

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der AKAP-Ht31/AKAP-Lbc Antikörper

Zuerst wurden die Antikörper die gegen verschiedene Epitope von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc gerichtet sind in Ko-Präzipitationen eingesetzt, um heraus zu finden welche Detektionsmuster die Antikörper aufweisen. Gegen die N- und C-Termini von AKAP-Ht31 wurden insgesamt vier polyklonale Antiseren (Biogenes GmbH, Berlin) generiert (Abb. 3.4), um eine mögliche Rolle von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc oder Spleißvarianten des kodierenden Gens bei der Hormon-vermittelten Östrogen-Rezeptor Translokation in Brustkrebszellen zu untersuchen. Die polyklonalen Antikörper (pAk) N4 und 3060 binden im N-Terminus von AKAP-Ht31, pAk 1965 ist gegen ein Epitop im C-Terminus im Bereich der 2. RII-Bindungsstelle gerichtet und pAk DH bindet an die Dbl-homologe Region. Zusätzlich wurde ein Antikörper verwendet (Abb. 3.4), der von der Arbeitsgruppe von J. D. Scott generiert und zur Verfügung gestellt wurde. VO95 bindet im N-Terminus gegen ein 399-Aminosäuren Polypeptid. Die Epitope der Antikörper sind in Tab. 2.16 im Kapitel „Material und Methoden“ dargestellt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden zur Vereinfachung alle Antikörper, die gegen AKAP-Ht31 und AKAP-Lbc gerichtet sind, als anti-AKAP-Ht31-Antikörper bezeichnet, da diese Antikörper gegen Proteine gerichtet sind, die sehr wahrscheinlich Spleißvarianten des gleichen Gens darstellen. Die anti-AKAP-Ht31-Antikörper wurden zunächst in Kreuz-Immunpräzipitationsstudien eingesetzt, um ihre Spezifität gegen AKAP-Ht31-Spleißvarianten zu charakterisieren.

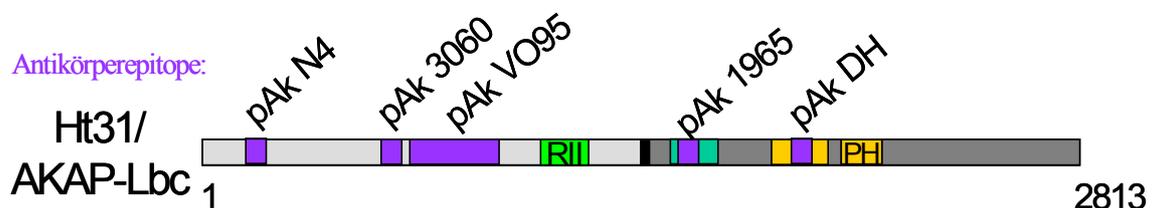


Abb. 3.4: Anti-AKAP-Ht31-Antikörper, die in Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz verwendet wurden. Schematische Darstellung der AKAP-Ht31-Epitope (violette Kästchen), gegen die die Antikörper gerichtet sind. pAk N4, 3060 und VO95 binden im N-Terminus von AKAP-Ht31. pAk 1965 ist gegen ein Epitop im Bereich der 2. RII-Bindungsstelle gerichtet. Das pAk DH-Epitop überlappt mit der Dbl-homologischen Region.

Immunpräzipitation von AKAP-Ht31-Spleißvarianten durch verschiedene anti-AKAP-Ht31-Antikörper

Die Antikörper 1965 und DH sind gegen Epitope gerichtet, die AKAP-Ht31 und Brx gemeinsam sind. Brx konnte in Lysaten der humanen Brustkrebszelllinien ZR-75-1 (Rubino et al., 1998) und MCF-7 (Abb. 3.5 A) nachgewiesen werden. Der anti-Brx-Antikörper detektiert in den Brustkrebszelllinien ZR-75-1 (schwach) und MCF-7 (deutlich) eine Bande bei 170 kDa. Dies entspricht dem Molekulargewicht von Brx. In den Lysaten der HEK-293-Zellen wurde wie erwartet kein Protein dieser Größe detektiert, da Brx in diesen Zellen nicht exprimiert wird. Die Zelllinie MCF-7 wurde ausgewählt, um zu testen, ob der Antikörper 1965 das Protein Brx und zusätzlich AKAP-Ht31/AKAP-Lbc (309 kDa) oder andere Spleißvarianten detektiert (Klussmann et al., 2001b).

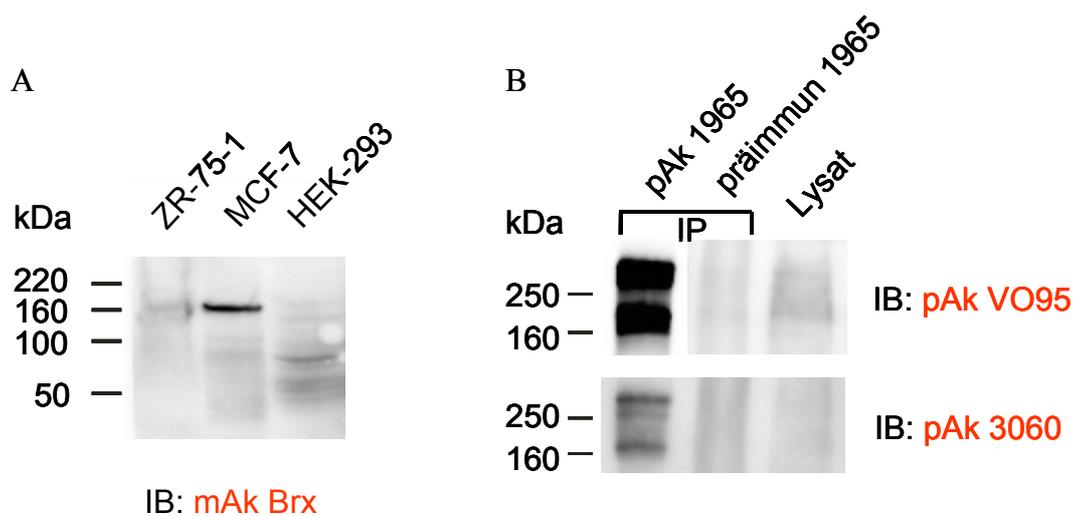


Abb. 3.5: Anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965 und anti-Brx-Antikörper detektieren Brx. **A:** Es wurden Lysate der Brustkrebszelllinien ZR-75-1 und MCF-7, sowie der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 hergestellt. Die Detektion erfolgte im *Western-Blot*-Verfahren mit einem anti-Brx-Antikörper. **B:** Es wurden Lysate der Brustkrebszelllinie MCF-7 hergestellt und eine Immunpräzipitation mit dem anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965 oder Präimmunsersum durchgeführt. Die Detektion von AKAP-Ht31-Varianten erfolgte im *Western-Blot*-Verfahren mit anderen anti-AKAP-Ht31-Antikörper. Es wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundäntikörper eingesetzt. Die Signale wurden mit dem *Lumi-light Western-Blot* Detektionssystem am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim) sichtbar gemacht.

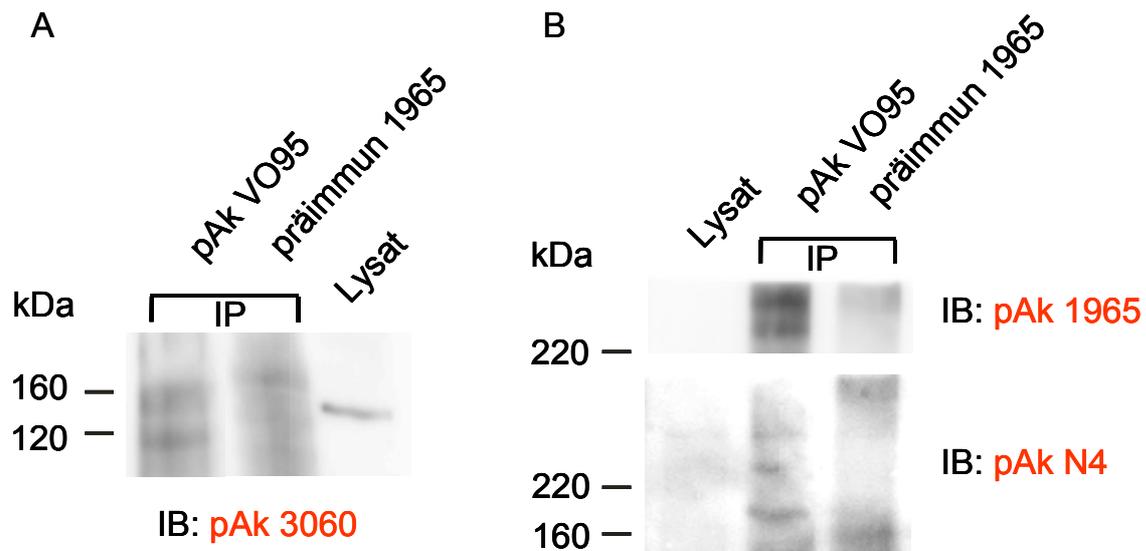


Abb. 3.6: Anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 immunpräzipitiert verschiedene AKAP-Ht31-Varianten aus MCF-7-Zellen. Es wurden Lysate der Brustkrebszelllinie MCF-7 hergestellt und eine Immunpräzipitation mit dem anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 durchgeführt. Die Detektion von AKAP-Ht31-Varianten erfolgte im *Western-Blot*-Verfahren mit den anti-AKAP-Ht31-Antikörpern 3060 (A), 1965 (B, oberes Bild) und N4 (B, unteres Bild). Zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurde mit Präimmunserum präzipitiert. Es wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Die Signale wurden mit dem *Lumi-light Western-Blot* Detektionssystem am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim) sichtbar gemacht.

