

1 Einleitung

Eukaryotische Zellen werden durch extrazelluläre Signale, wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren reguliert. Diese lenken eine große Vielfalt zellulärer Aktivitäten, wie die Aktivität von Ionenkanälen, neuronale Reizleitung, Zellwachstum und Zelldifferenzierung (Taylor et al., 1990; Scott et al., 1991). Rezeptoren dienen der Vermittlung dieser Signale und geben sie an intrazelluläre Transduktionssysteme weiter. Diese Signaltransduktionskaskaden leiten die Information schnell und präzise weiter und können zu einer Verstärkung spezifischer biologischer Antworten führen. Da Zellen oft mehreren Botenstoffen gleichzeitig ausgesetzt sind, ist es von größter Bedeutung die Genauigkeit dieser Netzwerke aufrecht zu erhalten, um die entsprechenden physiologischen Antworten auszulösen. Ein Hauptmechanismus zur Steuerung der intrazellulären Signaltransduktion ist der reversible Prozess der Phosphorylierung, der den Phosphorylierungsstatus einer Vielzahl von Proteinen verändert und somit die Aktivierung und Deaktivierung von Komponenten eines Signalweges reguliert (Glass und Krebs, 1982; Krebs, 1985). Phosphorylierungen regulieren enzymatische Aktivitäten durch allosterische Konformationsänderungen, oder durch direktes Öffnen oder Schließen des katalytischen Zentrums (Johnson und Barford, 1990; Barford et al., 1991; Johnson und O'Reilly, 1996). Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen benötigen zwei unterschiedliche Klassen von Enzymen: (2) Kinasen wie Protein Kinase A, Protein Kinase C, Protein Kinase G, Rezeptor-Kinasen und *mitogen activated protein kinases* (MAPK) katalysieren die Phosphorylierungsreaktion (Krebs, 1985). Die Aktivität dieser Enzyme wird durch *second messenger* wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklisches Guanosin-monophosphat (cGMP), Phospholipide oder Ca^{2+} reguliert. (1) Die Familie der Protein Phosphatasen katalysieren die Dephosphorylierungsreaktion (Krebs, 1985).

1.1 Struktur und Funktion der cAMP-abhängigen Protein Kinase A

Der cAMP-Signalweg ist eine sehr gut charakterisierte Signaltransduktionskaskade. Der *second messenger* cAMP vermittelt neben der Steuerung von *cyclic-nucleotide gated* (CNG) Ionenkanälen (Kaupp und Seifert, 2002) und *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs; de Rooji et al., 2000) die meisten seiner zellulären Effekte über die Aktivierung der cAMP-abhängigen Protein Kinase A (PKA). PKA ist eine Serin/Threonin Kinase, bestehend aus zwei katalytischen (C) Untereinheiten, die von einem Dimer aus regulatorischen (R) Untereinheiten in einem inaktiven Stadium gehalten werden. Dieses Holoenzym liegt solange

im inaktiven Zustand vor, wie regulatorische und katalytische Untereinheiten miteinander assoziiert sind (Corbin et al., 1973; Corbin et al., 1977; Potter et al., 1978; Potter et al., 1979; Beebe et al., 1986).

Das PKA-Holoenzym kann aus verschiedenen Isoformen seiner Untereinheiten aufgebaut werden: vier katalytische Untereinheiten, $C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$ und PRKX, und vier regulatorische, $RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$ und $RII\beta$, sind bisher identifiziert worden (Jahnsen et al., 1986; Scott et al., 1987; Chrivia et al., 1988; Solberg et al., 1991; Skalhegg und Tasken, 1994; Zimmermann et al., 1999). Im Gegensatz zu $C\alpha$ und $C\beta$, die in den meisten Geweben zu finden sind, wird $C\gamma$ ausschließlich in den Testes exprimiert (Beebe et al., 1990). Die katalytischen Untereinheiten $C\alpha$, $C\beta$ und $C\gamma$ weisen nur sehr geringe Unterschiede in Substratspezifität und Interaktion mit den regulatorischen Untereinheiten auf (Wen et al., 1995a). PRKX (die humane X-Chromosom-kodierte Protein Kinase X) wurde als cAMP-abhängige Kinase beschrieben, die unter physiologischen Bedingungen ein katalytisch inaktives Holoenzym mit RI -, aber nicht mit RII -Untereinheiten bildet (Zimmermann et al., 1999).

Die regulatorische Untereinheit ist ein modular aufgebautes Polypeptid. Es enthält eine N-terminale Dimerisierungsdomäne, eine Pseudosubstrat-/Autophosphorylierungsstelle, die als Kontakt für die katalytischen Untereinheiten fungiert, und zwei Bindungsstellen für cAMP. Die regulatorischen Untereinheiten weisen ein gewebespezifisches Expressionsmuster auf: $RI\alpha$ und $RII\alpha$ werden ubiquitär in den Geweben exprimiert. $RI\beta$ und $RII\beta$ sind hauptsächlich im Gehirn zu finden; $RII\beta$ wird zusätzlich auch im neuroendokrinen Gewebe, Fettgewebe, in den Ovarien und in den Testes exprimiert (Edelman et al., 1987; Stein et al., 1987; Taylor et al., 1992). $RI\alpha$ kommt zusätzlich in den Spleißvarianten $RI\alpha 1a$ und $RI\alpha 1b$ vor (Solberg et al., 1997).

Es existieren zwei Formen des heterotetramerschen PKA Holoenzym, die nach der Isoform der regulatorischen Untereinheiten benannt werden: Typ I PKA ($RI\alpha$ - und $RI\beta$ -Dimere) und Typ II PKA ($RII\alpha$ - und $RII\beta$ -Dimere). Zusätzlich zu ihrer charakteristischen Expressionsmuster (s.o.) unterscheiden sich PKA Typ I und II in ihrer Regulation und biochemischen Eigenschaften. Typ I PKA ist *in vivo* sensitiver gegenüber cAMP als Typ II und kommt hauptsächlich zytoplasmatisch vor (Corbin et al., 1973; Corbin et al., 1975; Taylor et al., 1992). Im Gegensatz dazu assoziieren 75 % der Typ II PKA mit spezifischen zellulären Strukturen und Organellen (Taylor et al., 1990; Scott et al., 1991). Die Bindungsaffinität von $RII\beta$ zu cAMP ist geringer als die von $RII\alpha$ und viel geringer als die

von RI α (Edelman et al., 1987; Taylor et al., 1992). Die Unterschiede zwischen den zwei PKA Typen bezüglich der cAMP-Affinität implizieren, dass Typ I und Typ II PKA cAMP-Signale empfangen und weiterleiten, die sich in Signaldauer und Intensität unterscheiden. Typ I PKA wird durch schwache, zeitlich begrenzte cAMP-Signale, Typ II PKA durch starke, eher andauernde cAMP-Signale aktiviert (Felicciello et al., 2001). Zusammen mit der divergenten subzellulären Lokalisation der PKA-Typen wird dies als Beitrag zur Spezifizierung physiologischer Antworten gewertet. Eine gesteigerte Diversität und vermutlich auch Spezifität entsteht zudem durch die Fähigkeit der R-Untereinheiten sowohl Homo- als auch Heterodimerisierungen einzugehen (Tasken und Aandahl, 2004).

Ein Signaltransduktionsweg mit PKA als Schlüsselenzym beginnt mit der Bindung eines extrazellulären Liganden an seinen G Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) an der Zellmembran. Die Bindung eines Agonisten führt zu einer Konformationsänderung des GPCR. Dies hat die Aktivierung des heterotrimerischen G-Protein G_s zur Folge (Pierce et al., 2000). G_s besteht aus einer α -Untereinheit und einem Dimer aus $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Aktiviertes G α_s trennt sich von den $\beta\gamma$ -Untereinheiten und aktiviert die Adenylyl-Zyklase, die wiederum den *second messenger* cAMP aus Adenosin-Triphosphat generiert. Zyklisches AMP kann mit einer Konstante von $780 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ in der Zelle frei diffundieren und hat eine Lebensdauer von bis zu 60 Sekunden (Zaccolo et al., 2000; Zaccolo et al., 2002). Eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des intrazellulären cAMP-Metabolismus fällt den Phosphodiesterasen (PDEs) zu, da diese für die Hydrolyse von zyklischen Nukleotiden verantwortlich sind (Jin et al., 1999; Dodge et al., 2001; Tasken et al., 2001; Tasken und Aandahl, 2004). Die Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Adenylyl-Zyklase- und Phosphodiesterase-Aktivität erfüllt somit eine wichtige Funktion in der Kontrolle der PKA-Signaltransduktion (Tang und Gilman, 1992; Beavo et al., 1994; Tasken und Aandahl, 2004).

Die Aktivierung der PKA erfolgt über cAMP, welches kooperativ an zwei Stellen, genannt A und B, der regulatorischen Untereinheiten bindet (Corbin et al., 1973; Kopperud et al., 2002). Die Bindung von zwei Molekülen cAMP an jede regulatorische Untereinheit aktiviert PKA, indem die Bindungsaffinität zwischen den regulatorischen und den katalytischen Untereinheiten verringert wird (Taylor et al., 1990; Wang et al., 1991; Gibbs et al., 1992; Tasken et al., 1997; Kopperud et al., 2002). Das Holoenzym dissoziiert und die freigesetzten katalytischen Untereinheiten phosphorylieren Substrate in ihrer Umgebung an den Aminosäuren Serin oder Threonin. Dies kann an zwei unterschiedlichen Aminosäuren-

Motiven eines Substrates geschehen: Arg-Arg-Xaa-Ser/Thr oder Lys-Arg-Xaa-Xaa-Ser/Thr (Kennelly und Krebs, 1991). Schätzungsweise 150 physiologisch relevante Substrate der PKA wurden bisher identifiziert (Shabb, 2001).

