und das AKAP Yotiao (Lin et al. 1998, Schmidt et al. 1999, Witczak et al. 1999, Takahashi et al. 1999). Während AKAP350/450-Spleißvarianten die PKA an den Zentrosomen und dem Golgi-Apparat verankern (Schmidt et al. 1999, Witczak et al. 1999, Takahashi et al. 1999), ist Yotiao an neuronalen Synapsen mit dem NMDA-Rezeptor assoziiert und an der Modulation der Rezeptoraktivität beteiligt (Lin et al. 1998, Westphal et al. 1999). Ebenfalls durch alternatives Spleißen entstehen S-AKAP84, AKAP121 und D-AKAP1/AKAP149 verwandte Proteine, die eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen (Lin et al. 1995, Trendelenburg et al. 1996, Chen et al. 1997, Huang et al. 1997a,b und 1999). Während S-AKAP84 und AKAP121 an die äußere Mitochondrienmembran binden, sind N-terminale Spleißvarianten von D-AKAP1 an den Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert.

Nicht alle Spleißvarianten müssen für AKAPs kodieren. Es kann sich auch um funktionell unterschiedliche Proteine handeln. Eine Spleißvariante des Drosophila

DAKAP200, das  $\Delta$ DAKAP200, gehört zu den MARCKS-Proteinen (*mammalian myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) und scheint daher andere physiologische Funktionen in der Zelle zu übernehmen. Eine RII-Bindung konnte für dieses Protein nicht nachgewiesen werden (Li et al. 1999).

#### 4.7 hHt31/rHt31, hBrx und Proto-Lbc sind Spleißvarianten eines Gens

Am Ende der experimentellen Arbeiten konnte aufgrund der Ergebnisse des Human-genomprojektes die genomische Struktur von hHt31 analysiert werden. Die Ergebnisse von Datenbankrecherchen ergaben, daß ein Gen auf Chromosom 15 sowohl für hHt31 als auch für hBrx und das *lbc* (*lymphoid blast crisis*)-Proto-Onkogen<sup>1</sup> (Sterpetti et al. 1999), dessen Sequenz dem C-Terminus von hBrx entspricht (Aminosäuren 534-1429), kodiert. Aufgrund der in der Datenbank publizierten Sequenzen verschiedener überlappender EST-Klone (*Expressed Sequence Tags*) und der Sequenz eines 5'-RACE-Produktes konnte eine hypothetische cDNA konstruiert werden, die aus 36 Exons besteht. Alle 36 Exons konnten inzwischen dem genomischen Klon ref/NT\_010343.4 des Chromosoms 15 zugeordnet werden, nur das Startkodon von hBrx (Exon 8a) wird von einem genomischen Klon kodiert, dessen chromosomale Lokalisation noch nicht bestimmt wurde. Durch die Klonierung und anschließende Sequenzierung verschiedener RACE-Produkte wurde die Existenz der konstruierten hypothetischen cDNA von hHt31 bestätigt. So wurde mittels 5'-RACE die bisher bekannte Sequenz von hHt31 am 5'-Ende um 2149 bp verlängert. Der Translationsstart wurde erst nach Abschluß der experimentellen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe ermittelt. Das erste Exon der cDNA von hHt31 kodiert für ein ATG in der Kozak-Konsensussequenz TGGGTCATGAAA. Diese Sequenz entspricht aufgrund des Guaninrestes in Position -3 einem adäquaten Kontext für den Translationsstart in Vertebraten.

Durch 3'-RACE konnte die Sequenz von hHt31 am 3'-Ende um 3138 bp verlängert werden, die den Basenpaaren 1153-4290 von hBrx entsprechen. Das Translationsende der cDNA von hHt31 wird von den Basenpaaren 4288-4290 der hBrx-cDNA kodiert.

---

<sup>1</sup> Bei der cDNA des zuerst beschriebenen Onkoproteins Lbc (*lymphoid blast crisis*, Toksoz und Williams 1994) handelt es sich um eine Chimäre, die aus der Fusion der N-terminalen Sequenz von Proto-Lbc mit einer nicht verwandten C-terminalen Sequenz entstanden ist (Sterpetti et al. 1999).

Dieser Befund stützt zum einen die Hypothese, daß hBrx und Proto-Lbc kürzere Spleißvarianten von hHt31 sind und ist zum anderen besonders interessant, da in diesem Bereich auch die DH-Domäne (*dbl-homology* Domäne) von hBrx (und somit auch von Proto-Lbc und Lbc) liegt. Die DH-Domäne ist das gemeinsame Merkmal der Dbl-Onkoproteine (Toksoz und Williams 1994, Whitehead et al. 1997, Rubino et al. 1998, Sterpetti et al. 1999), die als Nukleotidaustauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors* (GEF)) bezeichnet werden und die die kleinen GTPasen der Rho-Familie aktivieren. Sie beschleunigen die Konversion des Proteins von der inaktiven GDP- in die aktive GTP-Form. Rho-Proteine regulieren das Aktinzytoskelett und über verschiedene Effektoren eine Vielzahl weitere Signalprozesse einschließlich Wachstums- und Differenzierungsvorgängen (Hall 1998). Das Protein hHt31 wäre damit das erste bekannte AKAP mit einer katalytischen Aktivität. Eine Rho-GEF-Aktivität muß in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Ebenso ist die Bindung des AKAP hHt31 an den Estrogenrezeptor experimentell nachzuweisen, da hHt31 auch diese Bindungsdomäne von hBrx enthält.

Die Existenz weiterer Spleißvarianten von hHt31 erscheint wahrscheinlich. Neben der Detektion verschiedener immunreaktiver Proteine in diversen Geweben und Zelllinien mit zwei hHt31-spezifischen Antikörpern, wurden auch bei der Untersuchung der mRNA-Expression von hBrx durch Rubino et al. (1998) und von Proto-Lbc durch Sterpetti et al. (1999) in verschiedenen humanen Geweben und Zellen mRNA-Transkripte unterschiedlicher Größe detektiert. So beschreiben die Autoren unabhängig voneinander neben einer wahrscheinlich für hBrx kodierenden 5,3 kb großen mRNA im Brustdrüsengewebe, Hoden und in der Brustkrebszelllinie ZR-75-1 (Rubino et al. 1998) mRNA-Transkripte in der Größenordnung von 6 kb bis 9,5 kb in Skelettmuskel, Hoden, Herz, Lunge und anderen Geweben sowie in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien. Im Fall von Proto-Lbc sind zudem verschiedene cDNA-Klone isoliert worden, die durch alternatives Spleißen am 5'-Ende entstehen (Sterpetti et al. 1999).

Die genomische Sequenzanalyse der cDNA von hHt31 erlaubt auch die Einordnung des bei dem *Screening* der Rattennieren-cDNA-Bibliothek mit einer rHt31-spezifischen Sonde isolierten Klons 3.1. Die beiden Exons dieses Klons (I und II) entsprechen Exon 8 und 9 der cDNA von hHt31 (vgl. 3.8.1).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es sich bei hHt31 und möglicherweise auch bei hBrx (bei Nachweis einer RI/RII-Bindung) um sogenannte multifunktionelle *Scaffolds* (gerüstbildende Proteine) handelt, welche an der Regulation verschiedener

transmembranärer und intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind (vgl. 1.1.5).