Der anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965 immunpräzipitiert verschiedene AKAP-Ht31-Spleißvarianten aus MCF-7-Zellen (Abb. 3.5 B). Die Inkubation des Präzipitats im *Western Blot* mit den Antikörpern VO95 (Abb. 3.5 B, oberes Bild) und 3060 (Abb. 3.5 B, unteres Bild) zeigt für beide Antikörper das gleiche Bandenmuster: jeweils drei Banden bei 170 kDa, 250 kDa und >250 kDa. Die größte Bande ist möglicherweise das vollständige AKAP-Ht31 (309 kDa), die Bande bei 170 kDa vermutlich Brx. Bei 250 kDa-Protein könnte es sich auch um eine andere Spleißvarianten von AKAP-Ht31 oder aber um proteolytische Abbauprodukte vollständigen AKAP-Ht31-Variante handeln.

Als nächstes wurde eine Immunpräzipitation mit dem N-terminalen anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 durchgeführt. Im Kontrollansatz wurde das Präimmunserum 1965 verwendet, da das entsprechende Präimmunserum nicht zur Verfügung stand. Präimmunserum 1965 stammt, wie anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95, aus Kaninchen und dient somit als Kontrolle für den Sekundärantikörper POD-anti-Kaninchen.

Antikörper VO95 immunpräzipitiert verschiedene AKAP-Ht31-Varianten aus MCF-7-Zellen (Abb. 3.6). Detektion im *Western Blot* mit Antikörper 3060 zeigt zwei Banden bei 120 kDa und 160 kDa (Abb. 3.6 A). Im Präzipitat von VO95 detektieren die Antikörper 1965 (Abb. 3.6 B, oberes Bild) und N4 (Abb. 3.6 B, unteres Bild) je zwei Banden >220 kDa (möglicherweise die 250 kDa-Variante und 309 kDa-AKAP-Ht31). Antikörper N4 detektiert zusätzlich eine Bande bei 180 kDa. Bei der Vielzahl präzipitierter Banden kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich auch um proteolytische Abbauprodukte einer einzigen, großen AKAP-Ht31-Variante oder um die AKAP-Ht31-Spleißvarianten Brx oder proto-Lbc handelt.

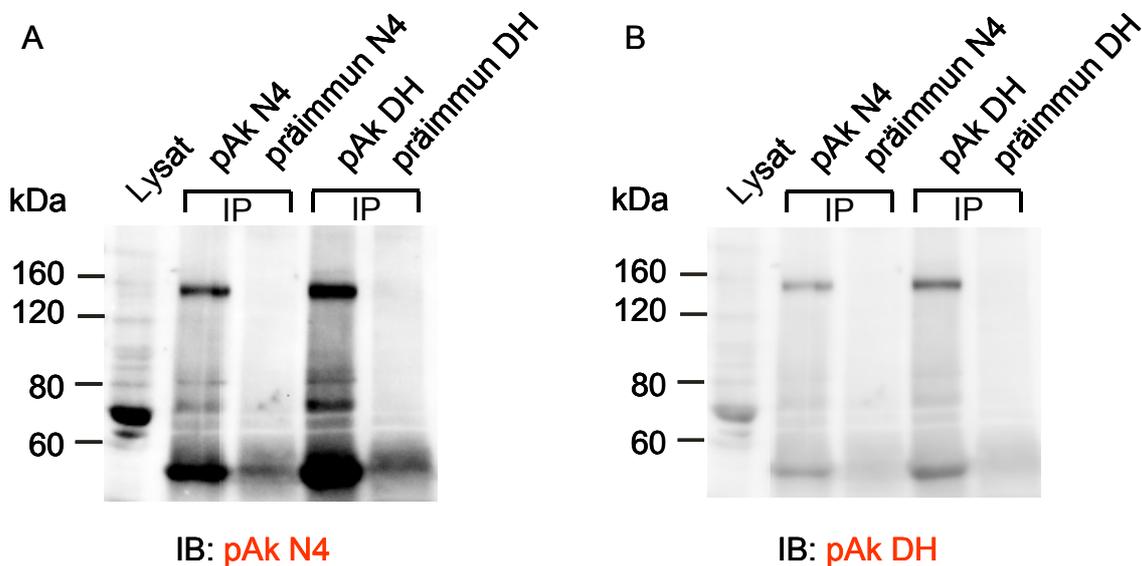


Abb. 3.7: Anti-AKAP-Ht31-Antikörper DH und N4 immunpräzipitieren verschiedene AKAP-Ht31-Varianten aus MCF-7-Zellen. Es wurden Lysate der Brustkrebszelllinie MCF-7 hergestellt und Immunpräzipitationen mit den anti-AKAP-Ht31-Antikörpern N4 und DH und entsprechendem Präimmunserum durchgeführt. Die Detektion von AKAP-Ht31-Varianten erfolgte im *Western-Blot*-Verfahren mit den anti-AKAP-Ht31-Antikörpern N4 (A) und DH (B). Es wurden Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Die Signale wurden mit dem *Lumi-light Western-Blot* Detektionssystem am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim) sichtbar gemacht.

Anschließend wurden Immunpräzipitationsstudien mit zwei weiteren anti-AKAP-Ht31-Antikörpern durchgeführt. Immunpräzipitation mit einem der beiden Antikörper DH (C-Terminus) oder N4 (N-Terminus) und anschließender *Western Blot* mit dem jeweils anderen Antikörper zeigt wiederum ein neues Bild von möglichen AKAP-Ht31-Spleißvarianten (Abb. 3.7). Die anti-AKAP-Ht31-Antikörper N4 und DH erkennen in den Immunpräzipitationen jeweils drei Banden bei 70 kDa, 80 kDa und 150 kDa. Hierbei handelt es sich entweder um AKAP-Ht31-Spleißvarianten oder um proteolytische Abbauprodukte.

Insgesamt konnten mit den sechs verschiedenen Antikörpern im *Western Blot* nach Immunpräzipitation bis zu neun mögliche Proteine detektiert werden (Tab. 3.1). Zum anderen wird deutlich, dass die gegen AKAP-Ht31 bzw. AKAP-Lbc generierten Antikörper nicht nur ein Protein erkennen, sondern verschiedene potentielle Spleißvarianten von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc und möglicherweise die vollständigen Proteine. Die Möglichkeit, dass es sich bei einigen dieser potentiellen Spleißvarianten um proteolytische Abbauprodukte einer größeren Variante handelt, ist nicht auszuschließen.

IP	Detektierte Banden (kDa)					
	WB: N4	WB: 3060	WB: VO95	WB: 1965	WB: DH	RII-overlay
N4					70 80 >250	80
VO95	180 >220 >>220	120 160		>220 >>220		80 >220 >>220
1965		170 250 >250	170 250 >250			>220 >>220
DH	70 80 >250					80

Tab. 3.1: Anti-AKAP-Ht31-Antikörper erkennen verschiedene AKAP-Ht31-Spleißvarianten in MCF-7 Zellen. Dargestellt sind die AKAP-Ht31-Spleißvarianten, die durch Immunpräzipitation mit einem Antikörper angereichert wurden und durch einen zweiten Antikörper im *Western Blot* (zweite bis sechste Spalte) oder im RII-overlay (siebte Spalte) nachgewiesen wurden. WB: *Western Blot*; >: geschätztes Molekulargewicht einer Bande nach *Western Blot*, die größer als höchster Proteinstandard ist; >>: geschätztes Molekulargewicht einer zweiten, größeren Bande.

Um aus dieser großen Anzahl von Proteinen die AKAP-Ht31-Spleißvariante zu finden, die möglicherweise mit ER α assoziiert ist, wurden cAMP- und Immunpräzipitationsstudien mit den oben aufgeführten anti-AKAP-Ht31-Antikörpern und anti-ER α -Antikörpern durchgeführt.

3.2 ER α interagiert mit AKAP-Ht31-Spleißvarianten

Die AKAP-Ht31-Spleißvariante Brx wird ausschließlich in den Testis und in Östrogen-sensitiven Geweben exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass Brx mit ER α interagiert (Rubino et al., 1998). In den folgenden Experimenten sollte herausgefunden werden, ob das vollständige AKAP-Ht31/AKAP-Lbc oder eine Spleißvariante einem möglichen Komplex mit PKA und ER α angehört. Die Präsenz der potentiellen zweiten RII-Bindungsdomäne von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc in einer solchen Spleißvariante könnte diesem Protein AKAP-Funktion vermitteln.

Dazu wurde zunächst eine cAMP-Agarose-Präzipitation aus Lysaten von MCF-7-Zellen durchgeführt. In der cAMP-Agarose-Präzipitation können AKAP-Proteine über die Interaktion der regulatorischen Untereinheiten mit cAMP-Agarose angereichert werden. Da AKAP-Proteine Bindungsstellen für regulatorische Untereinheiten der PKA besitzen, können theoretisch alle AKAP-Proteine und mit ihnen assoziierte Proteine auf diese Weise präzipitiert werden (Carr und Scott, 1992).

3.2.1 Präzipitation verschiedener AKAP-Proteine und ER α aus MCF-7-Zellen

Als Erstes wurden potentielle AKAP-Proteine in cAMP-Agarose-Präzipitaten mittels des RII-*overlay* detektiert. Abb. 3.8 A zeigt vier potentielle AKAP-Proteine der Größen 40 kDa, 60 kDa, 80 kDa und 160 kDa, wobei die 80 kDa-Bande am deutlichsten detektierbar ist.

In einem parallelen Ansatz (Abb. 3.8 B) wurde das cAMP-Agarose-Präzipitat nach einer Kopräzipitation von ER α untersucht. Die Detektion mit einem monoklonalen anti-ER α -Antikörper im *Western Blot* zeigt im Präzipitat und im Lysat eine Bande bei 67 kDa. Dies entspricht dem Molekulargewicht des nativen ER α . Die Spezifität der cAMP-Agarose-Präzipitation wird durch die Tatsache belegt, dass in der Kontrolle mit cAMP keine Bande

detektiert wurde. Die Präzipitation des ER α mit cAMP-Agarose erfolgt vermutlich über einen AKAP-PKA-Komplex, der im Folgenden genauer untersucht wurde.

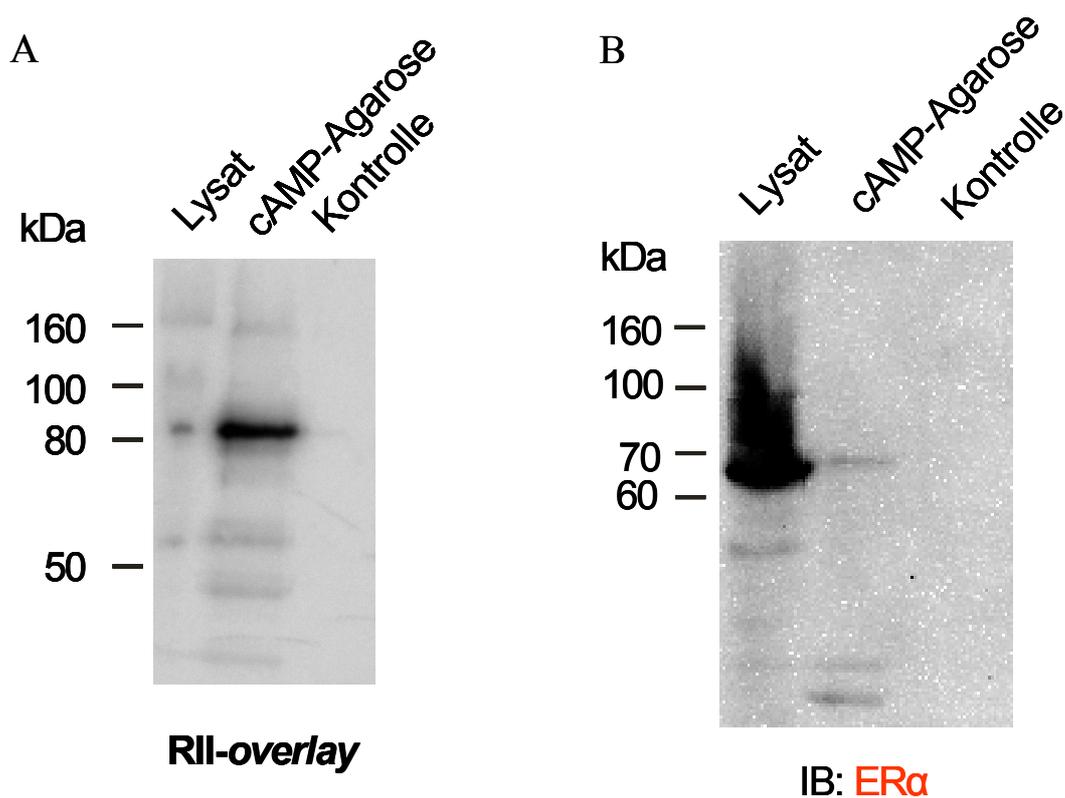


Abb. 3.8: Zyklische AMP-Agarose präzipitiert AKAP-Proteine und ER α aus MCF-7-Zellen. Es wurden Lysate der Brustkrebszelllinie MCF-7 hergestellt und eine cAMP-Agarose-Präzipitation durchgeführt. Vorinkubation der cAMP-Agarose mit cAMP diente als Kontrolle. **A:** Die Detektion präzipitierter AKAP-Proteine erfolgte durch RII-overlay. Die Signale wurden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. **B:** Die Detektion mit Anti-ER α -Antikörper ER-15 erfolgte im *Western-Blot*-Verfahren. Es wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Die Signale wurden mit dem *Lumi-light Western-Blot* Detektionssystem am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim) sichtbar gemacht.

3.2.2 AKAP-Ht31/AKAP-Lbc oder eine Spleißvariante interagiert mit dem ER α

Antikörper VO95 erkennt, wie in den Kreuz-Immunpräzipitationsstudien in Lysaten von Brustkrebszellen gezeigt (s.o.), neben AKAP-Lbc auch andere AKAP-Ht31-Spleißvarianten. Dieser Antikörper wurde eingesetzt, um AKAP-Ht31-Spleißvarianten und potentiell assoziierte Proteine (wie möglicherweise ER α) immunpräzipitieren. Hierfür wurden zunächst Lysate von MCF-7- und ZR-75-1-Zellen verwendet. Im Kontrollansatz wurde das Präimmunserum 1965 verwendet, da das entsprechende Präimmunserum nicht zur Verfügung stand (s.o.).

Detektion von ER α im *Western Blot* zeigte eine deutliche Bande bei 67 kDa nach Immunpräzipitation mit Antikörper VO95 (Abb. 3.9 A und B). In dem Ansatz mit MCF-7-Zellen ist nach Inkubation mit Präimmunserum 1965 bei 67 kDa eine schwache Bande zu erkennen, jedoch nicht in dem Ansatz mit ZR-75-1-Zellen. Dieses Ergebnis ist ein Indiz für die Interaktion einer AKAP-Ht31-Spleißvariante mit ER α .

Um diese AKAP-Ht31-Spleißvariante näher zu charakterisieren wurde eine weitere Immunpräzipitation aus Lysaten von MCF-7-Zellen durchgeführt und das Präzipitat im RII-*overlay* auf AKAP-Proteine hin untersucht. In Abb. 3.9 C ist zu erkennen, dass Antikörper VO95 eine Doppelbande >220 kDa immunpräzipitiert. Die obere der beiden Banden ist vermutlich das vollständige, 309 kDa große AKAP-Ht31 oder AKAP-Lbc. Dieser Befund zeigt, dass eine Interaktion zwischen AKAP-Ht31 oder AKAP-Lbc mit ER α *in vivo* stattfindet.

Um die mit anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren wurde anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965 eingesetzt. Auch von diesem Antikörper war bekannt, dass er verschiedene AKAP-Ht31-Spleißvarianten erkennt (Klussmann et al., 2001b). In den Kreuz-Immunpräzipitationsstudien in Lysaten von Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass Antikörper 1965 in der Lage ist neben AKAP-Ht31 auch andere AKAP-Ht31-Spleißvarianten immunpräzipitieren. In den folgenden Experimenten wurde Antikörper 1965 eingesetzt um AKAP-Ht31/AKAP-Lbc oder Spleißvarianten und mit diesen assoziierte Proteine zu präzipitieren (Abb. 3.10 A). Ein Nachweis von ER α nach Immunpräzipitation mit dem Antikörper 3060 war nicht möglich (Daten hier nicht gezeigt). Als Positivkontrolle und Negativkontrolle wurden in diesem Versuch die gleichen Präzipitationen durchgeführt, wie für anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 (s.o.).

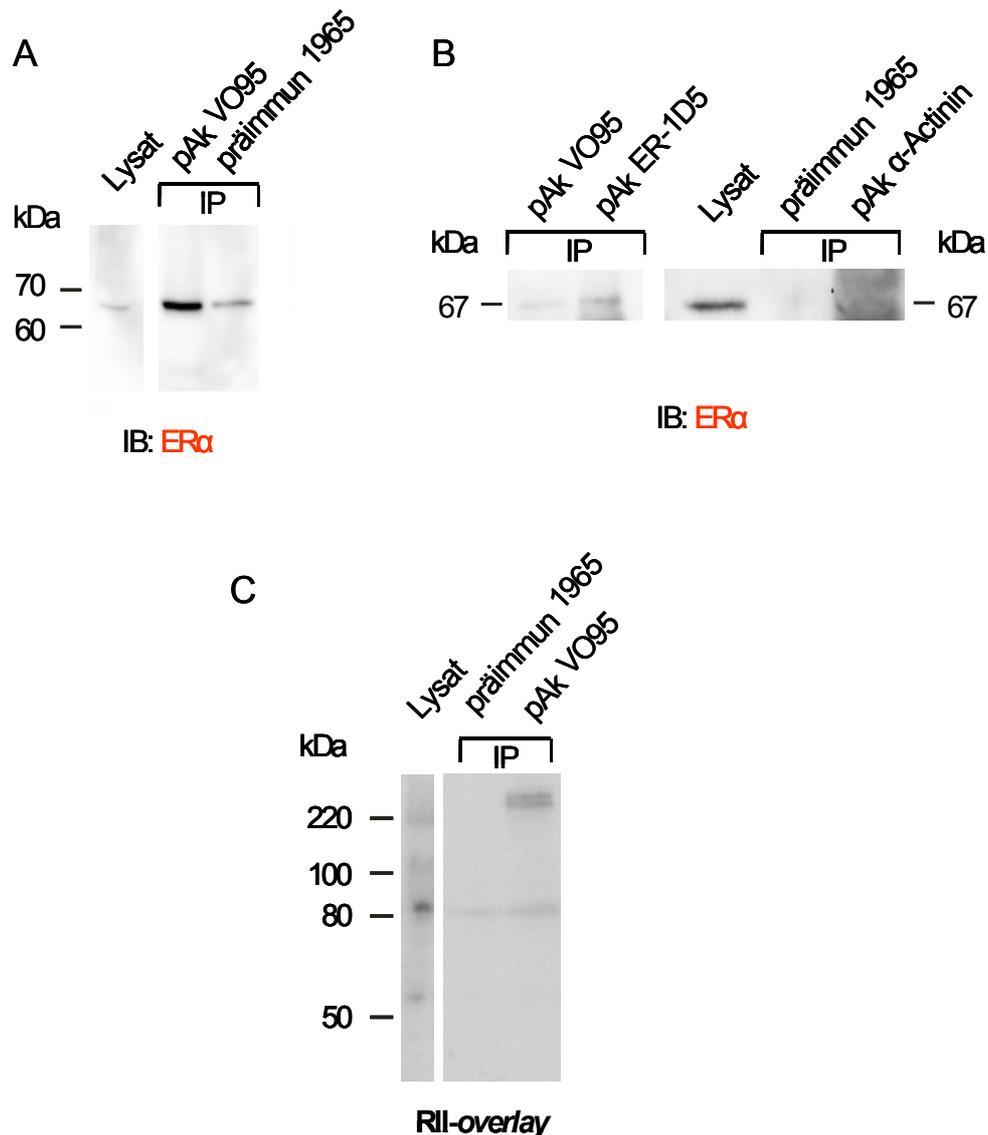


Abb. 3.9: Anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 immunpräzipitiert den ER α und vermutlich das vollständige AKAP-Ht31. A und B: Es wurden Lysate der Brustkrebszelllinien MCF-7 (A) und ZR-75-1 (B) hergestellt und eine Immunpräzipitation mit dem anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 und dem Präimmunserum 1965 durchgeführt. Die Detektion erfolgte im *Western-Blot*-Verfahren mit anti-ER α -Antikörper ER-15 (A) ER-10 (B). Immunpräzipitationen mit anti-ER α -Antikörper ER-1D5 diente als Positivkontrolle und mit anti-Aktinin-Antikörper als Negativkontrolle (B). Die Detektion erfolgte im *Western Blot* mit anti-ER α -Antikörper. Es wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Die Signale wurden mit dem *Lumi-light Western-Blot* Detektionssystem am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim) sichtbar gemacht. **C:** Es wurden Lysate der Brustkrebszelllinie MCF-7 hergestellt und Präzipitationen mit dem anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 und dem Präimmunserum 1965 durchgeführt. Die Detektion präzipitierter AKAP-Ht31-Varianten erfolgte durch RII-overlay. Die Signale wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Der Darstellung der Ergebnisse liegt jeweils (A, B und C) eine Membran zugrunde, die aus Gründen der Darstellung graphisch bearbeitet wurde.

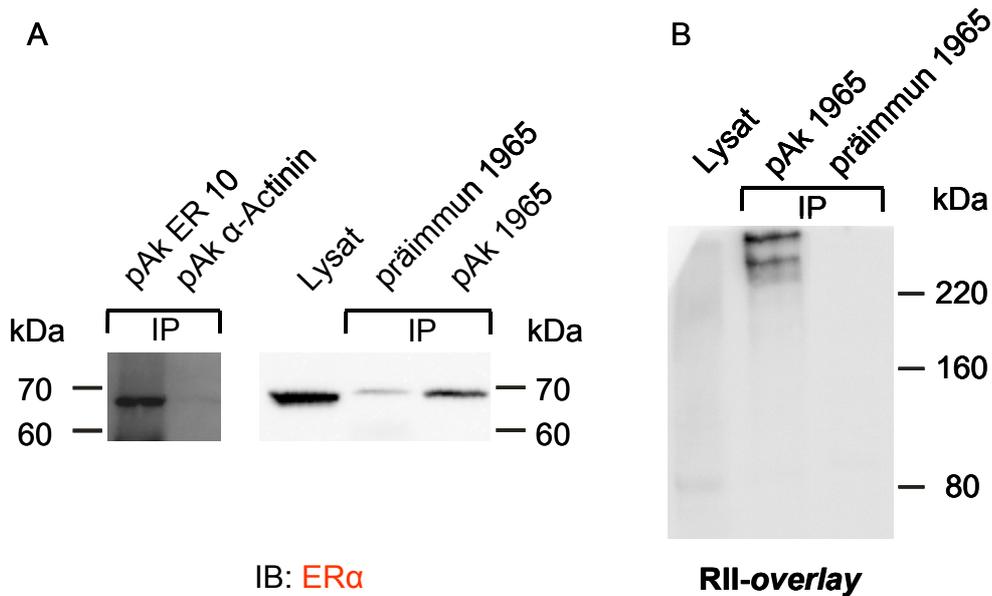


Abb. 3.10: Anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965 immunpräzipitiert vermutlich das vollständige AKAP-Ht31 und ER α aus MCF-7-Zellen. A und B: Es wurden Lysate der Brustkrebszelllinie MCF-7 hergestellt und eine Immunpräzipitation mit anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965 und Präimmunsereum 1965 durchgeführt. **A:** Immunpräzipitationen mit anti-ER α -Antikörper ER-15 diente als Positivkontrolle und mit anti-Aktinin-Antikörper als Negativkontrolle. Die Detektion erfolgte im *Western-Blot*-Verfahren mit anti-ER α -Antikörper ER-15. Es wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Die Signale wurden mit dem *Lumi-light Western-Blot* Detektionssystem am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim) sichtbar gemacht. Der Darstellung der Ergebnisse liegt eine Membran zugrunde. **B:** Die Detektion präzipitierter AKAP-Ht31-Varianten erfolgte durch RII-*overlay*. Die Signale wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

ER α interagiert möglicherweise mit einer AKAP-Ht31-Spleißvariante, die von Antikörper 1965 erkannt wird. Die Detektion der Proteine in dem Präzipitat mit anti-ER α -Antikörper im *Western Blot* zeigte eine deutliche Bande bei 67 kDa nach Immunpräzipitation mit Antikörper 1965 und in der Positivkontrolle. Allerdings ist auch im Präimmunsereum 1965 in dieser Höhe eine schwache Bande zu erkennen.

Um auch diese AKAP-Ht31-Spleißvariante näher zu charakterisieren wurde so verfahren, wie bereits für den Antikörper VO95 beschrieben (s.o.). Eine weitere Immunpräzipitation aus

Lysaten von MCF-7-Zellen mit dem Antikörper 1965 wurde durchgeführt, um das Präzipitat im RII-*overlay* auf das Vorhandensein von AKAP-Proteinen zu untersuchen (Abb. 3.10 B). Der Antikörper immunpräzipitiert auch hier eine Doppelbande >220 kDa. Die obere der beiden Banden ist auch diesmal vermutlich das vollständige AKAP-Ht31 oder AKAP-Lbc. Diese AKAP-Ht31-Spleißvariante ist in der Lage mit ER α *in vivo* zu interagieren.

Die Ergebnisse, die mit den Antikörpern 1965 und VO95 in den Immunpräzipitationsstudien und im RII-*overlay* erzielt wurden, deuten darauf hin, dass ER α möglicherweise mit zumindest einer AKAP-Ht31-Spleißvariante interagiert. Dabei kann es sich sowohl um das vollständige AKAP-Ht31 oder AKAP-Lbc, als auch um eine kürzere Variante, wie z.B. Brx handeln.

3.2.3 Eine kleine AKAP-Ht31-Spleißvariante interagiert vermutlich mit ER α

In den Ko-Präzipitationen mit anti-AKAP-Ht31-Antikörpern wurde gezeigt, dass die anti-AKAP-Ht31-Antikörper N4 und DH die gleichen AKAP-Ht31-Spleißvarianten detektieren (siehe Abb. 3.7). Die Verwendung dieser Antikörper in einer Immunpräzipitation und anschließender Detektion des ER α zeigte, dass vermutlich eine AKAP-Ht31-Spleißvariante mit ER α interagiert (Abb. 3.11 A und B). Die Detektion des ER α erfolgte mit zwei verschiedenen anti-ER α -Antikörpern, mAk ER-10 (Abb. 3.11 A) und mAk ER-15 (Abb. 3.11 B). Die Positiv- und Negativkontrollen wurden wie für die anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 und 1965 beschrieben durchgeführt (s.o.). Eine Immunpräzipitation mit anti-ER α -Antikörper ER-15 diente als Positivkontrolle. Als Kontrollansatz für die Maus-generierten anti-ER α -Antikörper wurde auch hier eine Immunpräzipitation mit dem Muskel-spezifischen, Maus-generierten anti-Aktinin-Antikörper durchgeführt, da das entsprechende Präimmenserum nicht zur Verfügung stand.

Zur näheren Charakterisierung dieser AKAP-Ht31-Spleißvariante wurde eine Immunpräzipitation aus Lysaten von MCF-7-Zellen mit den Antikörpern DH und N4 durchgeführt und das Präzipitat im RII-*overlay* auf AKAP-Proteine hin untersucht (Abb. 3.11 C und D). Antikörper DH (Bild A) und N4 (Bild B) immunpräzipitieren beide eine Bande bei 80 kDa.

