

1 Einleitung

Die physiologische Wirkung einer Vielzahl von Hormonen und Neurotransmitter wird über die Aktivierung von Signalkaskaden, welche den Phosphorylierungsstatus von Effektorproteinen verändern, vermittelt (Krebs et al. 1979, Krebs 1985, Hunter 1995, Lester und Scott 1997). An diesem reversiblen Prozeß sind zwei Klassen von Enzymen beteiligt: Proteinkinasen und Phosphoproteinphosphatasen. Die Phosphorylierung erfolgt durch Kinasen, welche die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe von ATP auf spezifische Serin- oder Threoninreste katalysieren, die Dephosphorylierung wird durch Phosphoproteinphosphatasen vermittelt. Viele dieser Enzyme sind ubiquitär verteilt und zeigen eine breite und überlappende Substratspezifität. Dennoch führt jedes hormonelle Signal zu spezifischen zellulären Reaktionen. Einer der Mechanismen zur präzisen Kontrolle und Regulation der Enzymaktivitäten ist die Kompartimentierung dieser Enzyme durch die Assoziation mit Ankerproteinen, welche sie in der Nähe ihrer Substrate lokalisieren (Hubbard und Cohen 1993, Faux und Scott 1996, Pawson und Scott 1997, Schillace und Scott 1999, Edwards und Scott 2000, Feliciello et al. 2001). Die Proteinkinase A ist eine der multifunktionellen Kinasen mit einer breiten Substratspezifität, welche durch die sogenannten *protein kinase A anchoring proteins* (AKAPs) an subzellulären Strukturen verankert wird.

1.1 Proteinkinase A (PKA) und *protein kinase A anchoring proteins* (AKAPs)

1.1.1 Proteinkinase A

Bei vielen wichtigen zellulären Prozessen wie Kontraktion, Sekretion, Stoffwechsel, Gentranskription, Zellwachstum und -teilung erfolgt die Weiterleitung extrazellulärer Signale über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, das G-Protein G_s, Aktivierung einer Adenylzyklase und Bildung des *second-messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (Wedegaertner et al. 1995, Taussig und Gilman 1995). Alle bisher bekannten Effekte von cAMP werden mit Ausnahme einiger, direkt durch cAMP regulierter Ionenkanäle (*cyclic nucleotide-gated (CNG) channels*) des olfaktorischen

und visuellen Systems (Wei et al. 1998, Broillet und Firestein 1999, Kingston et al. 1999), durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) vermittelt.

Das inaktive PKA-Holoenzym wird aus einem Dimer der regulatorischen Untereinheiten (R) und zwei katalytischen Untereinheiten (C) gebildet (Beebe und Corbin 1986). Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung von je zwei Molekülen cAMP an die regulatorischen Untereinheiten, wodurch die Bindungsaffinität zwischen den regulatorischen und katalytischen Untereinheiten verringert wird (Taylor et al. 1990, Taskén et al. 1997). Die freigesetzten katalytischen Untereinheiten können ihre Substrate an Serin- bzw. Threoninresten phosphorylieren, die in folgendem Motiv vorliegen: Arg-X₁₋₂-Ser/Thr-X (Kennelly und Krebs 1991). Aufgrund der Häufigkeit dieses Motivs in vielen Proteinen muß der cAMP-Spiegel und die Kinaseaktivität durch verschiedene Regulationsmechanismen kontrolliert werden. So wird der intrazelluläre cAMP-Spiegel durch das Verhältnis von Adenylylzyklase- und Phosphodiesteraseaktivität bestimmt (Tang und Gilman 1992, Beavo et al. 1994). Signalterminierungsmechanismen wie die Desensibilisierung der Adenylylzyklase oder die lokalisierte Aktivierung der Phosphodiesterasen sichern eine weitere lokale Reduktion des *second messenger* cAMP (Smith et al. 1996). Die stärkere Expression der regulatorischen gegenüber den katalytischen Untereinheiten führt zur schnellen Reformation des Holoenzym bei Absinken des cAMP-Spiegels (Amieux et al. 1997).

Die Untereinheiten der PKA werden bei den Mammalia von sieben verschiedenen Genen, welche auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, kodiert. Drei Gene kodieren für die Isoformen der katalytischen Untereinheit C α , C β und C γ (Uhler et al. 1986a, Uhler et al. 1986b, Beebe et al. 1990) und vier Gene für die Isoformen der regulatorischen Untereinheit RI α , RI β , RII α und RII β (Sandberg et al. 1987, Solberg et al. 1991, Øyten et al. 1989 und Levy et al. 1988). Die regulatorische Untereinheit RI α existiert in den zwei Spleißvarianten RI α 1a und RI α 1b (Solberg et al. 1997).

Die beiden vorherrschenden katalytischen Untereinheiten C α und C β werden in den meisten Geweben exprimiert, hingegen ist die katalytische Untereinheit C γ ausschließlich im Hoden zu finden (Beebe et al. 1990). Die regulatorischen Untereinheiten zeigen ebenfalls ein unterschiedliches Expressionsmuster. Während RI α und RII α ubiquitär in den Geweben vorkommen, ist die regulatorische Untereinheit RI β in erster Linie im Gehirn zu finden. RII β wird selektiv im Gehirn, im neuroendokrinen Gewebe, in den Granulosazellen des Ovars und in den Sertoli-Zellen des Hoden exprimiert (Erlichman

et al. 1980, Stein et al. 1987). Das PKA-Holoenzym wird nach der Isoform der regulatorischen Untereinheiten benannt.

