

4 Diskussion

4.1 Eine AKAP-Ht31-Spleißvariante interagiert mit ER α und kotransloziert nach Stimulation in den Kern

Abb. 4.1 zeigt eine schematische Darstellung eines möglichen Komplexes bestehend aus ER α , einer AKAP-Ht31-Variante und PKA, wie er in MCF-7-Zellen vorliegen könnte. Aus den immunbiochemischen und immunhistologischen Experimenten wird postuliert, dass ER α über ein unbekanntes Motiv an die AKAP-Ht31-Variante bindet.

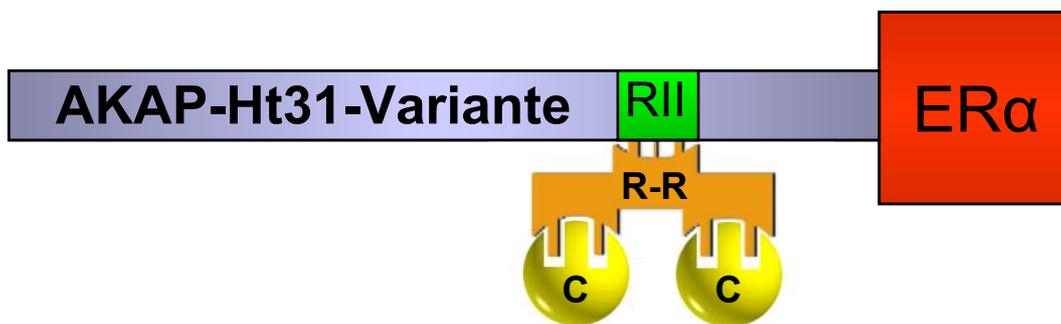


Abb. 4.1: Eine AKAP-Ht31-Variante >220 kDa bildet einen Komplex mit ER α und PKA. Schematische Darstellung eines möglichen Komplexes bestehend aus ER α , einer AKAP-Ht31-Variante und PKA. Die AKAP-Ht31-Variante bindet über ein unbekanntes Motiv an ER α . PKA könnte über seine regulatorischen Untereinheiten an die RII-Bindungsdomäne von AKAP-Ht31 verankert sein. RII: RII-Bindungsdomäne von AKAP-Ht31, R-R: Dimer der regulatorischen Untereinheiten der PKA, C: katalytische Untereinheiten der PKA.

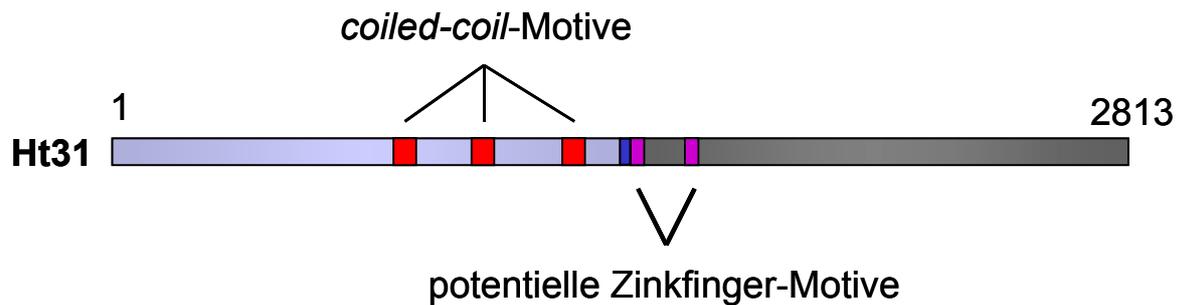


Abb. 4.2: Schematische Darstellung potentiell funktioneller Domänen von AKAP-Ht31. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz. *Coiled-coil*-Motive sind in rot dargestellt; potentielle Zinkfinger-Motive in violett.