Die cAMP-abhängige Signaltransduktion wird terminiert, indem der cAMP-Spiegel und somit auch die PKA-Aktivität durch die Desensibilisierung von Rezeptoren und die Aktivierung von Phosphodiesterasen reduziert werden (Beavo et al., 1994; Mons und Cooper, 1995). Obwohl nur die Verfügbarkeit von cAMP Voraussetzung für die Aktivierung der PKA ist, sind zusätzliche Faktoren dafür verantwortlich, dass die Kinase wieder in ihren inaktiven Zustand zurückkehrt. Die regulatorischen Untereinheiten werden im Überschuss gegenüber den katalytischen Untereinheiten exprimiert. Dies hat eine schnelle Formierung des PKA-Holoenzym zur Folge, wenn der cAMP-Spiegels wieder seinen basalen Wert erreicht hat (Amieux et al., 1997). Zusätzlich fungiert höchst wahrscheinlich der ubiquitäre hitzestabile Protein Kinase Inhibitor (PKI) als Absicherung, indem er freie katalytische Untereinheiten einfängt und auch deren Export aus dem Nukleus vermittelt (Wen et al., 1995).

Fundamentale zelluläre Prozesse wie z.B. Metabolismus, Transkription von Genen, Leitfähigkeit von Ionenkanälen, synaptische Transmission, Zellwachstum, Zellteilung und Polymerisierung/Depolymerisierung des Aktin-Zytoskelett werden durch PKA-katalysierte Phosphorylierung moduliert (Taylor et al., 1992; Scott et al., 1991; Francis und Corbin, 1994). Die breite Substratspezifität der PKA wirft die fundamentale Frage auf, wie dieses Enzym präzise seine Effektormoleküle selektiert und eine spezifische Antwort auf einen bestimmten Reiz auslöst. Eine prinzipielle Strategie um diese Spezifizierung zu erreichen ist die Kompartimentalisierung von Signalamyzen (Pawson und Saxton, 1999; Tasken und Aandahl, 2004; Wong und Scott, 2004).

1.1.1 Verankerung der PKA durch ein Dimer der regulatorischen Untereinheiten

Eine Möglichkeit die Substratspezifität der PKA zu vermitteln, ist die Lokalisation der PKA in der Nähe ihrer Substrate. Die Lokalisation von Typ II PKA innerhalb der Zelle wird durch die Assoziation der regulatorischen Untereinheiten mit Gerüst-Proteinen, den *A kinase anchoring proteins* (AKAPs; im weiteren AKAP-Proteine) vermittelt. AKAP-Proteine sind eine Familie von funktionell verwandten Proteinen, die anhand ihrer Fähigkeit definiert werden mit dem PKA-Holoenzym intrazellulär zu assoziieren und dessen katalytische

Aktivität kopräzipitieren (Colledge und Scott, 1999; Ndubuka et al., 1993; Glantz et al., 1994; Tasken und Aandahl, 2004; Wong und Scott, 2004).

Mittels Austausch einzelner Aminosäuren durch Mutagenese, chimären Proteinen, biochemischen Analysen und *solid-phase binding assays* wurde gezeigt, dass zumindest die ersten 30 Aminosäuren der PKA RII-Untereinheiten an der Verankerung an AKAP-Proteine beteiligt sind (Luo et al., 1990; Hausken et al., 1994; Hausken et al., 1996; Lin et al., 1995). Diese Region unterstützt zusätzlich die Dimerisierung der RII-Untereinheiten, die eine Voraussetzung für die Bindung an AKAP-Proteine ist (Scott et al., 1990; Hausken und Scott, 1996). Deletion der N-terminalen Aminosäuren 1 bis 5 verhindern die Verankerung der RII-Untereinheiten an AKAP-Proteinen, hat allerdings keinen Einfluss auf die Dimerisierung (Coghlan et al., 1995; Hausken und Scott, 1996). Dies wiederum führte schließlich zu der Identifizierung von Isoleucin an den Positionen 3 und 5 als essentielle Determinanten für die Assoziation mit AKAP-Proteinen (Hausken et al., 1994; Hausken et al., 1996). Zusätzliche Determinanten für die Verankerung mit AKAP-Proteinen wurden zwischen den Aminosäuren 11 und 25 der RII-Untereinheiten ermittelt (Lin et al., 1995). Durch *nuclear magnetic resonance* (NMR-) Studien wurde herausgefunden, dass die N-terminalen Aminosäuren 1 bis 44 des PKA-RII Dimers für eine Interaktion mit der PKA-Bindungsdomäne der AKAP-Proteine (siehe 1.2.1) verantwortlich sind, und dass die 23 N-terminalen Aminosäuren eine breite hydrophobe Oberfläche ausbilden, die für die Interaktion essentiell ist (Hausken et al., 1994; Hausken et al., 1996; Newlon et al., 1997). Schließlich wurde die Struktur des RII-Homodimers als ein dicht gepacktes, antiparalleles, X-Typ vier-Helix-Bündel postuliert, das für die AKAP-Bindung (N-terminale Helix beider Protomere) und für die Dimerisierung (C-terminale Helices des Bündels) notwendig ist. Die Verankerung der PKA erfolgt über direkten Kontakt der Helices, die auf einer Interaktion der hydrophoben Aminosäuren beider Bindungspartner beruht (Newlon et al., 1997; Newlon et al., 1999; Newlon et al., 2001).

Die dreidimensionale Struktur von RI α -Untereinheiten ist der der RII-Untereinheiten sehr ähnlich, wie in NMR-Studien herausgefunden wurde. Die Aminosäuren 12 bis 61 der RI α -Untereinheiten bilden ein etwas weiter C-terminal gelegenes, X-Typ vier-Helix-Bündel aus (Leon et al., 1997; Banky et al., 1998; Banky et al., 2000). Der extreme N-Terminus in RI-Untereinheiten besteht aus einer Helix, die in das vier-Helix-Bündel zurückgefaltet ist (Tasken und Aandahl, 2004).

1.2 Regulation der PKA durch *A kinase anchoring proteins*

Die Familie der AKAP-Proteine umfasst mittlerweile mehr als 50 Mitglieder, deren Molekulargewichte zwischen 15 und 550 kDa liegen. Es handelt sich hierbei um eine sehr heterogene Familie, die in höchstens 30 % ihrer Gesamtsequenz übereinstimmen. Die ersten AKAP-Proteine, MAP2 und AKAP75, wurden als Kontaminationen bei der affinitätschromatographischen Reinigung der PKA RII-Untereinheiten über cAMP-Sepharose entdeckt (Theurkauf und Vallee, 1982; Sarkar et al., 1984, Bregman et al., 1989). AKAP-Proteine binden auch nach Transfer auf eine Nitro-Zellulosemembran RII-Untereinheiten (Lohmann et al. 1984). Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um AKAP-Proteine im RII-*overlay* nachzuweisen. Hierbei handelt es sich um einen modifizierten *Western Blot*, bei dem an Stelle eines primären Antikörpers radioaktiv markierte RII-Untereinheiten als Sonde eingesetzt werden (Bregman et al. 1989, Carr und Scott 1992). Diese Standardmethode zur Detektion von AKAP-Proteinen eignet sich auch zum Durchmustern von cDNA-Expressionsbibliotheken.

Die Technik des RII-*overlay* wurde zu einer effizienten Klonierungsstrategie verfeinert, die auf der beschriebenen Interaktion beruht. So war es möglich eine Vielzahl von AKAP-Proteinen mit RII-Untereinheiten als Sonde aus cDNA Expressions-Bibliotheken verschiedener Gewebe zu klonieren (z.B. Bregman et al., 1989; Carr et al., 1992; Hirsch et al., 1992; Coghlan et al., 1994; McCarthy et al., 1995; Lin et al., 1995; Lester et al., 1996; Dransfield et al., 1997; Nauert et al., 1997; Henn et al., 2004). Die Präsenz von 10 bis 20 AKAP-Proteinen, lokalisiert in unterschiedlichen Bereichen einer individuellen Zelle, gewährleistet die Spezifität des PKA-Signalwegs. Dies ermöglicht eine separate Aktivierung von lokal definierten PKA-Populationen durch unterschiedliche extrazelluläre Signale.

1.2.1 Struktur und Charakteristika von AKAP-Proteinen

Die meisten AKAP-Proteine besitzen zumindest zwei funktionelle Motive, eines für die Verankerung mit dem PKA-Holoenzym (die RII-Bindungsdomäne) und eines für die Assoziation mit definierten subzellulären Kompartimenten (das Verankerungsmotiv).