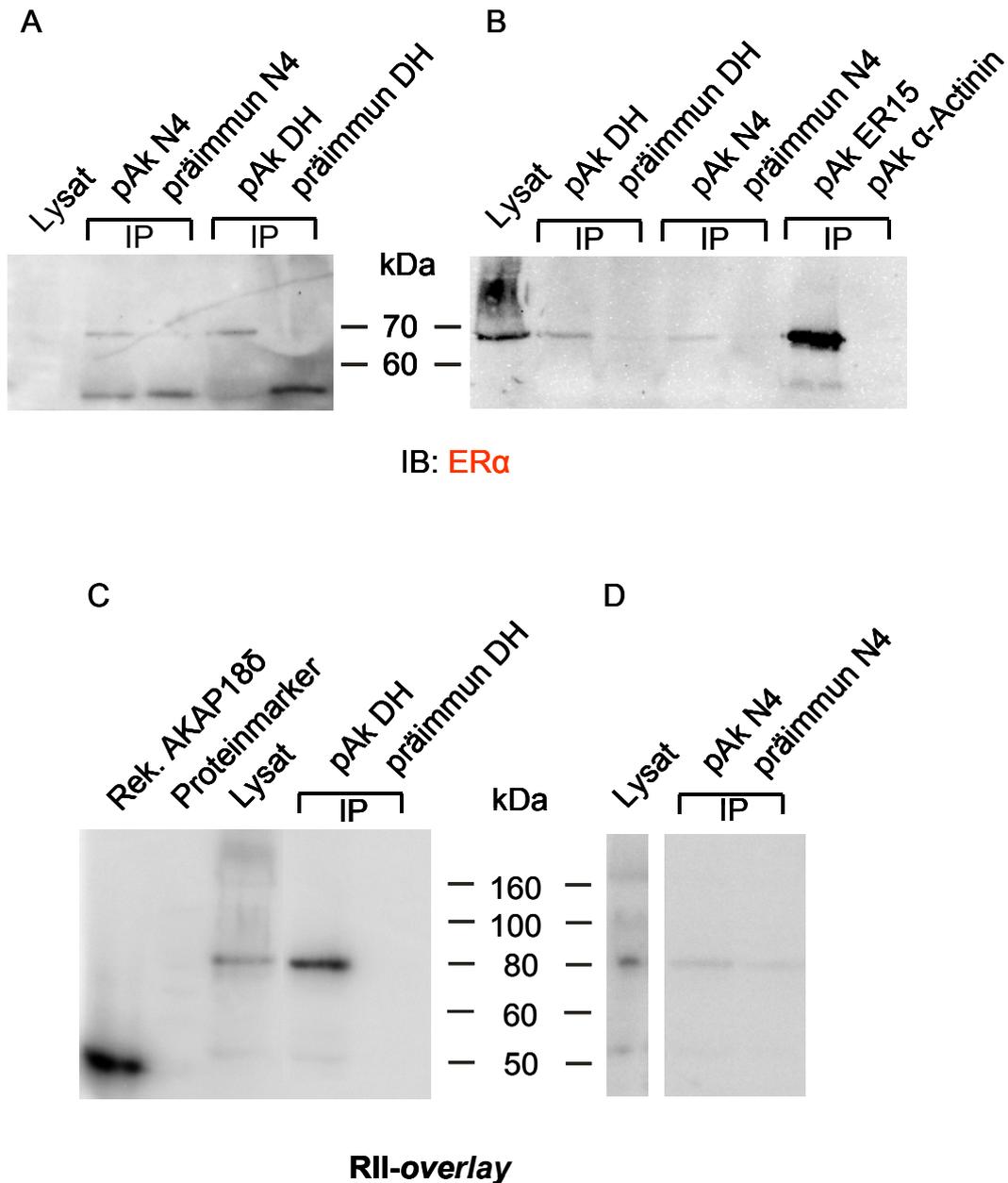


Abb. 3.11: Anti-AKAP-Ht31-Antikörper DH und N4 immunpräzipitieren eine 80 kDa große AKAP-Ht31-Variante und den ER α aus MCF-7-Zellen. Es wurden Lysate der Brustkrebszelllinie MCF-7 hergestellt und Immunpräzipitationen mit den anti-AKAP-Ht31-Antikörpern N4 und DH und entsprechendem Präimmunsereum durchgeführt. **A und B:** Detektion erfolgte im *Western-Blot*-Verfahren mit anti-ER α -Antikörper ER-10 (**A**) und ER-15 (**B**). Immunpräzipitationen mit dem anti-ER α -Antikörper ER-15 diente als Positivkontrolle und mit dem anti-Aktinin-Antikörper als Negativkontrolle (**B**). Es wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Die Signale wurden mit dem *Lumi-light Western-Blot* Detektionssystem am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim) sichtbar gemacht. **C und D:** Die Detektion erfolgte durch RII-overlay. Rekombinantes AKAP188 ist als Positiv-Kontrolle aufgetragen. Die Signale wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Der Darstellung der Ergebnisse in **D** liegt eine Membran zugrunde, die aus Gründen der Darstellung graphisch bearbeitet wurde.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine weitere, kleine, 80 kDa-Variante von AKAP-Ht31 existiert, die auch als AKAP fungiert und möglicherweise mit ER α *in vivo* interagiert. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um proteolytische Abbauprodukte einer großen Variante handelt.

3.3 Lokalisation von ER α und potentiellen Interaktionspartnern

In den biochemischen Experimenten wurden Interaktionen von ER α mit AKAP-Ht31/AKAP-Lbc bzw. einer AKAP-Ht31-Spleißvariante nachgewiesen. In untransfizierten und mit AKAP-Lbc-GFP transfizierten MCF-7-Zellen sollte nun eine Kolo­kalisierung der potentiell beteiligten Proteine mittels Immunfluoreszenzstudien visualisiert werden. Hierzu wurden die Zellen entweder mit 17- β -Estradiol (E₂) stimuliert oder unbehandelt gelassen.

3.3.1 ER α transloziert nach Stimulation aus dem Zytosol in den Nukleus

Zuerst wurde in MCF-7-Zellen die Translokation von ER α mit dem anti-ER α -Antikörper ER-10 in Immunfluoreszenzstudien vor und nach Behandlung mit E₂ nachgewiesen (Abb. 3.12). Es konnte gezeigt werden, dass ER α in unstimulierten Zellen (Abb. 3.12, obere Reihe) im Zytosol lokalisiert ist, während sich der Rezeptor nach E₂-Behandlung (Abb. 3.12, untere Reihe) hauptsächlich im Nukleus der Zellen befindet.

Abb. 3.13 zeigt ein Kontrollexperiment für die cy3-konjugierten anti-Maus- und cy5-konjugierten anti-Kaninchen-Sekundärantikörper alleine, in unstimulierten (Abb. 3.13, obere Reihe) und in mit E₂ behandelten (Abb. 3.13, untere Reihe) MCF-7-Zellen. Das Immunfluoreszenzbild zeigt, dass die Sekundärantikörper in Abwesenheit der Primärantikörper keine Strukturen erkennen.

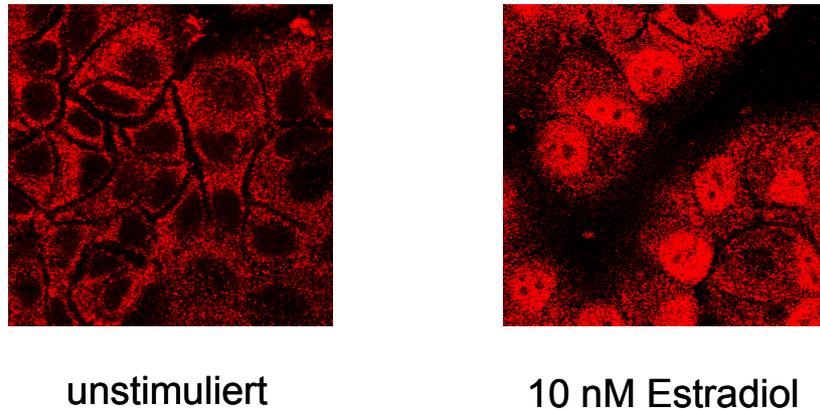
IF: ER α 

Abb. 3.12: ER α transloziert nach Stimulation aus dem Zytosol in den Nukleus. MCF-7-Zellen wurden in Phenolrot-freiem DMEM-Kulturmedium mit *charcoal-stripped* FCS kultiviert. 16 Stunden vor der Stimulation wurden die Zellen in Serum-freies DMEM-Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 10 nM E₂ für 30 min stimuliert oder unstimuliert weiter verwendet. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti-ER α Antikörper und cy3-konjugiertem anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert. ER α Immunfluoreszenz wurde durch Epifluoreszenz-Mikroskopie detektiert.

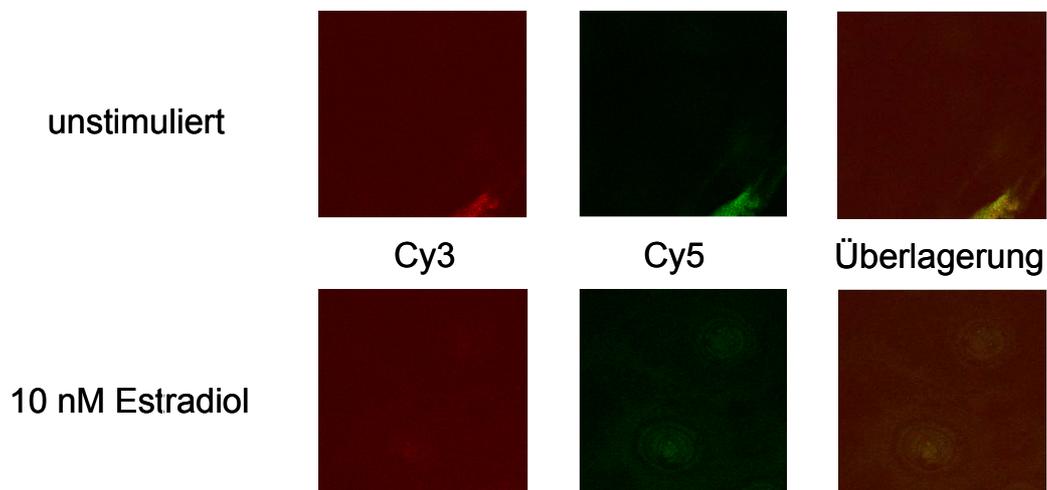


Abb. 3.13: Kontroll-Färbung von sAk Cy3 und Cy5 alleine in unstimulierten und stimulierten MCF-7-Zellen. MCF-7-Zellen wurden in Phenolrot-freiem DMEM-Kulturmedium mit *charcoal-stripped* FCS kultiviert. 16 Stunden vor der Stimulation wurden die Zellen in Serum-freies DMEM-Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 10 nM E₂ für 30 min stimuliert oder unstimuliert weiter verwendet. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und nur mit cy3-konjugiertem anti-Maus-Sekundärantikörper und cy5-konjugiertem anti-Kaninchen-Sekundärantikörper inkubiert. Immunfluoreszenz wurde durch Epifluoreszenz-Mikroskopie detektiert.

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

Es wurden Ko-Färbungen mit dem anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 (Abb. 3.14) und dem anti-ER α -Antikörper ER-10 in MCF-7-Zellen durchgeführt. In dem Experiment mit diesem anti-AKAP-Ht31-Antikörper ist zu erkennen, dass AKAP-Ht31/AKAP-Lbc in unstimulierten Zellen (Abb. 3.14, obere Reihe) mit ER α kolokalisiert. Nach Stimulation transloziert AKAP-Ht31/AKAP-Lbc allerdings nicht mit ER α in den Nukleus (Abb. 3.14, untere Reihe).

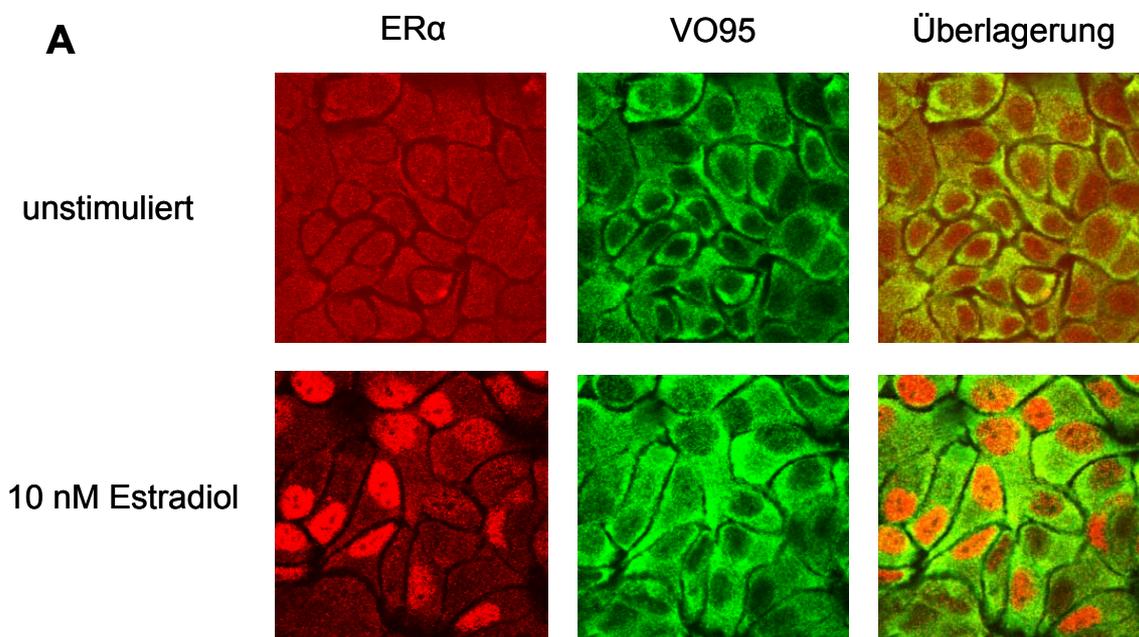


Abb. 3.14: AKAP-Ht31/AKAP-Lbc kotransloziert nach Stimulation nicht mit ER α in den Kern. MCF-7-Zellen wurden in Phenolrot-freiem DMEM-Kulturmedium mit *charcoal-stripped* FKS kultiviert. 16 Stunden vor der Stimulation wurden die Zellen in Serum-freies DMEM-Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 10 nM E₂ für 30 min stimuliert oder unstimuliert weiter verwendet. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit anti-ER α -Antikörper und cy3-konjugiertem anti-Maus-Sekundärantikörper und anti-AKAP-Ht31-Antikörper VO95 und cy5-konjugiertem anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern inkubiert. ER α und AKAP-Ht31 Immunfluoreszenz wurden durch Epifluoreszenz-Mikroskopie detektiert.

Daraufhin wurde AKAP-Lbc-GFP in MCF-7-Zellen überexprimiert und seine Lokalisation anhand des GFP-Signals festgestellt. ER α wurde, wie bereits beschrieben, in Immunfluoreszenzstudien mit dem anti-ER α -Antikörper ER-10 und cy3-konjugierten anti-Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen. In unstimulierten MCF-7-Zellen sieht man eine Kolo-kalisation von AKAP-Lbc-GFP und ER α (Abb. 3.15, untere Reihe). Nach Stimulation jedoch transloziert auch überexprimiertes AKAP-Lbc-GFP nicht mit ER α in den Nukleus (Abb. 3.15, obere Reihe).

Dies bestätigt den Befund mit dem Antikörper VO95, dass keine Ko-Translokation von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc und ER α in MCF-7-Zellen nach Stimulation mit E₂ stattfindet.

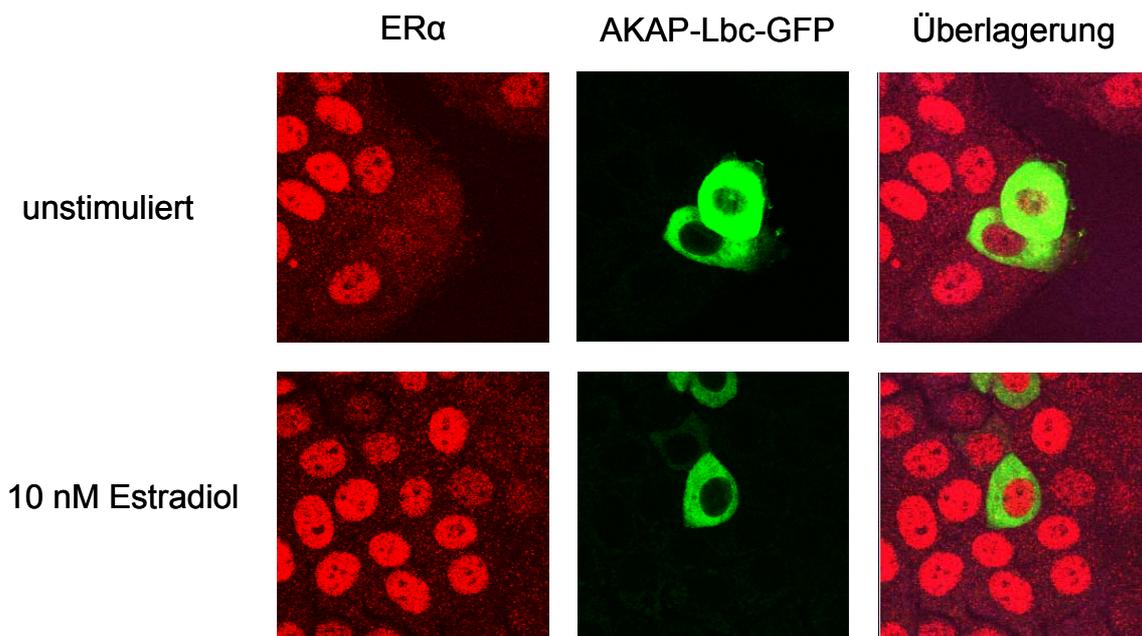


Abb. 3.15: Transfiziertes AKAP-Ht31/AKAP-Lbc kotransloziert nach Stimulation nicht mit ER α in den Kern. MCF-7-Zellen wurden in Phenolrot-freiem DMEM-Kulturmedium mit *charcoal-stripped* FCS kultiviert und mit AKAP-Lbc-GFP-Plasmid transfiziert. 16 Stunden vor der Behandlung wurden die Zellen in Serum-freies DMEM-Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 10 nM E₂ für 30 min stimuliert oder unstimuliert weiter verwendet. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit anti-ER α -Antikörper und cy3-konjugiertem anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert. ER α Immunfluoreszenz und GFP-Fluoreszenz wurden durch Epifluoreszenz-Mikroskopie detektiert.

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

In den biochemischen Präzipitationsexperimenten konnte zum einen gezeigt werden, dass die anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965 und 3060 vermutlich das vollständige AKAP-Ht31 (309 kDa) und eine kleinere >220 kDa-Variante aus MCF-7-Zellen präzipitieren. Zum anderen konnten starke Hinweise für eine Kopräzipitation von ER α mit Antikörper 1965 im *Western Blot* gefunden werden. Daher wurden Ko-Färbungen mit den anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965 (Abb. 3.16 A) und 3060 (Abb. 3.16 B) und dem anti-ER α -Antikörper ER-10 in MCF-7-Zellen durchgeführt. Aus den Bildern der beiden Versuchsreihen ist zu entnehmen, dass die detektierte AKAP-Ht31-Spleißvariante in unstimulierten Zellen (Abb. E16 A und B, obere Reihe) mit ER α kolokalisiert. Nach Stimulation transloziert diese AKAP-Ht31 Variante mit ER α in den Nukleus (Abb. E16 A und B, mittlere Reihe).

In den Kontrollexperimenten wurden die Antikörper für 30 Minuten mit ihren entsprechenden Peptiden vorinkubiert (Abb. 3.14 A und B, untere Reihe). Da die Signale in den Kontrollexperimenten im Vergleich zu den Antikörper-Signalen jedoch nicht vollständig reduziert sind, ist dieser Versuch nur bedingt aussagekräftig.

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

In den biochemischen Präzipitationsstudien wurde ebenfalls gezeigt, dass eine kleinere, vermutlich eine 80 kDa-Variante von AKAP-Ht31 ebenfalls mit ER α interagiert. Deshalb wurden die anti-AKAP-Ht31-Antikörper DH (Abb. 3.17 A) und N4 (Abb. 3.17 B), die diese 80 kDa große AKAP-Ht31-Variante präzipitieren, in Ko-Färbungen in MCF-7-Zellen eingesetzt. Beide detektieren in unstimulierten Zellen eine AKAP-Ht31-Spleißvariante, die offenbar mit ER α kolokalisiert ist (Abb. 3.17 A und B, obere Reihe). Nach Stimulation transloziert diese AKAP-Ht31 Variante mit ER α in den Nukleus (Abb. 3.17 A und B, mittlere Reihe). Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass die beiden Antikörper auch das vollständige AKAP-Ht31 erkennen.