Die katalytischen Untereinheiten unterscheiden sich kaum in Bezug auf die Substratspezifität und die Interaktion mit den regulatorischen Untereinheiten (Taylor et al. 1990, Gamm et al. 1996), die vier regulatorischen Untereinheiten hingegen weisen sowohl hinsichtlich der cAMP-Affinität als auch in der Verteilung innerhalb der Zelle Unterschiede auf (Corbin et al. 1975, Taylor et al. 1990, Taskén et al. 1997). So ist das Typ I-PKA-Holoenzym (RI α oder RI β) hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert, während in einigen Geweben bis zu 75 % des Typ II-PKA-Holoenzym mit RII α - oder RII β -Untereinheiten an subzellulären Strukturen verankert sind (Corbin et al. 1975, Scott 1991). Die Unterschiede in der subzellulären Lokalisation der Typ I- und Typ II-PKA sind weitere Faktoren, die zu einer gesteigerten Spezifität in der zellulären Antwort beitragen.

1.1.2 Protein kinase A anchoring proteins (AKAPs)

Die Assoziation der RII-Untereinheiten mit intrazellulären Kompartimenten wird durch AKAPs vermittelt (Rubin 1994, Faux und Scott 1996, Dell'Acqua und Scott 1997, Lester und Scott 1997, Pawson und Scott 1997, Schillace und Scott 1999a, Colledge und Scott 1999, Edwards und Scott 2000). Bei den Ankerproteinen handelt es sich um eine Gruppe funktionell verwandter Moleküle, die durch die Interaktion mit Typ I bzw. Typ II der regulatorischen Untereinheiten (RI bzw. RII) des PKA-Holoenzym charakterisiert sind. Die ersten Ankerproteine wurden bei der affinitätschromatographischen Reinigung der RII-Untereinheiten über cAMP-Sepharose isoliert (Sarkar et al. 1984). Diese assoziierten Proteine zeigten auch nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran eine RII-Bindung (Lohmann et al. 1984). Auf dieser Beobachtung beruht der RII-*overlay*, die Standardmethode zur Detektion von AKAPs. Es handelt sich hierbei um einen modifizierten Western Blot, bei dem statt eines primären Antikörpers radioaktiv markierte RII-Untereinheiten als Sonde eingesetzt werden (Bregman et al. 1989, Carr und Scott 1992). Diese Methode eignet sich auch zum *Screening* von cDNA-Expressionsbibliotheken.

In den letzten 16 Jahren wurden mehr als 25 AKAPs mit Molekulargewichten zwischen 15 und 550 kDa aus verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies isoliert (Tab. 1.1). Einige dieser Proteine existieren zudem in einer Vielzahl von Spleißvarianten und Isoformen (Colledge und Scott 1999).

Vorkommen und Eigenschaften einiger AKAPs

| AKAP | Gewebe/Kompartiment | Charakteristika |
|----------------------------------|---|--|
| AKAP15/18 | Plasmamembran, Zytosol | AKAP18 α und β sind an der Plasmamembran über Myristoylierung und Palmitoylierung verankert; AKAP18 γ ist zytosolisch lokalisiert |
| Ht31 | wurde aus einer Schilddrüsen-cDNA-Bibliothek isoliert; Zytosol | das der RII-Bindungsdomäne entsprechende Peptid Ht31 verhindert die PKA-Kompartimentierung durch AKAPs in Zellen |
| AKAP75/79/ AKAP150 | Plasmamembran, postsynaptische Membran, dendritisches Zytoskelett | Vorkommen im Gehirn von Rind (AKAP75), Mensch (AKAP79) und Ratte (AKAP150); bindet auch Calcineurin (PP2B) und PKC; Verankerung an der Plasmamembran und dem dendritischen Zytoskelett über polybasische Domänen |
| Ezrin | Aktin-Zytoskelett | könnte über EBP50/NHERF an CFTR gebunden sein |
| TAKAP80 | fibröser Mantel des Spermien-schwanzes | wird spezifisch im Hoden exprimiert |
| AKAP82 | fibröser Mantel des Spermien-schwanzes | potentielle Rolle in der Spermienkapazitation |
| AKAP95 | Kernmatrix | enthält ein Zinkfingermotiv, bindet an Chromatin und interagiert mit Eg7 (Bestandteil des 13S-Kondensinkomplexes) |
| AKAP-KL | Niere und Lunge; Aktin-Zytoskelett, apikale Membran von Epithelzellen | verschiedene Spleißvarianten |
| AKAP220 | Peroxisomen | bindet auch an PP1 |
| Gravin (AKAP250) | Aktin-Zytoskelett | bindet auch an PKC und β_2 -Adrenorezeptor |
| mAKAP | Skelett- und Herzmuskel, Gehirn; Kernmembran | wiederholte spektrinhomologe Domänen sind in die subzelluläre Verankerung involviert; die Expression wird während der Entwicklung reguliert |
| AKAP350/450/ CG-NAP Yotiao | postsynaptische Membran, neuromuskuläre Endplatte, Zentrosomen | verschiedene Spleißvarianten; CG-NAP bindet auch PP1, PP2A und PKN, Yotiao verankert PKA und PP1 am NMDA-Rezeptor |