Die Protein-Protein-Interaktion zwischen AKAP-Ht31-Variante und ER α könnte von zwei funktionellen Domänen von AKAP-Ht31 vermittelt werden: Die Sequenzanalyse von AKAP-Ht31 lässt auf die Existenz von *coiled-coil*- und potentiellen Zinkfinger-Motiven schließen (Abb. 4.2): Drei *coiled-coil*-Motive in Position 961 bis 997, 1185 bis 1222 und 1260 bis 1297 und zwei potentielle Zinkfinger-Motive in Position 1388 bis 1462 und 1656 bis 1706 der Aminosäuresequenz wurden entdeckt (eigene Arbeitsgruppe). *Coiled-coil*-Motive bilden eine Struktur aus zwei ineinander verschlungenen Helices, in deren Zentrum hydrophobe Aminosäuren Homo- und Heterodimerisierungen von Proteinen ermöglichen (Kwong et al., 2000). Zinkfinger-Motive sind ubiquitär in Proteinen zu finden. Ihre Funktion ist die Vermittlung von Protein-Protein- und Protein-Nukleinsäure-Interaktionen (Leon und Roth, 2000).

4.1.1 Eine AKAP-Ht31-Spleißvariante interagiert mit ER α

Die AKAP-Ht31-Spleißvariante Brx wird ausschließlich in den Testis und in Östrogen-sensitiven Geweben exprimiert (Rubino et al., 1998). In Immunpräzipitationsstudien konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Brx in Lysaten der humanen Brustkrebszelllinien ZR-75-1 und MCF-7 exprimiert wird. Der anti-Brx-Antikörper detektiert eine Bande von 170 kDa, die der Größe von nativem Brx entspricht.

Der einzige Antikörper, der in diesen Studien eine Interaktion einer AKAP-Ht31-Spleißvariante mit ER α in Immunpräzipitation und eine Ko-Translokation in Immunfluoreszenzstudien nachweisen konnte, war anti-AKAP-Ht31-Antikörper 1965. Von diesem Antikörper ist bekannt, dass er in der Lage ist AKAP-Ht31/AKAP-Lbc in ZR-75-1- und HeLa-Zellen zu erkennen (Klussmann et al., 2001b). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Antikörper 1965 aus MCF-7-Zellen eine Bande bei 170 kDa immunpräzipitiert, die vermutlich Brx entspricht. Zusätzlich immunpräzipitiert Antikörper 1965, ebenso wie Antikörper VO95, zwei Banden >220 kDa. In den Immunpräzipitationsstudien, die mit den Antikörpern 1965 und VO95 durchgeführt wurden, konnten die beiden Banden >220 kDa mit der RII-*overlay*-Methode als AKAP-Proteine identifiziert (Tab. 3.1) und ER α mit anti-ER α -Antikörpern detektiert werden.

Antikörper VO95 erkennt neben den beiden Banden >220 kDa zwei Banden bei 160 kDa und 180 kDa, von denen wiederum eine Brx entsprechen könnte. Eine mögliche Ursache für das Abweichen der Proteingröße gegenüber dem bekannten Molekulargewicht von 170 kDa kann in einer geringfügigen Abweichung des Laufverhaltens der Probe im SDS-Polyacrylamid-Gel im Vergleich zu dem Proteinstandard liegen. Der Grund hierfür könnten Verunreinigungen (z.B. Salze) in der Probe oder im Auftragspuffer sein, die im Laufe der Probenverarbeitung auftreten können und den Proteinstandard nicht betreffen.

Eine mögliche Detektion von Brx mit anti-Ht31-Antikörper ist in den durchgeführten Experimenten aufgrund der großen Sequenzidentität zu potentiellen AKAP-Ht31-Spleißvarianten wahrscheinlich, da Brx in Östrogen-sensitiven Geweben exprimiert wird und in der Lage ist mit ER α zu interagieren (Rubino et al., 1998). Die Tatsache, dass in den RII-*overlay*-Studien keine Bande bei 170 kDa detektiert wurde, könnte auf Eigenschaften der potentiellen zweiten RII-Bindungsdomäne, die in der C-terminalen Sequenz von AKAP-Ht31 (und damit auch in der Sequenz von Brx) gefunden wurde, zurückzuführen sein. Es ist möglich, dass die im Vergleich zu der klassischen RII-Bindungsdomäne 10-fach geringere Bindungsaffinität nicht ausreichend ist, um Brx im RII-*overlay* nachweisen zu können.

