

Aus dem Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie Berlin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. W. Rosenthal

*„Die Klonierung und Charakterisierung des
protein kinase A anchoring protein r(rat)Ht31
aus der Rattenniere“*

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Frau Barbara Pepperle
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. W. Rosenthal

Korreferent: Prof. Dr. B. Wittig

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 17.05.2002

5 Zusammenfassung

Bei dem Versuch der Identifizierung von *protein kinase A anchoring proteins* (AKAPs), die an der Vasopressin-vermittelten Wasserrückresorption im Sammelrohr der Niere beteiligt sind, wurde beim *Screening* einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek der Partialklon 2.1 (1747 bp, *GenBank accession number* AF387102) isoliert. Bei diesem Klon handelt es sich um das Rattenorthologe (rHt31 1-576) des humanen AKAP hHt31 (Carr et al. 1992a). Die Identität zwischen rHt31 (582 Aminosäuren) und hHt31 auf die gesamte Proteinelänge bezogen, beträgt 67,7 %. Die der klassischen Bindungsdomäne für die regulatorischen Untereinheiten der PKA (RII) von hHt31 entsprechende RII-Bindungsdomäne von rHt31 befindet sich im Bereich der Aminosäuren 65-78. Eine zweite Bindungsdomäne befindet sich im Bereich der Aminosäuren rHt31 470-576. Diese ist für die RII-Untereinheiten scheinbar weniger affin, die Bindung der RI-Untereinheiten wurde noch nicht untersucht.

Durch eine Kombination von RACE-Experimenten und Datenbankanalysen wurde die bisher bekannte cDNA-Sequenz von hHt31 (3045 bp) um 5397 bp verlängert. Die vollständige hHt31-cDNA (8442 bp, *GenBank accession number* AF387101) beinhaltet auch die cDNA-Sequenzen des *breast cancer nuclear receptor binding auxillary protein* (hBrx, Rubino et al. 1998) und des *guanine nucleotide exchange factors* (GEF) Proto-Lbc (Sterpetti et al. 1999). Bei diesen zur Familie der Dbl-Onkogene gehörenden Proteinen handelt es sich daher um kürzere Spleißvarianten von hHt31. Alle drei Proteine werden von einem Gen auf Chromosom 15, welches aus 36 Exons besteht, kodiert.

Mit einer rHt31-spezifischen Sonde konnten im Herzen und im Skelettmuskel sowie in der inneren Medulla der Rattenniere (Edemir 1999) mRNA-Transkripte von ca. 9 und größer 9,5 kb detektiert werden, die der mRNA von rHt31 entsprechen könnten.

Mit einem Antikörper, der sowohl rHt31/hHt31 als auch hBrx erkennt, wurde in zwei Brustkrebszelllinien sowohl in den löslichen als auch in den partikulären und nukleären Zellfraktionen ein immunreaktives Protein im hochmolekularen Bereich (ca. 300-400 kDa) detektiert, bei dem es sich wahrscheinlich um hHt31 handelt. In verschiedenen Geweben und Zelllinien wurden weiterhin immunreaktive Proteine unterschiedlicher Größe detektiert, was auf die Existenz weiterer Spleißvarianten hindeutet. Eine aufgrund der Sequenz postulierte RII-Bindungsdomäne in hBrx konnte experimentell nicht sicher nachgewiesen werden. Allerdings hat ein ca. 170 kDa-Protein

in der partikulären Fraktion der ZR-75-1-Zellen, bei dem es sich wahrscheinlich um hBrx handelt, im RII-*overlay* die RII-Untereinheiten gebunden. Sowohl hHt31 als möglicherweise auch die kürzere Spleißvariante hBrx (bei Nachweis einer RI/RII-Bindungsdomäne) können zu den multifunktionellen Adaptorproteinen gezählt werden, welche über verschiedene Effektoren eine Vielzahl von transmembranären und intrazellulären Signaltransduktionsprozessen regulieren.