| | | |
|--|--|---|
| S-AKAP84/ D-AKAP1 AKAP121/149 | äußere mitochondriale Membran, endoplasmatisches Retikulum | verschiedenen Spleißvarianten; dual- spezifisches AKAP (s. Text), bindet RI- und RII-Untereinheiten, enthält KH- Domänen (RNA-Bindung) |
| D-AKAP2 | Expression in vielen Geweben | dual-spezifisches AKAP (s. Text) |
| AKAP _{CE} | aus einer <i>C. elegans</i> cDNA-Ex- pressionsbibliothek isoliert | bindet an RI-ähnliche Untereinheit; ent- hält RING-Finger Domäne (Bestandteil vieler zytoplasmatischer, zytoskelett- assoziiierter und integraler Membran- proteine |
| DAKAP550 | <i>Drosophila</i> AKAP; Zytosol | enthält zwei RII-Bindungsdomänen |
| Abkürzungen: CFTR: <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> ; EBP50: ERM- binding phosphoprotein of 50 kDa; ERM: Ezrin/Radixin/Moesin; NHERF: Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor; NMDA: N-methyl-D-Aspartat; PKC: Proteinkinase C; PKN: Protein- kinase N; PP1: Proteinphosphatase 1; PP2B: Proteinphosphatase 2 B | | |

Tab. 1.1: Vorkommen und Eigenschaften von verschiedenen AKAPs (modifiziert nach Colledge und Scott 1999).

Die meisten der bisher isolierten AKAPs binden bevorzugt die RII-Untereinheiten (RII α und RII β). Daneben sind sogenannte *dual-spezifische* AKAPs (D-AKAPs) bekannt, die neben der RII- auch die RI-Untereinheit binden (Huang et al. 1997a und 1997b, Miki und Eddy 1998 und 1999, Huang et al. 1999). Das AKAP_{CE} aus *C. elegans* bindet ausschließlich die RI-Untereinheit (Angelo und Rubin 1998 und 2000).

Jedes AKAP besitzt zwei Bindungsmotive. Zum einen ein hoch konserviertes *anchoring* Motiv, welches die Bindung an das Dimer der regulatorischen RI/RII-Untereinheiten vermittelt, und zum anderen ein *targeting* Motiv, welches für die Assoziation des PKA-AKAP-Komplexes mit subzellulären Kompartimenten verantwortlich ist. In Abb. 1.1 ist das sogenannte Telefonmodell dargestellt, welches die Bindung der PKA an Zellkompartimente durch die AKAPs verdeutlicht.

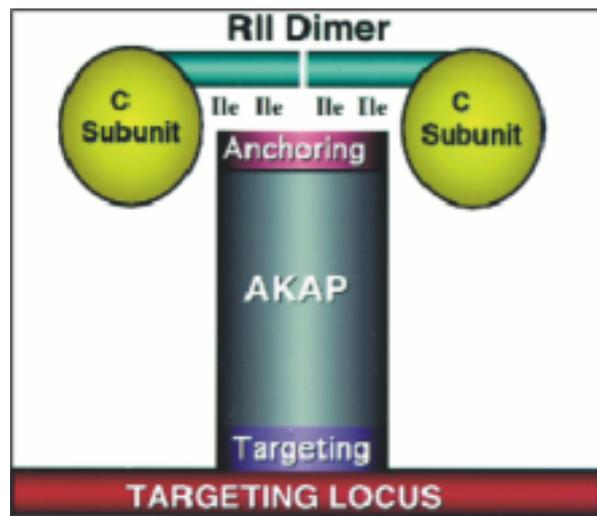


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der PKA-AKAP-Bindung (Telefonmodell, Dell'Acqua und Scott 1997). Die *anchoring*-Domäne des AKAPs bindet an das Dimer der RII (RI)-Untereinheiten der PKA. Die *targeting*-Domäne bindet an subzelluläre Kompartimente. Weitere Erläuterungen siehe Text. Ile: Isoleuzin; RII-Dimer: Dimer aus RII-Untereinheiten; C Subunit: katalytische Untereinheit der PKA; Targeting Locus: Zellkompartiment.

1.1.3 Charakterisierung der AKAP-PKA-Interaktion

Bis zur Entdeckung der dual-spezifischen AKAPs (D-AKAP1/S-AKAP84/AKAP121/AKAP149, D-AKAP2 und FSC1/AKAP82) wurde davon ausgegangen, daß nur die RII-Untereinheiten ($\text{RII}\alpha$ und $\text{RII}\beta$) der PKA durch AKAPs gebunden werden. Mit Hilfe von Deletionsmutanten und chimären Proteinen wurde die für die Interaktion mit den AKAPs notwendige minimale Region in der $\text{RII}\alpha$ - bzw. $\text{RII}\beta$ -Untereinheit der PKA ermittelt (Luo et al. 1990). Dabei zeigte sich, daß die Dimerisierung der RII-Untereinheiten eine Voraussetzung für die Interaktion ist und die ersten 44 N-terminalen Aminosäuren sowohl für die Dimerisierung als auch für die Interaktion erforderlich sind (Scott et al. 1990, Hausken et al. 1994).

Die dreidimensionale Struktur des N-Terminus der regulatorischen Untereinheit $\text{RII}\alpha$ (Aminosäuren 1-44) wurde mittels der NMR-Technik ermittelt (Newlon et al. 1997, 1999 und 2001). Es handelt sich um ein antiparalleles Dimer aus zwei Polypeptidketten, die in einem „Helix-turn-Helix“ Motiv vorliegen und eine vier-Helix-Bündel-Formation

Typ X ausbilden. Das Fragment kann in zwei funktionelle Regionen unterteilt werden: die ersten 23 N-terminalen Aminosäuren vermitteln die AKAP-Bindung durch eine breite hydrophobe Oberfläche, die restlichen Aminosäuren 24-44 sind für die Dimerisierung erforderlich. Die NMR-Strukturanalysen bestätigten frühere Beobachtungen, wonach die ersten 5 N-terminalen Aminosäuren, insbesondere die Isoleuzine an Position 3 und 5 (Hausken et al. 1994 und 1996), ebenso wie die Aminosäuren 11 bis 25 (Li und Rubin 1995), essentiell für die Bindung der RII-Untereinheiten an die AKAPs sind.

Bei der RII-Bindungsdomäne der Ankerproteine handelt es sich um ein stark konserviertes Strukturmotiv innerhalb dieser Proteinfamilie. Bei dem AKAP Ht31 konnte als erstes gezeigt werden, daß es sich hierbei um eine amphipatische Helixstruktur handelt (Carr et al. 1991). Die Bedeutung der amphipatischen α -Helix für die RII-AKAP-Interaktion konnte anhand von Mutagenesestudien, bei denen die Aminosäure Prolin an verschiedenen Stellen der RII-Bindungsdomäne eingeführt wurde, bewiesen werden. Aufgrund sterischer Inkompatibilität verhindert Prolin die Ausbildung einer α -helikalen Konformation, wobei die amphipatische Natur der Region nur gering beeinflusst wird. Eine RII-Bindung konnte für die mutierte RII-Bindungsdomäne von Ht31 nicht mehr nachgewiesen werden (Carr et al. 1991). Andere Untersuchungen (Alanin-scanning-Mutagenesen) zeigten die Bedeutung hydrophober Aminosäuren mit langen aliphatischen Seitenketten (Valin, Leuzin, Isoleuzin) für die AKAP-PKA-Interaktion (Glantz et al. 1993). Diese Ergebnisse wurden durch die NMR-Strukturanalysen bestätigt (Newlon et al. 1999). Die NMR-Daten deuten darauf hin, daß direkte Helix-Helix-Kontakte zwischen den hydrophoben Aminosäuren der Bindungsdomäne der AKAPs und der regulatorischen Untereinheit der PKA die Assoziation der beiden Proteine vermitteln. Durch Alignmentstudien mit 15 verschiedenen AKAPs wurde ein allgemeines RII-Bindungsmotiv postuliert: X-(Φ)-X-X-X-(A,S)-X-X-(Φ_2)-X-X-(Φ_2)-X-X-(A,S)-(Φ), wobei X jede beliebige Aminosäure, Φ die Aminosäuren Valin, Leuzin oder Isoleuzin, A die Aminosäure Alanin und S die Aminosäure Serin symbolisiert (Vijayaraghavan et al. 1999).

Die Assoziation der RI-Untereinheiten der PKA mit AKAPs wurde erst in jüngeren Studien genauer untersucht (Miki und Eddy 1999, Herberg et al. 2000). Die dualspezifischen AKAPs D-AKAP1 (S-AKAP84/AKAP121/AKAP149) und D-AKAP2 assoziieren sowohl mit Typ I als auch mit Typ II der regulatorischen Untereinheiten der

PKA. RII α bindet jedoch diese Proteine mit einer 25-500fach höheren Affinität als die RI-Untereinheit (Huang et al. 1997a, 1997b und 1999). Seither wurden verschiedene AKAPs kloniert, die auch die RI-Untereinheit mit hoher Affinität binden (Miki und Eddy 1998 und 1999, Yang et al. 1998). Die *anchoring* Domäne des AKAP_{CE} von *C. elegans* bindet die RI α -ähnliche Untereinheit R_{CE} mit nanomolarer Affinität und weder RII α noch RII β können die Bindung von R_{CE} an das AKAP_{CE} kompetitiv inhibieren (Angelo und Rubin 1998 und 2000). NMR-Analysen des N-Terminus der regulatorischen Untereinheit Typ RI α (Aminosäuren 1-61) zeigten, daß auch dieser eine vier-Helix-Bündel-Formation Typ X, ähnlich der Struktur des N-Terminus der RII α -Untereinheit, ausbildet (Banky et al. 2000). Unterschiede in der Sekundärstruktur der beiden regulatorischen Untereinheiten bestehen lediglich im Bereich der 9 N-terminalen Aminosäuren, die in der RI α -Untereinheit eine α -helikale und in der RII α -Untereinheit eine β -Faltblattstruktur ausbilden. Die unterschiedliche Sekundärstruktur könnte möglicherweise die verschiedenen Bindungsaffinitäten der AKAPs für die Isoformen der regulatorischen Untereinheiten der PKA erklären (Banky et al. 2000).

Zur funktionellen Bedeutung der RI-AKAP-Interaktion ist noch wenig bekannt. Die PKA Typ I mit RI α regulatorischen Untereinheiten wird in nahezu allen Geweben exprimiert (Taylor et al. 1990, Francis und Corbin 1994). Auch wenn RI α hauptsächlich zytosolisch lokalisiert ist (Rubin 1994), zeigen verschiedene Studien eine Verankerung *in vivo* (Skålhegg et al. 1994, Robinson et al. 1996, Reinitz et al. 1997). Dabei scheint die dynamische Verankerung der RI α -Untereinheiten im Gegensatz zur statischen Verankerung der RII-Untereinheiten von entscheidender Bedeutung für die Zelle zu sein. So wurde die Assoziation der RI-Untereinheiten mit der Plasmamembran von Erythrozyten (Rubin et al. 1973) und aktivierten T-Lymphozyten (Skålhegg et al. 1994) beschrieben. Bei der cAMP-vermittelten Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die PKA Typ I könnte die Lokalisation des Enzyms möglicherweise auch durch AKAPs vermittelt werden (Taskén et al. 1997). In *knockout*-Mäusen, die im Skelettmuskelgewebe keine regulatorischen Untereinheiten Typ II exprimieren, binden die RI α -Untereinheiten an ein mit Kalziumkanälen assoziiertes AKAP und erhalten so die normale, cAMP-abhängige Kanalleitfähigkeit durch die korrekte Verfügbarkeit der katalytischen Untereinheiten der PKA (Burton et al. 1997).

In vivo konnte weiterhin gezeigt werden, daß die katalytischen Untereinheiten in der Zelle bevorzugt mit den RII-Untereinheiten assoziieren und Typ I-PKA-Holoenzym

gebildet wird, wenn die Menge der freien katalytischen Untereinheiten die Menge der freien RII-Untereinheiten übersteigt (Otten et al. 1991). In $RI\beta$ - und $RII\beta$ -*knockout*-Mäusen wurde ein kompensatorischer Anstieg der $RI\alpha$ -Untereinheiten beobachtet. Dieser Effekt resultierte nicht aus einer gesteigerten Neusynthese der $RI\alpha$ -Untereinheiten, sondern aus dem geringeren proteolytischen Abbau der $RI\alpha$ -Untereinheiten durch Inkorporation in das PKA-Holoenzym (Amieux et al. 1996). Dieser wichtige Mechanismus zum Erhalt des Gleichgewichts zwischen den regulatorischen und katalytischen Untereinheiten ist möglicherweise essentiell für den Schutz der Zelle vor einer unregulierten katalytischen Aktivität. Ankerproteine, die auch die RI-Untereinheiten der PKA Typ I binden, könnten weiterhin die korrekte Lokalisation des Enzyms in der Zelle gewährleisten.

Durch Mutagenesestudien mit den Aminosäuren Valin und Alanin konnten hydrophobe Aminosäuren an drei homologen Positionen (Konsensusposition 2, 6 und 10 einer amphipatischen Helix) in der $RI\alpha$ - bzw. $RII\alpha$ -Bindungsdomäne der Ankerproteine FSC1/AKAP82 bzw. Ht31 identifiziert werden, die für die $RI\alpha$ - bzw. $RII\alpha$ -Bindung erforderlich sind. Dabei scheint die Länge der aliphatischen Seitenkette der Aminosäure an Konsensusposition 6 einer amphipatischen Helix die $RI\alpha$ - (kurze Seitenkette) oder $RII\alpha$ -Bindungsspezifität (lange aliphatische Seitenkette) zu bestimmen (Miki und Eddy 1999). Diese von den Autoren postulierte „Drei-Aminosäuren-Regel“ gilt auch für andere AKAPs und ist vereinbar mit der erwähnten Konsensussequenz für die RII-Bindungsdomäne (Vijayaraghavan et al. 1999).

1.1.4 Die Bindung des PKA-AKAP-Komplexes an subzelluläre Kompartimente- die *targeting*-Domäne

Die Spezifität in der PKA-Verankerung wird durch die *targeting*-Domäne erreicht, ein Strukturmotiv, das im Gegensatz zu der *anchoring*-Domäne weder in der Sequenz noch in der Struktur der AKAPs konserviert ist. So werden AKAPs durch Protein-Protein-Interaktionen an strukturelle Elemente in der Zelle und durch Protein-Lipid-Interaktionen an Membranen verankert.

Verschiedene AKAPs assoziieren mit unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, so z. B. mit den Zentrosomen, den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum und

dem Golgi-Apparat, der Plasma- und Kernmembran und mit Vesikeln (Lester und Scott 1997, Colledge und Scott 1999, Edwards und Scott 2000). Zytoplasmisch lokalisierte AKAPs sind ebenfalls beschrieben (Carr et al. 1993, Han et al. 1997, Trotter et al. 1999). Das bisher einzige bekannte, im Zellkern exprimierte AKAP ist AKAP95 (Coghlan et al. 1994, Eide et al. 1998, Collas et al. 1999, Steen et al. 2000). In Abb. 1.2 ist schematisch die subzelluläre Lokalisation einiger AKAPs dargestellt.

Die genauen Mechanismen der Verankerung sind nur für einige AKAPs bekannt. So wird das herzmuskelspezifische Ankerprotein mAKAP durch eine Region mit drei spektrinartigen Wiederholungssequenzen an der perinukleären Membran der Kardiomyozyten verankert (Kapiloff et al. 1999). Zwei Isoformen des AKAP15/18 werden durch Lipidmodifikationen (Myristoylierung und Palmitoylierung) an der Plasmamembran verankert (Fraser et al. 1998, Trotter et al. 1999). Drei polybasische Regionen in der *targeting*-Domäne des AKAP79 sind an der Lokalisation des Proteins an der inneren postsynaptischen Membran (PSD, *postsynaptic density*) beteiligt (Dell'Acqua et al. 1998).

Neuere Studien deuten darauf hin, daß die Verankerung durch unterschiedliches Spleißen der mRNA reguliert werden kann. So konnte für zwei Spleißvarianten des dual-spezifischen D-AKAP1 gezeigt werden, daß unterschiedliche N-terminale *targeting*-Domänen für die Lokalisation an der Mitochondrienmembran bzw. am endoplasmatischen Retikulum verantwortlich sind (Huang et al. 1999). Spleißvarianten des AKAPs CG-NAP (AKAP350/450) werden an den Zentrosomen oder dem Golgi-Apparat verankert. Eine weitere Spleißvariante, das AKAP Yotiao, assoziiert direkt mit dem NMDA-Rezeptor an der postsynaptischen Membran (Takahashi et al. 1999, Witczak et al. 1999, Schmidt et al. 1999, Westphal et al. 1999).

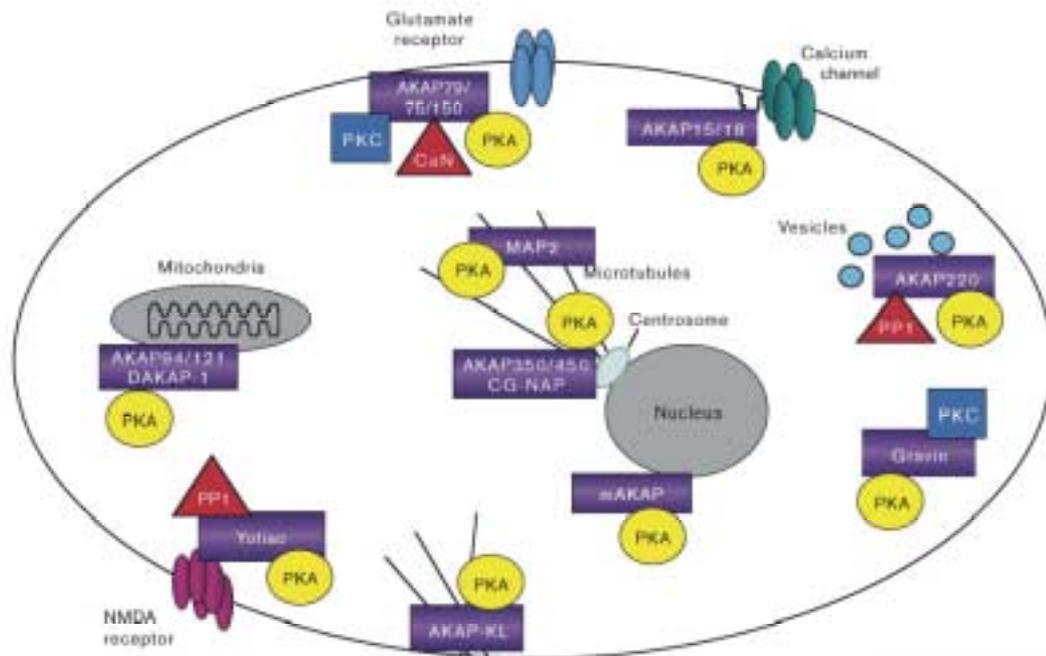


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der subzellulären Lokalisation einiger AKAPs (Edwards und Scott 2000).

1.1.5 AKAPs als *Scaffolds* (Gerüste) für verschiedene Signaltransduktionsproteine

Die AKAPs wurden zuerst durch die Interaktion mit der Proteinkinase A charakterisiert. Einige dieser Proteine können jedoch auch andere an der Signaltransduktion beteiligte Enzyme binden. Durch die gleichzeitige Verankerung von Enzymen, die gegensätzliche Reaktionen katalysieren, wie z. B. Kinasen und Phosphatasen, können diese, auch als *scaffolding* (gerüstbildende) Proteine bezeichneten AKAPs ganze Signalkomplexe in der Nähe bestimmter Substrate lokalisieren und so zur Spezifität und Regulation der zellulären Antwort auf extrazelluläre Signale beitragen (Faux und Scott 1996, Schillace und Scott 1999, Colledge und Scott 1999, Edwards und Scott 2000, Feliciello et al. 2001).

AKAP79 war das erste AKAP, für das die Interaktion mit mehreren Enzymen nachgewiesen werden konnte (Klauck et al. 1996, Kashishian et al. 1998). Dieses Protein bindet die Proteinkinase A, die Proteinkinase C und die Proteinphosphatase Calcineurin (PP2B), wobei jedes Enzym in gebundenem Zustand inhibiert ist. Da unterschiedliche Signale für die Aktivierung jedes einzelnen Enzyms notwendig sind, können an dieser

Stelle verschiedene *second messenger* wie cAMP, Kalzium und Phospholipide zusammentreffen (Faux und Scott 1996). Weitere Beispiele sind das AKAP220, welches die PKA und die Proteinphosphatase PP1 an den Peroxisomen lokalisiert (Schillace et al. 1999b), und das bereits erwähnte AKAP Yotiao, das neben der PKA ebenfalls die Proteinphosphatase PP1 bindet (Westphal et al. 1999). Das AKAP CG-NAP bindet nicht nur die PKA und die Proteinphosphatase PP1, sondern auch noch die Rho-abhängige Kinase PKN (NGF (nerve growth factor) -aktivierte Proteinkinase) und die Proteinphosphatase PP2A (Takahashi et al. 1999).

Auch andere Proteine können mit AKAPs assoziieren, so bindet Ezrin, ein Mitglied der zytoskelett-assoziierten ERM-Familie Ezrin, Radixin und Moesin, das als AKAP identifiziert wurde, an ein Protein (EBP50/NHERF), welches an der Regulation des Natrium-Protonen-Transportes in der apikalen Membran von Epithelzellen beteiligt ist (Reczek et al. 1997).

1.1.6 Funktionelle Aspekte der PKA-Verankerung durch AKAPs

Die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der PKA-Verankerung *in vivo* wurde durch die Entwicklung von synthetischen Peptiden (Ht31) mit der Sequenz der amphipatischen Helixregion des AKAP Ht31 möglich. Sie binden die RII-Untereinheiten mit hoher Affinität ($K_D = 4 \text{ nM}$) und verhindern so die Assoziation der RII-Untereinheiten mit den AKAPs (Carr et al. 1992a). Durch Myristoylierung oder durch die Kopplung mit Stearatresten (S-Ht31) werden die Peptide membranpermeabel (Scott 1997, Lester und Scott 1997). Durch die Inkubation von Zellen in Kultur mit den Ht31-Peptiden kann die Bindung der PKA an AKAPs intrazellulär inhibiert und die Auswirkung auf bestimmte zelluläre Funktionen untersucht werden.

Erste elektrophysiologische Studien zeigten nach Inhibition der PKA-Verankerung durch das Peptid Ht31 eine Abnahme der AMPA/Kainate-abhängigen Ionenströme in primär kultivierten hippocampalen Neuronen (Rosenmund et al. 1994). Andere Arbeiten konnten die Bedeutung der PKA-Verankerung bei der Regulation von L-Typ Kalziumkanälen im Herz- und Skelettmuskel (Gao et al. 1997, Johnson et al. 1994 und 1997), von kalziumaktivierten Kaliumkanälen in der glatten Muskulatur (Wang und Kotlikoff 1996) und von ROMK1-Kaliumkanälen in der Niere (Ali et al. 1998) nachweisen. AKAPs modulieren die Leitfähigkeit der Ionenkanäle durch die Lokalisation der

Proteinkinasen und -phosphatasen in der Nähe bestimmter Kanaluntereinheiten, die wahrscheinlich durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden (Fraser und Scott 1999).

Die Aktivität des NMDA-Rezeptors wird durch das AKAP Yotiao, welches auch die Proteinphosphatase PP1 bindet, moduliert. Die in gebundenem Zustand aktive Phosphatase limitiert die Kanalleitfähigkeit des NMDA-Rezeptors, bis die PKA durch cAMP aktiviert wird und den Ionenkanal oder ein assoziiertes Protein phosphoryliert, wodurch die Leitfähigkeit rapide ansteigt (Westphal et al. 1999). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß myristoylierte Ht31-Peptide die cAMP-abhängige Inhibition der Interleukin 2-Transkription in Jurkat-T-Zellen aufheben (Lester und Scott 1997) und daß S-Ht31-Peptide die Spermienmotilität einschränken (Vijayaraghavan et al. 1999).

Auch bei komplexen Prozessen, wie die durch das Hormon GLP-1 (*glucagon-like peptide*)-vermittelte Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas und in RINm5F-Zellen (klonale β -Zelllinie der Ratte) sind AKAPs beteiligt (Lester et al. 1997). Die Aktivierung der PKA durch GPL-1 führt zur Phosphorylierung von L-Typ-Kalziumkanälen (Safayhi et al. 1997) und begünstigt die Exozytose von Insulin aus sekretorischen Granula. Die Ht31-Peptid-vermittelte Inhibition der PKA-Verankerung führte zu einer deutlichen Verringerung der Insulinsekretion. Dabei wurden weder die cAMP-Bildung noch die Aktivität der katalytischen Untereinheiten der PKA durch die Peptide beeinflusst (Lester et al. 1997). Weiterhin konnte nach Expression des wildtypischen AKAP18 in RINm5F-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, welche AKAP18 nicht exprimierten, eine Erhöhung der Insulinsekretion nach GLP-1-Applikation nachgewiesen werden (Fraser et al. 1998).

1.2 Die Vasopressin-vermittelte Wasserrückresorption im Sammelrohr der Niere

Klußmann et al. (1999) zeigten, daß AKAPs auch an der durch das antidiuretische Hormon Arginin-Vasopressin (AVP) vermittelten Wasserrückresorption in den Prinzipalzellen des Sammelrohrephitels der Niere beteiligt sind. Ein Modell des molekularen Mechanismus ist in Abb. 1.3 dargestellt. Das im Hypothalamus synthetisierte Hormon AVP bindet an den Vasopressin-V2-Rezeptor der basolateralen Zellmembran der Prinzipalzellen (Birnbaumer et al. 1992). Der V2-Rezeptor ist über das G-Protein G_s an die Adenylylzyklase Typ VI gekoppelt. Die Bindung des Liganden führt zur Aktivierung des Rezeptors und über G_s zur Stimulation der Adenylylzyklase, welche cAMP als *second messenger* synthetisiert. Die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten aktiviert die PKA, die daraufhin den Wasserkanal Aquaporin 2 (AQP2) phosphoryliert (Fushimi et al. 1997, Katsura et al. 1997). AQP2 liegt in unstimulierten Zellen in der Membran von intrazellulären Vesikeln vor und transloziert nach der Phosphorylierung in die apikale, dem Urin zugewandte Zellmembran, wodurch sich die Wasserpermeabilität der Prinzipalzellen rapide erhöht (Shuttle-Hypothese; Wade et al. 1981, Wade 1994, Nielsen et al. 1995, Klußmann et al. 2000).