Da im RII-*overlay* keine Bande detektiert werden konnte, die dem gesamten AKAP-Ht31/AKAP-Lbc (>>220 kDa) entspricht, handelt es sich bei den Kandidaten möglicherweise um kleinere Spleißvarianten von AKAP-Ht31. Die Proteinbande, die bei 160 kDa detektiert wurde, könnte Brx mit leicht abweichendem Laufverhalten im SDS-Polyacrylamid-Gel entsprechen (s.o.). Die detektierten Banden weichen in ihrer Intensität stark voneinander ab, ein Hinweis, dass auch hier möglicherweise proteolytische Abbauprodukte einer großen

Variante detektiert wurden. Falls verschiedene AKAP-Proteine präzipitiert wurden, die aufgrund ihrer jeweiligen RII-Bindungsdomänen voneinander abweichende RII-Bindungsaffinitäten besitzen, würde dies auch die unterschiedlichen Bandenintensitäten erklären (Carr et al., 1992; Dell'Acqua und Scott, 1997). Da nach cAMP-Agarose-Präzipitation auch ER α im *Western Blot* detektiert wurde, spricht dies für das Vorhandensein von zumindest einem funktionellen AKAP-Protein, das an den Rezeptor bindet und diesen kopräzipitiert. Eine nähere Entschlüsselung der Rolle von Brx war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich, da sich die Qualität des anti-Brx-Antikörpers für eine Anwendung in Immunpräzipitations- und Immunfluoreszenzstudien als unzureichend erwies.

Die zytosolische Lokalisation von ER α in unstimulierten MCF-7-Zellen und die nukleare Verteilung nach Stimulation mit E₂ konnte in ersten Immunfluoreszenzstudien bestätigt werden (Rubino et al., 1998; Driggers et al., 2001). Die beobachtete Lokalisation von ER α im Nukleus un behandelter Zellen lässt sich durch die vielfältigen Aktivierungsmöglichkeiten der ER α -gesteuerten Transkription erklären (Hall et al., 2001). Eine Vielzahl von Stimuli, wie Serum, der epidermale Wachstumsfaktor EGF, der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor IGF-1, der Neurotransmitter Dopamin, das Hormon Leptin, cAMP, Caveolin-1 und Akt-Kinase sind in der Lage ER α zu aktivieren und die Expression von Zielgenen zu verstärken (Power et al., 1991; Kato et al., 2001; McAfee und Neumann, 1996; Trowbridge et al., 1997; Smith, 1998; Karas et al., 1998; Cenni und Picard, 1999; Schlegel et al., 1999; Campbell et al., 2001; Catalano et al., 2004). Die zelleigene Produktion dieser Substanzen ist wahrscheinlich für die Induktion der ER α -Translokation verantwortlich. Die Induktion der ER α -Translokation durch Serum wurde in dieser Arbeit durch die Verwendung von Serum-freiem Medium verhindert (Karas et al., 1998).

In den Immunfluoreszenzstudien weißt Antikörper 1965, genau wie der Antikörper 3060, Kolokalisation einer AKAP-Ht31-Spleißvariante mit ER α vor und nach Behandlung mit E₂ nach. In den Kontrollexperimenten, in denen die anti-AKAP-Ht31-Antikörper mit dem entsprechenden Peptid vorinkubiert wurden, konnte nur eine diffuse Färbung beobachtet werden. Die Ursache für eine unvollständige Blockierung der Antikörper trotz Vorinkubation mit dem entsprechenden Peptid könnte in geringer Bindungsaffinität der Interaktionspartner liegen.

In Immunfluoreszenzstudien mit Antikörper VO95 konnte AKAP-Ht31/AKAP-Lbc jedoch nur im Zytosol nachgewiesen werden. Die Behandlung mit E₂ führte hier weder zu einer

nuklearen Verteilung des Proteins, noch zu einer Kolo-kalisation mit ER α . Auch in AKAP-Lbc-GFP transfizierten MCF-7-Zellen war das Signal von AKAP-Lbc-GFP nach E₂-Stimulation ausschließlich im Zytosol zu finden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass AKAP-Lbc zwar in der Lage ist mit ER α zu interagieren, aber nach E₂-Stimulation nicht mit dem Rezeptor in den Kern transloziert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Antikörper 1965 und VO95 im Gegensatz zu den Immunpräzipitationsstudien in den Immunfluoreszenzstudien nur bestimmte, nicht identische Spleißvarianten detektieren. Hierbei kann es sich um Varianten handeln, die zwar in den Immunpräzipitationsstudien nachgewiesen wurden, aber im RII-*overlay* nicht als AKAP-Proteine identifiziert werden konnten. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass es sich um Spleißvarianten handelt, die in den Immunpräzipitationsstudien nicht detektiert wurden.