Die RII-Bindungsdomäne der AKAP-Proteine

Die PKA-RII-Bindungsdomäne der AKAP-Proteine ist innerhalb dieser Proteinfamilie hoch konserviert. Seine 14 bis 18 Aminosäuren bilden eine amphipatische Helix aus (Carr et al., 1991; Newlon et al., 1997; Fraser and Scott, 1999). Mit der Entdeckung des *human thyroid-anchoring* Proteins Ht31 (AKAP-Ht31/AKAP-Lbc) und der Herstellung eines synthetischen, aus 24 Aminosäuren bestehenden Ht31-Peptids wurde die RII-Bindungsdomäne der AKAP-Proteine näher charakterisiert (Carr et al., 1991; Carr et al., 1992). Die Einführung eines Prolins an verschiedenen Stellen in die Sequenz des Ht31-Peptids verändert den amphipatischen Charakter des Motivs und zerstört die Helix-Struktur durch seine sterische Inkompatibilität. Dies hat zur Folge, dass keine Assoziation mit RII-Untereinheiten mit der mutierten RII-Bindungsdomäne des Ht31-Peptids stattfindet (Carr et al., 1991; Carr et al., 1992). Die hohe Bindungsaffinität des Ht31-Peptids hat dieses Peptid in der Vergangenheit zu einem Standardinhibitor der PKA-Verankerung gemacht. Das Peptid wird durch Anbindung eines Stearatrestes (S-Ht31-Peptid) oder durch Myristylierung membranpermeabel und kann durch die Plasmamembran in die Zelle gelangen. Diese Methode kann die Funktion der PKA-Verankerung bei bestimmten physiologischen Prozessen aufzeigen. Beispielsweise schränkt S-Ht31 die Beweglichkeit von Spermien ein (Vijayaraghavan et al., 1997). Myristylierte Ht31-Peptide können die cAMP-abhängige Transkription des Gens IL-2 in Jurkat-T-Zellen inhibieren (Scott, 1997; Lester und Scott, 1997).

Die hohe Affinität des Ht31-Peptids zu den RII-Untereinheiten hat unmittelbar Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation des PKA-Holoenzym: Die Berechnung des K_D -Wertes der Ht31-Peptid-PKA Interaktion ergab eine Größenordnung von 1 bis 11 nM. Der Wert dieser Affinitätskonstante ist mit den intrazellulären Konzentrationsbereichen von RII-Untereinheiten und den meisten AKAP-Proteinen gut zu vereinbaren. Dies lässt darauf schließen, dass der RII-AKAP Komplex *in situ* bevorzugt wird. Das PKA-Holoenzym bindet an das Ht31-Peptid mit der gleichen Affinität wie ein RII-Dimer. Aus diesen Daten folgt, dass das PKA-Holoenzym in Zellen mit basalem cAMP-Spiegel an AKAP-Proteinen verankert vorliegt (Dell'Acqua und Scott, 1997).

Im Allgemeinen verankern AKAP-Proteine vornehmlich RII-PKA Holoenzyme. Diese Interaktion geschieht mit nanomolarer Affinität (Carr et al., 1992) und tritt *in vivo* mit 100-fach größerer Affinität auf als die Bindung an RI-PKA (Burton et al., 1997). Es gibt jedoch auch einige Beispiele für AKAP-Interaktionen, die nicht ausschließlich auf TypII-PKA begrenzt ist, sondern auch TypI-PKA beinhalten können (Burton et al., 1997; Banky et al.,

2000; Herberg et al., 2000). Für AKAP_{CE} z.B. wurde gezeigt, dass es spezifisch mit den RI-ähnlichen PKA-Untereinheiten in *Caenorhabditis elegans* interagiert und dass RII-Untereinheiten diese Bindung nicht inhibieren können (Angelo und Rubin, 1998; Angelo und Rubin, 2000). Des Weiteren gibt es biochemische *in vitro* Studien, die dual-spezifische AKAP-Proteine, wie D-AKAP1, D-AKAP2, AKAP82 (FCS1), MyosinVIIA und AKAP18 γ beschreiben, die neben RII- auch RI-Untereinheiten binden können (Huang et al., 1997; Miki und Eddy, 1998; Miki und Eddy, 1999; Huang et al., 1999; Kussel-Andermann et al., 2000). Für AKAP220 konnte gezeigt werden, dass sowohl RI-, als auch RII-Untereinheiten aus humanen Zelllysaten des Testis immunpräzipitiert und somit die Fähigkeit besitzt mit beiden Typen *in vivo* zu interagieren (Reinton et al., 2000). Für AKAP82 und AKAP-Ht31 konnte anhand von Mutagenesestudien drei N-terminale Aminosäuren an den Positionen 2, 6 und 10 identifiziert werden, die offenbar entscheidend beeinflussen, ob RI α - oder RII α -Untereinheiten gebunden werden. Die Affinität für RI α -Untereinheiten wird erhöht, wenn die langen aliphatischen Seitenketten der hydrophoben Seitenketten der N-terminalen Helix durch kurze Seitenketten ersetzt werden (Miki und Eddy, 1999).

Die unterschiedliche Bindungsaffinität von RI α - und RII α -Untereinheiten könnte durch die Sekundärstruktur im N-Terminus erklärt werden. Bei den RI α -Untereinheiten bilden die ersten neun Aminosäuren eine α -Helix, bei den RII α -Untereinheiten ein β -Faltblatt (s. 1.1.1).

Das Verankerungsmotiv der AKAP-Proteine

Die meisten bekannten AKAP-Proteine haben neben der RII-Bindungsdomäne für das PKA-Holoenzym mindestens ein weiteres. Das Verankerungsmotiv ist im Unterschied zu der RII-Bindungsdomäne nicht konserviert. Es reguliert die intrazelluläre Lokalisation der AKAP-Proteine, und somit auch die des assoziierten PKA-Holoenzym und eventuell weiterer Interaktionspartner, durch Anbindung an die verschiedenartigsten Zellkompartimente (Dell'Acqua and Scott, 1997; Colledge and Scott, 1999; Edwards and Scott, 2000; Michel and Scott, 2002; Tasken and Aandahl, 2004; Wong und Scott, 2004). AKAP-Proteine konnten an einer Vielzahl zellulärer Organellen identifiziert werden. In Abb. 1.1 ist die subzelluläre Lokalisation einiger AKAP-Proteine dargestellt.

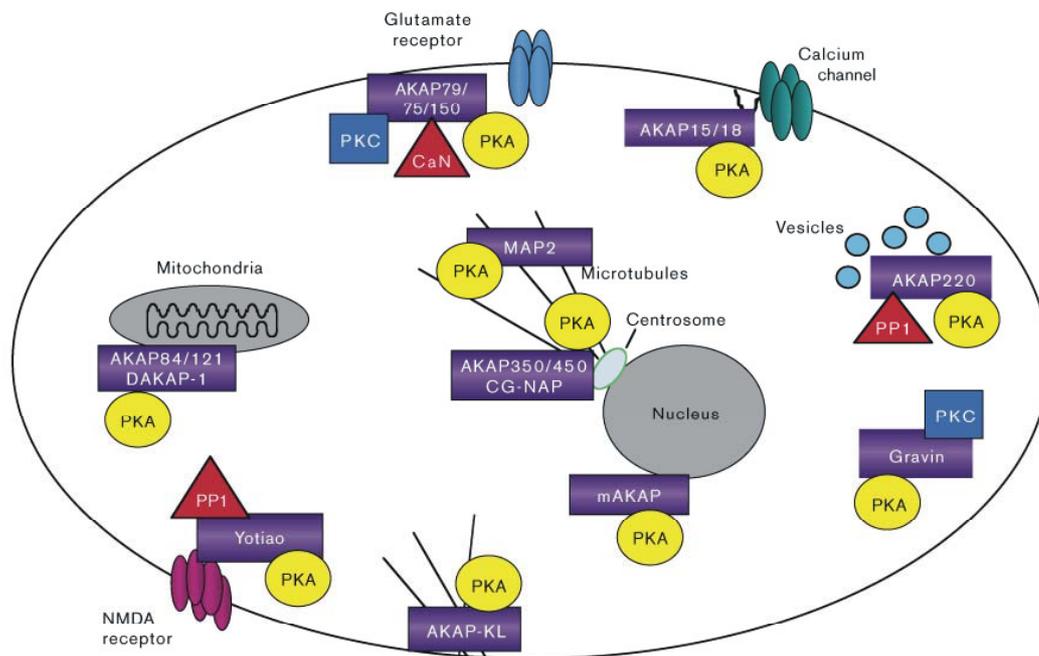


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der subzellulären Lokalisation einiger AKAP-Proteine (nach Edwards und Scott 2000).

Die Anbindung an bestimmte subzelluläre Kompartimente wird durch spezielle Verankerungs-Sequenzen erreicht, die Lipid-Interaktionen mit Membranstrukturen eingehen. Die genaue Identifizierung der Verankerungs-Sequenzen ist bisher erst für wenige AKAP-Proteine vollständig erfolgt.

Für MAP2 hat man herausgefunden, dass eine C-terminale repetitive Octadecapeptidsequenz das Protein an den Mikrotubuli verankert (Joly et al., 1989). Zwei nicht benachbarte N-terminale Regionen (T1 und T2) bewerkstelligen die submembrane Bindung von AKAP75/79 am kortikalen Zytoskelett in HEK293 Zellen (Li et al., 1996). Die Assoziation von AKAP15/18 α wird durch Myristylierungs- und Palmylierungssignale an Membranstrukturen in unmittelbarer Umgebung von Kalzium- und Natriumkanälen vermittelt (Fraser et al., 1998; Gray et al., 1998; Trotter et al., 1999). AKAP79 besitzt im Verankerungsmotiv drei polybasische Regionen, die für die Assoziation mit der postsynaptischen Membran eine Rolle spielen (Dell'Acqua et al., 1998). Das im Herzmuskel vorkommende mAKAP wiederum

bindet über drei sich wiederholende Spektrin-ähnliche Sequenzen an die perinukleare Membran der Kardiomyozyten (Kapiloff et al., 1999).

