

5 Zusammenfassung

AKAP-Ht31/AKAP-Lbc gehört zu der Familie der *A kinase anchoring proteins*. Es weist eine ubiquitäre Verbreitung auf und ist in seiner Interaktion mit verschiedenen anderen physiologisch relevanten Proteinen in zahlreiche regulatorische Zellprozesse eingebunden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst anti-AKAP-Ht31-Antikörper in Kreuz-Immunpräzipitationsstudien mit MCF-7-Zellen getestet, um ihre Spezifität gegen AKAP-Ht31-Spleißvarianten zu charakterisieren. Insgesamt konnten im *Western Blot* nach Immunpräzipitation bis zu neun mögliche AKAP-Ht31-Spleißvarianten mit Molekulargewichten von 70 kDa bis >250 kDa detektiert werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden AKAP-Proteine der Größen 40 kDa, 60 kDa, 80 kDa und 160 kDa in MCF-7-Zellen mittels einer cAMP-Agarose-Präzipitation angereichert und anhand des RII-overlays detektiert. Der nukleare Steroid/Thyroid-Rezeptor ER α wurde ebenfalls nach cAMP-Agarose-Präzipitation im *Western Blot* detektiert. Dies spricht für das Vorhandensein eines Komplexes aus einem funktionellen AKAP-Protein, daran gebundenen ER α und, über die RII-Bindungsdomäne des AKAP-Protein verankerter, PKA.

Die Identifizierung potentiell beteiligter AKAP-Ht31-Spleißvarianten nach Immunpräzipitation im RII-overlay führte zu vier Proteinen. Zwei Proteine mit einem Molekulargewicht >220 kDa, von denen das größere wahrscheinlich das gesamte AKAP-Ht31/AKAP-Lbc (309 kDa) und das kleinere eine weitere AKAP-Ht31-Spleißvariante oder ein proteolytisches Abbauprodukt darstellt. Des Weiteren kommt die AKAP-Ht31-Spleißvariante Brx und eine 80-kDa-Protein als Interaktionspartner von ER α in Frage. In Immunfluoreszenzstudien in MCF-7-Zellen konnte gezeigt werden, dass zumindest eine AKAP-Ht31-Variante in unbehandelten Zellen mit ER α kolokalisiert und nach E₂-Behandlung mit dem Rezeptor in den Nukleus transloziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das vollständige AKAP-Ht31/AKAP-Lbc und/oder eine kleinere Variante mögliche Interaktionspartner von ER α sind.

Um AKAP-Ht31 vollständig zu erhalten (ein 4,5-kb-Fragment des 3'-Endes existierte bereits), wurde das 5'-Ende seiner Nukleotidsequenz aus einer humanen Nieren-cDNA-Expressionsbibliothek (Stratagene, Heidelberg) kloniert.

Aus dem vollständigen wildtypischen Klon von AKAP-Ht31/AKAP-Lbc wurden die klassische Bindedomäne der PKA-RII-Untereinheiten (Ht-RII), die nicht-kanonische (zweite) Bindedomäne der PKA-RII-Untereinheiten (Ht-2.RII) und die Pleckstrin-homology und Dbl-homology (DHPH-) Domäne als GFP-Konstrukte kloniert.

Summary

AKAP-Ht31/AKAP-Lbc belongs to the family of the *A kinase anchoring proteins*. This AKAP shows an ubiquitous distribution, interacts with many different physiological relevant proteins and is involved in a number of regulatory processes within the cell.

Anti-AKAP-Ht31/AKAP-Lbc-antibodies were tested in cross-immunoprecipitation studies in MCF-7 cells, to characterize their specificity against AKAP-Ht31/AKAP-Lbc splice variants. Using the *Western Blot* technique after immunoprecipitation, up to nine potential AKAP-Ht31/AKAP-Lbc splice variants with molecular weight ranging from 70 kDa till >250 kDa were detected.

In the next part of this work, AKAPs with molecular weight of 40 kDa, 60 kDa, 80 kDa and 160 kDa were enriched in MCF-7 cells using cAMP-agarose-precipitation and subsequently detection with RII-overlay assays. Additionally the nuclear steroid/thyroid receptor ER α had been detected in *Western Blot* assays after cAMP-agarose-precipitation. This was the first hint for a complex consisting of ER α , PKA and an AKAP.

Four potential involved AKAP-Ht31 splice variants were then identified using again the RII-overlay technique after immunoprecipitation. Two proteins with molecular weight >220 kDa. The bigger protein most likely represents full-length, 309 kDa AKAP-Ht31. The smaller protein might be a new AKAP-Ht31 splice variant or a proteolytic degradation product. The AKAP-Ht31 splice variant Brx and a 80 kDa protein are also candidates for the interaction with ER α .

Immunofluorescence studies in MCF-7 cells showed, that at least one AKAP-Ht31 splice variant co-localizes in untreated cells with ER α and co-transport with the receptor after E₂-treatment into the nucleus.

These findings point to the possibility that full-length AKAP-Ht31 and/or a smaller splice variant might interact with ER α .

In order to gain the full-length AKAP-Ht31/AKAP-Lbc the 5'-end was cloned using a human kidney cDNA expression library (Stratagene, Heidelberg).

In the next part of this work, a full-length AKAP-Ht31/AKAP-Lbc construct was used to clone the classical binding domain of PKA-RII-subunits (Ht-RII), the potential second binding domain of PKA-RII-subunits (Ht-2.RII) and the Pleckstrin- and Dbl-homology (DHPH-) Domain into GFP-vectors.