In fortführenden Studien müssten zunächst die AKAP-Ht31-Varianten identifiziert werden, die an dem Komplex mit PKA und ER α beteiligt sind. Hierzu könnten eine SDS-PAGE der Immunpräzipitaten mit anti-ER α -Antikörper aus MCF-7- und ZR-75-1-Zelllysaten durchgeführt werden. Die Banden von Interesse (insbesondere die Banden bei 80 kDa, 170 kDa, und die beiden Banden >220 kDa) können aus dem Gel der SDS-PAGE ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie analysiert werden.

Auch die Generierung neuer anti-AKAP-Ht31-Antikörper, die eventuell einen höheren Wirkungsgrad in Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz erzielen, könnten zur Ermittlung des Interaktionspartners von ER α beitragen.

Von großem Interesse ist auch die physiologische Rolle einer AKAP-Ht31-Spleißvariante und Brx bei der Translokation von RII β -Untereinheiten im Zusammenhang mit der Liganden-abhängigen Translokation in den Kern. Dazu könnten ZR-75-1- und MCF-7-Zellen mit PKA-RII β -CFP und den entsprechenden, His- oder Flag-*tag* versehenen AKAP-Ht31-Spleißvarianten transfiziert werden. In (Immun-) Fluoreszenzstudien können die zelluläre Verteilung der Konstrukte vor und nach E₂ Stimulation sichtbar gemacht werden.

4.1.2 Eine 80-kDa-AKAP-Ht31-Spleißvariante interagiert möglicherweise mit ER α

Die anti-AKAP-Ht31-Antikörper N4 und DH erkennen in den Kreuz-Immunpräzipitationsstudien identische Banden bei 70 kDa, 80 kDa und 150 kDa (Tab. 3.1). Beide Antikörper sind in der Lage ER α immunpräzipitieren. In den anschließenden RII-*overlay*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach Immunpräzipitation mit den Antikörpern DH und N4 aus Lysaten von MCF-7-Zellen ein RII-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 80 kDa existiert. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine 80 kDa-Variante von AKAP-Ht31, die in der Lage ist mit ER α *in vivo* zu interagieren, oder um ein proteolytisches Abbauprodukt einer größeren AKAP-Ht31-Spleißvariante.

In Immunfluoreszenzstudien mit den anti-AKAP-Ht31-Antikörper N4 und DH und dem anti-ER α -Antikörper ER-10 in MCF-7-Zellen konnte nicht geschlossen werden, dass ER α mit einer von Antikörper N4 und DH detektierten AKAP-Ht31-Spleißvariante in unstimulierten Zellen kolokalisiert und nach E₂-Stimulation mit ER α in den Nukleus transloziert. Die Kontrollen mit dem Präimmunserum weisen ein fast identisches Färbungsmuster im Vergleich mit den anti-Ht31-Antikörpern auf. Dies deutet darauf hin, dass Antikörper N4 und DH und das korrespondierende Präimmunserum in der Immunfluoreszenz nicht optimal funktioniert (s.o.). Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass die Spezifität der Antikörper für die potentielle 80 kDa-Variante von AKAP-Ht31 zu gering ist, oder dass starke unspezifische Bindungen bestehen.

Eine Interaktion der 80 kDa-Variante von AKAP-Ht31 mit ER α ist nach den Ergebnissen der Immunfluoreszenz unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen. Es ist durchaus möglich, dass diese beiden anti-AKAP-Ht31-Antikörper in den Immunpräzipitationsstudien besser an ihre Epitope binden, als das in der Immunfluoreszenz der Fall ist.

Falls die Antikörper N4 und DH eine eigenständige Spleißvariante von AKAP-Ht31 erkennen, die kein Abbauprodukt des vollständigen AKAP-Proteins ist, handelt es sich aufgrund der Lage der Epitope der beiden Antikörper in der Proteinsequenz von AKAP-Ht31 höchst wahrscheinlich um Spleißvarianten, die aus einem N-terminalen und einem C-terminalen Fragment mit RhoGEF-Domäne bestehen. Hierbei könnte es sich um eine ähnliche Variante wie onco-Lbc (49 kDa) handeln, ein Vertreter der AKAP-Ht31-Familie, der im wesentlichen aus der RhoGEF-Domäne besteht (Zheng et al., 1995; Sterpetti et al., 1999).

