

Funktionelle Analyse des Proteinkinase A
Ankerproteins Ht31

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalis (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von
Christopher T. F. Blum
aus Kaiserslautern

angefertigt am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie

Berlin, den 24. Mai 2005

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt. Ich erkläre, dass ich mich bisher nicht an einer anderen Einrichtung um einen Doktorgrad beworben habe und keinen derartigen Titel besitze.

Berlin, am 24. Mai 2005

Christopher Blum

Gutachter: 1. Prof. Dr. Walter Rosenthal
2. Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Tag der Disputation: 16.12.2005

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Struktur und Funktion der cAMP-abhängigen Protein Kinase A	6
1.1.1 Verankerung der PKA durch ein Dimer der regulatorischen Untereinheiten	9
1.2 Regulation der PKA durch <i>A kinase anchoring proteins</i>	11
1.2.1 Struktur und Charakteristika von AKAP-Proteinen	11
1.2.2 AKAP-Proteine bilden multivalente Signalkomplexe	16
1.2.3 AKAP-Ht31 und seine Speisvarianten	20
1.3 Regulation der Transkription durch Östrogene und Östrogenrezeptor	23
1.3.1 Der Estradiol-Östrogenrezeptor-Signalweg	24
1.4 Rolle der PKA bei der Transkriptionskontrolle im Nukleus	28
1.5 Die Ht31-Spleißvariante Brx reguliert ER-Aktivität	29
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Materialien	30
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Reagenziensätze	30
2.1.2 DNA Klonierungsvektoren	35
2.1.3 PCR- und Sequenzierungs-Primer	35
2.1.4 Bakterienkulturen	38
2.1.5 Flüssigmedien und Agarplatten für <i>E. coli</i>	38
2.1.6 Antibiotika und andere Medienzusätze für Bakterienkulturen	39
2.2 Allgemeine molekularbiologischen Methoden	39
2.2.1 Puffer	39
2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen	40
2.2.3 Plasmid-DNA-Isolierungen	40
2.2.4 DNA-Spaltung mit Hilfe von Restriktionsenzymen	41
2.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
2.2.6 Sequenzierung von DNA	41
2.2.7 Datenbankrecherche	42

	Seite	
2.2.8	Klonierung des N-Terminus von AKAP-Ht31	42
2.2.9	Klonierung von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc Domänen	43
2.3	Zellkultur der humane Zelllinien	43
2.3.1	Transfektion der Brustkrebszelllinien mit pEGFP-Konstrukten	45
2.4	Proteinbiochemische Methoden	45
2.4.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.4.2	Western Blot	47
2.4.3	Immunpräzipitation und cAMP-Agarose Präzipitation	49
2.4.4	Immunfluoreszenz	50
2.4.5	RII- <i>overlay</i>	50
3	Ergebnisse	54
3.1	Charakterisierung der AKAP-Ht31/AKAP-Lbc Antikörper	54
3.2	ER α interagiert mit AKAP-Ht31-Spleißvarianten	59
3.2.1	Präzipitation verschiedener AKAP-Proteine und ER α aus MCF-7-Zellen	59
3.2.2	AKAP-Ht31/AKAP-Lbc oder eine Spleißvariante interagiert mit dem ER α	61
3.2.3	Eine kleine AKAP-Ht31-Spleißvariante interagiert vermutlich mit ER α	64
3.3	Lokalisation von ER α und potentiellen Interaktionspartnern	66
3.3.1	ER α transloziert nach Stimulation aus dem Zytosol in den Nukleus	66
3.3.2	AKAP-Ht31/AKAP-Lbc kolokalisiert mit ER α in ruhenden MCF-7-Zellen, kotransloziert aber nach Stimulation nicht mit ER α in den Kern	68
3.3.3	Eine große AKAP-Ht31-Variante kolokalisiert mit ER α in ruhenden MCF-7-Zellen und kotransloziert mit ER α nach Stimulation in den Kern	70
3.3.4	Eine kleine AKAP-Ht31 Variante kolokalisiert möglicherweise mit ER α in ruhenden MCF-7-Zellen und kotransloziert mit ER α nach Stimulation in den Kern	70
3.4	Klonierung des 5'-Endes von AKAP-Ht31	73
3.5	Klonierung von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc Domänen	75

		Seite
4	Diskussion	77
4.1	Eine AKAP-Ht31-Spleißvariante interagiert mit ER α und kotransloziert nach Stimulation in den Kern	77
4.1.1	Eine AKAP-Ht31-Spleißvariante >220 kDa interagiert mit ER α	78
4.1.2	Eine 80-kDa-AKAP-Ht31-Spleißvariante interagiert möglicherweise mit ER α	81
4.2	Konsequenzen der Translokation eines Komplexes aus AKAP-Ht31-Variante, PKA und ER α	83
4.2.1	Möglicher Einfluss der Translokation eines Komplexes aus ER α , einer AKAP-Ht31-Variante und PKA auf die Gen-Transkription	85
4.3	Klonierung des 5'-Endes und funktioneller Domänen von AKAP-Ht31	87
5	Zusammenfassung	89
	Summary	90
6	Literaturverzeichnis	91
	Danksagungen	108
	Lebenslauf	109