

Chapter 5

Summary

As AKAP-PKA binding is a pivotal step in cAMP signalling, we set out to generate tools to study this step of compartmentalisation. In this work AKAP7 δ -derived peptides with high affinity to RII subunits of PKA were developed, by systematic amino acid substitution. These peptides function as potent disruptors of PKA anchoring *in vitro* in peptide-spot- and SDS-Page based RII overlay assays and delocalise PKA activity from vesicles. Their use as valuable tools for *in vivo* disruption of PKA anchoring has been demonstrated in two cellular systems, by the inhibition of induced increases in L-type Ca²⁺ channel currents in neonatal cardiac myocytes and by the inhibition of AQP2 redistribution upon stimulation in rat renal primary cells. In addition to the already known function of hydrophobic amino acids, it was demonstrated by peptide substitution arrays that polar and charged amino acids contribute to the high affinity AKAP-PKA anchoring. Further, these results enhance our understanding of AKAP-PKA interactions. Utilising these new insights, a bioinformatic-based approach to search for new AKAPs was made possible for the first time. Development of algorithms and their implementation enabled a successful protein database search yielding 4519 peptides of 2352 human proteins. A high-throughput detection for RII-binding for 2572 of the yielded peptides was performed combining peptide spot-synthesis with RII overlay assay resulting in 829 RII-binding peptides. Of the peptides obtained from this approach, 14 displayed RII-binding in an AKAP manner pointing out that the cognate proteins may function as AKAPs which was not previously demonstrated for these proteins. The protein CN129 whose structure is completely described, was chosen for further characterisation of its AKAP function. The RII-binding domain of CN129 was mapped, approving the database obtained peptide as PKA anchoring domain. The CN129 cDNA was cloned from human and rat species and expressed as CFP-fusion proteins, demonstrating the AKAP function *in vitro* and the subcellular localisation for the fusion proteins. The high conservation of the CN129 sequence indicates an important cellular function.

Zusammenfassung

Die Verankerung der PKA durch AKAP stellt einen entscheidenden Schritt im cAMP-Signalweg dar. In der vorliegenden Arbeit wurden Werkzeuge entwickelt, um die PKA Verankerung zu untersuchen: Peptide hoher Affinität zu RII-Untereinheiten der PKA, die von AKAP7 δ durch systematischen Aminosäureaustausch abgeleitet wurden. Diese Peptide sind *in vitro* hochwirksame Entkoppler der PKA Verankerung in Peptid-Spot- und SDS-PAGE basierten RII-overlay Assays und delokalisieren Vesikel gebundene PKA-Aktivität. Ihre Wirksamkeit als *in vivo* Entkoppler der PKA Verankerung wurde in zwei zellulären Systemen gezeigt, durch die Inhibition von induziertem Anstieg der L-Typ Kalzium-Kanal Ströme in neonatalen Kardiomyozyten, sowie durch die Inhibition der AQP2 Umverteilung nach Stimulation in renalen Primärzellen von Ratten. Zusätzlich zur hinlänglich beschriebenen Bedeutung der hydrophoben Aminosäuren für die AKAP-PKA Bindung wurde durch Peptid-Substitutions Arrays gezeigt, dass polare und geladene Aminosäuren zur hoch-affinen Bindung beitragen. Diese Erkenntnis erweitert das gängige Verständnis der AKAP-PKA Bindung. Dadurch wurde erstmalig ein bioinformatischer Ansatz möglich, um nach bisher unbeschriebenen AKAP zu suchen. Die Entwicklung und Implementierung von Algorithmen ermöglichte eine erfolgreiche Datenbanksuche, die 4519 Peptide aus 2352 humanen Proteinen identifizierte. Die Detektion von 2572 der identifizierten Peptide wurde durch Kombination von Peptid Spot-Synthese und RII-overlay Assays in hohem Durchsatz realisiert und ergab 829 RII-bindende Peptide. Von den so erhaltenen Peptiden zeigten 14 charakteristische AKAP-RII Bindung, was auf eine bisher nicht beschriebene AKAP Funktion der zugehörigen Proteine hinweist. Das Protein CN129, dessen Struktur bereits beschrieben ist, wurde zur weiteren Charakterisierung seiner AKAP Funktion ausgewählt. Die RII-Bindedomäne von CN129 wurde kartiert und damit das Peptid aus der Datenbanksuche als PKA-Bindedomäne bestätigt. Die cDNA von CN129 aus Ratte und Mensch wurde kloniert, als CFP-Fusionsprotein exprimiert und die AKAP-Funktion *in vitro*, sowie die subzelluläre Verteilung des Fusionsproteins gezeigt. Die hochkonservierte Aminosäure-Sequenz von CN129 deutet auf eine bedeutende zelluläre Funktion des Proteins hin.