AKAP	Gewebe/Zellen	Lokalisation	Interaktionspartner*
AKAP-Ht31/AKAP-Lbc	ubiquitär	Zytoskelett, Zytoplasma	RhoA, $G\alpha_{12}$, PKC, PKD, 14-3-3
AKAP15/18 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$	Niere, Herz, Skelettmuskulatur, Gehirn, Bauchspeicheldrüse	Vesikel, Plasmamembran, Kanäle, Zytoplasma	Na^+ und Ca^{2+} Kanäle
AKAP75/79/150	Gehirn, Hoden, Schilddrüse, Herz, Lunge, Leber	Plasmamembran, postsynaptische Membran	PKC, PP2B (CaN), NMDA-Rezeptor, AMPA-Rezeptor, SAP97, PSD-95, KCNQ2-Kanal, Ca^{2+} Kanal, AQP-Kanäle
AKAP78/Ezrin	Sekretorisches Gewebe	Plasmamembran, Kanäle	Cl^- Kanal (CFTR), EBP50/NHERF
AKAP82/FSC1	Hoden, Spermazellen	Fibrioser Spermienschwanz	
AKAP84/121/149/D-AKAP1	Niere, Skelettmuskulatur, Leber, Lunge, Herz, Hoden	Mitochondrien, ER, Kernmembran	Lamin B, PP1
AKAP95	Niere, Herz, Leber, Skelett, Muskulatur, Bauchspeicheldrüse	Nukleus	Eg7/Condensin
AKAP220/hAKAP220	Gehirn, Hoden	Zytoskelett, Peroxisome, Vesikel	PP1
AKAP350/450/Yotatio/CG-NAP/Hyperion	Gebärmutter, Schilddrüse, Bauchspeicheldrüse, Muskel, Hoden, Niere, Herz, Leber, Lunge, Milz, Gehirn	Zentrosome, Golgi-Apparat, postsynaptische Membran, neuromuskuläre <i>junctions</i>	PKC, PKN, PP1, PP2A, PDE4D3, NMDA Rezeptor
AKAP-KL	Niere, Lunge, Thymus, Cerebellum	Plasmamembran, Zytoskelett	
mAKAP	Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur	Kernmembran	PDE4D3
Gravin	Endothelzellen	Zytoplasma, Zytoskelett	PKC, β -Arrestin
MAP2B	ubiquitär	Mikrotubuli	Tubulin, <i>L-type</i> Ca^{2+} Kanal
MyosinVIIA	ubiquitär	Zytoskelett	
Pericentrin	ubiquitär	Zentrosome	Dynein, γ -Tubulin
Scar/WAVE-1	Gehirn	Zytoskelett, Mitochondrien	Abl, Wrp, Rac, Arp2/3, Abi-1, PIR121, NAP125, PP1, Glucokinase, BAD
D-AKAP2	Hoden, Niere, Herz, Milz, Gehirn, Skelettmuskulatur, Leber, Lunge.	unbekannt	G-Protein (?)
DAKAP200	<i>Drosophila</i>	Plasmamembran	F-Actin,
DAKAP550	<i>Drosophila</i>	Plasmamembran, Zytoplasma	Ca^{2+} -Calmodulin
AKAP _{CE}	<i>Caenorhabditis elegans</i>	unbekannt	

Tab. 1.1: Vorkommen, subzelluläre Lokalisation und Interaktionspartner einiger AKAP-Proteine. * ohne PKA (Verändert nach Feliciello et al., 2001; Kapiloff, 2002; Tasken und Aandahl, 2004; Wong und Scott, 2004).

Eine Assoziation von AKAP-Proteinen wurde mit der Kernmembran, endo- und sarkoplasmatischem Retikulum, dem Golgi-Apparat, Vesikeln, der Plasmamembran, Rezeptoren, Kanälen, Peroxisomen, Zentrosomen und dem Zytoskelett nachgewiesen (Tab. 1.1; Feliciello et al., 2001; Kapiloff, 2002; Tasken und Aandahl, 2004; Wong und Scott, 2004). Es existieren aber auch zytosolische AKAP-Proteine, die kein Verankerungsmotiv besitzen, wie z.B. AKAP-Ht31 (Carr et al., 1993; Han et al., 1997; Trotter et al., 1999).

1.2.2 AKAP-Proteine bilden multivalente Signalkomplexe

Obwohl die prinzipielle Aufgabe der AKAP-Proteine die Verankerung und Kompartimentalisierung der PKA ist, wird die Entdeckung, dass AKAP-Proteine auch andere Signalezyme zu multivalenten Signaltransduktionskomplexen koordinieren können, immer bedeutender. Die Koordinierung dieser Signalkomplexe vereint effektiv *upstream activators* mit spezifischen *downstream targets*. AKAP-Proteine fungieren als Gerüstproteine, die Signalezyme wie Kinasen und Phosphatasen regulieren. Dies ist besonders interessant, da die gegensätzliche Effekte von Kinasen und Phosphatasen in einem Transduktionskomplex kolokalisiert werden.

Die Interaktion von AKAP-Proteinen mit mehreren Enzymen konnte als erstes für AKAP79 nachgewiesen werden (Nauert et al., 1997; Kashishian et al., 1998). AKAP79 koordiniert die Lokation eines Signalkomplexes bestehend aus PKA, PKC und der Protein Phosphatase Calcineurin (PP2B), der über negativ geladene Phospholipid-bindende Domänen an die synaptische Membran von Neuronen verankert ist. Präzisere Orientierung des Signalkomplexes an den NMDA-Rezeptor findet durch die Protein-Protein Interaktion mit der PDZ-Domäne der Proteine der MAGUK- (*membrane associated guanylyl kinase*) Familie statt (Schillace und Scott, 1999; Colledge et al., 2000). PKC und Calcineurin sind inaktiv solange sie an AKAP79 gebunden sind (Klauck et al., 1996; Kashishian et al., 1998). Wenn die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt oder Phospholipide aus der Plasmamembran freigesetzt werden, dissoziieren PKC und Calcineurin von dem Signalkomplex und zeigen katalytische Aktivität (Dell'Acqua et al., 1998; Faux und Scott, 1999). So organisiert AKAP79 zwei Kinasen und eine Phosphatase, die Signale unterschiedlicher *second messenger* koordinieren und integrieren.

Ein anderes Beispiel für die effektive Verknüpfung von *upstream activators* und *downstream targets* in multivalenten Signalkomplexen ist mAKAP. Das muskelselektive mAKAP bindet PKA und eine Spleißvariante der cAMP-spezifischen Typ 4 Phosphodiesterase (PDE4D3)

und vermittelt so die Senkung des cAMP-Spiegels in der Umgebung der verankerten PKA (Dodge et al., 2001; Wong und Scott, 2004). PKA-Phosphorylierung steigert die PDE4D3 Aktivität um das zwei- bis dreifache und sorgt über diese negative Rückkopplung für eine schnelle Terminierung des cAMP-Signals. Die Integration von Phosphodiesterasen in AKAP-Komplexe bringt neben den räumlichen Aspekten somit noch zeitliche Regulierung der cAMP-Signale (Smith und Scott, 2002).

Multivalente Signalkomplexe am Zytoskelett: AKAP-Ht31/AKAP-Lbc

Für die Signaltransduktion am Zytoskelett ist die Organisation von Kinasen und Phosphatasen besonders wichtig. Das Aktin-Zytoskelett ist von großer Bedeutung für eine Vielzahl von essentiellen biologischen Prozessen in allen eukaryotischen Zellen, wie Regulation der Zellform, Polarität der Zelle, Bewegungsvermögen und Zellteilung. Die Zellen stehen vor der Aufgabe, Signale aus einer großen Anzahl von Signalwegen zu integrieren, um die Lokalisation und den Zeitpunkt der Aktin-Polymerisierung präzise zu kontrollieren. Eine Schlüsselrolle fällt dabei der Familie der kleinen Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 zu. Ein sehr intensiv charakterisierter Vertreter dieser Familie ist RhoA, das neben seiner Beteiligung an Zellzyklus, Genexpression und Zytokinese, die Bildung von F-Aktin-Stressfasern kontrolliert (Tapon und Hall, 1997; van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Aspenström, 1999; Alto et al., 2002; Etienne-Manneville und Hall, 2002). RhoA vermittelt die Signale von transmembranen Rezeptoren über selektive Interaktion der aktivierten Rho-GTPase mit Effektorproteinen, zu denen auch AKAP-Proteine zählen und stimuliert so die Bildung des Aktinfilaments (Diviani und Scott, 2001).

Rho-Signalwege werden beispielsweise durch die extrazellulären Liganden Lysophosphatsäure (LPA) und Thrombin ausgelöst (Bishop und Hall, 2000). Die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor mobilisiert letztlich die Pertussistoxin-insensitiven heterotrimerischen G-Protein Untereinheiten $G_{\alpha 12}$ und $G_{\alpha 13}$ (Strathmann und Simon, 1991; Buhl et al., 1995). Intrazelluläre Interaktionspartner für die G_{α} -Untereinheiten sind Proteine mit *Guanine nucleotide Exchange Factor* (GEF-) Funktion (Kaibuchi et al., 1999). GEF-Proteine binden in der Regel an $G_{\alpha 12}$ - und $G_{\alpha 13}$ -Untereinheiten und aktivieren Rho-Proteine, indem sie deren Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzen.

Charakterisierend für RhoGEFs ist eine circa 250 Aminosäuren umfassende Region, die *Dbl homology* (DH) Domäne, gefolgt von einer circa 100 Aminosäuren langen Region, der *Pleckstrin homology* (PH) Domäne (Mahadevan et al., 1995; Cerione und Zheng, 1996; Zeng

et al., 1996). Die DH-Domäne katalysiert den Nukleotidaustausch, besitzt also die eigentliche GEF-Funktion, während die PH-Domäne für die Lokalisation an den F-Aktin Stressfasern und der Plasmamembran verantwortlich ist (van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Olson et al., 1997; Whitehead et al., 1996; Hall, 1998; Bishop und Hall, 2000).

AKAP-Lbc ist Teil eines Signalkomplexes, der durch LPA-induzierte G_{12} -Stimulation aktiviert werden kann. Aktiviertes AKAP-Lbc interagiert mit Rho über seine DH-Domäne und induziert den Nukleotidaustausch (s.o.). Aktives Rho-GTP dissoziiert von dem AKAP-Lbc-PKA Komplex und partizipiert in verschiedenen zellulären Prozessen, einschließlich der F-Aktin Stressfasern Bildung (Diviani et al., 2001). Eine Anhebung des intrazellulären cAMP-Spiegels aktiviert die katalytischen Untereinheiten des an AKAP-Lbc verankerten PKA-Holoenzym. Die freigesetzten C-Untereinheiten können zum einen AKAP-Lbc an Serin 1565 phosphorylieren und damit die Rekrutierung des Proteins 14-3-3 an AKAP-Lbc einleiten und so die RhoGEF-Aktivität von AKAP-Lbc inhibieren (Diviani et al., 2004). Zum anderen wird RhoA an Serin 188 phosphoryliert. Dies wiederum führt zu einer Inhibierung von RhoA (Lang et al., 1996; Ellerbroek et al., 2003). AKAP-Lbc spielt bei diesem Vorgang somit eine zentrale Rolle, da es das Gerüst darstellt für einen Komplex, der cAMP und Rho Signalwege integriert. Auch eine andere Spleißvariante von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc funktioniert als RhoGEF: Proto-Lbc ist in HEK293T-Zellen in der Lage RhoA über $G_{\alpha_{12}}$ -induzierte Signalwege zu aktivieren (Dutt et al., 2004).

Für AKAP-Ht31/AKAP-Lbc ist bisher eine große Anzahl von Interaktionspartnern beschrieben worden. Neben Interaktionen mit PKA, RhoA, $G_{\alpha_{12}}$ und 14-3-3 organisiert AKAP-Lbc zusätzlich eine Protein Kinase Kaskade, in der PKA und PKC Aktivitäten in einer Weise synchronisiert werden, die zu der Aktivierung einer dritten Kinase (PKD) führt. PKD und das PKC-Isoenzym PKC_{η} , das vermutlich über $G_{\alpha_{12/13}}$ -vermittelte Aktivierung von Rho aktiviert wird, sind über AKAP-Lbc in einem Signalkomplex lokalisiert (Valverde et al., 1994; Yuan et al., 2001; Yuan et al., 2002; Storz et al., 2004; Carnegie et al., 2004). PKC_{η} bindet in der PH-Domäne, während PKD in der C-terminalen Region von AKAP-Lbc verankert wird (Carnegie et al., 2004). In der ersten Phase dieser Signalkaskade wird PKD durch PKC_{η} -Phosphorylierung an Serin 744 und 748 aktiviert (Zugaza et al., 1996; Waldron et al., 1999; Carnegie et al., 2004). In der zweiten Phase des Aktivierungsprozesses wird AKAP-Lbc an Serin 2737 durch PKA phosphoryliert, was zu der Freisetzung der aktivierten PKD führt (Carnegie et al., 2004).

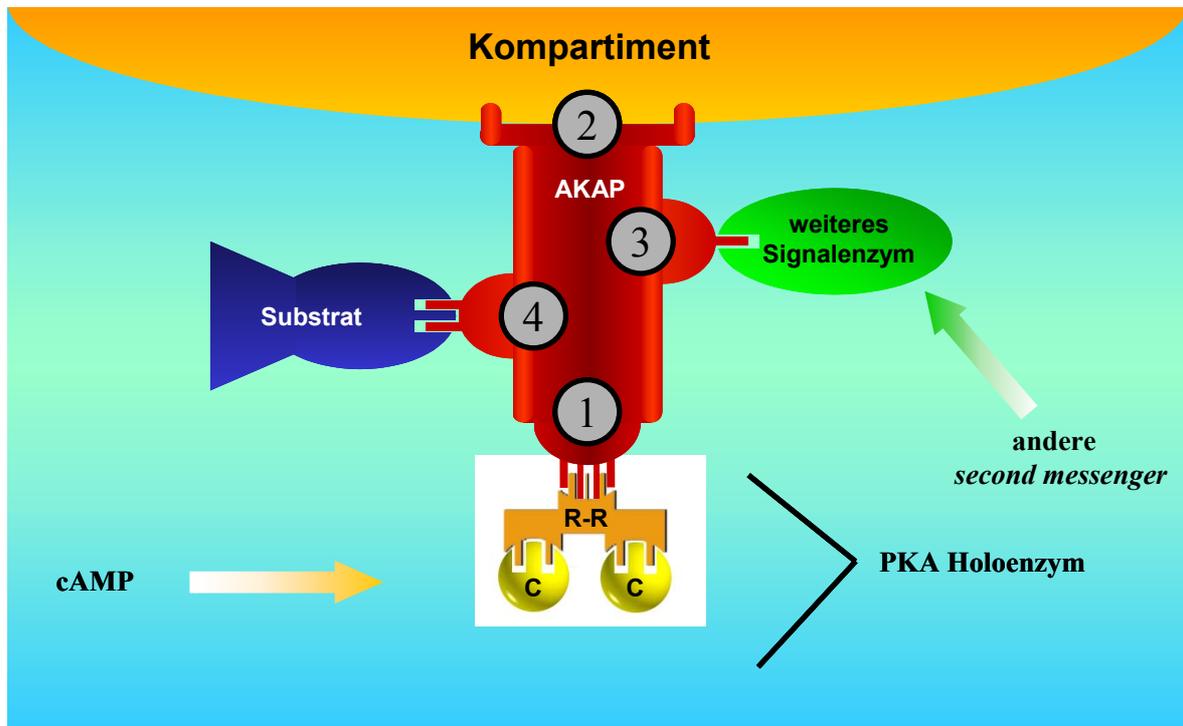


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines multivalenten AKAP-Signalkomplexes. (1) Die RII-Bindungsdomäne verankert das PKA-Holoenzym über die regulatorischen Untereinheiten. (2) Das Verankerungsmotiv lokalisiert den AKAP-PKA-Komplex an subzelluläre Kompartimente. Darüber hinaus können einige AKAP-Proteine mit weiteren Signalezymen (grün) interagieren (3). Einige wenige AKAP-Proteine verfügen über eigene katalytische Aktivität (4). Die katalytischen Untereinheiten der PKA (C) werden über die Anbindung von cAMP aktiviert. Die führt zu der Dissoziation von dem Dimer der regulatorischen Untereinheiten der PKA (R-R). Andere *second messenger* sind in der Lage weitere Signalezyme am AKAP-Signalkomplex zu regulieren.

AKAP-Ht31, das zu 99 % der Sequenz von AKAP-Lbc entspricht, sowie sein Rattenorthologon Rt31 und AKAP18 δ wurden bei der Durchmusterung einer Rattennierenexpressions-cDNA-Bibliothek mittels der RII-*overlay* Technik identifiziert (Klussmann et al., 2001b; Henn et al., 2004). In primär kultivierten Zellen aus innermedullären Sammelrohrzellen der Rattenniere (IMCD-Zellen: *inner medullary collecting duct cells*) vermittelt RhoA die Ausbildung von F-Aktin Stressfasern, welche dort scheinbar u.a. einen cAMP-vermittelten Vesikeltransport zur Plasmamembran verhindern (Klussmann

et al., 2001b). Eine Depolymerisierung der F-Aktin Stressfasern kann sowohl mit dem spezifischen Rho-Inhibitor *Clostridium limosum* C3 Toxin, als auch mit einem Rho-Kinase Inhibitor erzielt werden und somit auch den Transport von AQP2-tragenden Vesikel auslösen (Klussmann et al., 2001a). In diesem Prozess induziert die Aktivierung der PKA nicht nur den Vesikeltransport, sondern inhibiert auch RhoA durch Phosphorylierung. AKAP-Ht31/Rt31 ist ein Kandidat, der diese beiden Signalwege möglicherweise integrieren könnte.

Die Bildung eines multivalenten Signalkomplexes mit einem AKAP-Protein als Gerüstprotein, das katalytische Aktivität aufweist, wie für AKAP-Lbc beschrieben und für AKAP-Ht31 durchaus wahrscheinlich, ist ein neuer Aspekt in der Funktion der AKAP-Proteine. Dies verdeutlicht, dass die Rolle von AKAP-Proteinen über die Funktion als reines Gerüstprotein für andere Proteine weit hinaus geht (Abb. 1.2).

1.2.3 AKAP-Ht31 und seine Spleißvarianten

AKAP-Ht31 ist eine Spleißvariante einer Reihe von RhoGEF-Proteinen, deren erste Vertreter bei einer Suche nach Genen mit Transformationspotential aus humanen Myeloid-Leukämiezellen entdeckt wurden (Toksoz und Williams, 1994). Dabei wurden u.a. die folgenden Proteine identifiziert, die vermutlich alle Spleißvarianten eines einzigen Gens sind, das auf dem Chromosom 15 (Region q24 – q25) lokalisiert ist (Abb. 1.3; Klussmann et al., 2001b; Diviani et al., 2001).

Die proto-oncogenische Variante proto-Lbc besteht aus 893 Aminosäuren (105 kDa) und hat eine C-terminale Region, die ihr Transformationspotential vermindert. Proto-Lbc ist im Gegensatz zu dem hauptsächlich zytosolisch verbreiteten onco-Lbc in der partikulären (Membran-) Fraktion lokalisiert (Sterpetti et al., 1999). Das *breast cancer nuclear receptor-binding auxilliary protein* (Brx) ist eine weitere Spleißvariante bestehend aus 1429 Aminosäuren (170 kDa), die bis auf die ersten vier Aminosäuren mit dem C-Terminus von AKAP-Ht31 identisch ist. Brx wird ausschließlich in Testes und in Östrogen-sensitiven Geweben exprimiert und ist in der Lage mit dem Östrogenrezeptor (ER) zu interagieren (Rubino et al., 1998).

Abb. 1.3 zeigt die Spleißvariante AKAP-Ht31 im Vergleich zu Brx, proto-Lbc und der Spleißvariante AKAP-Lbc. AKAP-Ht31 und sein Rattenorthologon Rt31 enthalten neben der PKA-RII-Bindungsdomäne ein RhoGEF-Motiv. AKAP-Lbc enthält im C-Terminus an Stelle von Brx die Sequenz von proto-Lbc (Diviani et al., 2001).

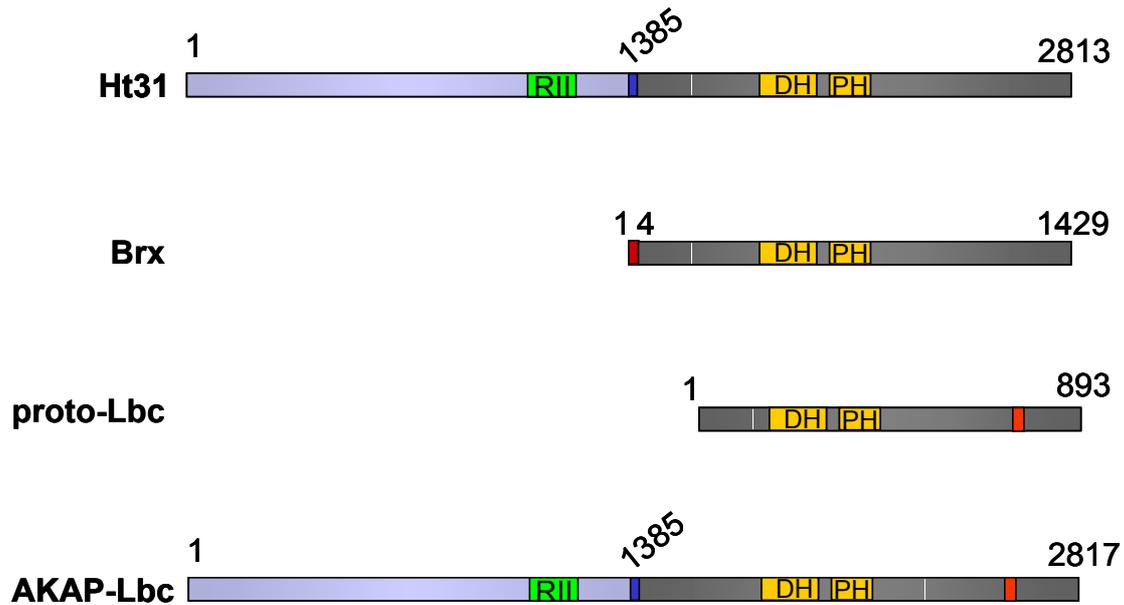


Abb. 1.3: Schematischer Vergleich von AKAP-Ht31 mit anderen Spleißvarianten des gleichen Gens. Dargestellt sind Aminosäuresequenz und die wichtigsten funktionellen Domänen. Der C-Terminus von AKAP-Ht31 ist bis auf die ersten vier Aminosäuren mit Brx identisch. Der C-Terminus von AKAP-Lbc hingegen ist mit proto-Lbc identisch. Die Zahlen geben Aminosäure-Positionen an. RII: RII-Bindungsdomäne für die regulatorischen Untereinheiten der PKA; DH: *Dbl-homology* Motiv, fungiert als RhoGEF; PH: *Pleckstrin-homology* Motiv, kann an F-Aktin Stressfasern binden.

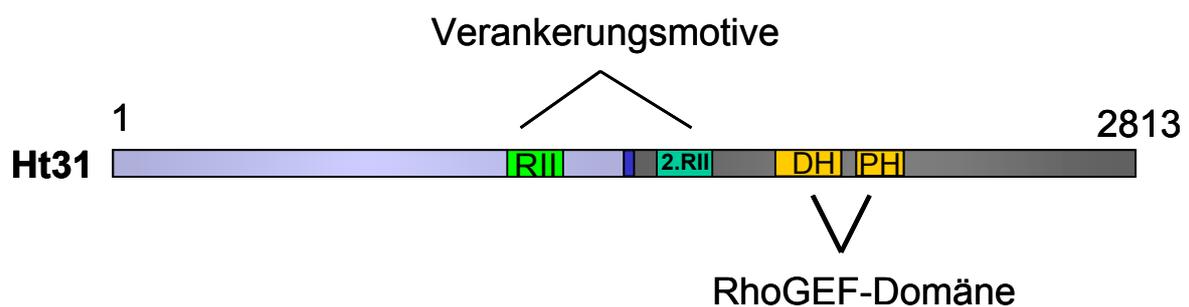


Abb. 1.4: Schematische Darstellung funktioneller Domänen von AKAP-Ht31. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz. RII: klassische RII-Bindungsdomäne; 2.RII: potentielles zweite RII-Bindungsdomäne für regulatorische Untereinheiten der PKA; DH: *Dbl-homology* Motiv; PH: *Pleckstrin-homology* Motiv.

AKAP-Ht31 wurde ursprünglich aus einer Schilddrüsen-cDNA-Bibliothek isoliert und ist in humanen Geweben nahezu ubiquitär exprimiert (Tab. 1; Carr et al., 1991; Carr et al., 1992). Die RII-Bindungsdomäne für die regulatorischen Untereinheiten der PKA liegt an Position 1247 bis 1260 der Aminosäuresequenz von AKAP-Ht31 (Abb. 1.4).

Daneben besitzt AKAP-Ht31 eine zweite potentielle, nicht-kanonische Bindungsdomäne für RII-Untereinheiten an Position 1470 bis 1768 der Aminosäuresequenz (eigene Arbeitsgruppe). Die zweite RII-Bindungsdomäne bildet im Gegensatz zu einer klassischen RII-Bindungsdomäne sehr wahrscheinlich keine amphipatische Helix aus (Strukturanalysen der eigenen Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Dr. G. Krause, FMP). *Surface Plasmon Resonance*-Studien haben ergeben, dass die Bindungsaffinität dieser RII-Bindungsdomäne für RII β -Untereinheiten 10-fach geringer ist als die klassischer RII-Bindungsdomänen (eigene Arbeitsgruppe). Die bereits beschriebenen DH- und PH-Domänen (s.o.) liegen in der Aminosäuresequenz an Position 1995 bis 2226 (DH-Domäne) und 2239 bis 2336 (PH-Domäne).

1.3 Regulation der Transkription durch Östrogene und Östrogenrezeptor

Östrogene spielen sowohl in der reproduktiven Physiologie, als auch in zahlreichen humanen Krankheiten, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose, Alzheimer und Gebärmutter-schleimhaut- und Brustkrebs eine wichtige Rolle (Russo et al., 2003). Es gibt drei Mechanismen die für die Karzinogenität von Östrogenen verantwortlich gemacht werden: (1) erhöhte Rezeptor-vermittelte hormonale Aktivität (Calaf et al., 1994; Russo et al., 1993; Calaf und Russo 1993; Russo et al., 2003), (2) eine Cytochrom P450 vermittelte metabolische Aktivierung (Osborne et al., 1993; Hu und Kim, 2001) und (3) die Induktion von Aneuploidität durch Östrogene (Greendale et al., 1999; Schairer et al., 2000; Ross et al., 2001).

Zirkulierende Östrogene stammen hauptsächlich aus der Steroidgenese der Ovarien. Das Steroidhormon 17 β -Estradiol (E₂) ist das stärkste Östrogen des Brustgewebes (Hu et al., 2001). Das Eintreten der Menopause vor dem vierzigsten Lebensjahr verringert das Risiko für Frauen an Brustkrebs zu erkranken signifikant (Hu et al., 2001). Jedoch scheint die Aufnahme von zirkulierendem E₂ nicht signifikant zu dem Gesamtgehalt an Östrogenen in Brusttumoren beizutragen; die Mehrheit der Östrogene stammt aus der *de novo* Biosynthese in diesen Geweben (Hu et al., 2001).

Der Östrogenrezeptor α (ER α) gehört zu der Klasse I der nuklearen Steroid/Thyroid-Rezeptor Superfamilie. ER α vermittelt die Effekte von E₂ und einer Vielzahl von endogenen, synthetischen und natürlich vorkommenden Östrogenen auf Zellwachstum, Differenzierung und Funktion in einer großen Anzahl von Geweben, einschließlich den weiblichen und männlichen Fortpflanzungsorganen, Brustdrüsen, skelettalen und kardiovaskulären Systemen (Kuiper und Gustafsson, 1997). E₂ bindet an zwei verschiedene, intrazelluläre Rezeptoren, Östrogenrezeptor α (ER α) und β (ER β), die von zwei verschiedenen Genen kodiert werden (Giguere, 1998). ER α ist der vorherrschende Subtyp in Brust, Uterus, Cervix, Vagina und in einigen zusätzlichen Organen, während ER β ein eher limitiertes Expressionsmuster aufweist und hauptsächlich in Ovarien, Prostata, Testis, Milz, Lunge, Hypothalamus und Thymus vorkommt (Couse et al., 1997). ER α ist ein Mitglied der Superfamilie von Transkriptionsfaktoren, welche wiederum Rezeptoren für Steroid- (Androgene, Ecdysone, Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Östrogene und Progesterone) und Thyroidhormone einschließt. Diese Rezeptoren sind zum einen durch das Vorhandensein hoch-konservierter DNA- (DBDs) und Liganden-Bindungsdomänen (LBDs) charakterisiert. Des weiteren besitzen sie die Fähigkeit zur Regulation der Transkription über die Bindung an *cis-acting enhancer elements* in der Promotorregionen aktiver Gene, entweder als Homo- oder Heterodimere, seltener als Monomere (Tsai und O'Malley; 1994; Mangelsdorf und Evans, 1995; Cowley et al., 1997; Ogawa et al., 1998; Beato, 2000). Die beiden Rezeptorsubtypen ER α und ER β besitzen im Bereich ihrer DBDs und LBDs starke Homologien, woraus folgt, dass sie mit identischen DNA *response elements* interagieren und dass sie ähnliche Bindungsaffinitäten für endogene, synthetische und natürlich vorkommende Östrogene in *in vitro* Studien zeigen (Kuiper et al., 1997).

1.3.1 Der Estradiol-Östrogenrezeptor-Signalweg

Die Klonierung der ersten Östrogenrezeptor-cDNA vor über 15 Jahren trug in großem Umfang dazu bei die komplexen molekularen Mechanismen zu verstehen, die den diversen physiologischen Effekten von E₂ und der Vielzahl von synthetischen ER-Liganden zu Grunde liegen. Die Sequenz von ER α kann auf Basis ihrer Aminosäuresequenz in sechs verschiedene Regionen, A bis F, unterteilt werden (Abb. 1.5; Krust et al., 1986).

Die N-terminale A/B Domäne enthält eine Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion 1 (AF-1) die auch unabhängig von LBD agieren kann. Die C-Domäne enthält zwei Zink-Finger Motive, die der DBD zugehörig sind. Daran schließt sich die D- Domäne an, der bisher nur

die Verknüpfung zur nächsten Region zugeschrieben werden konnte. Die LBD liegt in der E-Domäne; sie enthält eine Liganden-abhängige Aktivierungsfunktion (AF-2). AF-1 und AF-2 aktivieren die Transkription unabhängig voneinander, wirken aber synergistisch und agieren in einer Promotor- und Zell-spezifischen Art und Weise (Kumar et al., 1986; Lees et al., 1989; Tora et al., 1989). Die F-Domäne spielt möglicherweise eine modulatorische Rolle bei der ER-Aktivierung (Coleman et al. 2003).

Die Dimerisierung von ER α wird in der Abwesenheit von Liganden größtenteils von der DBD vermittelt; Bindung von E₂ ermöglicht die Dimerisierung durch LBD. Die Dimerisierung fördert die Anbindung an spezifische Östrogenrezeptor DNA *response elements* (EREs; Chen et al., 1999). Anti-Östrogene, wie Tamoxifen und ICI 164,384 antagonisieren den Effekt der Östrogene, indem sie mit diesen um die Bindung an ER α kompetitieren (Berry et al., 1990; McDonnell et al., 1995; McInerney und Katzenellenbogen, 1996).



Abb. 1.5: Schematische Darstellung der sechs verschiedenen ER α -Regionen. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz. A- und B-Domäne: Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion 1 (AF-1). C-Domäne: DNA-Bindungsdomäne. D-Domäne: Verknüpfungs-Region. E-Domäne: Bindung von Liganden und Liganden-abhängige Aktivierungsfunktion (AF-2). F-Domäne: eventuell modulatorische Rolle bei der ER-Aktivierung. Serin 118 und Serin 167: Phosphorylierungsstellen für MAP Kinasen. Serin 236 und Serin 305: Phosphorylierungskonsensusstelle für PKA.

Liganden-abhängige Aktivierung durch ER α (Klassischer Mechanismus)

Der Liganden-abhängige Mechanismus ist das definierende Element der Mitglieder der Klasse I der nuklearen Steroid/Thyroid-Rezeptor Superfamilie (Abb. 1.6). Rezeptoren dieser Familie sind im allgemeinen im Nukleus stimulierter und unstimulierter Zellen lokalisiert (Hager et al., 2000). Für die Brustkrebszelllinie MCF-7 konnte jedoch gezeigt werden, dass ER α in unstimulierten Zellen im Zytosol lokalisiert ist. Die Bindung eines Liganden wie E₂ löst die Translokation des Rezeptors in den Nukleus und eine aktivierende Konformationsänderung in ER α aus. Dies fördert wiederum die Homodimerisierung der Rezeptoren und eine starke Affinitätsbindung an EREs im Nukleus (Beato und Sanchez-Pacheco, 1996; McKenna et al., 1999). Die Dimerisierung ist notwendig und ausreichend für eine Bindung an EREs. Phosphorylierung von ER α an den Phosphorylierungsstellen für MAPK und PKA (siehe Abb. 1.5) verstärkt die Affinitätsbindung an EREs (Hall, 2001). Die Liganden-abhängige transkriptionale Aktivierung durch ER α wird von der konstitutiven AF-1-Motiv und von der Hormon-abhängigen AF-2-Motiv vermittelt (Tora et al., 1989).

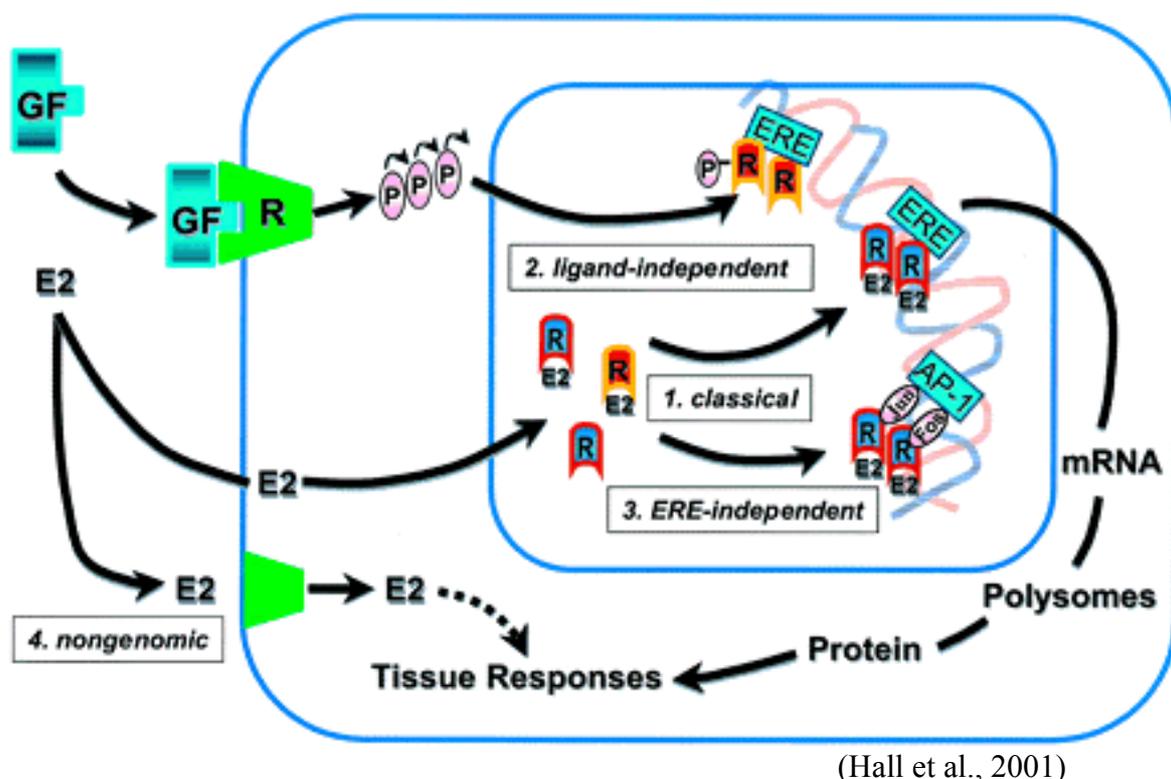


Abb. 1.6: Estradiol-abhängige Östrogenrezeptor-Signalwege. Erläuterungen im Text. (Hall et al., 2001)

DNA-gebundene Rezeptoren treten entweder direkt oder über Kofaktoren mit der Transkriptionsmaschinerie in Verbindung. Dies führt zu einer Aktivierung oder Inhibierung der Gentranskription und zu physiologischen Antworten in den entsprechenden Geweben (Mangelsdorf et al., 1995; McKenna et al., 1999).

Liganden-unabhängige Aktivierung durch ER α

Zusätzlich zu der Hormon-vermittelten Aktivierung kann die ER α -Funktion in Abwesenheit von E₂ durch extrazelluläre Signale moduliert werden (Abb. 1.6). Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion spielt die Phosphorylierung des Rezeptors eine wesentliche Rolle. Phosphorylierung ist eine geläufige kovalente Modifikation, die einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren darstellt. Die Modifikation des Phosphorylierungsstatus von ER α durch zelluläre Kinasen ist sehr wahrscheinlich ein Mechanismus der Liganden-unabhängigen Aktivierung. Die Wachstumsfaktoren EGF (*epidermal growth factor*) und IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) lösen z.B. den Ras-Raf Signalweg der Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) aus, an deren Ende die Phosphorylierung des Serin in Position 118 in der AF-1-Motiv des humanen ER α und von Serin 167 durch eine der MAPK (Erk1 oder Erk2) steht (Abb. 1.5; Kato, 2001). In anderen Studien wurde gezeigt, dass auch E₂ in der Lage ist Erk1 und Erk2 zu aktivieren (DiDomenico et al., 1996; Migliaccio et al., 1996; Endoh et al., 1997; Singh et al., 1999; Lobenhofer et al., 2000). Darüber hinaus stimuliert auch mit *bovine serum albumin* (BSA) konjugiertes E₂, das impermeabel für Zellmembranen ist, die MAPK-Aktivität (Watters et al., 1997). Eine Erklärung für dieses Phänomen kommt von verschiedenen Studien, die die Existenz von Plasmamembran-assoziierten ERs beschreiben, (Karthikeyan und Thampan, 1996; Nadal et al., 1998; Razandi et al., 1999). Ein Teil der ER α -Population ist über Palmitoylierung in der Plasmamembran von E₂-Zielzellen lokalisiert (Acconcia et al., 2004). Palmitoylierung und Interaktion des ER α mit dem membranständigen Caveolin-1 wird in Anwesenheit von E₂ reduziert (Acconcia et al., 2005).

Auch der Anstieg von intrazellulärem cAMP durch Forskolin, ein direkter Aktivator der Adenylyl-Zyklase und 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX), ein PDE-Inhibitor, kann die ER α -Aktivität in der Abwesenheit von E₂ durch PKA-Phosphorylierung verstärken (Coleman et al., 2003). Die Kofaktoren p160 und CREB-*binding-protein* (CBP) stimulieren die cAMP-induzierte transkriptionelle Aktivität von ER α dabei zusätzlich (Shang et al., 2000; Coleman et al., 2003).

ERE-unabhängige Aktivierung durch ER α

Neben den beschriebenen Wegen der transkriptionellen Aktivierung, gibt es auch eine ERE-unabhängige Induktion von Genen durch ER α . Liganden-gebundener ER α aktiviert z.B. die Expression von IGF-1 und Kollagen über die Interaktion des Rezeptors mit dem aus Fos und Jun bestehenden Kofaktor AP-1 an AP-1-*responsive elements* der DNA (Abb. 1.6). Dabei ist offensichtlich die Interaktion der AF-1 und AF-2 Domänen von ER α mit den Kofaktor-Proteinen nötig für die Aktivierung des AP-1 *responsive element* (Kushner et al., 2000; Hall et al., 2001).

Nicht-genomische Effekte der Östrogene

Die beobachteten biologischen Effekte von E₂ in Knochen, Brustgewebe und Nervensystem, deuten darauf hin, dass Östrogen auch nicht-genomische Effekte vermittelt. Dies geschieht möglicherweise durch Östrogenrezeptor-Varianten, die an der Zelloberfläche vorkommen und mit intrazellulären Signaltransduktionsenzymen verknüpft sind (Abb. 1.6). Östrogenrezeptor und Membran-gebundene Tyrosinkinase-Signalwege sind offenbar miteinander verbunden, da gezeigt werden konnte, dass E₂ den MAPK-Signalweg aktivieren kann. Die physiologische Folge dieser Signalkaskade ist die Aktivierung von endothelialer NO-Synthase (Mendelsohn, 2000; Simoncini et al., 2000).

1.4 Rolle der PKA bei der Transkriptionskontrolle im Nukleus

Neben den drei beschriebenen Wegen die transkriptionelle Aktivität zu regulieren gibt es auch einen direkten Einfluss von PKA-Signalprozessen auf die Transkriptionskontrolle. Tatsächlich sind durch cAMP-vermittelte PKA-Signale in der Lage den Nukleus zu erreichen und dort zahlreiche Gene durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren zu regulieren. Die Zielgene werden entweder direkt durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren oder indirekt durch Hochregulierung von Transkriptionsfaktoren oder Modulatoren, die auf die Zielgene einwirken, reguliert (Selected papers from the 1st International Consultation on Prostate Cancer, 1996; Du und Montminy, 1998; Daniel et al., 1998; Mayr und Montminy, 2001). Der PKA-Signalweg in den Nukleus setzt den Kerneintritt von freien katalytischen Untereinheiten voraus. Der Eintritt des PKA-Holoenzym und von Dimeren der R-Untereinheiten wird normalerweise durch Größenausschluss verhindert

(Riabowol et al., 1988; Meinkoth et al., 1990; Solberg et al., 1994). Die katalytischen Untereinheiten gelangen über passive Diffusion in den Kern (Harootunian et al., 1993). Dort phosphorylieren sie Transkriptionsfaktoren wie z.B. das *cAMP-responsive element binding protein* (CREB) und stimulieren damit spezifisch die Transkription (Gonzalez et al., 1989; Gonzales und Montminy, 1989). Phospho-CREB wiederum rekrutiert den Kofaktor CBP zu dem *cAMP-responsive element* (CRE) des Zielpromotors (Chrivia et al., 1993). Die Genexpression wird schließlich aktiviert, indem CBP die Chromatinstruktur modifiziert und mit Faktoren der generellen Transkriptionsmaschinerie interagiert (Bannister und Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996; Nakajima et al., 1997).

Die Terminierung des Signals hingegen benötigt einen aktiven Mechanismus: Im Nukleus binden die katalytischen Untereinheiten an das hitzestabile PKI, wodurch die C-Untereinheiten inaktiviert werden. Gleichzeitig erfährt PKI eine Konformationsänderung, so dass ein Exportsignal präsentiert wird, das zum Export des C-PKI Komplexes aus dem Nukleus führt (Fantozzi et al., 1994; Wen et al., 1994; Wen et al., 1995a; Wen et al., 1995b).

Für RII α -Untereinheiten wurde gezeigt, dass ihre Bindung an das E1A_{12S} Oncoprotein des Adenovirus Typ 12 zu einer Translokation von RII α in den Nukleus führt, und dass diese in der Aktivierung eines CRE-Promotors involviert sind (Fax et al., 2001). In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass Ethanol die Translokation von RII β , aber nicht von RI-Untereinheiten oder C β , in den Nukleus von NG108-15 Zellen induziert (Constantinescu et al., 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass RII β und AKAP75 in Granulazellen des Cerebellums die cAMP-induzierte Transkription eines *lacZ*-Reportergens mit CRE-Promotor wesentlich stimulierte (Paolillo et al., 1998). Bei dieser Aktivierung der Transkription könnte AKAP75 über seine Bindungsstelle für regulatorische Untereinheiten die Translokation von RII β in den Kern vermitteln. Für die AKAP75-Spleißvariante AKAP45 konnte gezeigt werden, dass seine Expression in Thyroid-Zellen die Akkumulation von katalytischen PKA-Untereinheiten im Nukleus vermindert. Dies führt zu einer herabgesetzten Expression von cAMP-abhängigen Genen, einschließlich der Gene für RII β und in Folge der Abwesenheit von RII β zu einer Herabregulierung der Thyroid-spezifischen Genexpression (Felicciello et al., 1996)

1.5 Die Ht31-Spleißvariante Brx reguliert ER-Aktivität

Mittels *Western Blot* und Immunohistochemie konnte gezeigt werden, dass die AKAP-Ht31-Spleißvariante Brx in reproduktiven Östrogen-Zielgeweben exprimiert wird (Rubino et al., 1998). Brx besitzt neben seiner RhoGEF-Domäne noch eine weitere funktionelle Region, die in der Lage ist nukleare Hormonrezeptoren, einschließlich ER α und ER β , zu binden. Brx bindet über seinen C-Terminus spezifisch an ER α und ER β . Deren transkriptionelle Aktivierung durch Brx erfolgt nach dem Liganden-abhängigen Modell (s.o.) und kann durch ein Mitglied der Rho-Familie, Cdc24, spezifisch inhibiert werden (Rubino et al., 1998; Driggers et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass Brx in der Lage ist zytoplasmatische Signalwege in denen Rho-GTPasen und nukleare Hormonrezeptoren involviert sind, zu integrieren.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Verlauf dieser Arbeit sollte eine mögliche Interaktionen zwischen AKAP-Ht31/AKAP-Lbc, bzw. möglichen AKAP-Ht31-Spleißvarianten und ER α in immunbiologischen Studien in Brustdrüsenkrebszellen MCF-7 und ZR-75-1 untersucht werden. Dafür sollten zunächst Antikörper gegen AKAP-Ht31 und AKAP-Lbc in Kreuz-Immunpräzipitationsstudien getestet werden, um ihre Spezifität gegen AKAP-Ht31-Spleißvarianten zu charakterisieren. In weiteren Versuchen sollte dann mittels cAMP-Agarose-Präzipitation, Immunpräzipitation und RII-*overlay* ein potentieller AKAP-Ht31-ER α -Komplex nachgewiesen werden. In Immunfluoreszenzstudien sollte dann überprüft werden, ob ein solcher Komplex gegebenenfalls aus dem Zytosol in den Nukleus transloziert.

Um das bereits existierende 4,5 kb-Fragment des 3'-Endes von AKAP-Ht31 zu vervollständigen sollte eine humane Nieren Marathon Ready™ cDNA Bibliothek (Clontech, Heidelberg) verwendet werden, um daraus das fehlende 5'-Fragment von AKAP-Ht31 zu klonieren. Des weiteren sollten funktionelle Domänen von AKAP-Ht31 als GFP-Fusionsproteine hergestellt werden. Hierbei handelt es sich um die Pleckstrin- und Dbl-*homology* (DHPH) Domäne, die klassische (Ht-RII) und die nicht-kanonischen (zweite) Bindedomäne der PKA-RII-Untereinheiten (Ht-2.RII).