Abstract

In an attempt to isolate protein kinase A anchoring proteins (AKAPs) involved in vasopressin-mediated water reabsorption a partial cDNA clone with an open reading frame of 582 amino acids (rHt31 (*GenBank accession number AF387102*)) and 67,7 % identity to the human AKAP hHt31 was isolated. One RII binding site was mapped to amino acid residues 65-78; a second binding site with lower RII affinity was mapped to amino acid residues 470-576. The complete cDNA sequence of hHt31 was determined by a combination of RACE-PCR experiments and data base analysis. The hHt31 cDNA includes the estrogen receptor cofactor hBrx and the RhoA GDP/GTP exchange factor proto lymphoid blast crisis (Lbc) sequences. The human Ht31 gene was assigned to chromosome 15 (region q24-25). It consists of 36 exons and encodes hHt31 and the smaller splice variants hBrx and proto-Lbc. A rHt31-specific probe detected in heart, skeletal muscle and renal inner medulla mRNA transcripts of 9 kb and > 9.5 kb. The mRNA species of > 9.5 kb may encode the rHt31 protein. An antibody directed against a common epitope in rHt31, hHt31 and hBrx detects in the human mammary carcinoma cell lines ZR75-1 and MCF7 a protein of about 300-400 kDa, which may represent the full length Ht31 protein. In various human tissues and cell lines the antibody detected several proteins (60 - > 200 kDa) in the soluble and particulate fractions, indicating the presence of multiple splice variants in different subcellular fractions. Ht31 and its splice variants may represent a new type of multivalent scaffold proteins, which may regulate various signal transduction pathways.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Proteinkinase A (PKA) und <i>protein kinase A anchoring proteins</i> (AKAPs).....	1
1.1.1	Proteinkinase A.....	1
1.1.2	<i>Protein kinase A anchoring proteins</i> (AKAPs)	3
1.1.3	Charakterisierung der AKAP-PKA-Interaktion	6
1.1.4	Die Bindung des PKA-AKAP-Komplexes an subzelluläre Kompartimente- die <i>targeting</i> -Domäne.....	9
1.1.5	AKAPs als <i>Scaffolds</i> (Gerüste) für verschiedene Signaltransduktionsproteine ..	11
1.1.6	Funktionelle Aspekte der PKA-Verankerung durch AKAPs	12
1.2	Die Vasopressin-vermittelte Wasserrückresorption im Sammelrohr der Niere. .	14
1.3	Zielstellung dieser Arbeit	16
2	MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.2	Reagenziensätze (Kits)	20
2.1.3	Peptide	20
2.1.4	Antikörper.....	21
2.1.5	Sonstige Materialien	21
2.1.6	Geräte	21
2.1.7	Computeranalysen und Software.....	23
2.1.8	Bakterienstämme, cDNA-Bibliothek und eukaryontische Zelllinien	23
2.1.8.1	Bakterienstämme	23
2.1.8.2	cDNA-Bibliothek und Bakteriophage	23
2.1.8.3	Eukaryontische Zellen und Zelllinien.....	24
2.1.9	Desoxyribonukleinsäuren (DNA).....	24
2.1.9.1	Vektoren	24
2.1.9.2	Rekombinante Plasmide	24
2.1.9.3	Oligonukleotide	25
2.1.9.3.1	Sequenzierungsprimer für Klon 2.1.....	25
2.1.9.3.2	Sequenzierungsprimer für Klon 3.1.....	26
2.1.9.3.3	Primer mit Schnittstellen für die Klonierung von DNA-Fragmenten in den Vektor pGEX-4T-3.....	27
2.1.9.3.4	Primer für die hBrx-cDNA-Synthese aus ZR-75-Zellen	28

2.1.9.3.5	Primer für die Amplifikation von hHt31 aus der Marathon™ cDNA	28
2.1.9.3.6	Sequenzierungsprimer für die 5'- und 3'-RACE-Produkte (hHt31)	29
2.1.10	Flüssigmedien und Agarplatten für <i>E. coli</i>	30
2.1.11	Antibiotika und andere Medienzusätze	30
2.2.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	31
2.2.1.1	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.2.1.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	31
2.2.1.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.2.1.2	Nukleinsäure-Isolierungsmethoden	32
2.2.1.2.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> im kleinen Maßstab	32
2.2.1.2.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> mit dem QIAGEN Midi PREP Kit	33
2.2.1.2.3	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> mit den QIAPREP™ Minipreps für Bioroboter 9600 (QIAGEN)	34
2.2.1.3	Spezifische DNA-Spaltung durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen	35
2.2.1.4	Horizontale Agarosegelelektrophorese	35
2.2.1.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.2.1.5.1	Isolierung von DNA-Fragmenten mit dem Geneclean-Kit II (Dianova)	36
2.2.1.5.2	Isolierung von DNA-Fragmenten mit dem QIAEX II Kit (Qiagen)	37
2.2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.2.1.7	PCR-Amplifizierung von cDNA-Fragmenten	38
2.2.1.8	5'- und 3'-RACE mit dem Marathon-Ready™ cDNA-Kit (Clontech)	40
2.2.1.9	DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode (Sanger et al. 1977)	41
2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	42
2.2.3	DNase-Verdau und cDNA-Synthese	43
2.2.3.1	DNase-Verdau	43
2.2.3.2	cDNA-Synthese	44
2.2.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [α^{32} P]-dCTP	45
2.2.5	Abtrennung der DNA-Fragmente von freien Nukleotiden	46
2.2.6	Multiple tissue Northern Blot	47
2.2.6.1	Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran	47
2.2.6.2	Waschen und Exposition der Membran	48
2.2.7	Entfernen einer Sonde von einer Membran	49
2.2.8	Screening einer Rattennieren cDNA-Bibliothek	50
2.2.8.1	Primäres Screening	50
2.2.8.1.1	Herstellung der Bakteriensuspension	51
2.2.8.1.2	Bestimmung des Phagentiters durch Infektion der Bakterien	51
2.2.8.1.3	Herstellung der Nitrozellulosefilter (Replikafilter)	52