Onco-Lbc ist ein 424-Aminosäuren (49 kDa) langes Oncogen mit starker RhoGEF-Aktivität, das fast ausschließlich aus DH- und PH-Domäne besteht. Es ist ein Fusionsprotein des N-Terminus von proto-Lbc und einer kurzen C-terminalen Sequenz, die von Chromosom 7

stammt (Sterpetti et al., 1999). Onco-Lbc ist in der Lage über den Rho-Signalweg NIH-3T3 Zellen zu transformieren und die Synthese neuer DNA in ruhenden Fibroblasten zu stimulieren (Zheng et al., 1995). Eine onco-Lbc-ähnliche AKAP-Ht31-Spleißvariante müsste in jedem Fall aus mehreren Exons bestehen:

- (1) Ein Exon, das die Bindung von Antikörper N4 an sein Epitop ermöglicht und folglich im N-terminalen Bereich der Sequenz von AKAP-Ht31 liegen muss (Aminosäuren 216 bis 230 der AKAP-Ht31-Sequenz).
- (2) Ein zweites Exon, das die RhoGEF-Domäne (342 Aminosäuren von Position 1995 bis 2336) trägt, in der sich das Epitop des Antikörpers DH befindet (Klusmann et al., 2001b; Diviani et al., 2001).

Eine solche AKAP-Ht31-Spleißvariante wäre nicht nur in der Lage als AKAP zu fungieren, sondern könnte auch in seiner Funktion als RhoGEF in den Metabolismus der Rho-Signalwege involviert sein.

- (3) Ein drittes Exon, das die im *RII-overlay* nachgewiesene Bindung von RII-Untereinheiten des Proteins ermöglicht.

Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die klassische RII-Bindungsdomäne von AKAP-Ht31 (14 Aminosäuren von Position 1247 bis 1260), die gegenüber der potentiellen, zweiten RII-Bindungsdomäne (299 Aminosäuren von Position 1470 bis 1768) eine stärkere Bindungsaffinität besitzt. Es ist auch möglich, dass beide Bindungsdomänen in dieser Spleißvariante vorkommen. Dies würde dann jedoch insgesamt mindestens vier Exons voraussetzen, da ein Protein, das die Sequenz zwischen den beiden PKA-Verankerungsdomäne von AKAP-Ht31 einschließt größer als 80 kDa wäre; (unter der Annahme, dass eine Aminosäure durchschnittlich 110 Da wiegt, würde ein Protein von 80 kDa aus ungefähr 730 Aminosäuren bestehen).

4.2 Konsequenzen der Translokation eines Komplexes aus AKAP-Ht31-Variante, PKA und ER α

Aufgrund der gewonnenen Daten kommen vier potentielle AKAP-Ht31-Varianten als mögliche Interaktionspartner von ER α in Frage: Das vollständige AKAP-Ht31/AKAP-Lbc (1) oder eine große Spleißvariante >220 kDa (2), die AKAP-Ht31-Spleißvariante Brx (3) und eine 80-kDa-Variante (4), die möglicherweise Ähnlichkeit zu onco-Lbc hat.

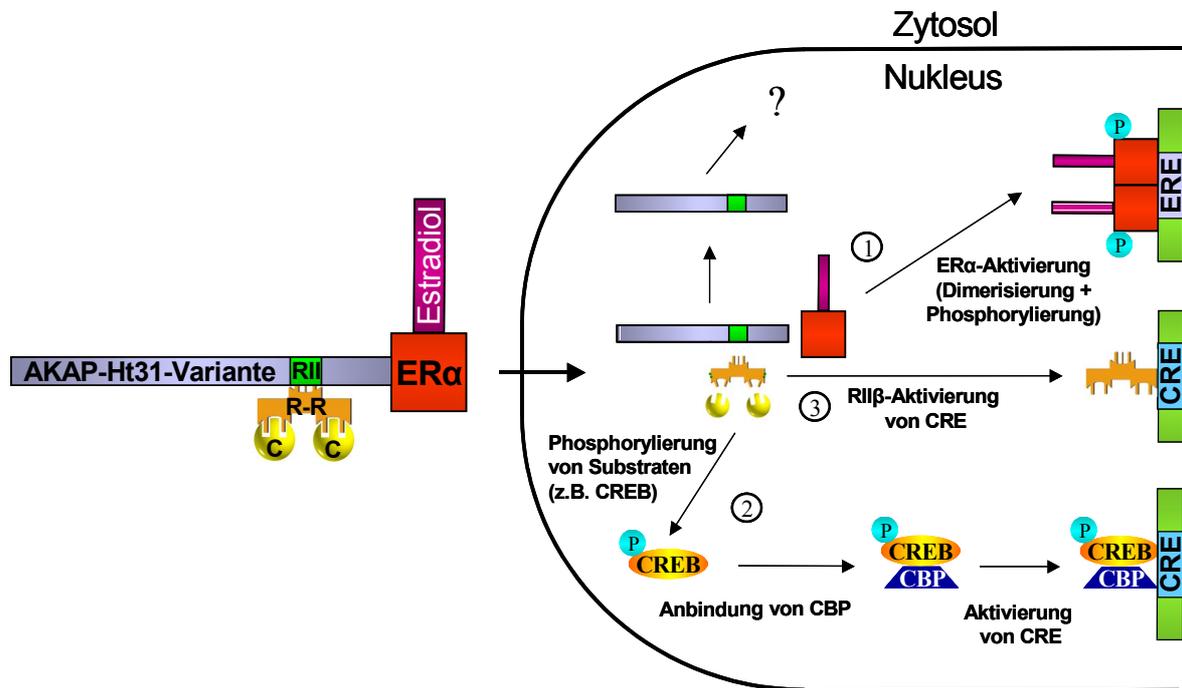


Abb. 4.3: Möglicher Einfluss der Translokation eines Komplexes aus ER α , einer AKAP-Ht31 Variante und PKA auf die Gen-Transkription. RII: RII-Bindungsdomäne einer AKAP-Ht31-Variante; R-R: Homodimer von RII-Untereinheiten der PKA; C: katalytische Untereinheiten der PKA; P: Orthophosphatgruppen an Phosphorylierungsstellen von Substraten der Kinasen; CREB, CBP, CRE, ERE und Regulationen der Gen-Transkription (1, 2, 3) siehe Erläuterungen im Text.

Ein Modell für die Konsequenzen der Translokation eines Komplexes bestehend aus einer AKAP-Ht31-Variante, PKA und ER α wird im Folgenden erörtert: Aufgrund der Stimulation durch die Anbindung eines Liganden (z.B. E₂) an ER α transloziert der Komplex in den Kern. PKA kann über die RII-Bindungsdomäne der AKAP-Ht31-Variante verankert werden (Abb. 4.1). Dies ist von Bedeutung, da der Eintritt des PKA-Holoenzym und von R-Untereinheiten normalerweise durch Größenausschluss verhindert wird (Riabowol et al., 1988; Meinkoth et al., 1990; Solberg et al., 1994). Die Möglichkeit, dass mit der Translokation des oben beschriebenen Komplexes nicht allein ER α , sondern auch RII- und C-Untereinheiten der PKA in den Nucleus gelangen, kann potentiell mehrere Regulationen der Gen-Transkription auslösen (Abb. 4.3). Die Überexpression von RII β -Untereinheiten der PKA in MCF-7-Brustkrebszelllinien resultiert in einer auffälligen Änderung des Verteilungsmusters der PKA.

Das beobachtete Transformationspotential und die Inhibition des Wachstums korrelieren mit der nuklearen Translokation von RII β (Cho-Chung, 1990; Budillon et al., 1995; Nesterova et al., 1995). RII β -Untereinheiten der PKA können als Transkriptionsfaktor fungieren. RII β , jedoch nicht RII α , interagiert dabei entweder unabhängig oder über CREB mit dem CRE des Promotors. Die Bindung wird in Gegenwart von cAMP noch verstärkt (Elliott et al., 1998).

4.2.1 Möglicher Einfluss der Translokation eines Komplexes aus ER α , einer AKAP-Ht31-Variante und PKA auf die Gen-Transkription

Der Darstellung in Abb. 4.2 ist zu entnehmen, dass es hauptsächlich drei potentielle Einflüsse der Translokation eines Komplexes aus ER α , einer AKAP-Ht31-Variante und PKA auf die Gen-Transkription gibt:

(1) **Liganden-abhängige transkriptionale Aktivierung durch ER α -Homodimere an EREs.** Die Anbindung des Hormons E₂ an die LBD von ER α bewirkt die Translokation des Rezeptors in den Kern, induziert eine aktivierende Konformationsänderung im Rezeptor ER α und fördert seine Homodimerisierung (Beato und Sanchez-Pacheco, 1996). Wird der ER α -Homodimer phosphoryliert, so wird die Affinitätsbindung an EREs verstärkt (Hall, 2001). Die Bindung von Kofaktoren wie CBP und p160 stimuliert die transkriptionelle Aktivität von phosphoryliertem ER α dabei zusätzlich, ist aber nicht notwendig (Shang et al., 2001; Coleman et al., 2003). Die Gen-Aktivierung wird von der konstitutiven AF-1-Region zusammen mit der Hormon-abhängigen AF-2-Region des Rezeptors vermittelt (Tora et al., 1989). Dies führt in den meisten Fällen zu einer Aktivierung (alternativ: Deaktivierung) der Gentranskription und zu physiologischen Antworten in den Brustdrüsenkrebszellen (Mangelsdorf et al., 1995; McKenna et al., 1999).

(2) **Regulation der Transkription durch katalytische Untereinheiten der PKA.** Die nukleare Translokation eines Komplexes aus AKAP-Ht31-Spleißvariante, PKA und ER α bietet weitere Möglichkeiten zur Aktivierung oder Deaktivierung der Transkription. Die C-Untereinheiten des PKA-Holoenzym dissoziieren in Anwesenheit von cAMP von dem Komplex. Freie C-Untereinheiten der PKA im Nukleus führen zu einer erhöhten Phosphorylierung von ER α und dadurch zu einer Verstärkung der Aktivierung von ER α (Aronica und Katzenellenbogen, 1993; Cho und Katzenellenbogen, 1993; Ince et al.,

1994; Bunone et al., 1996). Die PKA-Phosphorylierung von ER α an Serin 236 kann die Dimerisierung in Abwesenheit von E₂ inhibieren, während die Gegenwart eines Liganden diese Inhibierung aufheben kann (Aronica und Katzenellenbogen, 1993; Cho und Katzenellenbogen, 1993; Ince et al., 1994; Le Goff et al., 1994; Bunone et al., 1996; El-Tanani und Green, 1997). Die Phosphorylierung von Serin 236 ist ein Mechanismus zur Regulation der E₂-induzierten DNA-Bindung von ER α und moduliert möglicherweise die Assoziation von ER α mit anderen Transkriptionsfaktoren (Chen et. al., 1999). PKA und Östrogene zeigen synergistische Effekte und steigern die transkriptionale Aktivität von ER α (Aronica und Katzenellenbogen, 1993; Cho und Katzenellenbogen, 1993; Ince et al., 1994). Eine weitere Möglichkeit der Kontrolle der Transkription besteht durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB durch die C-Untereinheiten (Gonzalez et al., 1989; Gonzales und Montminy, 1989). Phospho-CREB rekrutiert den Kofaktor CBP, beide binden an CRE des Zielpromotors und leiten damit spezifisch die Transkription ein (Chrivia et al., 1993).

(3) Regulation der Transkription durch regulatorische Untereinheiten der PKA. Mit dem Komplex aus AKAP-Ht31-Spleißvariante, PKA und ER α können RII β -Untereinheiten der PKA in den Nukleus gelangen und dort als Transkriptionsfaktor fungieren. Die Regulation der Transkription durch RII β erfolgt entweder unabhängig, über eine direkte Anbindung an CREs, oder über eine Interaktion mit CREB und anschließender Bindung an CREs (letzteres ist in Abb. 4.2 nicht dargestellt). Dieser Prozess wird in Gegenwart von cAMP noch verstärkt (Elliott et al., 1998).

Unklar ist die weitere Rolle der AKAP-Ht31-Spleißvariante, nachdem sie mit dem Komplex in den Kern transloziert ist. Es ist denkbar, dass sie ubiquitiniert und somit dem Proteinabbau überantwortet wird.

4.3 Klonierung des 5'-Endes und funktioneller Domänen von AKAP-Ht31

AKAP-Ht31 und AKAP-Lbc sind zu 99% identisch, unterscheiden sich nur im C-Terminus und sind, wie auch Brx und proto-Lbc, Spleißvarianten des AKAP-Ht31-Gens. Der C-Terminus von AKAP-Ht31 ist, bis auf die ersten vier Aminosäuren, identisch mit dem Protein Brx. AKAP-Lbc hingegen hat im C-Terminus die Sequenz der proto-oncogenischen AKAP-Ht31-Spleißvariante proto-Lbc (Sterpetti et al., 1999; Klusmann et al., 2001b; Diviani et al., 2001).

Aus der humanen Nieren Marathon Ready™ cDNA Bank konnte in dieser Arbeit das fehlende Fragment des 5'-Endes von AKAP-Ht31 gewonnen werden. Das neu erhaltene AKAP-Ht31 5'-Fragment überlappt mit dem bereits existierenden 3'-Fragment (Klusmann et al. 2001b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Klonierung des vollständigen AKAP-Ht31 aus N- und C-terminalem Klon aus Zeitgründen nicht durchgeführt. Für die weiteren Studien wurde das Konstrukt AKAP-Lbc-GFP aus der Arbeitsgruppe von J. D. Scott (Vollum Institute, Portland, USA) verwendet.

Die Konstrukte, die aus dem wildtypischen Klon von AKAP-Lbc kloniert wurden (Ht-RII, Ht-2.RII und DHPH), konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr in die Studien einfließen. Zwei Projekte würden sich jedoch in diesem Zusammenhang anbieten:

- (1) In *Fluorescence resonance energy transfer* (FRET) -Messungen mit dem Ht-2.RII-YFP-Konstrukt und einem Konstrukt bestehend aus der regulatorischen Untereinheit der PKA und CFP (PKA-RII-CFP) könnte in HEK-293- und IMCD-Zellen eine mögliche Funktion der potentiellen zweiten RII-Bindungsdomäne von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc untersucht werden. Als Positivkontrolle bietet sich das Konstrukt mit der klassischen RII-Bindungsdomäne von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc, Ht-RII-YFP an. Falls die zweite nicht-kanonische Bindungsdomäne von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc tatsächlich in der Lage ist regulatorische Untereinheiten der PKA zu binden, könnte dies auf weitere Funktionen von AKAP-Ht31 und seinen Spleißvarianten hinweisen. Die AKAP-Ht31-Spleißvariante Brx z.B. wäre ebenfalls in der Lage regulatorische Untereinheiten der PKA zu binden, und somit definitionsgemäß ein AKAP-Protein. Brx-gebundene RIIβ-Untereinheiten könnten auf diesem Weg nach dem Modell der Liganden-abhängigen Aktivierung von ERα mit dem Rezeptor in den Kern translozieren und an der Transkriptionskontrolle in Brustdrüsenzellen beteiligt zu sein (Cho-Chung, 1990; Budillon et al., 1995; Nesterova et al., 2000; Rubino et al., 1998; Driggers et al., 2001; Hall et al., 2001). RIIβ-Untereinheiten können als

Transkriptionsfaktor fungieren, indem sie unabhängig oder über CREB mit dem *cAMP-responsive element* (CRE) interagieren (Elliott et al., 1998). Dies könnte auch näheren Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von Brx bei Brustdrüsenkrebs geben.

- (2) Mit einem Konstrukt, das die RhoGEF-Domäne (DHPH-YFP) trägt, könnten die Auswirkungen einer kompetitiven Rho-Inhibierung auf AKAP-Ht31/AKAP-Lbc, bzw. AKAP-Rt31 studiert werden. Die Interaktion von Rho mit AKAP-Ht31/AKAP-Lbc ist wesentlicher Bestandteil der Regulation des F-Aktinzytoskeletts (siehe „Einleitung“, Multivalente Signalkomplexe am Zytoskelett: AKAP-Ht31/AKAP-Lbc). Der Einfluss dieser Signaltransduktion auf die Translokation des Wasserkanals AQP-2 könnte in Immunfluoreszenzstudien in IMCD-Zellen untersucht werden.