In gereinigten AQP2-haltigen Vesikeln konnte eine endogene PKA-Aktivität nachgewiesen werden (Lande et al. 1996). Dieser Befund legte die Vermutung nahe, daß die PKA möglicherweise über AKAPs an der Vesikelmembran verankert ist. Maric et al. (1998) etablierten ein Primärzellkulturmodell von Prinzipalzellen aus der inneren Medulla der Rattenniere (*inner medullary collecting duct* (IMCD)-Zellen), welches ermöglicht, *in vivo* die AQP2-Translokation zu untersuchen. Die Translokation von AQP2 aus intrazellulären Vesikeln von primär kultivierten Sammelrohrzellen der Rattenniere wurde durch die Präinkubation der Zellen mit dem S-Ht31 Peptid stark inhibiert. Die katalytische Aktivität der PKA wurde dagegen nicht beeinflusst (Klußmann et al. 1999). Diese Daten zeigen, daß nicht nur die Aktivität der PKA, sondern auch ihre Verankerung an spezifischen subzellulären Kompartimenten für die AQP2-Translokation von entscheidender Bedeutung ist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß verschiedene AKAPs in IMCD-Zellfraktionen, angereichert mit AQP2-haltigen Vesikeln oder mit Zellmembranen, enthalten sind (Klußmann et al. 1999).

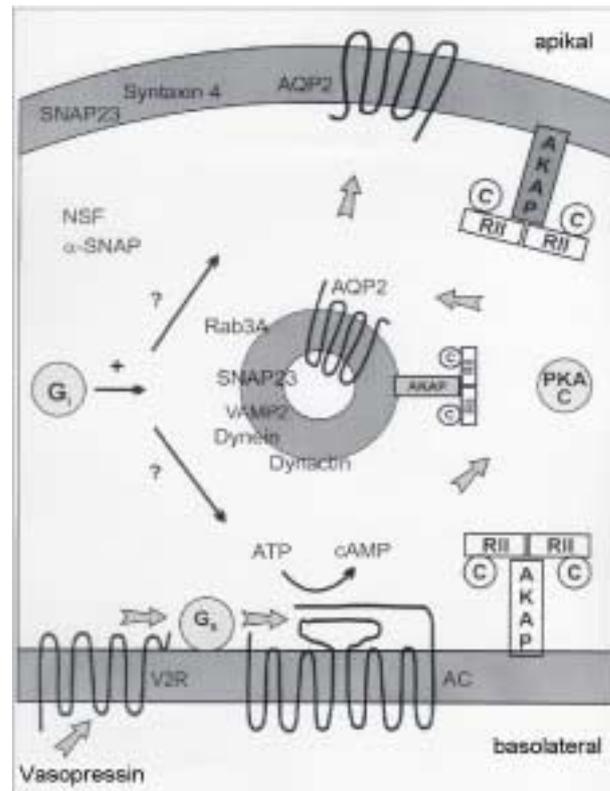


Abb. 1.3: Schema des molekularen Mechanismus der Aquaporin 2 (AQP2) -Translokation in der Prinzipalzelle der inneren Medulla der Niere (Klußmann et al. 2000). Basolateral befindet sich das Blut, apikal der hypotone Urin. Nach Stimulation des Vasopressin-V2-Rezeptors (V2R) mit Vasopressin wird über die Kopplung an ein G_s -Protein die Adenylylzyklase (AC) aktiviert. Letztere wandelt ATP in cAMP um. Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits AQP2 phosphoryliert. Daraufhin fusionieren die AQP2-haltigen Vesikel mit der apikalen Membran. Wasser kann nun entlang seines osmotischen Gradienten in die Zelle fließen und über AQP3 und AQP4 (nicht gezeigt) auf der basolateralen Seite in das Interstitium und Blut rückresorbiert werden. AKAPs verankern die PKA, die aus jeweils zwei regulatorischen (RII) und zwei katalytischen Untereinheiten (C) besteht, an subzellulären Kompartimenten wie der Zell- oder der Vesikelmembran. Ohne diese Verankerung ist die Translokation von AQP2 nicht möglich. Die an der AQP2-Translokation beteiligten AKAPs konnten bisher noch nicht näher charakterisiert werden.

Neben den oben genannten Proteinen und dem G_i -Protein, von denen eine Beteiligung an der AQP2-Translokation bekannt ist, wurden in den Prinzipalzellen weitere Proteine identifiziert, die potentiell beteiligt sein könnten: α -SNAP, Dynactin, Dynein, NSF, Rab3A, SNAP23, Syntaxin 4, Synaptobrevin II (hier als VAMP2 bezeichnet).

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Zur Identifizierung von an der AQP2-Translokation möglicherweise beteiligten AKAPs wurde in der Arbeitsgruppe Klußmann ein *Screening* einer Rattennieren-cDNA-Expressionsbibliothek mittels der RII-*overlay*-Methode durchgeführt. Dabei wurde der Partialklon 2.1 isoliert, der für ein Proteinfragment kodiert, welches dem humanen AKAP Ht31 aus der Schilddrüse homolog ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte dieser Klon genauer charakterisiert werden. Neben der Bestimmung der RII-Bindungsdomäne mittels Deletionsmutanten wurde die gewebespezifische Expression einer potentiellen mRNA und nach der Gewinnung spezifischer Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen die gewebe- und zellspezifische Proteinexpression untersucht. Weiterhin sollte durch ein erneutes *Screening* der gleichen Bibliothek die vollständige cDNA-Sequenz dieses Klons bestimmt werden. Da auch das humane AKAP Ht31 bisher nur teilweise kloniert wurde, sollte mittels 5'- und 3'-RACE auch die vollständige cDNA-Sequenz des humanen Proteins ermittelt werden.