2.2.8.1.4	Herstellung der radioaktiven Sonde.....	53
2.2.8.1.5	Hybridisierung der Nitrozellulosefilter.....	53
2.2.8.2	Sekundäres <i>Screening</i>	54
2.2.8.3	„ <i>In vivo Exzision</i> “ der pBluescript-Phagemide aus dem Uni-ZAP XR-Vektor... 55	55
2.2.8.4	Isolierung der pBluescript-Plasmide und Charakterisierung der <i>inserts</i>	56
2.2.9	Proteinbiochemische Methoden.....	57
2.2.9.1	Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen	57
2.2.9.1.1	Vorbereitung der Glutathion-Sepharose 4B	57
2.2.9.1.2	Reinigung der GST-Fusionsproteine	58
2.2.9.2	Thrombinspaltung der GST-Fusionsproteine	59
2.2.9.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	60
2.2.9.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	62
2.2.9.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	62
2.2.9.4.2	Coomassie Blau-Färbung.....	64
2.2.9.4.3	Western Blot.....	65
2.2.9.4.4	Immundetektion.....	68
2.2.9.4.5	Peptidinhibition des affinitätsgereinigten Antikörpers 1965	69
2.2.10	Affinitätsreinigung von Antiseren	69
2.2.10.1	Herstellung der Peptidaffinitätssäulen.....	70
2.2.10.2	Affinitätsreinigung des Antiserums	71
2.2.11	Herstellung von Zellfraktionen eukaryontischer Zellen	72
2.2.11.1	Herstellung von löslichen und partikulären Zellfraktionen	72
2.2.11.2	Reinigung der Kernfraktion eukaryontischer Zellen	73
2.2.12	Herstellung von Zellfraktionen aus Geweben der Ratte.....	74
2.2.13	RII- <i>overlay</i>	74
2.2.13.1	Radioaktive Markierung der RII-Untereinheiten.....	75
2.2.13.2	Abtrennung der RII-Untereinheiten von freien Nukleotiden.....	75
2.2.13.3	Hybridisierung.....	76
3	ERGEBNISSE.....	78
3.1	Sequenzanalyse des Klons 2.1	78
3.2	Untersuchung der gewebespezifischen Expression der mRNA von rHt31	82
3.3	Kartierung der RII-Bindungsdomäne	84
3.3.1	Herstellung von Deletionsmutanten durch PCR.....	84
3.3.2	Expression der Deletionsmutanten als GST-Fusionsproteine	86
3.3.3	RII- <i>overlay</i> mit den GST-Fusionsproteinen	88