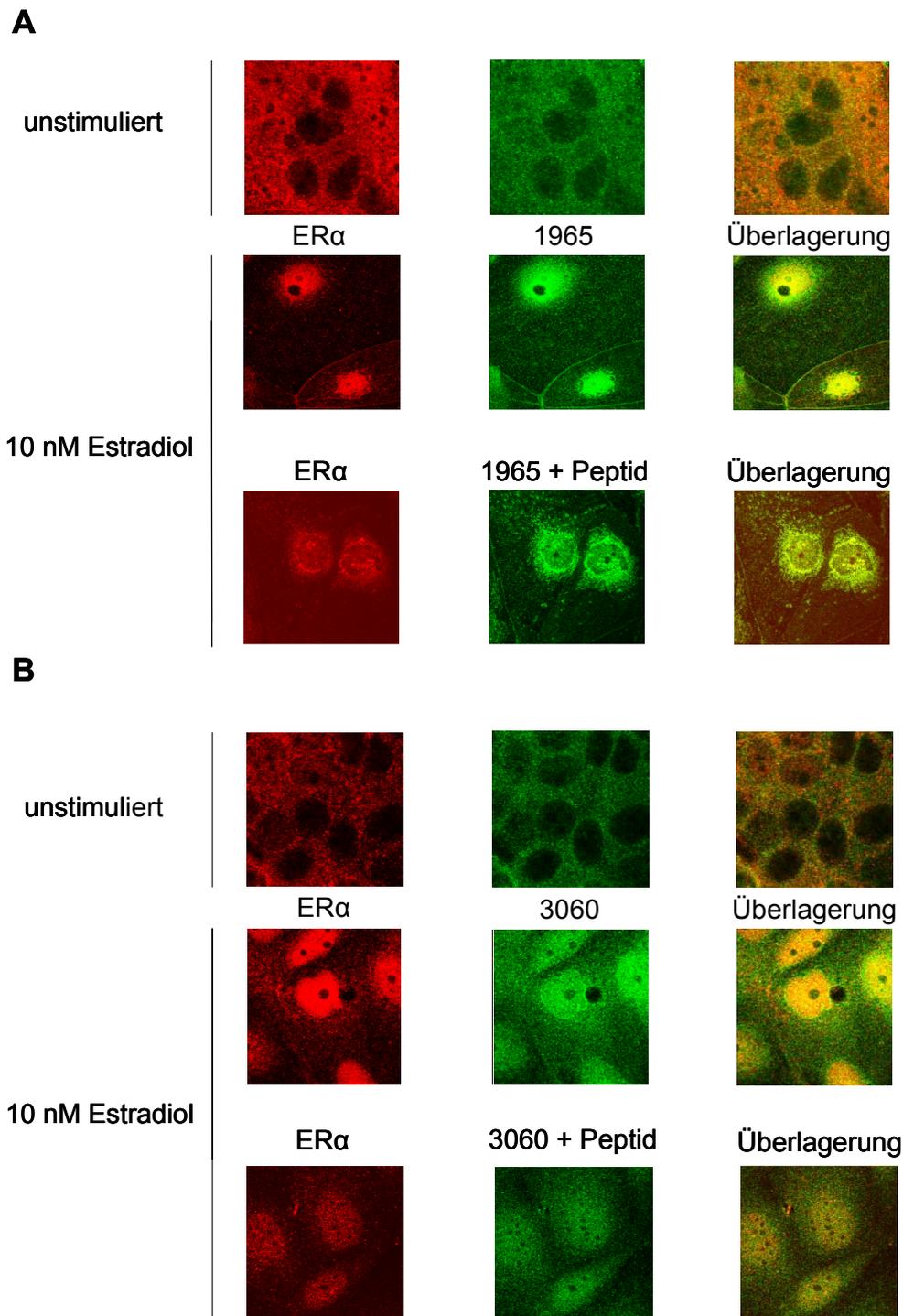


Abb. 3.16: Ko-Translokation von ERα und (einer) AKAP-Ht31-Variante(n). MCF-7-Zellen wurden in Phenolrot-freiem DMEM-Kulturmedium mit *charcoal-stripped* FCS kultiviert. 16 Stunden vor der Stimulation wurden die Zellen in Serum-freies DMEM-Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 10 nM E₂ für 30 min stimuliert oder unstimuliert weiter verwendet. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit anti-ERα-Antikörper und cy3-konjugiertem anti-Maus-Sekundärantikörper und mit anti-AKAP-Ht31-Antikörpern 1965 (A) oder 3060 (B) und cy5-konjugiertem anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern inkubiert. Kontrollen: anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965 und 3060 wurden für 30 Minuten mit ihren entsprechenden Peptiden vorinkubiert. ERα und AKAP-Ht31 Immunfluoreszenz wurden durch Epifluoreszenz-Mikroskopie detektiert.

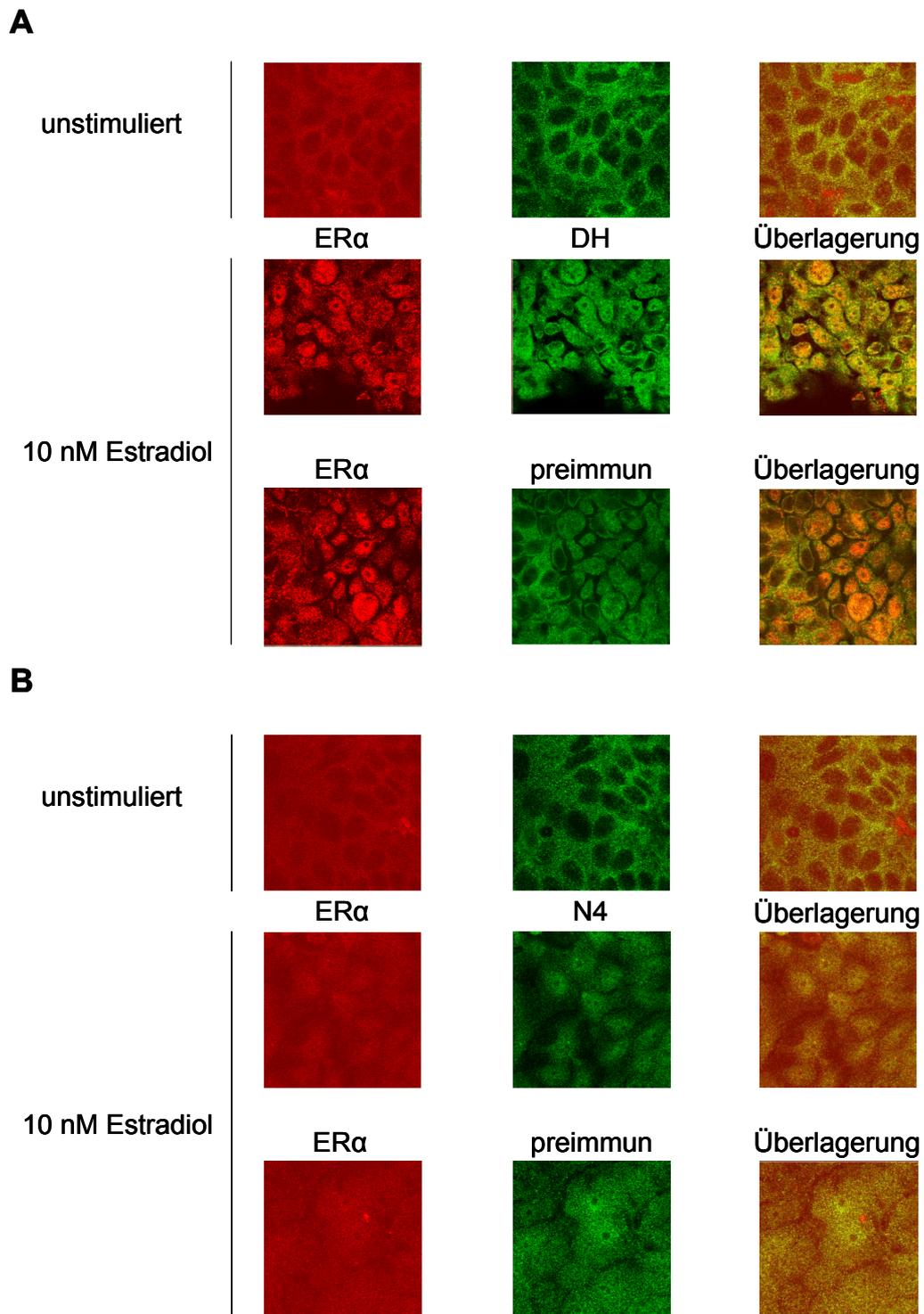


Abb. 3.17: Ko-Translokation von ER α und (einer) AKAP-Ht31-Variante(n). MCF-7-Zellen wurden in Phenolrot-freiem DMEM-Kulturmedium mit *charcoal-stripped* FCS kultiviert. 16 Stunden vor der Stimulation wurden die Zellen in Serum-freies DMEM-Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 10 nM E₂ für 30 min stimuliert oder unstimuliert weiter verwendet. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit anti-ER α -Antikörper und cy3-konjugiertem anti-Maus-Sekundärantikörper und mit anti-AKAP-Ht31-Antikörpern N4 (A) oder DH (B) und cy5-konjugiertem anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern inkubiert. Kontrollen: An Stelle der Antikörper wurde das entsprechende Präimmunserum verwendet. ER α und AKAP-Ht31 Immunfluoreszenz wurden durch Epifluoreszenz-Mikroskopie detektiert.

In den Kontrollexperimenten wurden an Stelle der anti-Ht31-Antikörper das entsprechende Präimmenserum verwendet (Abb. 3.17 A und B, untere Reihe). Die Signale der stimulierten Zellen in den Kontrollexperimenten ist im Vergleich zu der Detektion mit anti-Ht31-Antikörpern nur geringfügig schwächer. Daher sind auch die hier erhaltenen Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig.

3.4 Klonierung des 5'-Endes von AKAP-Ht31

Von AKAP-Ht31 war bisher nur ein 4,5 kb-Fragment des 3'-Endes der cDNA mit einem Stopkodon an dessen 3'-Ende kloniert worden (Klussmann et al. 2001b). Um das fehlende 5'-Ende inklusive Startkodon der cDNA von AKAP-Ht31 zu erhalten, wurde eine humane Nieren Marathon Ready™ cDNA Bank (Clontech, Heidelberg) verwendet. Über RACE- und anschließender *nested*-PCR konnten 5214 bp des N-Terminus von AKAP-Ht31 kloniert werden.

Die RACE-PCR wurde mit dem 5' Primer Ht-st-gsp1 und dem 3' Primer Ht-3-5310-5336 durchgeführt. Die damit gewonnene cDNA wurde anschließend in einer zweiten, *nested*-PCR mit 5' Primer NtermfwX und 3' Primer Ht-3-5225-5251 erneut amplifiziert.

Im Anschluss an diese beiden Amplifizierungen konnte ein DNA-Fragment größer 5 kb nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Dieses Fragment wurde anschließend über TA-Klonierung in den Vektor pTOPO® XL kloniert. Die Sequenzanalyse des Klons zeigte, dass es sich bei dem gewonnenen Fragment um den N-Terminus (1735 Aminosäuren) von AKAP-Ht31 handelt.

Das klonierte 5'-AKAP-Ht31-Fragment ist in Abb. 3.2 schematisch dargestellt. Die Sequenzen der 5' und 3' Klone überlappen im Bereich des Übergangs von N-Terminus zu C-Terminus, so dass aus diesen beiden Fragmenten das vollständige AKAP-Ht31 konstruiert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies nicht durchgeführt, da für weitere Arbeiten das Konstrukt AKAP-Lbc-GFP aus der Arbeitsgruppe von J. D. Scott (Vollum Institute, Portland, USA) zur Verfügung gestellt wurde.

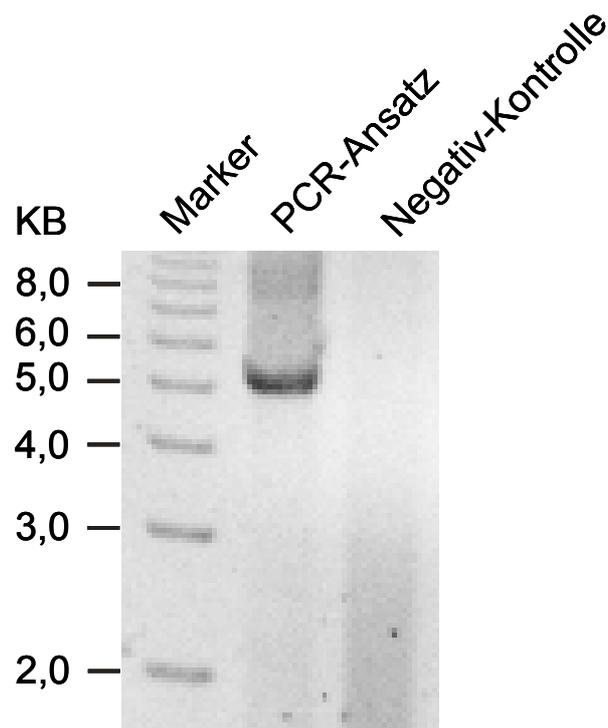


Abb. 3.1: Amplifizierung des 5' Endes von AKAP-Ht31 (5.2 kb-Fragment) durch PCR. Die Fragmente wurden aus einer cDNA-Bibliothek über RACE- und anschließender *nested*-PCR amplifiziert. Von dem 50 μ l PCR-Ansatz wurden zur Kontrolle 5 μ l auf ein 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Fragmente wurden in Gegenwart von EtBr im Gel aufgetrennt und anschließend am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim) durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Die Sequenzen von AKAP-Ht31 und AKAP-Lbc sind zu 99% identisch. Die Unterschiede betreffen kurze C-terminale Sequenzabschnitte. Der AKAP-Ht31 entspricht bis auf die ersten vier Aminosäuren der AKAP-Ht31-Spleißvariante Brx, der C-Terminus von AKAP-Lbc hingegen dem der AKAP-Ht31-Spleißvariante proto-Lbc (siehe „Einleitung“, Abb. 1.4; Klusmann et al., 2001b; Diviani et al., 2001). Im weiteren Verlauf wird aufgrund der großen Sequenzübereinstimmung die Benennung AKAP-Ht31/AKAP-Lbc verwendet, sofern nicht explizit auf eine der beiden Varianten Bezug genommen wird.

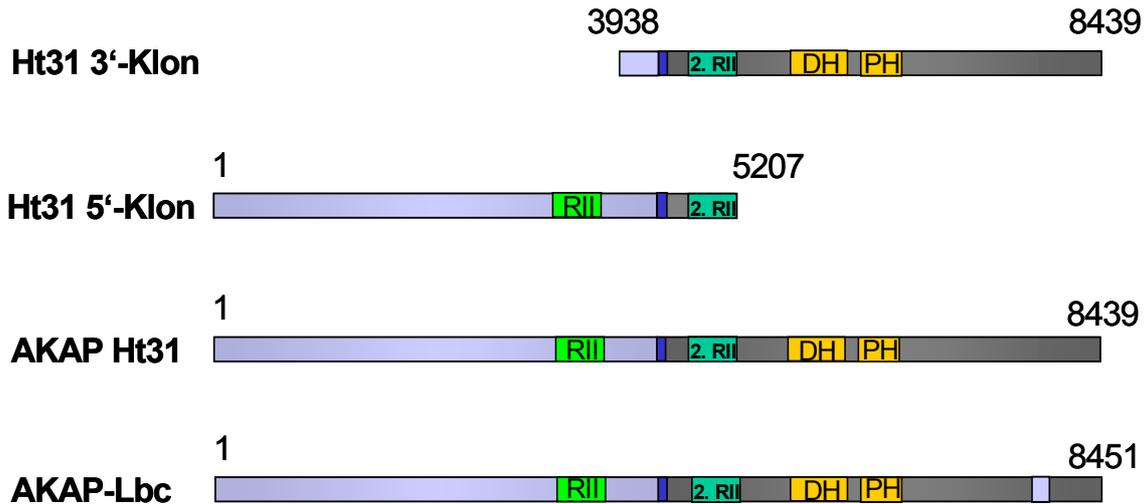


Abb. 3.2: Schematische Darstellung (Nummerierung der cDNA) von AKAP-Ht31, AKAP-Lbc und der klonierten AKAP-Ht31-Fragmente. Charakteristische Domänen sind durch Kästchen markiert. Identische Aminosäuren sind durch gleiche Farben dargestellt. RII, RII-Bindungsdomäne. 2. RII, potentielle 2. RII-Bindungsstelle. DH, Dbl-homologe Region; PH, Pleckstrin-homologe Region; DH und PH besitzen Rho-GEF-Funktion.

3.5 Klonierung von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc Domänen

AKAP-Ht31/AKAP-Lbc zeigt neben der Expression im Brustgewebe auch eine starke Expression in der Niere. Zur Charakterisierung von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc und seiner potentiellen zweiten PKA-Verankerungsdomäne sowie seiner RhoGEF-Domäne im Nierengewebe wurden GFP-Fusionsproteine der beiden PKA-Verankerungsdomänen und der RhoGEF-Domäne hergestellt.

Die Konstrukte Ht-RII-YFP und Ht-2.RII-YFP sollten in *Fluoreszenz resonance energy transfer* (FRET-) Messungen mit einem RII-CFP-Konstrukt der regulatorischen Untereinheit der PKA (PKA-RII-CFP) in HEK-293- und IMCD-Zellen eingesetzt werden. Dies soll Aufschluss über eine mögliche AKAP-Funktion der zweiten, potentiellen RII-Bindungsdomäne von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc geben. Das DHPH-YFP-Konstrukt sollte eingesetzt werden, um die Rolle der RhoGEF-Domäne von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc in der Vasopressin-vermittelten Translokation der AQP2-tragenden Vesikel in IMCD-Zellen zu

untersuchen. Die mit diesen Konstrukten geplanten Studien konnten im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

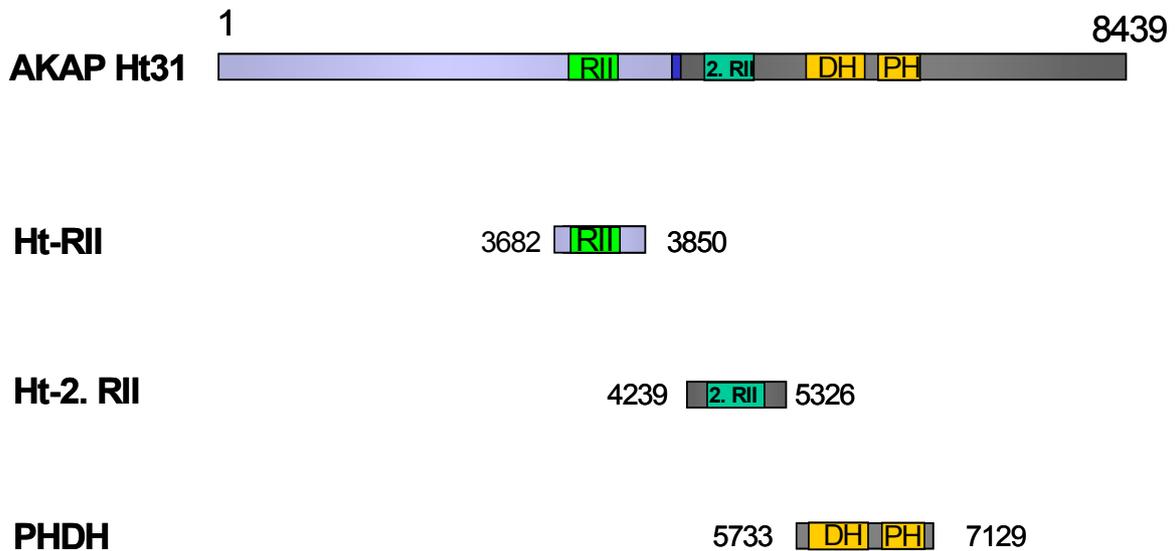


Abb. 3.3: Schematische Darstellung (Nukleinsäuresequenz) von AKAP-Ht31 und den klonierten AKAP-Ht31/AKAP-Lbc Domänen. Die Zahlen geben die jeweiligen Positionen in der Ht31-cDNA-Sequenz an. Auf die Darstellung des Vektors wurde verzichtet. RII, RII-Bindungsstelle. 2. RII, potentielle 2. RII-Bindungsstelle. DH, Dbl-homologische Region; PH, Pleckstrin-homologische Region.

Aus dem wildtypischen Klon von AKAP-Lbc (AKAP-Lbc-wt) wurden drei verschiedene Domänen von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc mittels PCR amplifiziert, dabei mit Schnittstellen versehen und in die Vektoren pECFP-N1 und pEYFP-N1 kloniert. Hierbei handelt es sich um die klassische Bindungsdomäne der PKA-RII-Untereinheiten (Ht-RII), die nicht-kanonische Bindungsdomäne der PKA-RII-Untereinheiten (Ht-2.RII) und die Pleckstrin-*homology*- und Dbl-*homology*- (DHPH-) Domäne. Abb. 3.3 zeigt eine schematische Darstellung der Nukleinsäuresequenz der drei klonierten AKAP-Ht31/AKAP-Lbc-Fragmente.