3.3.3.1	Die GST-Fusionsproteine rHt31 1-64, 1-80, 1-313, 65-313 und 80-313	88
3.3.3.2	RII- <i>overlay</i> mit dem GST-Fusionsprotein rHt31 281-576	89
3.4	Charakterisierung einer zweiten RII-Bindungsdomäne in rHt31	90
3.4.1	Sequenzanalyse des C-Terminus	90
3.4.2	Kartierung der potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 mittels RII- <i>overlay</i>	92
3.4.2.1	Herstellung von Deletionsmutanten durch PCR.....	92
3.4.2.2	Expression der Deletionsmutanten als GST-Fusionsproteine und RII- <i>overlay</i> ...	95
3.5	Nachweis einer potentiellen RII-Bindungsdomäne in hBrx	98
3.5.1	cDNA-Synthese aus ZR-75-1-RNA und Klonierung eines hBrx-Fragmentes	98
3.5.2	Expression der Deletionsmutante hBrx 84-378 als GST-Fusionsprotein und RII- <i>overlay</i>	99
3.6	Herstellung von hBrx-Deletionsmutanten für Strukturanalysen	101
3.7	Expressions- <i>Screening</i> einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek mit rHt31	104
3.8.1	Sequenzanalyse des <i>inserts</i> von Klon 3.1.....	106
3.8	Untersuchung der zell- und gewebespezifischen Expression von rHt31, hHt31 und hBrx	108
3.8.1	Charakterisierung des gegen rHt31/hHt31 und hBrx gerichteten affinitätsge- reinigten Antikörpers 1965	108
3.8.2	Detektion von immunreaktiven Proteinen in zwei Brustkrebszelllinien	110
3.8.2.1	Detektion von immunreaktiven Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 170-300 kDa in ZR-75-1- und MCF-7-Zellen	110
3.8.2.2	Detektion von immunreaktiven Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 35-120 kDa in MCF-7- und ZR-75-1-Zellen	113
3.8.3	Detektion von immunreaktiven Proteinen mit dem Antikörper 1965 in ver- schiedenen Nierenzelllinien (COS.M6, HEK293 und IMCD-Zellen).....	114
3.8.4	Detektion von immunreaktiven Proteinen mit unterschiedlichem Molekular- gewicht in subzellulären Fraktionen verschiedener Rattengewebe	116
3.9	Immunoblot und RII- <i>overlay</i> mit subzellulären Fraktionen von ZR-75-1- Zellen.....	118
3.10	Analyse der genomischen Struktur von rHt31/hHt31, hBrx und Proto-Lbc	120
3.10.1	Konstruktion einer hypothetischen cDNA von hHt31.....	120
3.10.2	Experimentelle Bestätigung der hypothetischen cDNA von hHt31 mittels 5'- und 3'-RACE.....	123
3.11	Immunoblot mit dem anti-hHt31-Antikörper 3060	124

4	DISKUSSION	127
4.1	Charakterisierung des <i>inserts</i> von Klon 2.1 (rHt31).....	127
4.2	Kartierung der RII-Bindungsdomäne in rHt31	128
4.3	Eine weitere RII-Bindungsdomäne befindet sich im C-Terminus von rHt31 ...	129
4.4	hBrx als potentielles AKAP	131
4.5	Untersuchung der mRNA-Expression von rHt31	133
4.6	Die subzelluläre Verteilung von rHt31, hHt31 und hBrx in verschiedenen Geweben und Zelllinien.....	134
4.7	hHt31/rHt31, hBrx und Proto-Lbc sind Spleißvarianten eines Gens.....	136
5	ZUSAMMENFASSUNG	139
6	LITERATURVERZEICHNIS	141
7	ANHANG	151

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Rosenthal für die interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und die großzügige Förderung und freundliche Begleitung meiner Forschungsarbeiten danken.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. E. Klußmann für die intensive Betreuung bedanken. Ich hatte jederzeit die Möglichkeit, auftretende Fragen und Probleme zu diskutieren. Für sein Engagement, seine Geduld und für seine motivierenden Worte bin ich ihm sehr dankbar.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. E. Klausenz und Frau B. Mohs für ihren exzellenten Sequenzierservice. Bei Frau A. Geelhaar, Frau Dr. G. Papsdorf und Frau R. Loose möchte ich mich für die Anleitung und Hilfe in der Zellkultur bedanken. Herrn Dr. G. Krause danke ich für die Hilfe bei der Sequenzanalyse von rHt31 und für seine Alignmentstudien, Herrn Prof. Dr. H. Oschkinat für die Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zur Raumstruktur von Deletionsmutanten von rHt31 und hBrx.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen ehemaligen Kollegen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Rosenthal, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mir in vielen Diskussionen wertvolle Anregungen gaben.

Großer Dank gilt der Sonnenfeldt-Stiftung in Berlin, die mir durch die großzügige Gewährung eines Stipendiums die finanziellen Mittel zur Verwirklichung dieser Arbeit zur Verfügung stellte.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken, die großen Anteil an meiner Arbeit nahmen und die mir durch ihre ständige Unterstützung und Motivation die Möglichkeit gaben, meine Ausbildung unter optimalen Bedingungen zu absolvieren.

Curriculum Vitae

Name: Pepperle

Vorname: Barbara

Geburtsdatum: 04.04.1972

Geburtsort: Berlin

1978 bis 1986 Polytechnische Oberschule, Berlin

1986 bis 1990 Erweiterte Oberschule Immanuel Kant (Abitur), Berlin

1990 Krankenpflegepraktikum, Krankenhaus Köpenick, Berlin

1990 bis 1991 Care Assistent, St. Bartholomews Hospital, London (England)

1991 bis 1998 Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin

1998 bis 2000 Promotion am Forschungsinstitut für Molekulare Medizin (FMP)
mit einem Stipendium der Sonnenfeld-Stiftung, Berlin

1999 bis 2000 Ärztin im Praktikum, Institut für Pharmakologie,
Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin

seit 01.01.2001 Assistenzärztin in der IV. Medizinischen Klinik, Abt. Nephrologie
Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin