

Regulation und Koordination der Proteinkinase A im cAMP-vermittelten Signalweg

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

angefertigt am
Fachbereich 18 - Naturwissenschaften
Abteilung Biochemie
der Universität Kassel

**U N I K A S S E L
V E R S I T Ä T**

vorgelegt von
Hans-Michael Zenn

Kassel
März 2010

Betreuer: Prof. Dr. Friedrich W. Herberg und Dr. Anke Prinz

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich W. Herberg
2. Gutachter: PD Dr. Enno Klußmann
3. Gutachter: Prof. Dr. Mireille A. Schäfer
4. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Nellen

Datum der Disputation: 02. Juni 2010

Überzeugungen sind oft die gefährlichsten Feinde der Wahrheit.

Friedrich Nietzsche

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die cAMP-vermittelte Signaltransduktion in Eukaryonten	1
1.2	Die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA)	3
1.2.1	Die C Untereinheiten der PKA	4
1.2.2	Die R Untereinheiten der PKA	6
1.3	Subzelluläre Koordination der PKA Holoenzyme durch AKAPs	8
2.	Aufgabenstellung	12
3.	Material und Methoden	13
3.1	Molekularbiologische Methoden	13
3.1.1	Amplifizierung und Präparation rekombinanter Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	13
3.1.2	Restriktionsspaltung, Modifikation und Ligation von DNA	13
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion von DNA aus Agarosegelen	15
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	15
3.1.5	Gerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA	16
3.1.6	Klonierung pro- und eukaryontischer Expressionsvektoren	18
3.2	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	21
3.2.1	Expression der PKA R Untereinheiten.....	21
3.2.2	Expression der humanen PKA-CA.....	21
3.2.3	Expression von GST-Fusionsproteinen.....	22
3.3	Protein-biochemische Methoden	22
3.3.1	Reinigung der R Untereinheiten der PKA.....	22
3.3.2	Reinigung der His ₆ -hCA	24
3.3.3	PKI(5-24) Affinitätschromatographie.....	24
3.3.4	Reinigung von GST-Fusionsproteinen.....	25
3.3.5	Thrombinspaltung von GST-Fusionsproteinen.....	26
3.3.6	GST <i>pull-down</i>	26
3.3.7	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
3.3.8	Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	28
3.3.9	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	28
3.3.10	Western Blot.....	29
3.4	Phosphorylierung der humanen R Untereinheiten des Typs II	30
3.4.1	Holoenzymbildung.....	30
3.4.2	Autophosphorylierung der Typ-II R Untereinheiten durch die PKA-CA.....	31
3.4.3	Phosphorylierung der hRIIA durch CDK1/Cyclin B.....	31
3.5	Dephosphorylierung der hRIIA	32
3.6	Biophysikalische Methoden	33
3.6.1	Bestimmung von Aktivierungskonstanten für cAMP mittels SPR	34
3.6.2	Interaktionsmessungen zwischen der C Untereinheit und den R Untereinheiten.....	35
3.6.3	Interaktionsmessungen zwischen R Untereinheiten und AKAPs	35
3.6.4	BRET ² -Interaktionsmessungen	36
3.7	Zellbiologische Methoden	37

3.7.1	Kultivierung und Passage von COS-7 und HeLa Zellen.....	37
3.7.2	Transfektion von eukaryontische Zellen.....	37
3.7.3	Immunfluoreszenzfärbung	38
4.	Ergebnisse	40
4.1	Substrat-Verfügbarkeit beeinflusst die Dissoziation des PKA Holoenzym.....	40
4.1.1	SPR-basierte Bestimmung von Aktivierungskonstanten für cAMP der PKA Holoenzyme .	41
4.1.2	Effekt von Substrat auf die Aktivierung des PKA Typ-IIA Holoenzym durch cAMP	44
4.1.3	Die P ⁰ -Stelle in der Autoinhibitionsdomäne ist eine Hauptdeterminante für die Aktivierung des PKA Heterotetramers.....	45
4.2	Autophosphorylierungen an den humanen R Untereinheiten des Typs II.....	48
4.2.1	Holoenzymbildung der humanen RIIA und	48
4.2.2	Während der Holoenzymbildung wird die hRIIA an Serin 99 und zum Teil an Serin 58 phosphoryliert	52
4.2.3	Die Autophosphorylierung der hRIIA an Serin 58 verursacht eine apparente Molekulargewichtserhöhung in der SDS-Gelelektrophorese	53
4.3	Biochemische und biophysikalische Funktionsuntersuchung der humanen RII □	
	Phosphorylierung an Serin 58	55
4.3.1	Die Bindung der RIIA an die CA Untereinheit wird durch Mutationen an der Position 58 nicht beeinflusst	55
4.3.2	Die P ⁰ -Stelle in der Autoinhibitionsstelle der RIIA ist dominant gegenüber S58 im Bezug auf die Interaktion mit der CA.....	56
4.3.3	Weder Phosphorylierung noch Mutationen der hRIIA an Position 58 und 99 wirken sich auf die Bindung von ausgewählten AKAPs aus.....	57
4.3.4	Mutationen der hRIIA an Threonin 54 in Kombination mit Serin 58 haben keinen Einfluss auf die Bindung von ausgewählten AKAPs	59
4.3.5	Der Phosphorylierungsgrad der hRIIA durch CDK1/Cyclin B ist <i>in vitro</i> unabhängig von der Vorphosphorylierung durch die PKA-C	61
4.3.6	Die RIIA als Plattform für Protein/Protein Interaktionen.....	63
4.4	Zellbiologische Untersuchung der hRIIA Phosphorylierung an Serin 58	66
4.4.1	Aktivierung des PKA Holoenzym Typ IIA in lebenden Zellen.....	66
4.4.2	Die zelluläre Lokalisation des Fusionsproteins hRIIA-GFP wird durch Mutationen an Position 58 nicht beeinflusst	67
4.4.3	Untersuchung zur Aktivierbarkeit der PKA Holoenzyme im Hinblick auf die intrazelluläre Verankerung durch AKAPs	68
4.5	Dephosphorylierung der hRIIA.....	70
4.5.1	Proteinphosphatase 1, 2CA (1A) und 2A dephosphorylieren die hRIIA effizient <i>in vitro</i>	71
4.5.2	Die hRIIA Phosphorylierung an Serin 58 ist im Holoenzymkomplex für Phosphatasen unzugänglich.....	73
4.5.3	R Untereinheit IIA in HeLa Zellen.....	74
4.6	SPR Studien zur RII Verankerung über neue AKAPs	77
4.6.1	Das GSK3 Binde-Protein ist ein Typ-II spezifisches AKAP <i>in vitro</i>	77
4.6.2	Negativ geladene Aminosäuren, die die amphipathische Helix des AKAP7 flankieren, tragen zur Bindung an die RIIA bei.....	80
5.	Diskussion	83
5.1	Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase	83
5.1.1	Aktivierung des PKA Typ-I Holoenzym.....	83
5.1.2	Aktivierung des PKA Typ-II Holoenzym.....	85

5.1.3	Bedeutung der Autoinhibitionsdomäne für die Aktivierung des Typ-IA und IIA Holoenzymes in Gegenwart von Substrat	87
5.2	Phosphorylierung der Typ-II R Untereinheiten	88
5.3	Die Linkerregion der hRIIA als Motiv für Protein/Protein Interaktionen	93
5.3.1	<i>Src-homology 3</i> Domänen (SH3)	94
5.3.2	14-3-3 Proteine.....	95
5.3.3	WW Domänen	96
5.4	Dephosphorylierung der hRIIA.....	99
6.	<i>Zusammenfassung</i>.....	102
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>	103
8.	<i>Anhang</i>	119
	Abkürzungsverzeichnis	119
	Publikationen	121
	Buchartikel	121
	<i>Danksagung</i>	122
	<i>Erklärung</i>	123

1. Einleitung

Als Signaltransduktion wird der Vorgang bezeichnet, bei dem extrazelluläre Signale über Rezeptoren an der Plasmamembran ins Innere der Zelle weitergeleitet und dort in spezifische zelluläre Reaktionen umgewandelt werden. Im Zellinneren erfolgt die Weiterverarbeitung des Signals, indem beispielsweise sekundäre Botenstoffe wie Zyklonukleotide, Ionen (z.B. Ca^{2+}) oder Phospholipide eine Vielzahl von Effektor-Proteinen aktivieren können (Pawson and Nash, 2000; Pawson and Scott, 2005).

Proteinkinasen vermitteln einen wichtigen Teil (wenn nicht sogar den Hauptteil) der Signaltransduktion in Eukaryonten. Die Phosphorylierung durch spezifische Proteinkinasen und Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen stellen gegensätzliche Regulationsmechanismen zur schnellen Weiterleitung/Amplifikation oder Beendigung eines Signals dar (Hunter, 1995; Hunter, 2000). Die besondere Bedeutung der Protein-Phosphorylierung, nicht nur im Zusammenhang mit Signaltransduktion, wird zudem dadurch deutlich, dass im menschlichen Genom ca. 2 % aller identifizierten Gene für Proteinkinasen kodieren (Manning et al., 2002a; Manning et al., 2002b). Die kovalente Modifikation mit einer Phosphatgruppe, meist an Serin/Threonin- und/oder Tyrosin-Resten, hat dabei vielfältige Auswirkungen auf die Zielproteine. Zum Beispiel kann die Stabilität oder Aktivität sowohl in positiver als auch in negativer Hinsicht beeinflusst werden. Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt ist die Schaffung von Plattformen für phosphorylierungsabhängige Protein/Protein Interaktionen, wodurch die subzelluläre Lokalisierung moduliert werden kann (Pawson and Nash, 2000).

1.1 Die cAMP-vermittelte Signaltransduktion in Eukaryonten

Die Stimulation der Produktion von zyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Hormone Adrenalin und Glukagon wurde erstmals 1957 beschrieben (Berthet et al., 1957a; Berthet et al., 1957b; Rall and Sutherland, 1958; Sutherland and Rall, 1958). Die Entdeckung von cAMP gilt als die Begründung des Konzepts von intrazellulären Botenstoffen (Beavo and Brunton, 2002).

Inzwischen ist bekannt, dass cAMP einen ubiquitären sekundären Botenstoff darstellt, der sowohl im gesamten Tier- und Pflanzenreich als auch in Prokaryonten vorkommt (Bolwell, 1995; Botsford and Harman, 1992). Die durch ein extrazelluläres Signal eingeleitete intrazelluläre Synthese von cAMP ist mittlerweile gut verstanden. Die

Bindung von Liganden wie z.B. Hormonen oder Neurotransmittern an membranständige G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranhelix-Rezeptoren (GPCR, *G protein coupled receptors*) ist der erste Schritt (Dalrymple et al., 2008; Lefkowitz, 2004). Eine Konformationsänderung der Rezeptoren führt zur Aktivierung der gebundenen heterotrimeren G-Proteine ($G_{\alpha\beta\gamma}$), indem ein Austausch des GDP zu GTP stattfindet (Yeagle and Albert, 2003). Daraufhin dissoziiert die G_{α} -Untereinheit von dem $G_{\alpha\beta\gamma}$ -Dimer. In Abhängigkeit von der G_{α} -Untereinheit werden unterschiedliche intrazelluläre Effektorproteine aktiviert oder inhibiert. Das stimulierende G_{α} -Protein, G_{α_s} , aktiviert Adenylzyklasen und startet somit die Produktion von cAMP aus ATP (Levitzki, 1988a; Levitzki, 1988b; Robidoux et al., 2004). Die Aktivierung von inhibitorischem G-Protein, G_{α_i} , durch 7-Transmembranhelix-Rezeptoren, führt zu einer Inhibition der cAMP-Produktion. Desweiteren werden GPCRs über Phosphorylierung durch spezifische GPCR-Kinasen, Bindung von Arrestinen oder durch Internalisierung reguliert (Antoni, 2000; Lefkowitz, 2004; Luttrell, 2006).

Wie vor rund zehn Jahren noch vielfach angenommen, wird eine Zelle nach Stimulation nicht mit cAMP „überflutet“, sondern es entstehen distinkte Mikrodomänen mit höherer cAMP-Konzentration (Zaccolo et al., 2006; Zaccolo and Pozzan, 2002). Die Hydrolyse von cAMP zu AMP durch Phosphodiesterasen ist entscheidend bei der Begrenzung des endogenen cAMP-Spiegels (Conti and Beavo, 2007; Mongillo et al., 2004).

In Eukaryonten sind neben der Proteinkinase A (PKA, siehe 1.2) weitere Zielproteine für cAMP bekannt. Eine Klasse dieser Proteine sind die zyklonukleotidgesteuerten Ionenkanäle (Craven and Zagotta, 2006). Eine Untergruppe, die CNG-Kanäle (*cyclic nucleotide-gated*), kommen hauptsächlich in Photorezeptoren und in olfaktorischen Neuronen vor, wo sie durch Bindung von cGMP oder cAMP geöffnet oder geschlossen werden (Kaupp and Seifert, 2001; Matulef and Zagotta, 2003; Weitz et al., 2002). Die HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated*) werden durch Hyperpolarisation aktiviert und durch Bindung von Zyklonukleotiden moduliert (Craven and Zagotta, 2006). Im Herzen führt die Bindung von cAMP an HCN-Kanäle zu einer schnelleren Öffnungsrate der Kanäle, die dadurch an der Adrenalin induzierten Erhöhung der Herzschlag-Frequenz beteiligt sind (Mangoni and Nargeot, 2001).

Vor zehn Jahren wurden mit Epac 1 und 2 zwei Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für Ras-ähnliche GTPasen (wie Rap1), die durch cAMP-Bindung reguliert werden, entdeckt (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). Diese Proteine sind an einer Vielzahl

zellulärer Prozesse wie Proliferation, Transkription, Vesikeltransport, Exozytose und Signaltransduktion in Neuronen regulierend beteiligt (Roscioni et al., 2008).

Trotz der vielfältigen Aufgaben von Epac Proteinen gilt die cAMP-abhängige Proteinkinase als der Haupteffektor der cAMP-Signaltransduktion in Eukaryonten.

1.2 Die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA)

Die PKA wurde vor mehr als 40 Jahren erstmals gereinigt und als diejenige Kinase identifiziert, die durch Phosphorylierung die Phosphorylasekinase aktiviert und somit den Glykogenstoffwechsel reguliert (Walsh et al., 1968). Inzwischen ist bekannt, dass die PKA an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung, Apoptose, Immunantwort und Gedächtnisbildung beteiligt ist (Skalhegg and Tasken, 2000; Tasken and Aandahl, 2004). Seit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der katalytischen (C) Untereinheit gilt diese als Prototyp für die Familie von Proteinkinasen (Kornev and Taylor, 2010; Taylor, 1989; Taylor et al., 1990).

Die C Untereinheit ist eine Serin/Threonin spezifische Kinase und gehört zu der AGC-Unterfamilie (PKA, PKG und PKC) (Hanks et al., 1988; Manning et al., 2002b; Parker and Parkinson, 2001). In der inaktiven Form liegt die cAMP-abhängige Proteinkinase als Heterotetramer aus einem Dimer der regulatorischen (R) mit zwei gebundenen C Untereinheiten vor. Die Aktivierung der PKA erfolgt durch den sekundären Botenstoff cAMP, indem vier Moleküle an die R Untereinheiten binden, was zu einer Konformationsänderung und zur Dissoziation der C Untereinheiten führt. Die freien C Untereinheiten sind in der Lage, Substrate mit der generellen Erkennungssequenz R-R/L-x-S/T-y zu phosphorylieren, wobei x einer beliebigen und y einer hydrophoben Aminosäure entspricht. Die zu phosphorylierende Aminosäure (Serin oder Threonin) wird als P⁰-Position bezeichnet (Kemp et al., 1977; Kemp and Pearson, 1990). Die in Abschnitt 1.2.2 detaillierter erläuterten R Untereinheiten besitzen ebenfalls eine vergleichbare Erkennungssequenz und sind somit kompetitive Inhibitoren der C Untereinheiten. Ein weiteres Molekül, das eine Substrat-Erkennungssequenz beinhaltet, ist der hitzestabile Proteinkinaseinhibitor (PKI) (Demaille et al., 1977; Walsh et al., 1971). Bei PKI handelt es sich um einen sogenannten Pseudosubstratinhibitor der C Untereinheit, da sich in der P⁰-Position eine nicht-phosphorylierbare Aminosäure (Alanin) befindet (R-R-N-A-I). Die Inhibition erfolgt durch eine 1:1 stöchiometrische Interaktion, die strikt Mg²⁺/ATP abhängig ist (Herberg and Taylor, 1993; Wen and Taylor, 1994; Whitehouse and Walsh, 1983; Zimmermann et al., 1999; Zimmermann et

al., 2008). PKI ist aufgrund seiner Größe (~ 8 kDa) in der Lage, die PKA-C Aktivität im Zellkern zu regulieren. Bei der Bindung an die C Untereinheit wird in PKI eine Kernexportsequenz (*NES, nuclear export signal*) am C-Terminus freigelegt, wodurch ein beschleunigter Export aus dem Zellkern erfolgen kann (Fantozzi et al., 1994; Wen et al., 1995). Von PKI sind im Menschen und in Mäusen je drei Isoformen bekannt (A, und), die unterschiedliche Expressionsmuster zeigen. PKIA wird primär in Muskeln exprimiert, PKI wird in Hoden sehr hoch exprimiert und PKI wird ubiquitär, jedoch gering exprimiert (Fantozzi et al., 1992; Zheng et al., 2000).

1.2.1 Die C Untereinheiten der PKA

Im Menschen sind fünf Gene bekannt, die für katalytische Untereinheiten der PKA kodieren: CA, C , C , PrKX und PrKY.

Die auf dem X-Chromosom kodierte Proteinkinase X (PrKX) ist ein aktives Protein, allerdings mit unterschiedlichen Eigenschaften im Vergleich zu der Hauptisoform CA (siehe unten) (Klink et al., 1995; Zimmermann et al., 1999). PrKX kann nur mit Pseudosubstratinhibitoren wie den R Untereinheiten des Typs I und dem hitzestabilen Proteinkinaseinhibitor PKI interagieren (Diskar et al., 2007; Zimmermann et al., 1999). Typ-II R Untereinheiten können allerdings von PrKX phosphoryliert werden. In Kinase-Aktivitätstests mit dem Heptapeptid Kempptide als Substrat zeigt PrKX eine zehn- bis fünfzehnfach geringere spezifische Aktivität als die CA. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal von PrKX und der CA ist der ungewöhnlich Prolin-reiche N-Terminus von PrKX. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass der N-Terminus als Interaktionsplattform für WW-Domänen enthaltende Proteine wie Pin1 (*peptidyl prolyl cis/trans isomerase*) dienen kann (Li et al., 2009a). Die Proteinkinase Y (PrKY) ist auf dem Y-Chromosom kodiert, wobei noch unklar ist, ob es sich dabei um ein Pseudogen bzw. eine Pseudokinase handelt, da dem Protein die 81 C-terminalen Aminosäuren fehlen würden, die für die katalytische Aktivität von Bedeutung sind (Schiebel et al., 1997a; Schiebel et al., 1997b).

Von dem Gen für C (*Prkacb*) sind bislang die meisten Spleißvarianten bekannt, die hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert werden (Guthrie et al., 1997; Orstavik et al., 2001; Showers and Maurer, 1986; Thullner et al., 2000; Uhler et al., 1986b; Wiemann et al., 1991). C wurde ausschließlich in Spermien und Hodengewebe gefunden (Beebe et al., 1990; Beebe et al., 1992; Zhang et al., 2004). Ein auffälliger Unterschied zwischen C

und CA ist, dass C *in vitro* zwar durch die R Untereinheiten, aber nicht durch PKIA oder PKI inhibiert werden kann (Zhang et al., 2004).

Von der Hauptisoform CA sind zwei Spleißvarianten, CA1 und CA2 (CAs) beschrieben worden (Maldonado and Hanks, 1988; Thomis et al., 1992; Uhler et al., 1986a). CA2 wurde ausschließlich in männlichem Hodengewebe nachgewiesen und weist, im Vergleich zu CA1, einen um sieben Aminosäuren verkürzten N-Terminus auf, wodurch diese Spleißvariante kein Myristylierungsmotiv enthält (Desseyn et al., 2000; Nolan et al., 2004). Die CA1 Isoform wird ubiquitär exprimiert und gilt, nicht erst seit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur, als Prototypkinase (Knighton et al., 1991a; Knighton et al., 1991b; Shuntoh et al., 1992; Taylor, 1989; Taylor et al., 2005).

Die PKA-C ist aus zwei globulären Domänen aufgebaut. Der sogenannte kleine Lobus besteht hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen und ist für die Mg^{2+} /ATP-Bindung verantwortlich. Der große Lobus besteht in erster Linie aus α -Helices, bildet die Interaktionsoberfläche für Substrate und beinhaltet die für die Katalyse entscheidenden Aminosäuren (Bossemeyer, 1995; Bossemeyer et al., 1993). Die Spalte zwischen den beiden Loben, in der das Substrat und ATP zusammengebracht werden, ist das aktive Zentrum der Kinase. Die Flexibilität des kleinen Lobus ermöglicht die für die Katalyse entscheidende offene und geschlossene Konformation des Enzyms (Bossemeyer et al., 1993; Zheng et al., 1993). Diese in AGC-Kinasen konservierte katalytische Kernregion umfasst in der PKA-C Untereinheit die Aminosäuren 40-300. Die N-terminalen Aminosäuren (1-39) sind unter anderem für die Stabilität wichtig (Herberg et al., 1997). Zudem sind im N-Terminus posttranslationale Modifikationen beschrieben worden. Serin 10 wird durch Autophosphorylierung modifiziert, wobei die Funktion noch unklar ist (Toner-Webb et al., 1992). Die Deamidierung des Asparagin 2 soll einen Einfluss auf die Kerntranslokation der PKA-C haben (Kinzel et al., 2000; Tholey et al., 2001). Eine weitere posttranslationale Modifikation ist die Myristylierung an Glycin 1 (Carr et al., 1982; Clegg et al., 1989; Yonemoto et al., 1993). Liegt die C Untereinheit frei vor, ist die Myristylsäure in einer tiefen, hydrophoben Tasche verankert (Zheng et al., 1993). Hingegen führt die Interaktion mit RII und nicht mit RIA zu einer erhöhten Flexibilität des N-Terminus der PKA-C, wodurch die Myristylsäure freigelegt wird und in Membranen verankert werden kann (Gangal et al., 1999). Zusätzlich zu den Modifikationen wurde die Bindung des *A Kinase Interacting Protein 1* (AKIP1) an die Aminosäuren 15-30 der α -Helix beschrieben (Sastri et al., 2005). Die Interaktion mit AKIP1 soll mitverantwortlich für die Kernlokalisation der PKA-C sein.

1.2.2 Die R Untereinheiten der PKA

Die Aktivität der C Untereinheiten wird hauptsächlich durch die reversible Bindung an die R Untereinheiten bestimmt. In Säugern sind vier Gene bekannt, die für die individuellen Proteine RIA, RI, RIIA und RIIB kodieren (Clegg et al., 1988; Jahnsen et al., 1986; Lee et al., 1983; Levy et al., 1988; Oyen et al., 1989; Sandberg et al., 1988; Sandberg et al., 1987; Scott et al., 1987; Solberg et al., 1991). Die ursprüngliche Unterteilung in Typ-I und Typ-II R Untereinheiten erfolgte aufgrund ihres unterschiedlichen Elutionsverhaltens während der Anionenaustausch-Chromatographie (Corbin et al., 1975; Reimann et al., 1971a; Reimann et al., 1971b). Die R Untereinheiten weisen eine hohe Homologie auf, wobei RIA und RI, im Bezug auf die Aminosäuresequenz, zu 81 % und RIIA und RIIB zu 68 % identisch sind (Skalhegg and Tasken, 2000). Lediglich von der RIA sind zwei Spleißvarianten bekannt, und zudem steht das Gen unter Kontrolle von zwei Promotoren (Solberg et al., 1997).



Abb. 1.2.1: Domänenaufbau der R Untereinheiten aus Säugern. N-terminal befindet sich die Dimerisierungs- und Dockingdomäne (D/D) mit einem darauf folgenden Linker, der die Autoinhibitionsdomäne (rot) enthält. Den strukturell größten Teil einer R Untereinheit bilden die zyklonukleotidbindenden Domänen A und B (CNB-A und CNB-B).

Der Domänenaufbau aller R Untereinheiten ist vergleichbar (Abb. 1.2.1). N-terminal befindet sich die Dimerisierungs- und Dockingdomäne (D/D), die zu der Funktion der Dimerbildung noch die Interaktionsfläche für A-Kinase Ankerproteine (AKAPs) enthält, und somit für die subzelluläre Verteilung des PKA Holoenzym entscheidend ist (Banky et al., 2000). Die Dimerisierung erfolgt über A-Helix Motive, die sich X-förmig antiparallel zusammenlagern (Newlon et al., 1997; Newlon et al., 1999). Lediglich bei RI Untereinheiten werden die Dimere durch Disulfidbrücken zusätzlich kovalent verbunden, die jedoch nicht essentiell für die Stabilität sind (Bubis et al., 1987; Leon et al., 1997). Üblicherweise bilden die R Untereinheiten Homodimere, allerdings wurde auch ein Heterodimer aus RIA und RI in lebenden Zellen beschrieben (Tasken et al., 1993). Weiter C-terminal folgt eine unstrukturierte Linkerregion, in der die Autoinhibitionsdomäne liegt (Li et al., 2000; Vigil et al., 2004b; Vigil et al., 2006). Diese Domäne stellt ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal von Typ-I und Typ-II R

Untereinheiten dar. Beide besitzen eine Konsensussequenz an die die PKA-C bindet, wobei RI Untereinheiten die Sequenz RRGAI (RIA) bzw. RRGGV (RI) beinhalten und RII Untereinheiten RRVSV (RIIA) bzw. RRASV (RII). Die Typ-I R Untereinheiten weisen keine phosphorylierbare Aminosäure in der Autoinhibitionsdomäne auf und werden daher als Pseudosubstratinhibitoren bezeichnet (Durgerian and Taylor, 1989; Titani et al., 1984). R Untereinheiten des Typs II hingegen besitzen ein phosphorylierbares Serin und werden als Substratinhibitoren bezeichnet (Takio et al., 1984; Takio et al., 1980). Ein weiteres auf der Autoinhibitionsdomäne beruhendes Unterscheidungsmerkmal ist, dass die Pseudosubstratinhibitoren erst in Gegenwart von Mg^{2+}/ATP hochaffin an die C Untereinheit binden (Durgerian and Taylor, 1989; Herberg et al., 1999; Herberg and Taylor, 1993; Zimmermann et al., 2008). Der hitzestabile Proteinkinase-Inhibitor (PKI), der ebenfalls eine Pseudosubstrat-Konsensussequenz enthält, verhält sich genauso (Walsh et al., 1971; Zimmermann et al., 1999; Zimmermann et al., 2008). Typ-II R Untereinheiten können sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Nukleotid/Metallionen Holoenzym bilden, wobei eine geringe Affinität in Gegenwart der Kofaktoren beschrieben wurde, was mit einer möglichen Autophosphorylierung in der P^0 -Stelle einhergehen kann (Rangel-Aldao and Rosen, 1976a; Rangel-Aldao and Rosen, 1977; Zimmermann et al., 1999).

Mehr als zwei Drittel der R Untereinheit besteht aus zwei aufeinanderfolgenden cAMP-Bindedomänen (CNB A und B) (Corbin et al., 1978; Doskeland, 1978; Taylor et al., 1990). Diese, ursprünglich durch Genduplikation entstandenen Domänen, unterscheiden sich in der Affinität für cAMP und diverser cAMP-Analoga (Doskeland, 1978; Doskeland et al., 1993; Dostmann et al., 1990; Schwede et al., 2000a; Schwede et al., 2000b; Schweinsberg et al., 2008; Shabb and Corbin, 1992).

Die A Isoformen der R Untereinheiten werden ubiquitär exprimiert (Skalhegg and Tasken, 1997), wobei die RIA in Ratten in frühen haploiden Zellen und die RIIA erst später während der Spermatidelongation exprimiert wird (Oyen et al., 1987; Skalhegg and Tasken, 2000). Die RI wird primär in neuronalem Gewebe (Cadd and McKnight, 1989; Clegg et al., 1996; Rogers et al., 1992), die RII in neuronalem Gewebe, sowie in braunem und weißem Fettgewebe exprimiert (Cummings et al., 1996).

Dass die verschiedenen R Untereinheiten funktionell nicht oder nur teilweise redundant sind, wurde aus Maus *knockout* Studien ersichtlich. Mäuse, in denen das Gen für die RIA (*Prkar1a*) durch den Austausch des Exons 3 unterbrochen wurde, starben früh in der

Embryonalentwicklung, aufgrund fehlerhafter Mesodermentwicklung, verursacht durch eine erhöhte PKA-C Basalaktivität (Amieux et al., 2002). Zudem war die Gesamtmenge der PKA-C reduziert. Heterozygote Mäuse (*Prkar1a^{+/-}*) sind lebensfähig, weisen allerdings eine stark eingeschränkte Fertilität auf, die auch mit einer erhöhten PKA-C Basalaktivität zusammenhängt (Burton et al., 2006). Der Carney Komplex in Menschen ist ebenfalls mit Mutationen, die zur Inaktivierung des *PRKARIA* Gens führen, in Zusammenhang gebracht worden (Burton et al., 2006; Kirschner et al., 2000a; Kirschner et al., 2000b).

Im Gegensatz zu RIA sind *Prkar1b knockout* Mäuse lebensfähig und weisen einen normalen Phänotyp auf, was mit einer kompensatorischen Erhöhung der RIA Expression erklärt wird (Amieux et al., 1997; Brandon et al., 1995). Allerdings zeigen diese Mäuse Defekte in der Gedächtnisbildung.

Wie bei RI sind *Prkar2a knockout* Mäuse lebensfähig und zeigen keinen offensichtlich unterschiedlichen Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp (Burton et al., 1997; Burton et al., 1999). Allerdings war auch bei diesen Mäusen die Gesamtmenge PKA-C reduziert und die RIA kompensatorisch stabilisiert. Lediglich ein Defekt bei der Langzeitpotenzierung (LTP) im visuellen Kortex konnte dem *Prkar2a knockout* zugeschrieben werden (Rao et al., 2004).

Ein *knockout* des RII Gens *Prkar2b* hat einen deutlichen Phänotyp zur Folge. Obwohl die Mäuse ein normales Fressverhalten zeigten, enthielten sie nur eine geringe Menge weißes Fettgewebe und waren resistent gegen ernährungsbedingte Fettsucht (Cummings et al., 1996; Schreyer et al., 2001).

1.3 Subzelluläre Koordination der PKA Holoenzyme durch AKAPs

Ein hohes Maß an Spezifität im cAMP/PKA Signalweg wird, zusätzlich zu den unterschiedlichen Eigenschaften der PKA Isoenzyme, durch die Interaktion mit A-Kinase Ankerproteinen (AKAPs) erreicht. AKAPs werden aufgrund ihrer Fähigkeit, die PKA Holoenzyme in distinkten subzellulären Kompartimenten zu verankern, als räumliche Koordinatoren der cAMP-abhängigen Proteinkinase verstanden (Wong and Scott, 2004). Vor mehr als 25 Jahren wurde das erste AKAP Map2 (*microtubule-associated protein-2*) als Kontamination bei Reinigungen der Typ-II R Untereinheiten entdeckt (Lohmann et al., 1984). Einschließlich einer Vielzahl von Spleißvarianten sind bislang mehr als 50 AKAPs entdeckt und beschrieben worden, die strukturell vielfältig, aber funktionell

vergleichbar sind (Pidoux and Tasken, 2010). Die Interaktion von AKAPs erfolgt über eine amphipathische Helix und die Dimerisierungs-/Dockingdomäne der R Untereinheiten (Carr et al., 1992; Carr et al., 1991). Für die hochaffine Interaktion sind hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen, aber auch Wasserstoff- und Salzbrücken verantwortlich (Gold et al., 2006; Hundsrucker et al., 2006; Newlon et al., 2001). Die Mehrzahl der bislang beschriebenen AKAPs sind sogenannte Typ-II spezifische, sie binden also ausschließlich die RIIA und RII Untereinheiten (Colledge and Scott, 1999; Tasken and Aandahl, 2004). Als dualspezifische AKAPs, die sowohl RI als auch RII Untereinheiten verankern, wurden D-AKAP1, D-AKAP2, Ezrin, Merlin, AKAP220 und PAP7 identifiziert (Dransfield et al., 1997; Gronholm et al., 2003; Huang et al., 1997a; Huang et al., 1997b; Li et al., 2001; Liu et al., 2003; Reinton et al., 2000). Erst wenige, nur Typ-I spezifische AKAPs wie A4-Integrine, Myosin oder das AKAP_{CE} (*C. elegans*) wurden beschrieben (Angelo and Rubin, 1998; Angelo and Rubin, 2000; Kussel-Andermann et al., 2000; Lim et al., 2007). Die molekulare Grundlage, wie AKAPs zwischen RI und RII Untereinheiten unterscheiden, wird noch immer untersucht. Eine Determinante ist die unterschiedliche Topographie der Dimerisierungs- und Dockingdomäne von RI und RII Untereinheiten. Dabei ist die hydrophobe Oberfläche der RIIA D/D Domäne, die mit der amphipathischen Helix von AKAPs interagiert, eine breite, offene und leicht zugängliche Vertiefung (Newlon et al., 2001; Newlon et al., 1999). Im Gegensatz dazu weist die RIA D/D Domäne eine eher unzugängliche Interaktionsfläche auf (Banky et al., 2000; Banky et al., 2003). Diese liegt in einer tiefen Spalte, eingerahmt von den N-terminalen Aminosäuren der RIA, wobei eine Neuausrichtung nach AKAP-Bindung vermutet wird (Banky et al., 2003; Kinderman et al., 2006). Zudem ist der hydrophobe Charakter der Interaktionsoberfläche durch einige geladene Aminosäuren unterbrochen, worauf ebenfalls eine AKAP Selektivität beruhen kann. Aus Kristallstrukturen der RIIA D/D Domäne, gebunden mit dem Peptid AKAP-IS (*in silico*) oder einem der amphipathischen Helix von D-AKAP2 entsprechenden Peptid, geht hervor, dass der flexible N-Terminus eines RIIA Protomers über zwei essenzielle Lysine mit den AKAP-Peptiden interagiert (Gold et al., 2006; Kinderman et al., 2006). Dieses könnte somit ebenfalls eine Determinante für die Typ-II Spezifität von AKAPs sein. Erst kürzlich wurde in dem dualspezifischen AKAP Ezrin eine weitere Sequenz entdeckt, die unabhängig von der amphipathischen Helix an der Interaktion mit RI Untereinheiten beteiligt ist (Jarnaess et al., 2008). Diese sogenannte RI *specifier region*

(RISR) ist in den meisten dualspezifischen AKAPs konserviert und soll die RI/AKAP Interaktion begünstigen.

Die subzelluläre Lokalisation von AKAPs erfolgt entweder durch spezielle „Zielsequenzen“, Interaktion mit anderen Proteinen oder durch posttranslationale Modifikationen. Weiterhin können unterschiedliche Spleißvarianten an verschiedenen Orten in der Zelle vorkommen.

Die alpha und beta Isoformen des AKAP18 (AKAP7) lokalisieren an Membranen, was auf Fettsäuremodifikationen zurückzuführen ist (Fraser et al., 1998; Trotter et al., 1999). Zudem interagiert das AKAP18A über ein modifiziertes Leuzin-*zipper* Motiv direkt mit L-Typ Ca^{2+} -Kanälen (Hulme et al., 2002; Hulme et al., 2003). Die gamma Isoform hingegen ist im Zytoplasma zu finden. Die von Henn und Mitarbeitern beschriebene Spleißvariante AKAP18 lokalisiert in den Hauptzellen des Sammelrohrs in der Niere an Aquaporin-2 (AQP2) enthaltenden Vesikeln (Henn et al., 2004; Henn et al., 2005). Phosphorylierung des AQP2 an Serin 256 durch die PKA-C führt zu einer Translokation von den intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran (Kamsteeg et al., 2000; Klusmann et al., 1999). Im Herzen bringt AKAP18 die PKA in räumliche Nähe zu der an dem sarkoplasmatischen Retikulum lokalisierten Ca^{2+} /ATPase (SERCA2) und ihrem Inhibitor Phospholamban (PLN) (Lygren et al., 2007). Die Phosphorylierung von PLN durch die PKA-C führt zur Dissoziation von SERCA2, womit die Inhibition durch PLN aufgehoben wird und der Ca^{2+} -Rücktransport in das sarkoplasmatische Retikulum erfolgen kann. Dieser Prozess des Ca^{2+} -Rücktransports durch SERCA2 ist von entscheidender Bedeutung, da es der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Relaxation und dem Wiederauffüllen des Herzens vor dem nächsten Pumpvorgang ist (Szentesi et al., 2004).

Das AKAP350 (AKAP9) ist ein weiteres Beispiel dafür, dass Spleißvarianten eines Gens unterschiedlich lokalisiert sind und unterschiedliche Spezifität vermitteln. Die Spleißvariante Yotiao bringt das PKA Holoenzym, durch direkte Bindung an den NMDA Rezeptor (N-Methyl D-Aspartat), an die synaptische Membran (Westphal et al., 1999). Andere Spleißvarianten wie das AKAP450, 350 und CG-NAP lokalisieren hingegen am Zentrosom über eine sogenannte PACT-Domäne (*pericentrin-AKAP350 centrosomal targeting domain*) (Diviani et al., 2000; Gillingham and Munro, 2000; Schmidt et al., 1999; Witczak et al., 1999). Das AKAP450 ist ein Beispiel für einen multivalenten Adapter, der verschiedene Signaltransduktionskomponenten zusammen bringt. Zusätzlich zu der PKA werden die Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A), die

Phosphodiesterase 4D3 (PDE4D3), PKC und PKN (Polynukleotidkinase) verankert (Tasken and Aandahl, 2004; Wong and Scott, 2004). Die Lokalisation der PKA mit den cAMP-hydrolysierenden Phosphodiesterasen in einem makromolekularen Komplex stellt die zeitliche Regulation des cAMP Signals dar. Zudem wird die räumliche und zeitliche Koordination des PKA/AKAP450 Komplexes phosphorylierungsabhängig reguliert. Am Anfang der Mitose phosphoryliert die CDK1/Cyc B die hRIIA an Threonin 54, wodurch eine Dissoziation vom AKAP450 begünstigt wird (Carlson et al., 2001; Keryer et al., 1998). Die genaue Aufgabe der AKAP Komplexe am Zentrosom ist nicht vollständig geklärt. Das Entfernen des endogenen AKAP450 und somit der mit ihm assoziierten Proteine vom Zentrosom durch Überexpression der PACT-Domäne führt zu einem Stillstand des Zellzyklus, zu einer beeinträchtigten Zytokinese und zur Zentriolenduplikation (Keryer et al., 2003).

Ein weiteres Beispiel für einen makromolekularen Proteinkomplex ist das muskelselektive AKAP (mAKAP). Dieses verankert die PKA und die PDE4D3 an der perinukleären Membran in Myozyten (Dodge et al., 2001). Eine hormoninduzierte Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels führt zur Aktivierung des verankerten PKA Holoenzym. Die Phosphorylierung der PDE an Serin 54 durch die PKA-C führt, im Gegensatz dazu, zu einer höheren Hydrolyseaktivität, wodurch der cAMP Spiegel wieder gesenkt wird. Somit koordiniert das mAKAP eine negative Rückkopplung von PKA/PDE4D3 (Dodge-Kafka et al., 2006). Zudem dient die PDE als Adapter für EPAC1 (*exchange protein activated by cAMP*) und ERK5 (*extracellular signal regulated kinase 5*) (Dodge-Kafka et al., 2005). Eine Phosphorylierung der PDE4D3 durch ERK5 wirkt inhibitorisch auf die Phosphodiesteraseaktivität (Dodge-Kafka et al., 2005; Hoffmann et al., 1999). Eine dadurch erhöhte cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung von EPAC1, das wiederum die kleine Ras-ähnliche GTPase Rap1 aktiviert. Rap1 inhibiert MEK5, wodurch ERK5 nicht aktiviert werden kann und die Inhibition der PDE4D3 aufgehoben wird (Dodge-Kafka et al., 2005). Somit integriert das mAKAP zwei cAMP-Signalwege in Form der PKA und EPAC mit Wachstumsfaktor-Signalwegen.

Durch Signalintegration verschiedener Komponenten, die direkt oder indirekt auf cAMP reagieren, und durch räumliche/zeitliche Koordination, wird ein hohes Maß an Spezifität und Selektivität in der cAMP-Signaltransduktion erreicht.

2. Aufgabenstellung

Die cAMP-abhängige Proteinkinase wird seit über 40 Jahren intensiv untersucht. Trotzdem sind grundlegende Mechanismen der dynamischen Regulation der Isoformen und Holoenzyme, sowie deren Verankerung durch A-Kinase Ankerproteine nicht genau bekannt. So unterscheiden sich die einzelnen Holoenzyme in der Komplexbildung sowie der Aktivierung durch cAMP deutlich. Das Typ-I Holoenzym ist, im Gegensatz zum Typ-II, durch cAMP alleine nicht vollständig dissoziierbar. Erst die Gegenwart von Substrat führt zu einer Destabilisierung des Holoenzym, wodurch ein höherer Dissoziationsgrad erreicht wird. Substrate bewirken zudem, dass das Typ-IA Holoenzym leichter aktiviert, was durch eine kleinere apparente Aktivierungskonstante für cAMP (K_{act}) gekennzeichnet ist. Da ein Großteil der in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Aktivierungskonstanten auf der Phosphotransferaseaktivität beruhen, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine davon unabhängige Analyseverfahren entwickelt werden. Diese sollte zur Aufklärung der molekularen Grundlage für die Unterschiede in der Dynamik des Typ-IA versus des Typ-IIA Holoenzym eingesetzt werden, speziell im Hinblick auf den Einfluss von Substrat(en) auf die apparenten Aktivierungskonstanten. Weitere Fragestellungen waren dabei insbesondere: 1.) Welche Bedeutung hat die Autoinhibitionsdomäne verschiedener R Untereinheiten im Hinblick auf die Interaktion mit der C Untereinheit oder auf die Aktivierung der entsprechenden Holoenzyme? 2.) Inwiefern spielt die Autophosphorylierung der Typ-II R Untereinheiten in und außerhalb der Autoinhibitionsdomäne eine Rolle für die Holoenzymdynamik? 3.) Hat der Phosphostatus der R Untereinheit, z.B. durch Autophosphorylierung, einen Einfluss auf die Interaktion mit A-Kinase Ankerproteinen?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten gerichtete Mutagenesen und Protein/Protein Interaktionsstudien *in vitro* (Oberflächen Plasmon Resonanz, SPR) und in lebenden Zellen (Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer, BRET) dienen.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen einen Einblick in die Dynamik und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Feinregulation unterschiedlicher PKA Holoenzyme geben und zu einem besseren Verständnis ihrer Regulation durch cAMP beitragen.

3. Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Fluka Chemie GmbH, Buchs; AppliChem GmbH, Darmstadt; Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie, Deisenhofen; PAA Laboratories GmbH, Cölbe und Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg bezogen.

Alle selbst hergestellten Lösungen und Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert (20 min bei 121 °C) oder sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße).

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Amplifizierung und Präparation rekombinanter Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde zunächst 5 ng DNA in elektokompetente *E. coli* Top10 (Invitrogen) transformiert und die Bakterien anschließend auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Nach einer über Nacht Inkubation bei 37 °C wurde eine Kolonie zur Inokulation einer LB-Flüssigkultur (mit Antibiotikum) verwendet und diese für 14-16 Stunden bei 37 C geschüttelt (200 Upm). Für Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab wurden 5-7 ml Kulturen angeimpft und die DNA mit dem E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I (OMEGA bio-tek) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurden 50 ml LB-Flüssigkulturen angeimpft und die DNA mit dem *PureYieldTM Plasmid Midiprep System* (Promega) gereinigt.

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte spektrophotometrisch (Lambda Bio, UV-VIS Spektrophotometer, Perkin Elmer), indem die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Mit dem erhaltenen Wert und der unten angegebenen Formel konnte die Konzentration berechnet werden.

DNA-Konzentration (µg/ml) = $OD_{260\text{ nm}} \cdot 50 \mu\text{g/ml (dsDNA)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$

3.1.2 Restriktionsspaltung, Modifikation und Ligation von DNA

Die Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA erfolgte ausschließlich mit Restriktionsenzymen von MBI Fermentas. Dabei wurden die Reaktionen unter den vom Hersteller angegebenen optimalen Puffer- und Inkubationsbedingungen durchgeführt.

Für Testrestriktionen im kleinen Maßstab (15 µl Endvolumen) wurden 0,5 µg Plasmid-DNA mit 0,5 µl des jeweiligen Restriktionsenzym versetzt, 1,5 µl 10x Puffer zugegeben und mit H₂O_{bidest} auf 15 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 1-2 Stunden bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µl 6x DNA-Ladepuffer (MBI Fermentas) gestoppt. Die Auftrennung der linearisierten Plasmid-DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Sollten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel extrahiert und anschließend für Klonierungen verwendet werden, wurden Restriktionsspaltungen von 3-5 µg DNA in 30-50 µl Reaktionsansätzen durchgeführt. Dabei erfolgte die Inkubation für mindestens 3 Stunden (oder über Nacht) bei 37 °C.

Zur Vermeidung der Religation wurden die 5'-Enden von linearisierten Vektoren dephosphoryliert. Zu diesem Zweck wurde die alkalische Phosphatase CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*, MBI Fermentas) verwendet. Die Reaktionen wurden für 1-2 Stunden bei 37 °C nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Entfernen der Phosphatase erfolgte entweder durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Extraktion der DNA-Fragmente oder unter Verwendung des „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems“ (Promega).

Für *blunt end* Klonierungen können linearisierte DNA-Fragmente mit einem 5'-Überhang durch Klenow Fragment (MBI Fermentas) in Gegenwart von dNTPs aufgefüllt werden. In einem typischen Ansatz wurde 1-2 µg geschnittene DNA mit 0,5 µl Klenow Fragment (5 U) und dNTPs (50 µM) (in entsprechendem Puffer) versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzen (75 °C für 10 min).

Die Ligation von geschnittener Vektor-DNA mit dem zu klonierenden DNA-Fragment erfolgte durch die T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas) für 2-4 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16 °C. Üblicherweise wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:5 eingesetzt. Ein typischer Ligationsansatz, mit einem Endvolumen von 10 µl, enthielt 30 ng Vektor-DNA, x µl Insert, 1 µl T4 DNA-Ligase und 1 µl Ligasepuffer (2,5 U) (MBI Fermentas). 1-2 µl der Ligationsansätze wurden in *E. coli* Top10 transformiert, selektiert und wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben amplifiziert. Jede Klonierung wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA in Berlin durchgeführt.

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von linearisierter DNA nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Sie wurde zur Analyse von Restriktionsspaltungen und der Trennung von DNA-Fragmenten zur anschließenden Extraktion bei Klonierungen eingesetzt. Im allgemeinen wurden 0,8-2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose (peQLAB) wurde in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,5) durch Kochen in einem Mikrowellenherd gelöst und in eine Gelkammer (Febikon) gegossen. Nach dem Aushärten der Agarose wurden die Kämme entfernt, das Gel in der Gelkammer mit 1x TAE-Laufpuffer bedeckt und die mit 6x DNA-Ladeenpuffer (MBI Fermentas) versetzten DNA-Proben in die Probenaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 10 V/cm Gellänge für 1 Stunde durchgeführt. Die Anfärbung der DNA-Fragmente erfolgte durch Inkubation (10-30 min) in einem Ethidiumbromid-Färbegrad (1 µg pro ml in 1x TAE).

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde Ethidiumbromid direkt zu der aufgekochten Agarose gegeben (1 µg pro ml). Nach der Elektrophorese wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Standardmethode zur Amplifizierung von DNA in kurzer Zeit. Das zu amplifizierende DNA-Fragment wird von Primern flankiert, die zur Template-DNA komplementär sind und spezifisch an diese hybridisieren. Auf eine Denaturierung und die Hybridisierung der Oligonukleotide folgt die Synthesereaktion, in der die DNA-Polymerase ausgehend von den 3'OH-Enden der Primer die DNA-Stränge verlängert. Der Zyklus aus Denaturieren, Primerhybridisierung und DNA-Synthese wird ≥ 30 mal durchlaufen, wobei jeder neu synthetisierte Strang im folgenden Zyklus als Template dienen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um DNA-Sequenzen für eine nachfolgende Klonierung zu amplifizieren, oder um gerichtete Mutationen einzuführen. Für Klonierungen wurden die als Primer fungierenden Oligonukleotide mit passenden Restriktionsschnittstellen synthetisiert, die eine Klonierung des erhaltenen PCR-Produktes nach einer Restriktionsspaltung erlaubten. Als DNA-Polymerase wurde hauptsächlich die *Pfu*-Polymerase (MBI Fermentas)

eingesetzt, die aufgrund ihrer 3'-5' Exonukleaseaktivität eine geringere Fehlerrate beim Baseneinbau als die *Taq*-Polymerase besitzt. Üblicherweise enthielt ein Ansatz folgende Komponenten:

1-5 ng	Template-DNA
5 µl	10x <i>Pfu</i> -Puffer mit MgSO ₄
10 pmol	des jeweiligen Primers
0,5 mM	dNTPs
1 µl (2,5 U)	<i>Pfu</i> -Polymerase
Aufgefüllt auf 50 µl mit sterilem <i>Aqua bidest</i>	

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Tpersonal Thermocycler von Biometra® durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die initiale Denaturierung der DNA (1 min bei 96 °C). Anschließend folgten 30-38 Zyklen nach dem folgenden Schema:

96 °C	30 Sekunden
x °C	30 Sekunden
72 °C	2 Minuten/kb Plasmidgröße

Zuletzt folgte eine finale Elongation bei 72°C für 7 Minuten. Das PCR-Programm wurde entsprechend der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer und der zu amplifizierenden DNA-Fragmentlänge variiert. Da die *Pfu*-Polymerase ca. 500 bp pro Minute amplifiziert, errechnete sich die Elongationszeit durch 2 Minuten pro kb Plasmidlänge. Anschließend wurden alle PCR-Produkte einer Extraktion aus Agarosegelen unterzogen (3.1.3).

3.1.5 Gerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Die gerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA wurde mit dem *Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) durchgeführt. Die Methode ermöglicht das Einfügen von Punktmutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA, die das zu untersuchende Gen trägt. Dies geschieht mit Hilfe von zwei zueinander komplementären synthetischen Oligonukleotiden, welche die gewünschte Mutation enthalten. Dabei wird durch eine Polymerase-Kettenreaktion das komplette Plasmid repliziert. Für gerichtete Mutagenesen wurde ausschließlich die *Pfu*-Polymerase verwendet. Ein typischer Ansatz enthielt folgende Komponenten:

30-50 ng	Plasmid-DNA
5 µl	10x <i>Pfu</i> -Puffer mit MgSO ₄
10 pmol	des jeweiligen Primers
2,5 mM	dNTPs
1 µl (2,5 U)	<i>Pfu</i> -Polymerase
Aufgefüllt auf 50 µl mit sterilem <i>Aqua bidest</i>	

Generelle Parameter für die anschließende PCR waren wie folgt:

96 °C	5 Minuten	
96 °C	30 Sekunden	} 18 Zyklen
x °C	1 Minute	
72 °C	2 Minuten/kb Plasmidgröße	
72 °C	20 Minuten	
10 °C	Pause	

Die Temperatur zur Hybridisierung (*annealing*) der Primer richtete sich nach der berechneten Schmelztemperatur (T_m). Nach der PCR-Reaktion wurden die Ansätze mit 1 μ l *DpnI* (MBI Fermentas) versetzt und für mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dieses Enzym besitzt die Erkennungssequenz 5'-G^{m6}ATC-3' und ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA. Dadurch wird die parentale Template-DNA mehrfach gespalten, die neu synthetisierten Plasmide allerdings nicht. Anschließend erfolgte die chemische Transformation von 2-5 μ l der Probe in NovaBlue GigaSinglesTM Zellen nach Anleitung des Herstellers. Nach Amplifikation der Plasmid-DNA wurde diese einer Restriktionsanalyse unterzogen und sequenziert.

3.1.6 Klonierung pro- und eukaryontischer Expressionsvektoren

Nachfolgend gelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren und ihre Beschreibung, sowie die zur Herstellung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide.

Tab. 3.1.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten prokaryontischen Expressionsvektoren.

Konstruktbezeichnung	Klonierung / Bemerkung
pHis5BA	Dr. Harald Seitz, MPI für molekulare Genetik (Berlin)
pRSET _b	Invitrogen
pGEX-KG	Addgene
pHis5BA-hCA	<i>NruI</i> / <i>HindIII</i> , hCA aus pRSET _b -hCA
pRSET _b -hCA	Dr. M. Diskar
pRSET _b -hRIA	Labor Prof. Dr. K. Tasken (Oslo, Norwegen)
pRSET _b -hRIIA	Labor Prof. Dr. K. Tasken (Oslo, Norwegen)
pRSET _b -hRIIA S99A	Diskar et al., 2007 Gerichtete Mutagenese der entsprechenden Kodons
pRSET _b -hRIIA S99D	
pRSET _b -hRIIA S58A	
pRSET _b -hRIIA S58E	
pRSET _b -hRIIA S58A/S99A	
pRSET _b -hRIIA S58E/S99D	
pRSET _b -hRIIA S58A/S99D	
pRSET _b -hRIIA S58E/S99A	
pRSET _b -hRIIA T54A	
pRSET _b -hRIIA T54E	
pRSET _b -hRIIA T54D	
pRSET _b -hRIIA T54A/S58A	
pRSET _b -hRIIA T54D/S58E	
pRSET _b -hRIIA T54E/S58A	
pRSET _b -hRIIA T54D/S58A	
pRSET _b -hRII	
pGEX-KG-hRIIA 1-44	<i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>
pGEX-KG-hRIIA 1-72	<i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>
pGEX-KG-hRIIA 1-87	<i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>
pGEX-KG-AKAP450 N-term.	Labor Prof. Dr. K. Tasken (Oslo, Norwegen)
pGEX-KG-AKAP450 C-term.	
pGEX-KG-AKAP149 Fragment	
pGEX-KG-hPin1	<i>NdeI</i> / <i>HindIII</i> , hPin1 amplifiziert aus einer humanen cDNA-Bank <i>Human Fetal Brain Matchmaker cDNA Library</i> (Clontech)

Tab. 3.1.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten eukaryontischen Expressionsvektoren.

Konstruktbezeichnung	Klonierungsstrategie / Bemerkung
pGFP ² -Vektoren	Packard Bioscience
pRLuc-Vektoren	
pGFP ² -C2-hCA	Prinz et al., 2006
pRLuc-N2-hRIIA	Prinz et al., 2006
pRLuc-N2-hRIIA	
pRLuc-N2-hRIIA S99A	Diskar et al., 2007
pRLuc-N2-hRIIA S99D	
pRLuc-N2-hRIIA S58A	Gerichtete Mutagenese der entsprechenden Kodons
pRLuc-N2-hRIIA S58E	
pRLuc-N2-hRIIA S58A/S99A	
pRLuc-N2-hRIIA S58E/S99D	
pRLuc-N2-hRIIA S58A/S99D	
pRLuc-N2-hRIIA S58E/S99A	
pGFP ² -N2-hRIIA	Dr. M. Diskar
pGFP ² -N2-hRIIA S58A	Gerichtete Mutagenese des entsprechenden Kodons
pGFP ² -N2-hRIIA S58E	
pRLuc-N3-IIAIA	Ligation zweier Fragmente gleichzeitig, <i>XhoI</i> / <i>blunt</i> / <i>HindIII</i>
pGFP ² -N1-hPin1	<i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i>
pRluc-N3-hPin1	<i>BglII</i> / <i>HindIII</i> , hPin1 aus pGFP ² -N1-hPin1

Tab. 9.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, gerichteter Mutagenesen oder Sequenzierungen. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersbach) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
hRII <i>Nde</i> I(f)	CATATGAGCATCGAGATCCCG
hRII <i>Eco</i> RI(r)	GAATTCTCATGCAGTGGGTTCAACAATATCC
hRIIAS58A(f)	CACGCCAGGCTCTGGGCCAC
hRIIAS58A(r)	GTGGCCCAGAGCCTGGCGTG
hRIIAS58E(f)	CACGCCAGGAGCTGGGCCAC
hRIIAS58E(r)	GTGGCCCAGCTCCTGGCGTG
hRIIAT54A(f)	CCCGCCGCCGCCACGCCAG
hRIIAT54A(r)	CTGGCGTGGGCCGGCGCCGGG
hRIIAT54E(f)	CCCGCCGCCGAGCCACGCCAG
hRIIAT54E(r)	CTGGCGTGGCTCGGCCGGG
hRIIAT54D(f)	CCCGCCGCCGACCCACGCCAG
hRIIAT54D(r)	CTGGCGTGGGTCCCACGCCAG
hRIIAN <i>Nde</i> I(f)	GAAGAGCATATGAGCCACATCCAGATC
hRIIA-44 <i>Hind</i> III(f)	GTAAGCTTCTAGGCGGGCCTCGCG
hRIIA-72 <i>Hind</i> III(f)	GTAAGCTTCTAGTCGGCGACACGGTC
hRIIA-87 <i>Hind</i> III(f)	GTAAGCTTCTAAACTTCCAAGTCCTC
hRIIAX <i>Xho</i> I(f)	ATACTCGAGATGAGCCACATCCAGATCCC
hRIIA-88blunt(r)	AACTTCCAAGTCCTCGTCCTCCTCCGAC
hRIA89-blunt (f)	CCAGTGGTTAAAGGTAGGAGGCGACGAG
hRIAH <i>Hind</i> III r	TATAAGCTTGACAGACAGTGACACAAAACCTG
hPin1 <i>Nde</i> I(f)	GTCATATGGCGGACGAGGAGAAGCTGC
hPin1 <i>Hind</i> III(r)	GTAAGCTTTCAGTCAGTGCAGGAGGATGATGTGG
hPin1 <i>Eco</i> RI(f)	GTGAATTCATGGCGGACGAGGAGAAGCTG
hPin1 <i>Hind</i> III(r)	GTAAGCTTCTCAGTGCAGGAGGATGATGTGG
Sequenzierprimer	
pRLuc-N(f)	GTCAGATCCGCTAGCGCTACC
pRLuc-N(r)	GTGATCATCCTCTTCCTCTGC

3.2 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine wurden ausschließlich in *E. coli* exprimiert. Die Transformation der verwendeten Expressionsplasmide erfolgte durch Elektroporation von ~ 5 ng Plasmid-DNA in elektrokompente Zellen. Aliquots dieser Ansätze wurden auf LB-Agarplatten, die das entsprechend benötigte Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Standardprozedur wurde für alle verwendeten Plasmide zur Retransformation angewendet.

3.2.1 Expression der PKA R Untereinheiten

Die cDNA aller humanen R Untereinheiten der PKA (hRIA, I , IIA und II) lagen in dem Vektor pRSET_b (Invitrogen) vor, der eine Ampizillin-Resistenzkassette (Amp^r) enthält. Die hRII wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert. Aufgrund der angewendeten Klonierungsstrategie, enthielt keines der resultierenden Proteine einen Fusionsanteil. Die Expression der Proteine erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Merck). Nach Transformation der Plasmid-DNA und Selektion auf Amp-haltigen (100 µg/ml) Agarplatten wurde 1 L LB-Flüssigmedium mit einer Kolonie inokuliert und für ca. 6 Stunden bei 37 °C und 140 Upm inkubiert. Kurz vor Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600 nm}) von 0,5-0,6 wurden die Kolben für ca. 30 Minuten bei RT weitergeschüttelt und anschließend die Expression durch Zugabe von IPTG (0,4 mM Endkonzentration) induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei RT über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (~ 4200 Upm, 30 min, Beckmann J6-HC) und das Bakterienpellet bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Expression der humanen PKA-CA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die humane CA Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase sowohl als His₆-Fusionsprotein als auch ohne *tag* verwendet.

Zur Expression ohne Fusion befand sich die cDNA der hCA in dem Vektor pRSET_b (Invitrogen) und zur Expression mit einem His₆-*tag* wurde das Plasmid pHis5BA-hCA verwendet. Beide Plasmide enthalten eine Ampizillin-Resistenz. Die Expressionsbedingungen der Proteine waren identisch mit denen der R Untereinheiten (siehe 3.2.1).

3.2.3 Expression von GST-Fusionsproteinen

Die verwendeten GST-Fusionskonstrukte lagen in dem Vektor pGEX-KG (Amp^r) (Guan and Dixon, 1991) oder in dem Vektor pGEX-4T3 (GE Healthcare) vor. Beide Vektoren enthalten die für eine Thrombin-Schnittstelle kodierende Sequenz, die es ermöglicht, den GST-tag nach Expression spezifisch abzuspalten. Nach der wie in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Transformation in elektrokompente *E. coli* BL21(DE3) und Selektion auf 100 µg/ml Ampizillin enthaltenden Agarplatten, wurde 10 ml LB-Flüssigmedium (mit Amp) mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert (200 Upm). Mit dieser Vorkultur erfolgte eine Inokulation von 1 L LB-Medium (100 µg/ml Amp) und eine weitere Inkubation für ein bis zwei Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler (140 Upm). Die Expression wurde bei RT für 3-4 Stunden durchgeführt und durch Zugabe von 400 µM IPTG induziert. Nach Ernte der Bakterien (4200 Upm, 30 min, Beckmann J6-HC) wurde das Pellet bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.3 Protein-biochemische Methoden

3.3.1 Reinigung der R Untereinheiten der PKA

Die Reinigung aller humanen R Untereinheiten erfolgte mittels einer modifizierten cAMP-Affinitätschromatographie (Bertinetti et al., 2009). Bei dieser Methode wird die spezifische Bindung der R Untereinheiten der PKA an cAMP ausgenutzt. Als immobilisierter Interaktionspartner diente das modifizierte cAMP Sp-8-AEA-cAMPS Agarose. Dabei ist an der Position 8 des Adeninrings ein Amino-Ethyl-Amino Linker zur kovalenten Kopplung angebracht und zudem ist das axiale exozyklische Sauerstoffatom (Sp) durch ein Schwefelatom ersetzt. Alle Substanzen, die zur Reinigung notwendig waren (Sp-8-AEA-cAMPS Agarose, cGMP), wurden von der Firma Biolog LSI, Bremen, bezogen.

Bei einer Proteinreinigung wurden ausschließlich vorgekühlte Puffer verwendet und alle Zentrifugations- und Inkubationschritte bei 4 °C durchgeführt. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte einer Reinigung im Suspensionsverfahren aufgeführt.

Das Bakterienpellet aus einer 1 L über Nacht Expression wurde in 17 ml Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (Sigma-Aldrich) resuspendiert und anschließend mit einer vorgekühlten *French Press* (Thermo IEC) aufgeschlossen (drei Zyklen bei ~ 1000 psi). Das Rohlysat wurde anschließend für 25 Minuten mit 27000 x g zentrifugiert (Sorvall

RC53, Rotor SS34). Währenddessen erfolgte die Equilibrierung der Sp-8-AEA-cAMPS Agarose (150 µl einer 50 %igen Suspension) in einem 15 ml Reaktionsgefäß durch dreimaliges Waschen mit Lysepuffer (500 x g, 2 min, 4 °C). Der lösliche Überstand nach Lyse der Bakterien wurde anschließend mit der equilibrierten Affinitätsmatrix über Nacht bei 4 °C auf einem über Kopf Roller inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte das fünfmalige Waschen (je ~ 15 ml) der Agarose (500 x g, 2 min, 4 °C). Die Elution erfolgte in der Regel schrittweise durch Zugabe eines 20 mM cGMP-haltigem Puffers in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für ca.15-20 Minuten bei 4 °C. Alle Elutionsfraktionen wurden anschließend vereinigt und einem Pufferaustausch unterzogen. Der Austausch erfolgte, je nach Elutionsvolumen, mit NAP10 oder PD10 Säulen (GE Healthcare) nach Angabe des Herstellers. Anschließend folgte eine extensive Dialyse in Schläuchen mit einem Molekulargewicht-*cut off* von ≤ 15 kDa (Roth). Es wurde zweimal für jeweils mindestens eine Stunde gegen 1 Liter und über Nacht gegen 2 Liter dialysiert. Die Lagerung der gereinigten Proteine erfolgte in Aliquots bei -20 °C.

Lysepuffer

20 mM MOPS (pH 7,0)
150 mM NaCl
4 mM -Mercaptoethanol
Protease Inhibitor Cocktail
(Sigma-Aldrich, P8465)

Wasch-, Dialyse- und Lagerungspuffer

20 mM MOPS (pH 7,0)
150 mM NaCl
4 mM -Mercaptoethanol

Elutionspuffer

20 mM MOPS (pH 7,0)
150 mM NaCl
4 mM -Mercaptoethanol
20 mM cGMP

3.3.2 Reinigung der His₆-hCA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die His₆-hCA mehrfach gereinigt. Als Affinitätsmatrices dienten Ni²⁺-NTA (Quiagen) oder Co²⁺-NTA Agarose (Clontech).

Die Resuspension der Bakterienpellets (1 L über Nacht Kultur), Lyse mittels *French Press* und Zentrifugation verliefen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Der lösliche Überstand wurde für 2 Stunden mit 200 µl (50 % Suspension) der equilibrierten Affinitätsmatrix bei 4 °C auf einem über Kopf Roller inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit je 15 ml Lysepuffer und drei weitere mit dem gleichen Volumen an Waschpuffer. Nach Überführung der Agarose in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß folgte die Elution durch Kompetition mit 250 mM Imidazol (Elutionspuffer) in mehreren Schritten. Zum Austausch des Elutionspuffer gegen Lagerungspuffer wurden auch hier NAP10 oder PD10 Entsalzungssäulen verwendet. Die C Untereinheit der PKA wurde auf Eis gelagert.

Lysepuffer

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
Protease Inhibitor Cocktail
(Sigma-Aldrich, P8849)

Waschpuffer

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)
300 mM NaCl
20 mM Imidazol

Elutionspuffer

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)
150 mM NaCl
250 mM Imidazol

Gelfiltrations- und Lagerungspuffer

20 mM MOPS (pH 7,0)
150 mM NaCl
4 mM -Mercaptoethanol

3.3.3 PKI(5-24) Affinitätschromatographie

Die PKI(5-24) Affinitätschromatographie ermöglicht eine schnelle und spezifische Reinigung aktiver und Fusionsanteil freier PKA-C (Olsen and Uhler, 1989). Dabei wird ein Peptid, das den Aminosäuren 5-24 des hitzestabilen Proteinkinase-Inhibitors entspricht, kovalent an Agarose gekoppelt als Affinitätsmatrix verwendet.

Das Bakterienpellet wurde in 17 ml TMN50 resuspendiert, lysiert (*French Press*) und anschließend zentrifugiert (25 min, 27000 x g, 4 °C). Der lösliche Überstand wurde auf 1 mM ATP eingestellt und mit 200 µl in TMN50 equilibrierter PKI(5-24) Agarose für 1-2 Stunden bei 4 °C auf einem über Kopf Roller inkubiert. Das Waschen erfolgte zweimal mit TMN50 und dreimal mit TMN250 (jeweils 15 ml), wobei beide Puffer vorher auf 400 µM ATP eingestellt worden waren. Die Elution wurde in bis zu zehn 0,5 ml Schritten

durchgeführt. Für die weitere Verwendung der C Untereinheit erfolgte ein Pufferaustausch gegen Lagerungspuffer (PD10 Entsalzungssäulen).

TMN50

50 mM Tris/HCl (pH 7,4)
50 mM NaCl
2 mM MgCl₂
4 mM β -Mercaptoethanol
Protease Inhibitor Cocktail
(Sigma-Aldrich, P8849)

TMN250

50 mM Tris/HCl (pH 7,4)
250 mM NaCl
2 mM MgCl₂
4 mM β -Mercaptoethanol

Arginin-Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl (pH 7,4)
200 mM Arginin
50 mM NaCl
1 mM EDTA

Gelfiltrations- und Lagerungspuffer

20 mM MOPS (pH 7,0)
150 mM NaCl
4 mM β -Mercaptoethanol

3.3.4 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Das Bakteriensediment (1 L über Nacht Kultur) wurde in 17 ml kaltem Lysepuffer aufgenommen, anschließend mittels einer *Frech Press* lysiert (drei Zyklen mit ~ 1000 psi) und bei 27000 x g zentrifugiert (25 min bei 4 °C). Nach der Equilibrierung von 200 μ l Glutathion-Agarose (75 % Suspension, Macherey-Nagel) wurde diese für zwei Stunden bei 4 °C mit dem Überstand inkubiert. Es folgten fünf Waschrritte mit jeweils 15 ml PBS-Waschpuffer. Nach der Elution (1-2,5 ml) wurden die vereinigten Elutionsfraktionen einem Puffertausch gegen Lagerungspuffer unterzogen und bei -20 °C gelagert.

PBS-Lysepuffer

10 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4)
1,8 mM KH₂PO₄
140 mM NaCl
2,7 mM KCl
1 % Triton X-100 (optional)
Protease Inhibitor Cocktail
(Sigma-Aldrich, P8465)

PBS-Waschpuffer

10 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4)
1,8 mM KH₂PO₄
140 mM NaCl
2,7 mM KCl

Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
150 mM NaCl
15 mM reduziertes Glutathion

Lagerungspuffer

20 mM MOPS (pH 7,0)
150 mM NaCl

3.3.5 Thrombinspaltung von GST-Fusionsproteinen

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pGEX-KG kodiert, zwischen der cDNA für GST und der MCS (*multiple cloning site*), für eine Thrombin-Schnittstelle (LVPRGS), wodurch das spezifische Spalten des relativ großen GST-tags (26 kDa) ermöglicht wird. Das Anschneiden des tags erfolgte, während das Fusionsprotein an der Glutathion-Agarose gebunden war, d.h., ein Teil der mit GST-Fusionsprotein gesättigten Agarose (bei einer Reinigung, nach den Waschschriffen) wurde in 1 ml PBS mit Thrombin (Sigma-Aldrich) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die zugegebene Menge Thrombin, richtete sich nach dem Volumen der Glutathion-Agarose. Zu 100 µl reiner Agarose wurden 5 U Thrombin (Sigma Aldrich) zugegeben. Das Entfernen der Protease aus dem Überstand erfolgte durch eine 30 minütige Inkubation mit p-Aminobenzamidin-Agarose (Sigma-Aldrich) bei RT. Der Verlauf der Spaltung wurde durch SDS-PAGE (siehe 3.3.7) überprüft.

3.3.6 GST pull-down

GST *pull-down* Experimente werden durchgeführt, um potentielle Interaktionspartner eines bekannten Proteins (Köderprotein) zu identifizieren oder um eine bekannte Protein/Protein Interaktion zu verifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die an Serin 58 phosphorylierte hRIIA ein potentielles Motiv für phosphorylierungsabhängige Protein/Protein Interaktionen darstellt. Als Köder diente das Fusionsprotein aus GST und den Aminosäuren 1-87 der hRIIA (GST-IIA1-87) sowohl in phosphorylierter als auch in unphosphorylierter Form. Als Kontrolle wurden *pull-down* Experimente mit GST allein unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Der erste Schritt eines GST *pull-down* Experiments war die Immobilisierung des Köder-Proteins an Glutathion-Agarose. Dafür wurde jeweils 30 µg bereits gereinigtes GST und GST-IIA1-87 Fusionsprotein mit 50 µl Agarose (50 % Suspension) für zwei Stunden bei RT in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß inkubiert. Parallel erfolgte in einem weiteren Ansatz die Phosphorylierung des GST-IIA1-87 durch Zugabe von 20 µg hCA in Phosphorylierungspuffer (1 mM ATP, 5 mM MgCl₂). Als Indiz für eine erfolgreiche Phosphorylierung war eine apparente Molekulargewichtserhöhung des GST-IIA1-87 Proteins in der SDS-PAGE zu beobachten. Anschließend erfolgten drei Waschschriffte mit jeweils 0,5 ml Immobilisierungspuffer und zwei mit HeLa-Lysepuffer. Die Sedimentation

der Glutathion-Agarose zwischen den einzelnen Schritten wurde immer durch Zentrifugation bei 14000 x g erreicht (1-2 min, 4 °C).

Für ein *pull-down* Experiment parallel mit GST, phosphoryliertem und unphosphoryliertem GST-IIA1-87 Protein wurden ~ 3,5 x 10⁷ HeLa Zellen verwendet. Diese wurden durch Zugabe von 3,5 ml HeLa-Lysepuffer und mit Ultraschall aufgeschlossen (3 x 20 Pulse, 50 % Output, 50 % Zyklen). Anschließend erfolgte die Sedimentation der Zelltrümmer (14000 x g, 15 min, 4 °C). Vor der Inkubation der Köderproteine mit dem löslichen Überstand wurde dieser einer Vorreinigung (*preclear*) mit 100 µl Glutathion-Agarose (50 % Suspension) unterzogen (2 Stunden, 4 °C), anschließend auf die drei Köderprotein Ansätze (GST, GST-IIA1-87 und GST-IIA1-87 phosphoryliert) aufgeteilt und für weitere 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Agarose aus dem *preclear* und den drei *pull-down* Ansätzen wurde fünf Mal mit jeweils 1 ml HeLa-Lysepuffer gewaschen, in 35 µl 4x NuPage Probenpuffer (Invitrogen) aufgenommen und für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte unter Verwendung von 4-12 % Gradientengelen (Invitrogen) nach Angabe des Herstellers mit anschließender Coomassie- oder Silberfärbung.

Immobilisierungspuffer

20 mM MOPS (pH 7,0)
150 mM NaCl
0,005 % (v/v) Tween 20

Phosphorylierungspuffer

20 mM MOPS (pH 7,0)
150 mM NaCl
0,005 % (v/v) Tween 20
1 mM ATP
5 mM MgCl₂

HeLa-Lysepuffer

50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
200 mM NaCl
2 mM EDTA
0,5 % (v/v) NP-40
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche)

3.3.7 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in Gelkammern der Firma Biorad (Mini-Protean 2 oder Tetra Cell). Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 2x oder 5x SDS-Probenpuffer (einschl. 10 % (v/v) -Mercaptoethanol) versetzt, 5 Minuten bei 105 °C denaturiert und in der Regel auf ein 10 oder 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Trennung

erfolgte bei konstant 200 V (Tetra Cell) oder bei 30 mA pro Gel (Mini-Protean 2) für ca. eine Stunde.

2x SDS-Probenpuffer

20 mM Tris/HCl (pH 6,8)
10 % (w/v) SDS
20 % (v/v) Glycerol
0,01 % Bromphenolblau
10 % (v/v) -Mercaptoethanol

5x SDS-Probenpuffer

100 mM Tris/HCl (pH 6,8)
25 % (w/v) SDS
20 % (v/v) Glycerol
0,05 % Bromphenolblau
10 % (v/v) -Mercaptoethanol

1x SDS-Laufpuffer

25 mM Tris/HCl (pH 8,3)
192 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

3.3.8 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Nach der Elektrophorese wurden SDS-Gele eine Minute in *Aqua bidest* in einer Mikrowelle erhitzt und für 10 Minuten bei RT geschwenkt. Durch diese Prozedur wird ein Großteil des SDS aus dem Gel entfernt und dadurch die Hintergrund-Färbung verringert. Durch anschließende Inkubation der Gele in Coomassie-Färbelösung (für mehrere Stunden) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht.

Coomassie-Färbelösung

0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
2 % Phosphorsäure
5 % Ammoniumsulfat

3.3.9 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Silberfärbung ist eine besonders sensitive Methode zum Nachweis geringer Proteinmengen in SDS-Polyacrylamidgelen. Sie beruht auf der Bindung von Silberionen an Aminosäureseitenketten (besonders an Thiol- und Carboxylgruppen) mit anschließender Reduktion von metallischem Silber (Switzer et al., 1979).

Im Folgenden wird die Färbung eines SDS-Gels mit den entsprechenden Volumina der jeweiligen Lösung aufgeführt. Es ist darauf zu achten, immer Nitril-Handschuhe zu tragen und keine metallischen Hilfsmittel zu verwenden. Zudem sollte nur *Aqua bidest* für alle Lösungen verwendet werden.

Als erstes erfolgte eine Inkubation des SDS-Gels für ≥ 2 Stunden in 50 ml Fixierungslösung auf einem Schwenker. Anschließend wurde dreimal mit Waschlösung

(je 50 ml) für jeweils 20 Minuten gewaschen. Es folgte die Zugabe von *Sensitizing-Lösung* (50 ml, 2 min) und zwei kurze Waschschrte (1 min) mit Wasser. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 50 ml gekühlter Färbelösung und eine Inkubation für 20 Minuten auf einem Schwenker. Danach wurde das Gel zweimal für 20-60 Sekunden in Wasser geschwenkt und anschließend 100 ml Entwickler zugegeben. Die Inkubationszeit richtet sich dabei nach der erwünschten Färbungsintensität (2-5 min). Die Reaktion wurde durch direkte Zugabe von 50 ml Stopplösung und einer Inkubation für 10 Minuten beendet. Die Lagerung der so gefärbten SDS-Gele erfolgte in *Aqua bidest.*

Fixierlösung

50 % (v/v) Ethanol
12 % (v/v) Essigsäure
0,05 % (v/v) Formalin

Waschlösung

20 % (v/v) Ethanol

Sensitizing-Lösung

0,02 % (w/v) Na₂S₂O₃

Färbelösung

0,2 % (w/v) AgNO₃
0,076 % (v/v) Formalin

Entwickler

6 % (w/v) Na₂CO₃
0,0004 % (w/v) Na₂S₂O₃
0,05 % (v/v) Formalin

Stopplösung

12 % (v/v) Essigsäure

3.3.10 Western Blot

Als *Western Blot* wird der Elektrotransfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine PVDF- oder Nitrozellulosemembran, mit anschließender Detektion durch spezifische Antikörper, bezeichnet. Der Transfer auf zuvor in Methanol equilibrierte (5 Min.) PVDF-Membran (Roth) erfolgte in einer *semi dry* Blot Apparatur (peQLAB Biotechnologie GmbH) für 90 Minuten bei 1,5 mA pro cm². Das Gel und die Membran befanden sich dabei jeweils zwischen drei Lagen Whatman Papier (Biometra), das zuvor in Transferpuffer getränkt worden war. Nach dem Transfer folgte die Inkubation mit Blocklösung (mindestens eine Stunde bei RT) und drei Waschschrte mit 1x TBS-T (jeweils 10 min). Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (gegen das zu detektierende Protein), in geeigneter Verdünnung, für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 1x TBS-T und 1 % Magermilchpulver inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte mit 1x TBS-T und die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (eine Stunde bei RT). Nach drei weiteren Waschschrten erfolgte die Detektion mit dem Western LightningTM Chemilumineszenz-

Reagenz (PerkinElmer) nach Angaben des Herstellers. Die Chemilumineszenz wurde durch kurzes Auflegen (0,5 bis 5 min) eines Röntgenfilmes (Hyperfilm™ ECL, Amersham Pharmacia), Entwicklung und Fixierung sichtbar gemacht. In Tabelle 3.3.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgeführt.

Transferpuffer

25 mM Tris/HCl (pH 8,3)
 192 mM Glycin
 0,1 % (w/v) SDS
 20 % (v/v) Methanol

10x TBS-T

200 mM Tris/HCl (pH 7,4)
 1,4 M NaCl
 1 % (v/v) Tween 20

Blocklösung

1x TBS-T
 5 % (w/v) Magermilchpulver

Tab. 3.3.1: Für *Western Blot* verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Anti-PKAA cat (C-20)	IgG Kaninchen, polyklonal, 1:5000 verdünnt, Santa Cruz Biotechnology
Anti-RIIA	IgG ₁ Maus, monoklonal, 1:2000 verdünnt, BD Transduction Laboratories™
Ant- <i>Renilla</i> Luciferase	IgG ₁ Maus, monoklonal, 1:1000 verdünnt, USBio, Biomol GmbH
Anti-phospho PKA Substrat	IgG Kaninchen, monoklonal, 1:1000 verdünnt, Cell Signaling Technology
Anti-Maus HRP	IgG Kaninchen, 1:4000 verdünnt, Sigma Aldrich A 9044
Anti-Kaninchen HRP	F(ab') ₂ -Fragment Esel, 1:10000 verdünnt, Amersham NA 9340 (GE Healthcare)

3.4 Phosphorylierung der humanen R Untereinheiten des Typs II

3.4.1 Holoenzymbildung

Das Typ-I und II Holoenzym wurde in einem 1:1,25 molaren Verhältnis von C zu R Untereinheit durch Inkubation für mindestens 30 Minuten bei RT gebildet. Die Bildung des Typ-I Holoenzym erfolgte ausschließlich in Mg²⁺/ATP (5 mM MgCl₂, 1 mM ATP) haltigem Puffer (20 mM MOPS, 150 mM NaCl, 0,005 % Tween 20, pH 7,0) und die des Typ-II Holoenzym erfolgte in An- und Abwesenheit der Kofaktoren.

3.4.2 Autophosphorylierung der Typ-II R Untereinheiten durch die PKA-CA

Die Autophosphorylierung der Typ-II R Untereinheiten durch die PKA-CA wurde auf zwei Wegen durchgeführt. Zum einen erfolgte die Phosphorylierung der R Untereinheiten durch Inkubation mit 50fach weniger (molares Verhältnis) C Untereinheit für 30-120 Minuten bei RT in 100 μ M cAMP haltigem Phosphorylierungspuffer (20 mM MOPS, 150 mM NaCl, 4 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 100 μ M cAMP, pH 7,0). Zum anderen wurden 1:1 stöchiometrische Mengen R- und C-Untereinheit in Anwesenheit von cAMP zusammengegeben und für 30-120 Minuten bei RT inkubiert. Größere Mengen Phosphorylierte hRIIA wurden erhalten, in dem bei einer Reinigung ein Teil der Sp-8-AEA-cAMPS Agarose (80-100 μ l, mit \sim 1 mg gebundener R Untereinheit) mit hCA (500 μ g oder 10 μ g) in Phosphorylierungspuffer (ohne freies cAMP) für mindestens eine Stunde bei RT inkubiert wurde. Anschließend folgten fünf Waschschrte (jeweils 1,5 ml), Elution durch cGMP, Gelfiltration und Dialyse wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

3.4.3 Phosphorylierung der hRIIA durch CDK1/Cyclin B

Die humane R Untereinheit IIA wird von CDK1/CyclinB an Threonin 54 phosphoryliert (Keryer et al., 1998). Als Substrat für die CDK1/Cyc B diente unphosphorylierte rekombinante hRIIA und durch die PKA-CA an Serin 58 und 99 vorphosphorylierte hRIIA(PP). In 70 μ l Ansätze wurde 0,5 μ g unphosphorylierte hRIIA bzw. 0,5 μ g hRIIA(PP) mit jeweils 2,2 μ g CDK1/Cyc B (Biaffin GmbH) in Anwesenheit von γ - 32 P-ATP gegeben und bei 30 °C inkubiert. Aus den Ansätzen wurden nach 30, 60 und 120 Minuten 22,5 μ l entnommen, mit 7,5 μ l 4x NuPAGE Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten erhitzt (70 °C). Zur Kontrolle erfolgte die Inkubation von 0,16 μ g hRIIA oder hRIIA(PP) mit 0,7 μ g CDK1/Cyc B in Gegenwart des CDK1 Inhibitors Olomoucine (100 μ M) für 120 Minuten. Nach Auftrennung der Proben mit einem 4-12 % Gradientengel (Invitrogen) wurde der 32 P-Einbau durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

CDK1/Cyc B Phosphorylierungspuffer

50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
10 mM $MgCl_2$
2 mM DTT
1 mM EGTA
0,05 % Tween 20

3.5 Dephosphorylierung der hRIIA

Die zeitabhängige Dephosphorylierung von 4 µg zweifach phosphorylierter hRIIA(PP) (an Serin58 und 99) durch 0,25 U Proteinphosphatase 1 (New England Biolabs), 1 U PP2CA (Biaffin GmbH) und 1000 U CIAP (Fermentas) wurde bei 30 °C durchgeführt. Aus jeweils einem 120 µl Ansatz wurde nach 5, 15, 30 und 60 Minuten 28 µl abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 7 µl 5x SDS-Probenpuffer und Erhitzen (5 min bei 105 °C) gestoppt. Als Kontrolle erfolgte die Inkubation von 1 µg hRIIA(PP) in einem 28 µl Ansatz mit 0,06 U PP1, 0,25 U PP2CA und 250 U CIAP in Gegenwart von Phosphataseinhibitoren (10 mM Na-Orthovanadat oder 20 µM Okadasäure) für eine Stunde bei 30 °C. Die Proben wurden mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung des Gels untersucht. Als Nachweis einer erfolgten Dephosphorylierung wurde die apparente Molekulargewichtsreduktion der hRIIA von 53 auf 51 kDa herangezogen.

Die Dephosphorylierung von jeweils 1 µg der hRIIA(PP) durch 0,5, 1 und 2 U PP2A wurde für 30 Minuten bei 30 °C durchgeführt.

Zur Untersuchung der Dephosphorylierung der hRIIA im Holoenzymkomplex wurde das Heterotetramer in Mg^{2+} /ATP haltigem Puffer wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben gebildet. Zu 6 µg hRIIA wurde 4,45 µg hCA gegeben (entspricht einem molaren Verhältnis R/C von 1,25:1 und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde zu ein Sechstel des Ansatzes 5x SDS-Probenpuffer gegeben, ein weiteres Sechstel wurde mit 0,06 U PP1 in Anwesenheit von 10 mM Na-Orthovanadat versetzt und bei 30 °C für 60 Minuten inkubiert. Der Rest des Ansatzes wurde mit 0,25 U PP1 inkubiert und Proben nach 5, 15, 30 und 60 Minuten entnommen.

Die Bildung des Holoenzym aus zweifach phosphorylierter hRIIA(PP) und hCA erfolgte durch Inkubation der oben aufgeführten Mengen in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} /ATP. Die Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 1 wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

10x PP1 Puffer

10x Puffer (NEB)
10x $MnCl_2$ (NEB)

10x PP2CA/PP2A Puffer

100 mM Tris/HCl (pH 7,5)
20 mM $MgCl_2$

CIAP Puffer

10x Puffer (MBI Fermentas)

Zusätzlich zu den Untersuchungen mit gereinigten Proteinphosphatasen wurde die Dephosphorylierung rekombinanter hRIIA in HeLa Zellen Lysat in Gegenwart verschiedener Phosphataseinhibitoren untersucht. Dazu wurden 7×10^6 HeLa Zellen in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen (3 x 20 Pulse, 50 % Output, 50 % Zyklen). Der lösliche Überstand nach Sedimentation der Zelltrümmer (14000 x g, 15 min, 4 °C) wurde verwendet. Zur Untersuchung der Dephosphorylierung über die Zeit erfolgte die Inkubation von 0,75 µg hRIIA(PP) mit 60 µl HeLa Lysat Überstand (220 µg Protein) in 1x PP2CA/PP2A Puffer (mit 0,5 mM MnCl₂) bei 30 °C. Es wurden 28 µl nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten entnommen, mit je 7 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt und erhitzt. Ein Ansatz (0,18 µg hRIIA(PP), 14 µl HeLa Lysat) wurde als Kontrolle in Gegenwart der Phosphataseinhibitoren Na-Orthovanadat (10 mM), Okadasäure (10 µM) und Tautomycetin (10 µM) für 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Untersuchung der Proben erfolgte durch *Western Blot*-Analyse mit einem anti-RIIA Antikörper (BD Biosciences). Zur Dephosphorylierung der hRIIA(PP) in Anwesenheit eines Phosphataseinhibitors wurden einzelne 28 µl Ansätze (0,17 µg hRIIA(PP), 14 µl HeLa Lysat Überstand) mit Na-Orthovanadat (10 mM), Okadasäure (10 µM), Tautomycetin (10 µM) oder EDTA/EGTA (jeweils 5 mM) für 2 Stunden bei 30 °C inkubiert.

HeLa Lysepuffer

50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl
0,5 % (v/v) NP-40
20 µM H89
1 mM PMSF
Complete EDTA Free Protease Inhibitor Tablette (ROCHE)

3.6 Biophysikalische Methoden

Mit den optischen Massendetektoren der Marke Biacore (Biacore, GE Healthcare) ist es möglich, die Interaktion eines immobilisierten Moleküls (Ligand) mit einem sich in der Flussphase befindenden Molekül (Analyt) im Hinblick auf die Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation (k_a) und Dissoziation (k_d) zu untersuchen (Jason-Moller et al., 2006). Aus den beiden Geschwindigkeitskonstanten lässt sich die apparente Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) berechnen ($K_D=k_d/k_a$). Bei einer Bindung eines Analyten an einen Liganden ändert sich der Brechungsindex nahe der

Sensorchip-Oberfläche. Das detektierte *surface plasmon resonance* (SPR) Signal ist abhängig von dem Brechungsindex und wird in *resonance units* (RU) angegeben, wobei 1000 RU einer Oberflächenkonzentration von 1 ng/mm² entsprechen (Stenberg, 1991).

3.6.1 Bestimmung von Aktivierungskonstanten für cAMP mittels SPR

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Bestimmung von Aktivierungskonstanten (cAMP) der PKA Holoenzyme mittels SPR beruht auf einem deutlichen Signalunterschied bei Interaktion von freier His₆-hCA an kovalent gekoppelte anti-penta-His Antikörper (Qiagen) im Vergleich zum Heterotetramer (His-hCA: R Untereinheit). Die Bildung des jeweiligen Holoenzym erfolgte, indem His₆-hCA und die jeweilige R Untereinheit in einem 1:1,25 molaren Verhältnis als zweifach konzentrierte Stocklösung in Laufpuffer angesetzt und für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert wurde (Typ-IA 10 nM; Typ-IIA 10 nM; Typ-IAA99S 60 nM; Typ-IIAS99A 20 nM). In der Zwischenzeit wurden ebenfalls zweifach konzentrierte cAMP Verdünnungsreihen, angefangen von 8 oder 32 µM, in 1:1 Schritten mit Laufpuffer (20 mM MOPS , 150 mM NaCl, 0,005 % (v/v) Tween 20, 50 µM EDTA, pH 7,0 (+/- 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂)) in 96well-Platten angefertigt. Für die Messungen der Aktivierungskonstanten in Gegenwart des Substratpeptids Kemptide (Biosyntan) wurden doppelt konzentrierten cAMP Verdünnungsreihen in Laufpuffer mit Konstant 520 µM und 2 mM Kemptide angesetzt. Nach dem Mischen der Holoenzym-Stocklösung mit den cAMP-Verdünnungsreihen in einem 1:1 Verhältnis erfolgte die Injektion der Proben für 2-4 Minuten (Assoziation) bei einer Flussrate von 10 µl min⁻¹. Die Dissoziation wurde für 2-3 Minuten aufgezeichnet. Eine Sensorchipoberfläche (ohne Antikörper) diente als Referenzflusszelle. Zusätzlich wurde das Signal einer Pufferinjektion von den jeweiligen Messsignalen subtrahiert. Für das Typ-IIA Holoenzym wurde die Aktivierungskonstante für cAMP auch in Abwesenheit von Mg²⁺/ATP bestimmt. Die weitere Auswertung der so gewonnen Daten erfolgte mit dem Programm Prism 4.02 (GraphPad). Zur Bestimmung der Aktivierungskonstante wurde das SPR Signal (RU) kurz nach Beginn der Dissoziation gegen den Logarithmus der eingesetzten cAMP-Konzentration aufgetragen und eine nichtlineare Regression durchgeführt. Der Wendepunkt der sigmoid verlaufenden Kurve gibt die Aktivierungskonstante (K_{act}) an. Zur statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse von Einzelmessungen normalisiert und zusammengefügt.

3.6.2 Interaktionsmessungen zwischen der C Untereinheit und den R Untereinheiten

Für Interaktionsmessungen zwischen der PKA-CA und den R Untereinheiten wurde die C Untereinheit (ohne tag) durch Aminkopplung (NHS/EDC) in Gegenwart von 0,1 mM ATP und 0,5 mM MgCl₂ kovalent an die carboxymethylierte Dextranoberfläche (CM5 Chip, GE Healthcare) immobilisiert (250-350 RU) (Gesellchen et al., 2005). Bei einer Aminkopplung werden Proteine über ihren N-Terminus oder andere primäre Amine (Lysinreste) gekoppelt. Die mit einem His₆-tag versehene hCA konnte alternativ kovalent an NTA-Oberflächen immobilisiert werden (Diskar et al., 2007; Willard and Siderovski, 2006). Diese Vorgehensweise hat die Vorteile, dass His₆-Fusionsproteine vor der eigentlichen kovalenten Kopplung (NHS/EDC) auf der Ni²⁺NTA-Oberfläche ausgerichtet werden und dass die gesamte Prozedur in einem physiologischen Puffer durchgeführt werden kann (HBS-EP). Die R Untereinheiten wurden bei einer Flussrate von 30 µl min⁻¹ in Laufpuffer mit 1 mM ATP und 5 mM MgCl₂ injiziert. Bei Interaktionsmessungen mit den Typ-II R Untereinheiten erfolgten auch Messungen in Abwesenheit von Mg²⁺/ATP. Die Assoziation und Dissoziation wurde jeweils für 5 Minuten gemessen. Zur Regeneration wurde Laufpuffer (ohne Mg²⁺/ATP) mit 100 µM cAMP und 2,5 mM EDTA injiziert. Bei jeder Messung erfolgte die Subtraktion des Messsignals von dem auf einer Kontrolloberfläche detektierten Signal (ohne Ligand).

Die kinetischen Konstanten wurden durch nicht-lineare Regression mit der Software Biaevaluation 4.1 (Biacore, GE Healthcare), unter Annahme eines Langmuir 1:1 Bindungsmodells, berechnet.

NaPOPS150 Laufpuffer

20 mM MOPS (pH 7,0)
150 mM NaCl
0,005 % (v/v) Tween 20
50 µM EDTA
(1 mM ATP)
(5 mM MgCl₂)

HBS-EP Laufpuffer

10 mM HEPES (pH 7,4)
150 mM NaCl
0,005 % (v/v) Tween 20
50 µM EDTA
(1 mM ATP)
(5 mM MgCl₂)

3.6.3 Interaktionsmessungen zwischen R Untereinheiten und AKAPs

Die Bindungsstudien zwischen den R Untereinheiten der PKA und AKAPs erfolgte wie von Herberg und Mitarbeitern publiziert (Herberg et al., 2000). Dabei dient das kovalent an eine Oberfläche (CM5 oder C1 Chip) gekoppelte cAMP-Analog 8-AHA-cAMP zur

reversiblen Immobilisierung der R Untereinheiten. Die Injektion der R Untereinheiten über die cAMP-Oberfläche erfolgte bei einer Flussrate von $10 \mu\text{l min}^{-1}$ in Gegenwart von 0,5-1 mg/ml BSA. Dabei ist darauf zu achten, eine in jedem Messzyklus konstante Menge (RU) zu immobilisieren. Die Injektion der AKAPs erfolgte bei $30 \mu\text{l min}^{-1}$ in Laufpuffer (NaMOPS150 ohne Mg^{2+} /ATP). Zur Regeneration wurde 0,1 % SDS injiziert (2x 20 Sekunden bei $30 \mu\text{l min}^{-1}$) und anschließend mit Laufpuffer gespült (2-3 min). Zusätzlich zu der Referenzierung gegen eine Kontrolloberfläche (ohne R Untereinheit) erfolgte immer die Subtraktion eines Pufferlaufs (ohne Analyt).

Sollten Kompetitionsanalysen mit spezifischen *disrupter* Peptiden, die amphipathischen Helices bekannter AKAPs entsprechen, durchgeführt werden, erfolgte die Injektion einer konstanten Konzentration des AKAPs in Gegenwart von $5 \mu\text{M}$ des jeweiligen Peptids. Zudem wurde dieselbe Konzentration des Peptids ohne AKAP injiziert und das erhaltene Messsignal von den Kompetitionsanalysen abgezogen.

3.6.4 BRET²-Interaktionsmessungen

COS-7 Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit den jeweiligen PKA-Konstrukten (RLuc und GFP²) (3.7.2) mit $150 \mu\text{l}$ PBS ($4,3 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1,47 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $2,7 \text{ mM KCl}$, 137 mM NaCl , pH 7,4) gewaschen und anschließend mit Forskolin (Biomol) und IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin, Sigma-Aldrich) stimuliert. Die Stimulation erfolgte durch Zugabe von $25 \mu\text{l}$ einer Forskolin ($100 \mu\text{M}$ Endkonzentration) und IBMX (1 mM Endkonzentration) Mischung (in D-PBS, Invitrogen) in jeweils sechs *wells* pro Interaktionsmessung und einer Inkubation für 30 Minuten ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 \% CO_2). Zu jeweils 6 *wells*, die Zellen mit denselben Konstrukten enthielten, wurden $25 \mu\text{l}$ D-PBS gegeben (unstimuliert). Nach Stimulation und dem Entfernen der Lösung wurden $50 \mu\text{l}$ (pro *well*) einer $5 \mu\text{M}$ Coelenterazin 400a (PerkinElmer oder Biotrend) Lösung (in D-PBS) auf die Zellen gegeben und die 96*well*-Platte in dem FusionTM α -FP Mikrotiterplatten-Lesegerät (Packard BioSciences) ausgelesen. Die Detektion der GFP² (515 nm) und der *Renilla* Luziferase (410 nm) Emission erfolgte jeweils für eine Sekunde pro *well*. Zur Kontrolle wurde die Emission von nichttransfizierten Zellen (6 *wells*) ebenfalls gemessen und von dem jeweiligen Emissionssignal von transfizierten Zellen subtrahiert. Zur Bestimmung des BRET Hintergrund-Signals wurden Zellen in sechs *wells* mit einem für die Luziferase kodierenden Leervektor transfiziert. Die Auswertung der so erhaltenen Messwerte erfolgte mit dem Program Prism 4.2 (GraphPad) nach der folgenden Gleichung:

$$\text{BRET-Signal (ratio 515/410)} = \frac{\text{GFP}^2\text{-Emission (515 nm)} - \text{GFP}^2\text{-Emission n. t. Zellen}}{\text{RLuc-Emission (410 nm)} - \text{RLuc-Emission n. t. Zellen}}$$

3.7 Zellbiologische Methoden

3.7.1 Kultivierung und Passage von COS-7 und HeLa Zellen

Die Kultivierung von COS-7 (ATCC-Nr. CRL-1651) und HeLa (ATCC-Nr. CCL-2) Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma) komplettiert mit 10 % (Endkonzentration) Fötalem Kälberserum (FCS Gold, PAA Laboratories) in 175 cm²-Kulturflaschen (250 ml, Cellstar[®] Greiner Bio-One). Inkubiert wurden die Zellen in einem Brutschrank (Binder) bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Passage der adhärent wachsenden Zellen erfolgte zweimal wöchentlich. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 3-4 ml Trypsin EDTA (PAA Laboratories) versetzt und für 10-20 Minuten inkubiert (37 °C und 5 % CO₂). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml DMEM (ohne Serum) gestoppt und die Zellsuspension in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Zellen (500 x g, 5 min, GPR Centrifuge, Bechman). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauerkammer. Anschließend wurden die Zellen auf 2-2,5 x 10⁶ Zellen pro 50 ml verdünnt und in neue 175 cm²-Kulturflaschen überführt.

3.7.2 Transfektion von eukaryontische Zellen

Zur transienten Transfektion von COS-7 und HeLa Zellen wurde Nanofectin (PAA Laboratories) verwendet. Dabei handelt es sich um DNA-bindende Nanopartikel, die von Zellen durch Endozytose aufgenommen werden können.

Da BRET² Messungen in 96well-Platten (Nunc, *F96 MicroWell™ Plates*) erfolgten, wurden 2 · 10⁴ Zellen in 150 µl DMEM+FCS pro well ausgesät und 24 Stunden inkubiert (37 °C und 5 % CO₂). Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Transfektion in einer Vertiefung der 96well-Mikrotiterplatte. Für die Transfektion wurden 0,25 µg des jeweiligen Konstrukts (GFP² und RLuc) in 10 µl Nanofectin-Diluent gegeben und mit 0,8 µl Nanofectin in 10 µl Diluent versetzt (20 µl Endvolumen). Diese Ansätze wurden gemischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 130 µl DMEM+FCS gegeben. Nach dem Entfernen des Mediums von den Zellen erfolgten die Zugabe der Transfektionslösung und eine Inkubation für 2-3 Stunden (37 °C

und 5 % CO₂). Anschließend wurde die Transfektionsmischung mit einer Acht-Kanal-Pipette abgenommen, 150 µl DMEM+FCS zugegeben und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert (37 °C und 5 % CO₂). Für eine zu messende Protein/Protein Interaktion wurden mindestens sechs *wells* mit denselben Konstrukten transfiziert.

Der Expressionsnachweis der GFP²- und RLuc-Fusionsproteine erfolgte mittels *Western Blot* Analyse (siehe 3.3.10). Nach der eigentlichen BRET² Messung wurden die Zellen durch Zugabe von 25 µl SDS-Probenpuffer (pro *well*) und Erhitzen lysiert (5 min, 105 °C).

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation von exprimierten GFP²- und/oder RLuc-Fusionsproteinen wurden Zellen in *6well*-Platten (Nunc) transfiziert. Als Unterlage für die Zellen dienten runde Deckgläschen, die zuvor in 3,7 % HCl für mindestens 1 Stunde bei RT geschwenkt anschließend mit PBS gewaschen und einzeln in die Vertiefungen gelegt wurden. Pro *well* wurden 1 x 10⁵ Zellen in 2 ml Medium (DMEM+FCS) ausgesät und 24 Stunden in einem Brutschrank inkubiert (37 °C und 5 % CO₂). Für die Transfektion wurden 3 µg des jeweiligen Konstrukts in 100 µl Nanofectin-Diluent gegeben und mit 100 µl einer 1:10 Verdünnung Nanofectin (in Diluent) versetzt (200 µl Endvolumen). Bei der Kotransfektion von zwei Konstrukten (jeweils 3 µg) erfolgte die Zugabe von 100 µl einer 1:5 Verdünnung Nanofectin. Die Ansätze wurden gemischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde, ohne zuvor das Medium zu entfernen, tropfenweise auf den Zellen verteilt und die *6well*-Platte 2-3 Stunden in einem Brutschrank inkubiert (37 °C und 5 % CO₂). Anschließend wurde das Medium abgenommen, 2 ml frisches DMEM+FCS zugegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert.

3.7.3 Immunfluoreszenzfärbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden auf Deckgläschen angewachsene Zellen 24 Stunden nach Transfektion verwendet (siehe 3.7.2). Zunächst wurden die Zellen durch direkte Zugabe von 200 µl Fixierlösung (3,7 % Paraformaldehyd in 1x PBS) auf das Medium für 20 Minuten fixiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen drei Mal mit je 200 µl PBS gewaschen (je 200 µl). Darauf erfolgte die Überführung der Deckgläschen mit einer Pinzette aus den *wells* auf eine mit Parafilm bespannte Glasplatte. Anschließend wurden die Zellen für 10 min durch Zugabe von 200 µl 0,2 % TritonX-100 in 1x PBS permeabilisiert. Darauf folgten das Blocken (5 % w/v BSA, 0,2 % TritonX-100 in 1x PBS) und die Inkubation mit dem Primärantikörper

für jeweils eine Stunde. Als Primärantikörper für Immunfärbungen wurde in dieser Arbeit ausschließlich ein IgG anti-*Renilla* Luciferase Antikörper aus Maus (USBio, Biomol GmbH) verwendet, der in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt wurde (0,2 % TritonX-100, 1 % BSA in 1x PBS). Anschließend folgten drei Waschschrte mit je 200 µl PBS und eine einstündige Inkubation mit dem anti-Maus Cy3 konjugierten Sekundärantikörper (Prof. M. Maniak, Universität Kassel) in einer 1:500 Verdünnung (0,2 % TritonX-100, 1 % BSA in 1x PBS). Nach drei weiteren Waschschrten in PBS wurde eine zweite Fixierung für 20 Minuten durchgeführt (3,7 % Paraformaldehyd in PBS). Zur vollständigen Entfernung der Fixierlösung wurden die Zellen einem letzten Waschschrte unterzogen und in trockenem Zustand auf ein mit einem Tropfen ProLong[®] Gold *antifade reagent* mit DAPI (Invitrogen) versehenen Objektträger überführt. Die fertigen Präparate wurden für 2 Stunden bei 37°C vollständig getrocknet und bei -20 °C gelagert. Sollte nur die zelluläre Lokalisation von GFP²-Fusionsproteinen untersucht werden, erfolgte lediglich eine Fixierung und die Überführung auf einen Objektträger wie oben beschrieben. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio SCOPE.A1) analysiert und die Bilder mit dem Programm ImageJ bearbeitet.

4. Ergebnisse

Die Regulation der C Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase erfolgt in erster Linie durch die reversible Bindung an die R Untereinheiten. Man unterscheidet zwischen Typ-I und II R Untereinheiten (Durgerian and Taylor, 1989). Bei den Typ-I Untereinheiten handelt es sich um Pseudosubstratinhibitoren, deren Autoinhibitionsdomäne einer Substraterkennungs-Sequenz (Konsensus-Sequenz) für die PKA-C entspricht, jedoch keine phosphorylierbare Aminosäure enthält. Die R Untereinheiten des Typs II sind echte Substrate der C Untereinheit mit einem phosphorylierbaren Serin in der Autoinhibitionsdomäne. AKAPs sind eine Klasse von Proteinen, die die Aktivität der PKA nicht direkt beeinflussen, sondern lokale Spezifität durch räumliche und zeitliche subzelluläre Verankerung determinieren.

4.1 Substrat-Verfügbarkeit beeinflusst die Dissoziation des PKA Holoenzym

Das PKA Holoenzym, bestehend aus einem Dimer der R Untereinheit mit zwei gebundenen Molekülen der C Untereinheit, wird durch den sekundären Botenstoff cAMP aktiviert. Dabei führt die kooperative Bindung von vier Molekülen cAMP an das R Dimer zur Dissoziation und somit Aktivierung der C Untereinheiten (Taylor, 1989). Für jedes der Holoenzyme (Typ-IA, I, IIA und II) wurden *in vitro* Aktivierungskonstanten (K_{act}) für cAMP bestimmt (Cadd et al., 1990; Durgerian and Taylor, 1989; Herberg et al., 1994; Herberg et al., 1996; Tasken and Aandahl, 2004). Diese Konstanten entsprechen der Konzentration von cAMP, bei der die Hälfte des jeweiligen Holoenzym aktiv vorliegt. Diese Werte wurden in einem Großteil der Untersuchungen basierend auf Kinase-Aktivitätsbestimmungen ermittelt. Für Aktivitätsmessungen ist der spektrophotometrische Ansatz nach Cook und Mitarbeitern sowie eine auf der Übertragung von radioaktiv markiertem ^{32}P -ATP basierte Methode aufzuführen (Cook et al., 1982; Roskoski, 1983). Für diese Methoden zur Aktivitätsbestimmung ist die Phosphorylierung eines Substratpeptids, hier Kemptide, und somit die Anwesenheit von Substrat notwendig. Interessanterweise konnte in einer neuere Publikation aus der Arbeitsgruppe von S. O. Døskeland gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit von Substrat (Kemptide) einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierungskonstante des Typ-IA Holoenzym hat (Viste et al., 2005). Die Anwesenheit von Kemptide führt dazu, dass

weniger cAMP benötigt wird, um das Holoenzym halbmaximal zu aktivieren (K_{act} wird kleiner). Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt von der Substratkonzentration abhängig ist. In den Experimenten der Autoren war kein Einfluss von Substrat auf die Aktivierung des Typ-IIA Holoenzym ersichtlich. Die Verfügbarkeit von Substrat hat nicht nur einen Einfluss auf die Aktivierungskonstante für cAMP, sondern auch auf den Grad der Dissoziation des PKA-IA Holoenzym. Vigil und Mitarbeiter konnten mittels *small-angle X-ray scattering* Messungen zeigen, dass das Typ-IA Holoenzym durch einen Überschuss an cAMP nicht vollständig zu dissoziieren ist, sondern erst durch die Kombination von cAMP und Substrat (Kemptide) (Vigil et al., 2004a). Auch in lebenden Zellen ist das PKA-IA Holoenzym, selbst nach maximaler Stimulation der cAMP Produktion und Inhibition von Phosphodiesterasen, nur zu ~ 50 % dissoziierbar, wie in unserer Arbeitsgruppe in direkten Bindungsstudien mittels Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET) gezeigt werden konnte (Prinz et al., 2006).

4.1.1 SPR-basierte Bestimmung von Aktivierungskonstanten der PKA Holoenzyme für cAMP

Zur Bestimmung von Aktivierungskonstanten für cAMP (K_{act}), die nicht von der etwaigen Konkurrenz durch Substrat (Viste et al., 2005) beeinflusst sind, musste eine von der Kinaseaktivität als Messparameter unabhängige Methode entwickelt werden. Hierfür bot sich die Detektion des Massenunterschieds zwischen Holoenzym und freier C Untereinheit mittels eines SPR Sensors der Marke Biacore (GE Healthcare) an. Im Vergleich zum Holoenzymkomplex konnte bei Interaktionsmessungen von His₆-hCA allein an kovalent gekoppelte anti-*penta*-His Antikörper ein deutlicher Signalunterschied detektiert werden. Zudem war ein Signalunterschied ebenfalls messbar, wenn Holoenzym in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von cAMP injiziert wurde (Abb. 4.1.1). Dieses unterschiedliche Bindungsverhalten wurde zur Bestimmung von Aktivierungskonstanten für cAMP ausgenutzt.

Zur Validierung der Methode sollte die für das Typ-IA Holoenzym beschriebene Verkleinerung der Aktivierungskonstante für cAMP in Anwesenheit von Kemptide reproduziert werden. Die detaillierte Probenvorbereitung und Messung ist im Material- und Methodenteil (Abschnitt 3.6.1) beschrieben. Für das Typ-IA Holoenzym wurden die Experimente ausschließlich in MgCl₂/ATP-haltigem Puffer durchgeführt, da für eine

hochaffine Interaktion zwischen RIA und CA Nukleotid/Metallionen notwendig sind (Herberg and Taylor, 1993).

Abbildung 4.1.1 zeigt Sensogramme zweier exemplarischer Messreihen. Dabei wurde eine konstante Konzentration Holoenzym mit einer Verdünnungsreihe cAMP (A), oder cAMP und 260 μM Kemptide (B) für mindestens 15 Minuten (bis mehrere Stunden im Verlauf der Messung) inkubiert und anschließend über die anti-*penta*-His Antikörper-Chipoberfläche injiziert.

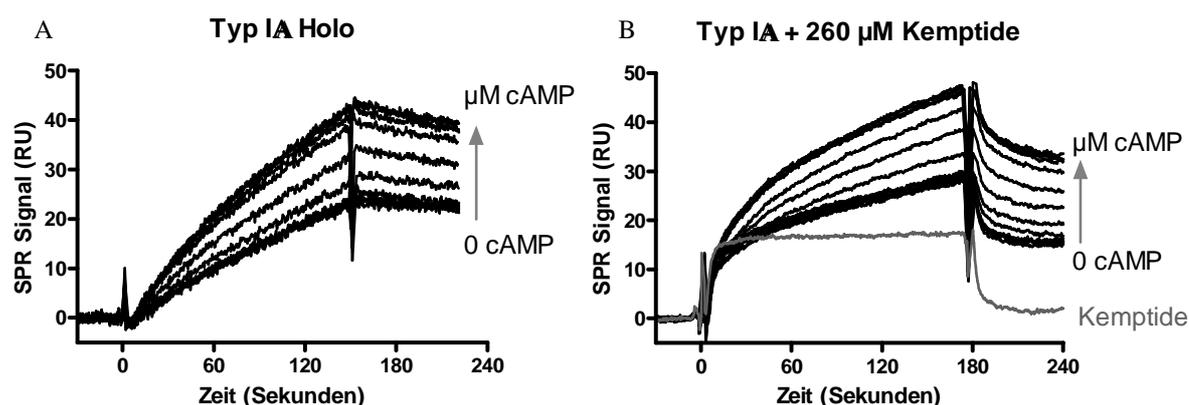


Abb. 4.1.1: SPR Messungen zur Bestimmung der Aktivierungskonstante für cAMP des Typ-IA Holoenzym. Eine konstante Menge His-hCA/hRIA Holoenzym (5 nM) wurde in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen cAMP (Verdünnungsreihe von 1 nM bis 4 μM) bei einer Flussrate von $10 \mu\text{l min}^{-1}$ über eine anti-*penta*-His Antikörper Sensorchipoberfläche injiziert. (A) Messreihe ohne Kemptide. (B) Messreihe bei gleichzeitiger Inkubation mit cAMP und 260 μM Kemptide. Es sind Bindungskurven nach Subtraktion des Signals von einer Referenzflusszelle (ohne Antikörper) dargestellt.

Bei einem optischen Massendetektor wie einem Biacore Gerät hätte man erwartet, dass bei abnehmender Masse, d.h. Dissoziation des Holoenzym (IA-Holo $\sim 170 \text{ kDa}$; His-hCA $\sim 42 \text{ kDa}$), eine Verringerung des Messsignals zu verzeichnen ist. In den durchgeführten Experimenten war der umgekehrte Fall zu beobachten. Bei zunehmender cAMP-Konzentration (und somit mehr frei vorliegender His-hCA) stieg das Messsignal (Abbildung 4.1.1 A und B). Da bislang nur der Aufbau verkürzter, heterodimerer PKA Holoenzyme röntgenkristallographisch aufgeklärt wurde (Brown et al., 2009; Kim et al., 2007; Wu et al., 2007) und die dreidimensionale Struktur eines Heterotetramers nicht genau bekannt ist, ist zu vermuten, dass bei den durchgeführten Messungen die Zugänglichkeit des His₆-tags (N-Terminus der hCA) für den anti-*penta*-His Antikörper den Signalunterschied ausmacht.

Zur Bestimmung der Aktivierungskonstante wurde das SPR Signal (RU), kurz nach Beginn der Dissoziation (für A: bei ca. 180 Sekunden; für B: bei ca. 210 Sekunden),

gegen den Logarithmus der eingesetzten cAMP Konzentration aufgetragen und eine nichtlineare Regression durchgeführt. Der Wendepunkt der sigmoid verlaufenden Kurve gibt die Aktivierungskonstante (K_{act}) an. Zur statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse von Einzelmessungen normalisiert und zusammengefügt. Die Symbole repräsentieren den Mittelwert aus Mehrfachbestimmungen mit Standardabweichung (SD). Abbildung 4.1.2 zeigt die Aktivierung des Typ-IA Holoenzym durch cAMP allein, durch cAMP mit konstant 260 μ M Kemptide und durch cAMP mit konstant 1 mM Substratpeptid.

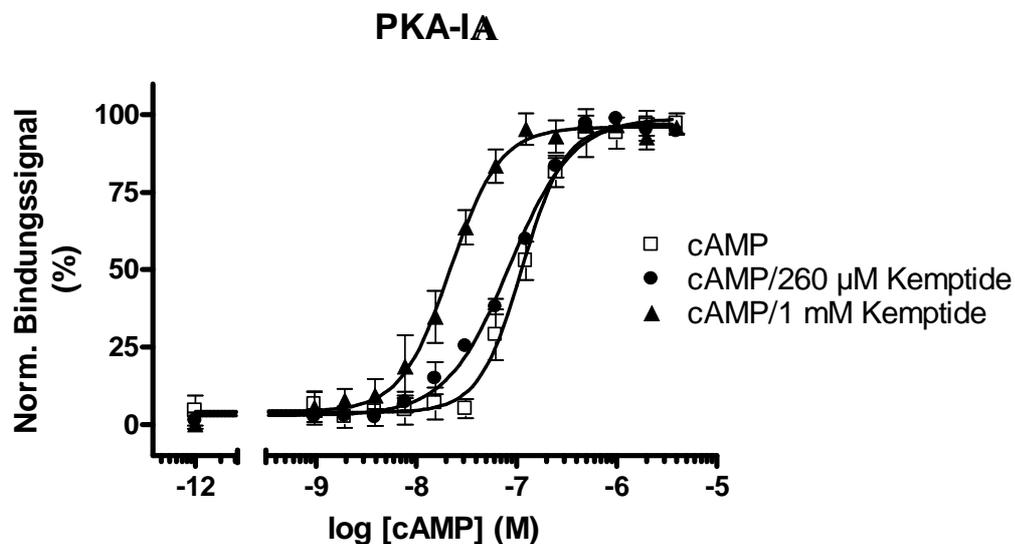


Abb. 4.1.2: Bestimmung der Aktivierungskonstante K_{act} (cAMP) für das Typ-IA Holoenzym (5 nM) in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Quadrat: Aktivierung durch cAMP. Kreis: Aktivierung durch cAMP in Gegenwart von 260 μ M Kemptide. Dreieck: Aktivierung durch cAMP in Gegenwart von 1 mM Kemptide. Die Symbole zeigen den Mittelwerte (\pm SD) aus 3-5 Messungen.

Aus den gezeigten Daten ist ersichtlich, dass mit zunehmender Substratkonzentration während der Holoenzymdissoziation weniger cAMP zur halbmaximalen Aktivierung benötigt wird. Mit diesen Messungen konnte somit veranschaulicht werden, dass es mit dem SPR basierten Ansatz möglich ist, Aktivierungskonstanten für das PKA Typ-IA Holoenzym zu bestimmen. Auch in den gezeigten Messungen führte die Anwesenheit von Kemptide zur einer Verkleinerung der K_{act} für cAMP. Insofern konnte die Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestätigt werden. In Tabelle 4.1.1 sind die unter den jeweiligen Bedingungen gemessenen Aktivierungskonstanten aufgeführt.

Tab. 4.1.1: Mittels SPR gemessene Aktivierungskonstanten für cAMP des PKA-IA Holoenzym in An- und Abwesenheit von Kemptide. Angegeben sind die Mittelwerte (\pm SD) aus 3-5 unabhängigen Messungen.

	cAMP	cAMP 260 μ M Kemptide	cAMP 1 mM Kemptide
K_{act} (nM)	114 ± 14	83 ± 7	22 ± 4

4.1.2 Effekt von Substrat auf die Aktivierung des PKA Typ-IIA Holoenzym durch cAMP

Zur weiteren Validierung des SPR basierten Ansatzes sollte noch die Aktivierungskonstante für das PKA-IIA Holoenzym bestimmt werden. Obwohl für das Holoenzym keine Änderung der Aktivierungskonstante in Abhängigkeit der Substratzugänglichkeit gezeigt werden konnte (Viste et al., 2005), wurden die Experimente analog zu den Messungen mit dem Typ-IA Holoenzym durchgeführt. Da die RII Untereinheiten in der Lage sind, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Mg^{2+} /ATP Holoenzym zu bilden, erfolgten die Messungen unter beiden Bedingungen. Abbildung 4.1.3 zeigt die Aktivierungskurven für das Typ-IIA Heterotetramer in An- und Abwesenheit des Substratpeptids Kemptide (A) und in Abwesenheit von Mg^{2+} /ATP (B) (siehe auch Tab. 4.1.2).

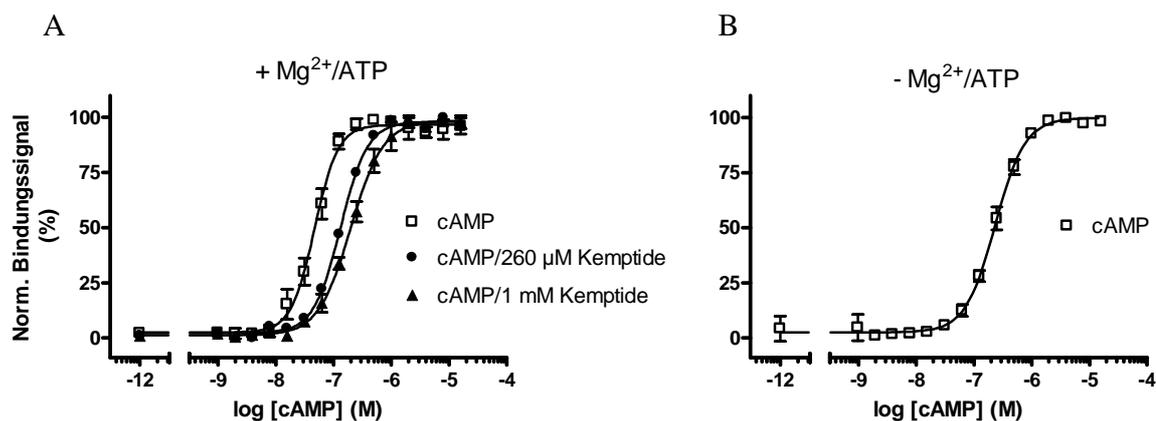


Abb. 4.1.3: Bestimmung der Aktivierungskonstante K_{act} für cAMP des Typ-IIA Holoenzym (5 nM). (A) Messungen in 5 mM $MgCl_2$ / 1 mM ATP in An- und Abwesenheit von Kemptide (0,260 bzw. 1 mM). (B) Messungen in Abwesenheit von Mg^{2+} /ATP. Die Symbole geben den Mittelwert (\pm SD) aus ≥ 3 Messungen an.

Aus diesen Messungen wird deutlich, dass mit zunehmender Konzentration an Kemptide mehr cAMP zur halbmaximalen Aktivierung des PKA-IIA Holoenzym benötigt wird.

Somit tritt im Vergleich zum PKA-IA Holoenzym der umgekehrte Effekt auf die gemessenen Aktivierungskonstanten ein. Vergleicht man die Konstante, die in Mg^{2+}/ATP ohne Kemptide bestimmt wurde (50 nM) mit der in Abwesenheit von Nukleotid/Metallionen gemessenen (~ 235 nM), wird ersichtlich, dass nahezu fünfmal mehr cAMP zur halbmaximalen Aktivierung in Abwesenheit von Mg^{2+}/ATP benötigt wird.

Tab. 4.1.2: Aktivierungskonstanten (K_{act}) für cAMP des PKA Typ-IIA Holoenzym unter den gegebenen Messbedingungen. Angegeben ist die K_{act} als Mittelwert aus $n = 3-6$ Messungen (\pm SD).

Messungen in Mg^{2+}/ATP			Ohne Mg^{2+}/ATP
cAMP	cAMP 260 μ M Kemptide	cAMP 1 mM Kemptide	235 \pm 14 nM
50 \pm 5 nM	132 nM	189 \pm 8 nM	

4.1.3 Die P^0 -Stelle in der Autoinhibitionsdomäne ist eine Hauptdeterminante für die Aktivierung des PKA Heterotetramers

Bei R Untereinheiten des Typs I handelt es sich um sogenannte Pseudosubstratinhibitoren und bei denen des Typs II um Substratinhibitoren, die von der PKA-CA phosphoryliert werden können. Dieser Unterschied in der P^0 -Stelle der Autoinhibitionsdomäne (bei hRIA Ala99; bei hRIIA Ser99) ist entscheidend für die Aktivierbarkeit der Holoenzyme in lebenden Zellen (Diskar et al., 2007; Martin et al., 2007). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die P^0 -Stelle mit dem unterschiedlichen Aktivierungsverhalten bei Substratanwesenheit in Zusammenhang gebracht werden kann. Dafür dienten die in Position 99 mutierte hRIAA99S und die hRIIAS99A (Diskar et al., 2007). Somit lag ein eigentlicher Pseudo- als Substratinhibitor vor und umgekehrt. Aufgrund der verringerten Affinität dieser R Untereinheiten zu der C Untereinheit wurden bei den Messungen mit der RIAA99S konstant 30 nM und bei denen mit der RIIAS99A 10 nM Holoenzym eingesetzt. Die Messungen und Auswertungen erfolgten wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

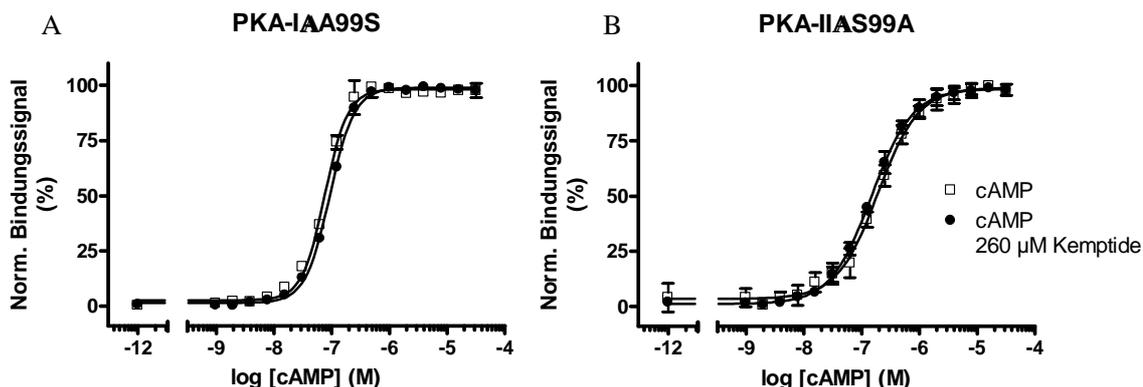


Abb. 4.1.4: Gemessene Aktivierungskonstante K_{act} für cAMP des Typ-IAA99S (30 nM) und PKA-IIAS99A (10 nM) Holoenzym in Anwesenheit von Mg^{2+}/ATP . (A) Aktivierungskurve des PKA-IAA99S. (B) Aktivierungskurve des PKA-IIAS99A Holoenzym in An- und Abwesenheit von 260 μ M Kemptide. Die Symbole geben den Mittelwert (\pm SD) aus 3-4 Messungen an.

Abbildung 4.1.4 zeigt die Aktivierungskurven des PKA-IAA99S und des PKA-IIAS99A Holoenzym in Abhängigkeit von der Substratanwesenheit während der Dissoziation. Durch Mutation des Kodons für Alanin 99 zu einem für Serin (hRIA) wird mehr cAMP zur halbmaximalen Aktivierung in Anwesenheit von Kemptide benötigt. Die K_{act} steigt von 77 nM auf 90 nM (Abb. 4.1.4 A). Bei der hRIIAS99A ist der umgekehrte Effekt zu beobachten. Nach Mutation des Kodons für Serin 99 zu einem für Alanin wird, in Anwesenheit von Kemptide, weniger cAMP zur halbmaximalen Aktivierung benötigt (Abb. 4.1.4 B). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die P^0 -Aminosäure der jeweiligen R Untereinheit zumindest eine Determinante für die steigende (PKA-IIA) oder sinkende (PKA-IA) Aktivierungskonstante in Anwesenheit von Substratpeptid während der Dissoziation ist. In Tabelle 4.1.3 sind die bestimmten Aktivierungskonstanten für cAMP aufgeführt.

Tab. 4.1.3: Aktivierungskonstanten (K_{act}) für cAMP des PKA-IAA99S und PKA-IAS99A Holoenzym unter den angegebenen Messbedingungen. Aufgeführt ist die K_{act} als Mittelwert (\pm SD) aus 3-4 Messungen.

	cAMP	cAMP 260 μ M Kemptide
PKA-IAA99S	77 \pm 3 nM	90 \pm 9 nM
PKA-IIAS99A	190 \pm 20 nM	152 \pm 8 nM

In Abbildung 4.1.5 sind die bestimmten K_{act} -Werte für die vermessenen Holoenzyme unter den gegebenen Bedingungen zusammengefasst. Zur statistischen Analyse der erhaltenen Aktivierungskonstanten wurde mit dem Programm Prism 4.02 eine *one-way Anova* mit einem Newman-Keuls post-Test durchgeführt. Die Sterne (*) geben die Signifikanz (p-Wert) der untereinander verglichenen Messungen an. In Gegenwart von Kempptide sind alle bestimmten Aktivierungskonstanten signifikant unterschiedlich zu den in Abwesenheit des Substratpeptids gemessen, mit einem p-Wert von $\leq 0,05$. Allerdings sind die Änderungen in den gemessenen K_{act} der Mutanten eher klein im Vergleich zu den Wildtyp Proteinen.

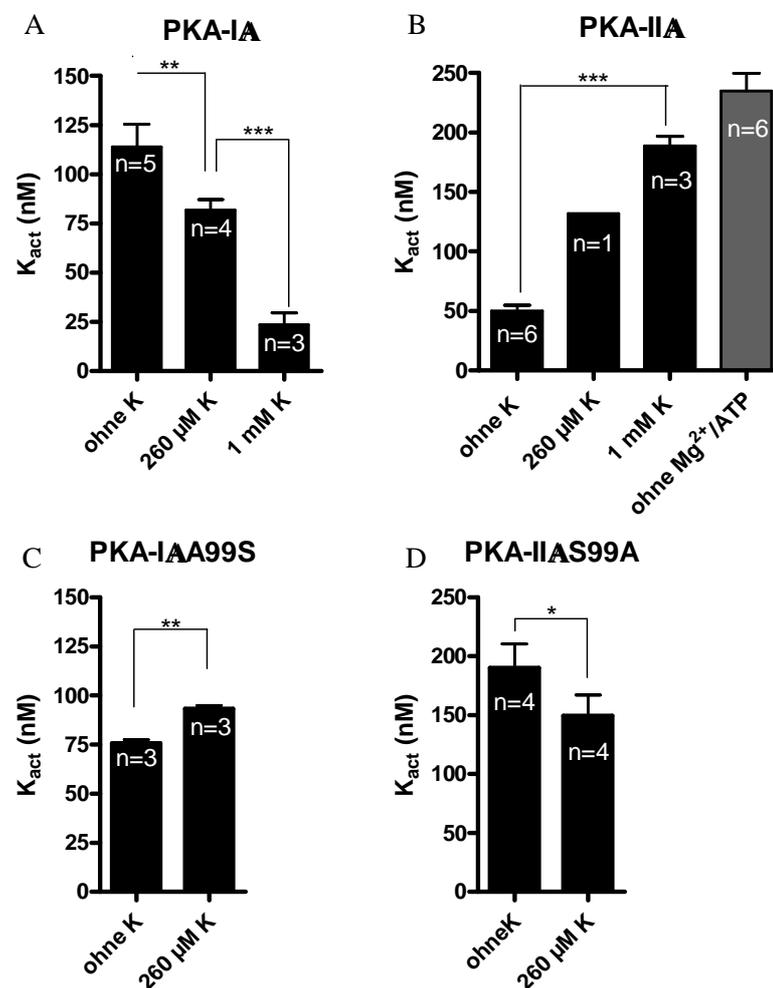


Abb. 4.1.5: Vergleich der bestimmten Aktivierungskonstanten des Wildtyp PKA-IA bzw. IIA mit dem PKA-IAA99S und IIAS99A Holoenzymen in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Dargestellt sind die gemessenen Aktivierungskonstanten (nM) für cAMP des Typ-IA (A), -IIA (B), -IAA99S (C) und -IIAS99A (D) Holoenzymen in An- und Abwesenheit der angegebenen Kempptidekonzentration. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (\pm SD). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm Prism 4.02 (*one-way Anova* mit einem Newman-Keuls post-Test). * p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01; *** p-Wert < 0,001.

4.2 Autophosphorylierungen an den humanen R Untereinheiten des Typs II

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass Substrat *in vitro* einen entgegengesetzten Einfluss auf die gemessenen Aktivierungskonstanten der Typ-IA und IIA Holoenzyme hat, und dass dieses Verhalten in der P⁰-Stelle der Autoinhibitionsdomäne mitbegründet ist.

Im Gegensatz zu RI-Untereinheiten handelt es sich bei RII-Untereinheiten um Substratinhibitoren. Da in der Literatur davon ausgegangen wird, dass bei der Bindung der C Untereinheit an die Typ-II R Untereinheiten die Autophosphorylierung der Autoinhibitionsdomäne erfolgen kann, sollte in der vorliegenden Arbeit der Phosphostatus, d.h. der Grad der Autophosphorylierung der humanen RIIA untersucht werden. Dabei war die Phosphorylierung im Holoenzym und während der Dissoziation (Aktivierung) durch cAMP in Ab- und Anwesenheit des Substratpeptids Kemptide von Interesse. Vergleichend dazu wurde das Typ-II Holoenzym untersucht. Der Phosphostatus der Autoinhibitionsdomäne (RRVSV) wurde mit einem anti-Phospho-PKA Substrat Antikörper nachgewiesen, der das Epitop RRxpS/T erkennt (x entspricht einer beliebigen Aminosäure, p steht für Phosphorylierung) (Abschnitt 3.3.10).

4.2.1 Holoenzymbildung der humanen RIIA und

Die Bildung des jeweiligen Holoenzym erfolgte in einem molaren Verhältnis von 1:1,25 (hCA:hRIIA/) in. Die Ansätze wurden aufgeteilt und mit cAMP alleine und mit cAMP in Gegenwart von Kemptide inkubiert. Abbildung 4.2.1 zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel (A) und den entsprechenden *Western Blot* (B) eines solchen Experiments. Vergleicht man die RIIA aus Spur 2 (unphosphoryliert), 3 (phosphoryliert) und 5 (Holoenzym), so fällt auf, dass die R Untereinheit im Holoenzym als Doppelbande (ca. 51 und 53 kDa) zu erkennen ist, von der beide Banden durch den anti-Phospho-PKA Substrat Antikörper detektiert werden. In Spur 3 wurde phosphorylierte RIIA (RIIA(P)) aufgetragen, die mit substöchiometrischer Menge an C Untereinheit (R/C Verhältnis 40:1) für 30 Minuten bei RT inkubiert wurde. Dabei ist durch den Phosphorylierungsspezifischen Antikörper keine Bande bei 53 kDa detektiert worden, lediglich Degradationsprodukte der RIIA(P) unterhalb von 50 kDa. Inkubiert man zur Holoenzymbildung vorphosphorylierte RIIA(P) mit CA im Verhältnis von 1,25:1, so wird

die Bande bei 53 kDa ebenfalls sichtbar (siehe Spur 4). Wird hingegen Holoenzym ohne Mg^{2+}/ATP gebildet, taucht die 53 kDa RIIA Bande nicht auf und es ist keine Phosphorylierung der P^0 -Stelle in der Autoinhibitionsdomäne durch den verwendeten Antikörper detektierbar (Spur 9).

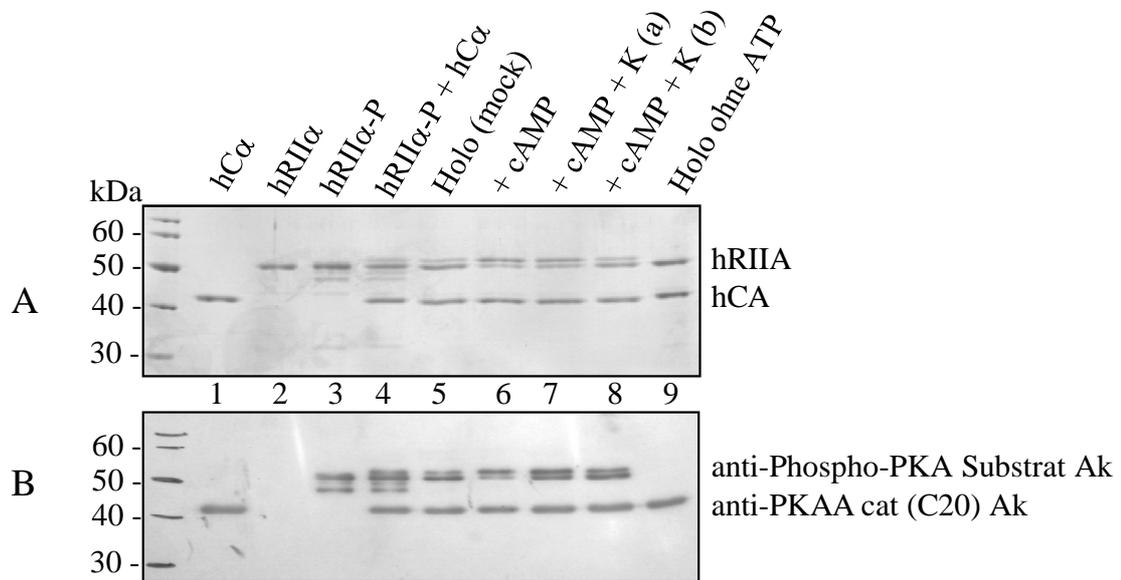


Abb. 4.2.1: Autophosphorylierung der hRIIA während der Holoenzymbildung und Dissoziation durch cAMP. Gezeigt ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel (A) und der korrespondierende *Western Blot* (B) von Typ-IIA Holoenzym vor und nach Stimulation mit 100 μM cAMP allein oder mit einer cAMP/Kemptide Mischung im Vergleich zu in Abwesenheit von Mg^{2+}/ATP gebildetem Holoenzym, den freien Untereinheiten sowie phosphorylierter hRIIA (hRIIA-P). K(a) entspricht 260 μM und K(b) 1 mM Kemptide mit jeweils 100 μM cAMP. Die Holoenzymbildung und die anschließende Inkubation mit cAMP \pm Kemptide erfolgte für jeweils 30 Minuten bei RT (0,2 mM ATP und 0,5 mM $MgCl_2$). Zum Nachweis der phosphorylierten hRIIA wurde ein anti-phospho-PKA Substrat Antikörper und zum Nachweis der hCA ein anti-PKAA Antikörper verwendet (Tabelle 3.3.1).

Nach Zugabe von cAMP zu dem Holoenzym ist die 53 kDa RIIA Bande deutlich stärker, wohingegen die 51 kDa Bande schwächer wird (Spur 6). Vergleicht man diesen Ansatz mit denen, wo gleichzeitig mit cAMP und Kemptide inkubiert wurde (Spur 7 und 8), wird deutlich, dass mit zunehmender Konzentration des Substratpeptids die 53 kDa Bande schwächer wird. Unter der Voraussetzung, dass der phosphospezifische Antikörper nur die Phosphorylierung der Autoinhibitionsdomäne erkennt (vgl. 51 kDa RIIA Bande in Spur 2 und 3), deutet die 53 kDa Bande auf eine weitere Phosphorylierung hin, die zumindest zu dem veränderten Laufverhalten in der SDS-PAGE beiträgt.

Analoge Experimente wurden mit der hRII durchgeführt (Abbildung 4.2.2). Dabei war keine apparente Molekulargewichtserhöhung zu erkennen. Im Holoenzym (Spur 5) detektierte der verwendete Antikörper eine deutliche Phosphorylierung, die nach Zugabe

von cAMP nicht stärker wurde (vgl. Spur 6). Dieses bedeutet, dass die RII bereits bei der Bildung des Holoenzym vollständig phosphoryliert wird. In Spur 3 und 4 ist RII aufgetragen, die für eine bis zwei Stunden mit fünfzigfach weniger C Untereinheit in Anwesenheit von cAMP inkubiert wurde. Der durch den Antikörper detektierte Phosphorylierungsgrad ist vergleichbar mit dem im Holoenzym (Spur 5). Aus den Ansätzen in den Spuren 5 bis 8 wird deutlich, dass unter den Bedingungen die Zugabe von Kemptide, mit gleichzeitiger Aktivierung durch cAMP, keinen Einfluss auf den Phosphostatus der hRII hat.

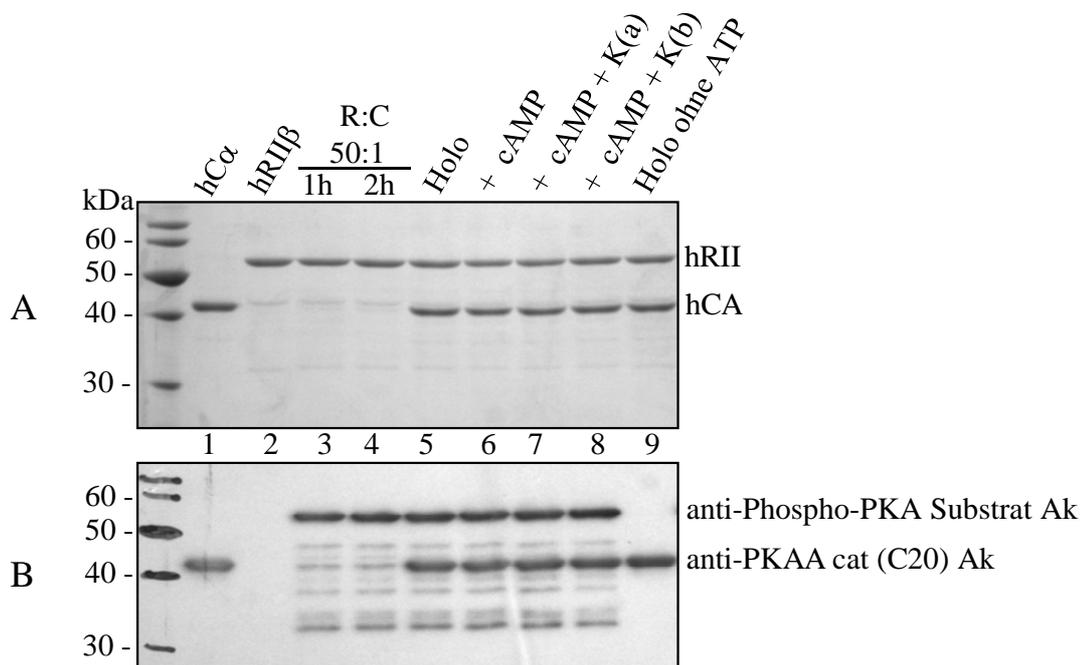


Abb. 4.2.2: Autophosphorylierung der hRII während der Holoenzymbildung und Dissoziation durch cAMP. Gezeigt ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel (A) und der korrespondierende *Western Blot* (B) vom Typ-II Holoenzym vor und nach Stimulation mit 100 μ M cAMP allein oder mit einer cAMP/Kemptide Mischung im Vergleich zu in Abwesenheit von Mg^{2+} /ATP gebildetem Holoenzym, den freien Untereinheiten sowie phosphorylierter hRII (inkubiert mit 50fach weniger hCA in Gegenwart von 100 μ M cAMP). K(a) entspricht 260 μ M und K(b) 1 mM Kemptide mit jeweils 100 μ M cAMP. Die Holoenzymbildung und die anschließende Inkubation mit cAMP \pm Kemptide erfolgte für jeweils 30 Minuten bei RT. Zum Nachweis der phosphorylierten hRII wurde ein anti-phospho-PKA Substrat Antikörper und zum Nachweis der hCA ein anti-PKAA cat Antikörper verwendet (Tabelle 3.1.1).

Zur genaueren Untersuchung der hRIIA Phosphorylierung wurden Ansätze analog der Bestimmung der K_{act} mittels SPR durchgeführt. Hierfür wurden eine konstante Menge Typ-IIA Holoenzym mit verschiedenen Konzentrationen an cAMP aktiviert und diese Proben mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.2.3 A). Die Inkubation des Holoenzym erfolgte mit cAMP allein und mit einer cAMP/Kemptide Mischung (1 mM Kemptide)

unter identischen Bedingungen (Abb. 4.2.3 B). Im Vergleich zum Holoenzym (Spur 3) wird in Spur 4 bis 9 deutlich, dass durch steigende cAMP-Konzentration die 53 kDa Bande der RIIA an Intensität zunimmt, wohingegen die 51 kDa Bande abnimmt (A). Mit zunehmender Dissoziation des Holoenzym wird die R Untereinheit mehr und mehr phosphoryliert. Zudem ist es möglich, die hRIIA komplett zu phosphorylieren, so dass nur noch die 53 kDa Bande sichtbar ist.

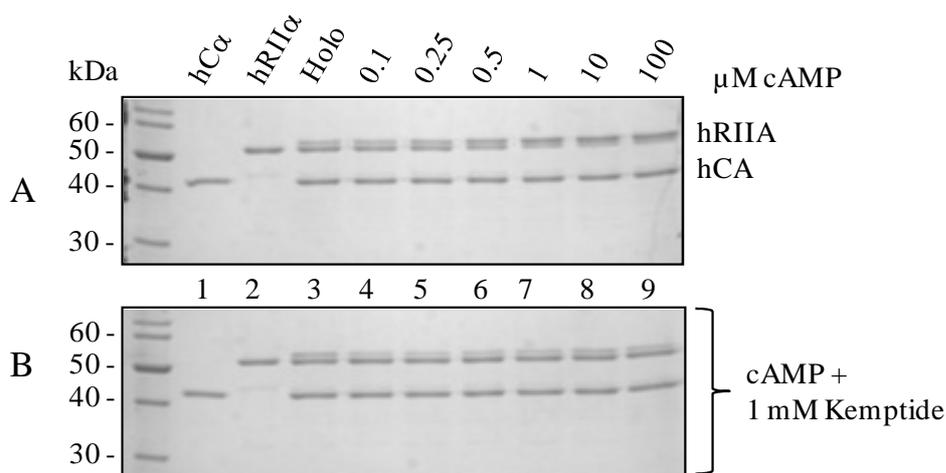


Abb. 4.2.3: SDS-PAGE des Typ-IIA Holoenzym nach Aktivierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von cAMP (A) und einer cAMP/Kemptide Mischung (B). Proben aus demselben Holoenzymansatz wurden mit verschiedenen Konzentrationen von cAMP (0,1-100 µM) ± 1 mM Kemptide für jeweils 30 Minuten bei RT inkubiert. In Spur 1 bzw. 2 ist freie hCA bzw. hRIIA aufgetragen.

Bei der gleichzeitigen Inkubation des Holoenzym mit cAMP und 1 mM Kemptide (B, Spur 4 bis 9) ist die 53 kDa RIIA Bande deutlich schwächer als bei der Probe ohne cAMP (Spur 3). Besonders deutlich ist der Unterschied in der Intensität der 53 kDa Bande, wenn man Spur 3 und 4 miteinander vergleicht. Dies deutet darauf hin, dass in Anwesenheit von cAMP und Kemptide eine Autodephosphorylierung der R Untereinheit auftreten kann. *In vitro* Autodephosphorylierung der R Untereinheit durch die C Untereinheit in Anwesenheit von Mg^{2+} /ATP und Kemptide konnte bereits gezeigt werden (Gjertsen et al., 1993). Ob dieser Effekt einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Typ-IIA Holoenzym in Anwesenheit von Kemptide bzw. natürlichen Substraten hat, ist jedoch unklar.

4.2.2 Während der Holoenzymbildung wird die hRIIA an Serin 99 und zum Teil an Serin 58 phosphoryliert

Die im vorigen Abschnitt gezeigten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es eine zweite Phosphorylierungsstelle in der humanen R Untereinheit IIA geben muss, da die apparente Molekulargewichtserhöhung (von 51 auf ~ 53 kDa) in einer SDS-PAGE nicht mit der Phosphorylierung der P⁰-Stelle (Ser 99) zu erklären ist (Abbildung 4.2.1).

Zur Identifizierung weiterer putativer Autophosphorylierungsstellen wurde ein Abgleich mit der ELM Datenbank (*Eukaryotic Linear Motif resource for functional sites in proteins*; <http://elm.eu.org>) durchgeführt. Dadurch konnte zusätzlich zu der bekannten P⁰-Stelle (Serin 99) die Aminosäure Serin 58 (PRQS⁵⁸L) als eine weitere putative Autophosphorylierungsstelle identifiziert werden.

Darauf wurde der Phosphostatus der 51 und 53 kDa hRIIA Bande mittels Massenspektrometrie untersucht. In der 51 kDa Bande wurden ausschließlich in der P⁰-Stelle (Serin 99) und keine an Serin 58 phosphorylierten Peptide detektiert (Tab. 4.2.1). In der 53 kDa Bande konnten sowohl an Serin 99, als auch an Serin 58 phosphorylierte Peptide nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass während der Holoenzymbildung hauptsächlich Serin 99 und zum Teil (nur in der 53 kDa Bande) Serin 58 phosphoryliert wird.

Tab. 4.2.1: Massenspektrometrische Analyse des Phosphostatus der hRIIA. Aufgeführt sind die identifizierten Peptide, die Serin 58 und 99 enthielten. Eine Phosphorylierung ist durch (p) gekennzeichnet. Die Messungen wurden freundlicherweise von Susanne Hanke und Diana Lang durchgeführt.

Bande	Peptid	Anzahl
51 kDa	⁵⁷ QSLGHPPPEPGPDR ⁷⁰	2
	⁵⁷ QSLGHPPPEPGPDRVADAKGDSESEEEDEDLEVPVPSR ⁹³	1
	⁹⁷ RV(p)SVCAETYNPDEEEEDTDPR ¹¹⁷	2
	⁹⁷ RV(p)SVCAETYNPDEEEEDTDPRVIHPK ¹²¹	1
	⁹⁷ RVSVCAETYNPDEEEEDTDPR ¹¹⁷	1
	⁹⁷ RVSVCAETYNPDEEEEDTDPRVIHPK ¹²¹	1
53 kDa	⁵⁷ Q(p)SLGHPPPEPGPDR ⁷⁰	2
	⁵⁷ Q(p)SLGHPPPEPGPDRVADAK ⁷⁵	1
	⁴⁵ APASVLPAAATPRQ(p)SLGHPPPEPGPDR ⁷⁰	2
	⁹⁷ RV(p)SVCAETYNPDEEEEDTDPR ¹¹⁷	2
	⁹⁷ RV(p)SVCAETYNPDEEEEDTDPRVIHPK ¹²²	1

4.2.3 Die Autophosphorylierung der hRIIA an Serin 58 verursacht eine apparente Molekulargewichtserhöhung in der SDS-Gelelektrophorese

Aus den bislang aufgeführten Ergebnissen war ersichtlich, dass die Phosphorylierung der humanen RIIA an der Aminosäure Serin 99 (Autoinhibitionsdomäne) nicht zu der apparenten Molekulargewichtserhöhung in der SDS-PAGE führt. Daher galt es zu klären, ob die Phosphorylierung an Ser 99 und 58 oder Serin 58 alleine zu dem veränderten Laufverhalten führt. Unter anderem wurden dafür drei GST-Fusionsproteine verwendet, die die Aminosäuren 1-44, 1-72 und 1-87 der hRIIA enthalten (Abb. 4.2.4).

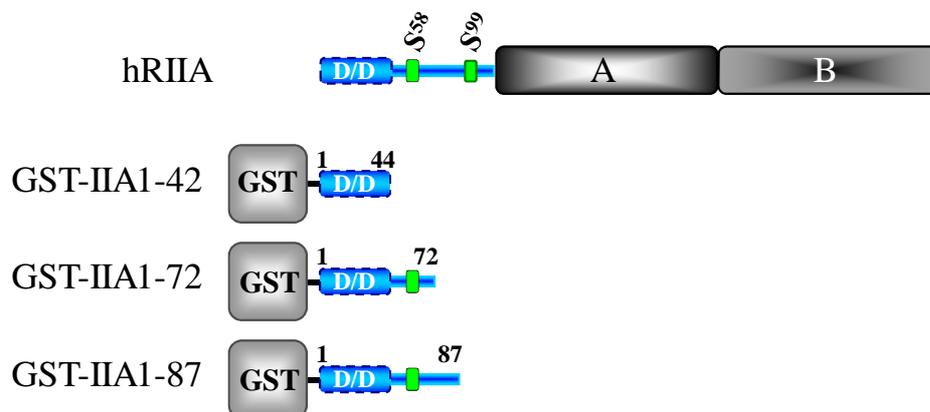


Abb. 4.2.4: Schematische Darstellung der hRIIA sowie der verkürzten GST-Fusionskonstrukte. D/D = Dimerisierungs- und Docking Domäne. A bzw. B = cAMP Bindedomänen. S⁵⁸ bzw. S⁹⁹ = von PKA-C phosphorylierbare Aminosäuren. Die drei GST-Fusionskonstrukte enthalten die kodierende Sequenz für die Aminosäuren 1 bis 44, 1 bis 72 bzw. 1 bis 87 der hRIIA.

Diese GST-RIIA N-terminalen Fusionsproteine wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit der hCA inkubiert und die Ansätze mittels SDS-PAGE im Hinblick auf ein verlangsamtes Laufverhalten untersucht. Die Zugabe des hitzestabilen Proteinkinaseinhibitors (PKI) zu jeweils einem Ansatz diente als Kontrolle (Abb. 4.2.5). Eine apparente Molekulargewichtserhöhung, als Folge der Autophosphorylierung, war nur bei den GST-Fusionsproteinen der RIIA1-72 und 1-87 zu erkennen (Spur 6 und 9). Durch gleichzeitige Inkubation mit PKI und somit spezifischer Inhibition der C Untereinheit kam es zu keiner Phosphorylierung (Spur 7 und 10). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass allein die Phosphorylierung der hRIIA an Serin 58 für das langsamere Laufverhalten (53 kDa Bande) in einer SDS-PAGE verantwortlich ist. Eine weitere Herangehensweise zur Bestätigung der Autophosphorylierungsstelle war ein Aminosäureaustausch der R Untereinheiten. Hierfür wurde mittels gerichteter Mutagenese (Abschnitt 3.1.5) das Kodon für S58 zu einem für Alanin (A) oder Glutamin-

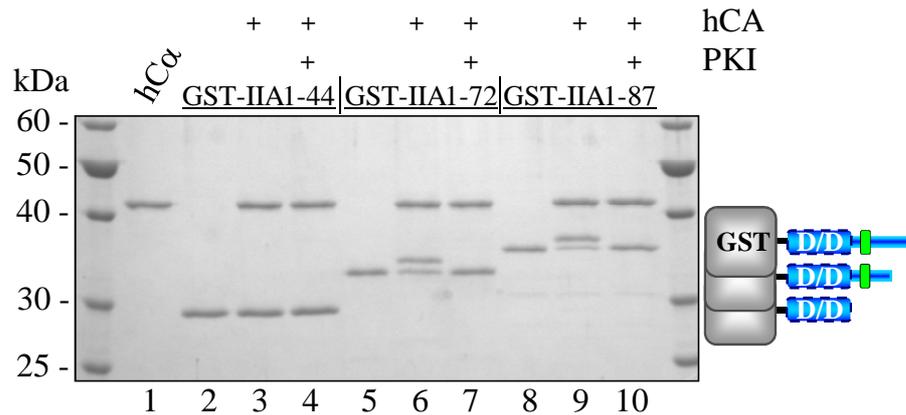


Abb. 4.2.5: Phosphorylierung der GST-RIIA N-Terminus Fusionsproteine durch die hCA. Aufgetragen wurde immer das angegebene GST-Fusionsprotein allein, nach Inkubation mit hCA und nach Inkubation mit hCA und PKI für 30 min bei RT. Nur die Fusionsproteine GST-IIA1-73 und GST-IIA1-87 zeigen eine apparente Molekulargewichtserhöhung nach Inkubation mit der hCA (Spur 6 und 9), die in Gegenwart von PKI nicht auftritt.

säure (E) ausgetauscht. Der Austausch einer phosphorylierbaren Aminosäure durch eine negativ geladene soll den phosphorylierten Zustand eines Proteins widerspiegeln. Als weitere Kontrolle diente das in der Autoinhibitionsdomäne mutierte Protein RIIAS99A, bei dem das Kodon für Serin 99 zu einem Kodon für Alanin ausgetauscht ist (Diskar et al., 2007). Diese Mutanten RIIA Proteine wurden zur Holoenzymbildung mit der C Untereinheit eingesetzt (analog zu 4.2.1). Im Vergleich zum Wildtyp-Protein führte bereits der Austausch des Serin 58 zu Glutaminsäure (E) zu einer verlangsamten Migration in der SDS-PAGE (Abb. 4.2.6 A).

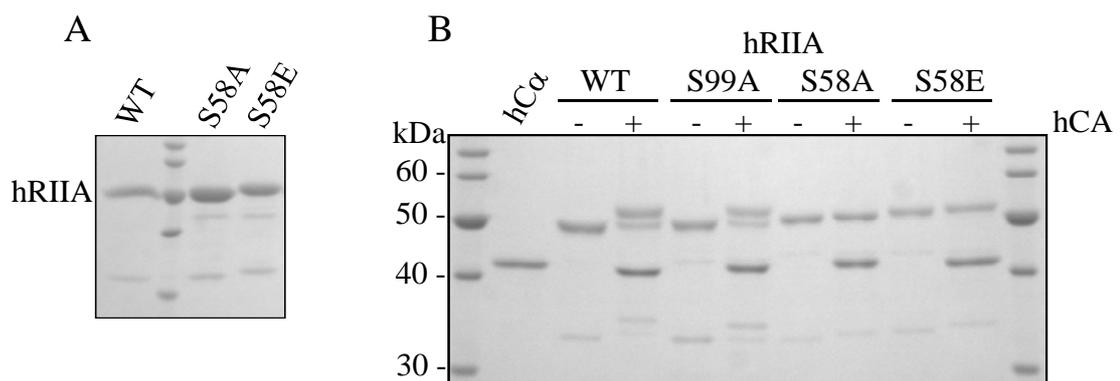


Abb. 4.2.6: Autophosphorylierung der hRIIA und deren Mutanten während der Holoenzymbildung. (A) Vergleich des apparenten Laufverhaltens der Wildtyp (WT) hRIIA mit den Mutanten S58A und S58E in einer SDS-PAGE. (B) Holoenzym aus Wildtyp (WT) hRIIA oder den Mutanten S99A, S58A bzw. S58E mit der hCA.

Verglichen mit der phosphorylierten Form der hRIIA war der Unterschied weniger deutlich. Die Mutation zu Alanin veränderte das Laufverhalten nicht. Nach der

Holoenzymbildung mit der RIIAS99A warn, wie beim Wildtyp, die Banden bei 51 und 53 kDa zu erkennen (Abb. 4.2.6 B). Bei den RIIAS58 Mutanten war keine Doppelbande ersichtlich. Somit konnte auch durch diese Herangehensweise gezeigt werden, dass die humane RIIA während der Holoenzymbildung auch an Serin 58 phosphoryliert wird und das die 53 kDa RIIA Bande allein auf die Phosphorylierung zurückzuführen ist.

4.3 Biochemische und biophysikalische Funktionsuntersuchung der humanen RIIA Phosphorylierung an Serin 58

Zur Funktionsuntersuchung der Phosphorylierung der hRIIA an Serin 58 wurden die in Abschnitt 4.2.2 aufgeführten Mutanten und Doppelmutanten in Kombination mit Serin 99 (Diskar et al., 2007) verwendet (Abb. 4.3.1). Die Mutationen wurde sowohl in dem Plasmid pRSETb-hRIIA (prokaryontischer Expressionsvektor) als auch im pRLuc-N2-hRIIA (eukaryontischer Expressionsvektor) eingefügt (siehe Abschnitt 4.4).

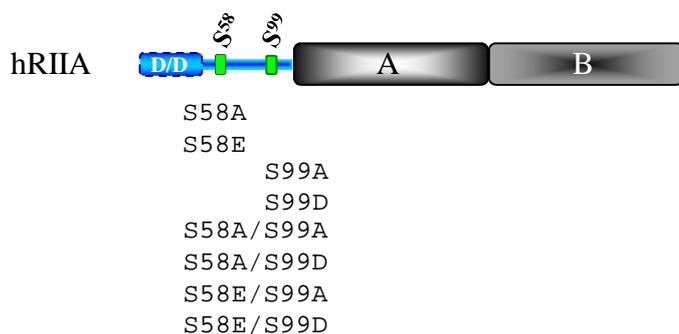


Abb. 4.3.1: Darstellung der in die cDNA der hRIIA eingeführten Mutationen. Das Kodon für Serin 58 und 99 wurde zu einem für Alanin oder einer negativ geladenen Aminosäure (Glutaminsäure oder Asparaginsäure) wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben ausgetauscht. Die Mutationen der Position 99 waren bereits vorhanden (Diskar et al., 2007).

4.3.1 Die Bindung der RIIA an die CA Untereinheit wird durch Mutationen an der Position 58 nicht beeinflusst

Es galt zu überprüfen, ob sich durch die Mutationen der RIIA an Position 58 die Bindungseigenschaften mit der C Untereinheit ändern. Dafür wurden SPR Messung mit Biacore 2000 oder 300 Geräten (GE Healthcare) durchgeführt. Die Bindung der jeweiligen R Untereinheit (Analyt) an die kovalent gekoppelte C Untereinheit (Ligand) erfolgte in Mg^{2+} /ATP-haltigem Laufpuffer. In Abbildung 4.3.2 sind exemplarische Sensogramme dargestellt, die die Bindung von 128 nM der jeweiligen R Untereinheit zeigen. Nach Normalisierung der Kurven ist deutlich zu erkennen, dass die Bindungskinetik der an Position S58 mutierten Proteine mit der hCA nahezu identisch mit

der der Wildtyp hRIIA ist. Hierdurch ist gezeigt, dass die hRIIA/hCA Interaktion von Mutationen an Serin 58 nicht beeinflusst wird.

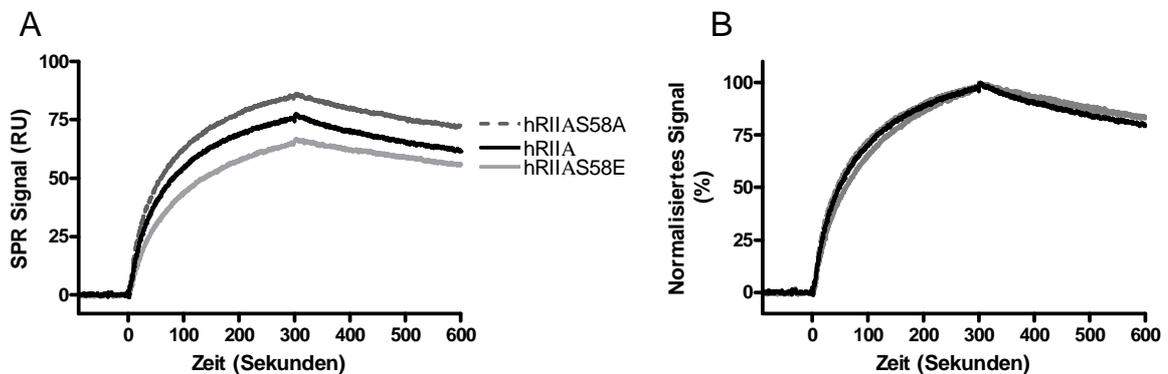


Abb. 4.3.2: SPR Interaktionsmessungen der hRIIA, hRIIAS58A und S58E mit kovalent gekoppelter hCA (250 RU). Die Bindung von je 128 nM R Untereinheit wurde in 5 mM MgCl₂ / 1 mM ATP-haltigem Puffer bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l min}^{-1}$ gemessen. (A) Originaldaten. (B) normalisierte Bindungsdaten.

4.3.2 Die P⁰-Stelle in der Autoinhibitionsstelle der RIIA ist dominant gegenüber S58 im Bezug auf die Interaktion mit der CA

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob unterschiedliche Kombinationen von Mutationen der RIIA an Position 58 und 99 einen Effekt auf die Interaktion mit der C Untereinheit haben. Dafür wurden die in Abbildung 4.3.1 aufgeführten Doppelmутanten, einschließlich der hRIIAS99A, verwendet. Die Proteine hRIIAS58A/S99D und hRIIAS58E/S99D wurden in einer Konzentration von 1024 nM injiziert. Abbildung 4.3.3 C zeigt die mittels cAMP-Affinitätschromatographie gereinigten RIIA Mutanten in der SDS-PAGE. Dabei fällt auf, dass alle Mutanten, die Glutaminsäure (E) an Position 58 enthalten, eine apparente Molekulargewichtserhöhung aufweisen. Zudem ist diese unabhängig davon, welche Aminosäure sich an Position 99 befindet. Vergleicht man die normalisierten Bindungskurven (Abb. 4.3.3 B), so wird deutlich, dass die Bindungskinetik auch dieser Mutanten sehr ähnlich der des Wildtyp-Proteins (schwarze Kurve) ist. Die verlangsamte Dissoziation tritt aufgrund des Austauschs von Serin 99 zu Alanin auf (graue Kurve). Die hRIIA Mutanten, die Asparaginsäure (D) an der Position 99 enthalten, zeigen selbst bei einer Konzentration von über 1 μM kaum Bindung, unabhängig davon, ob sich eine geladene oder ungeladene Aminosäure an Position 58 befindet (Abb. 4.3.3 A). Die apparenten Bindungskonstanten der Interaktion der C Untereinheit mit der hRIIA bzw. der hRIIAS99A sind in Tabelle 4.3.1 aufgeführt.

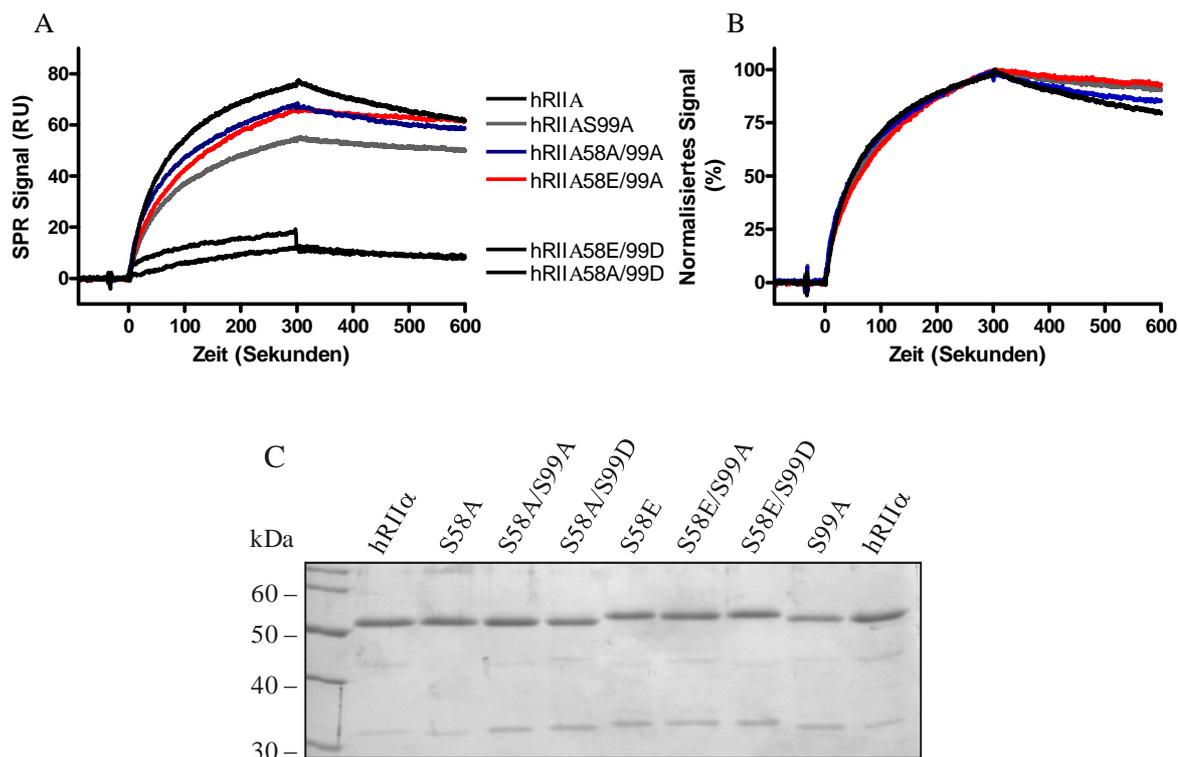


Abb. 4.3.3: SPR Bindungsmessungen der Wildtyp hRIIA im Vergleich zu Doppelmutanten mit kovalent gekoppelter hCA (250 RU). 128 nM der angegebenen R Untereinheiten bzw. 1,024 μM der Mutanten S58E/99D und S58A/99D wurden in $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ bei $30 \mu\text{l min}^{-1}$ injiziert. (A) entspricht den Original und (B) den normalisierten Daten. (C) zeigt die Abbildung einer SDS-PAGE der gereinigten hRIIA Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein.

Tab. 4.3.1: Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten sowie Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Bindung von hRIIA und hRIIAS99A an kovalent gekoppelte hCA in Gegenwart von $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ (Diskar et al., 2007).

	hRIIA	hRIIAS99A
k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$2,9 \times 10^5$	$6,4 \times 10^4$
k_d (s^{-1})	$2,1 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$
K_D (nM)	0,7	2

4.3.3 Weder Phosphorylierung noch Mutationen der hRIIA an Position 58 und 99 wirken sich auf die Bindung von ausgewählten AKAPs aus

Die Aminosäure Serin 58 der hRIIA befindet sich nahe der Dimerisierungs- und Dockingdomäne (D/D, Aminosäure 1-44). Da die Phosphorylierung an dieser Position einen Einfluss auf die Flexibilität der Linkerregion (zwischen D/D und Autoinhibitionsdomäne) haben könnte, wurde untersucht, ob sich die Bindung von AKAP450 und 149 in Abhängigkeit vom Grad der Autophosphorylierung oder dem Einfügen von Mutationen ändert. Zusätzlich zu den bisher aufgeführten Mutanten wurden

auch zwei Phosphoformen der RIIA verwendet. Dabei handelte es sich um S99 phosphorylierte sowie S99 und S58 doppelt phosphorylierte (53 kDa) R Untereinheit (vgl. Abb. 4.3.7 B).

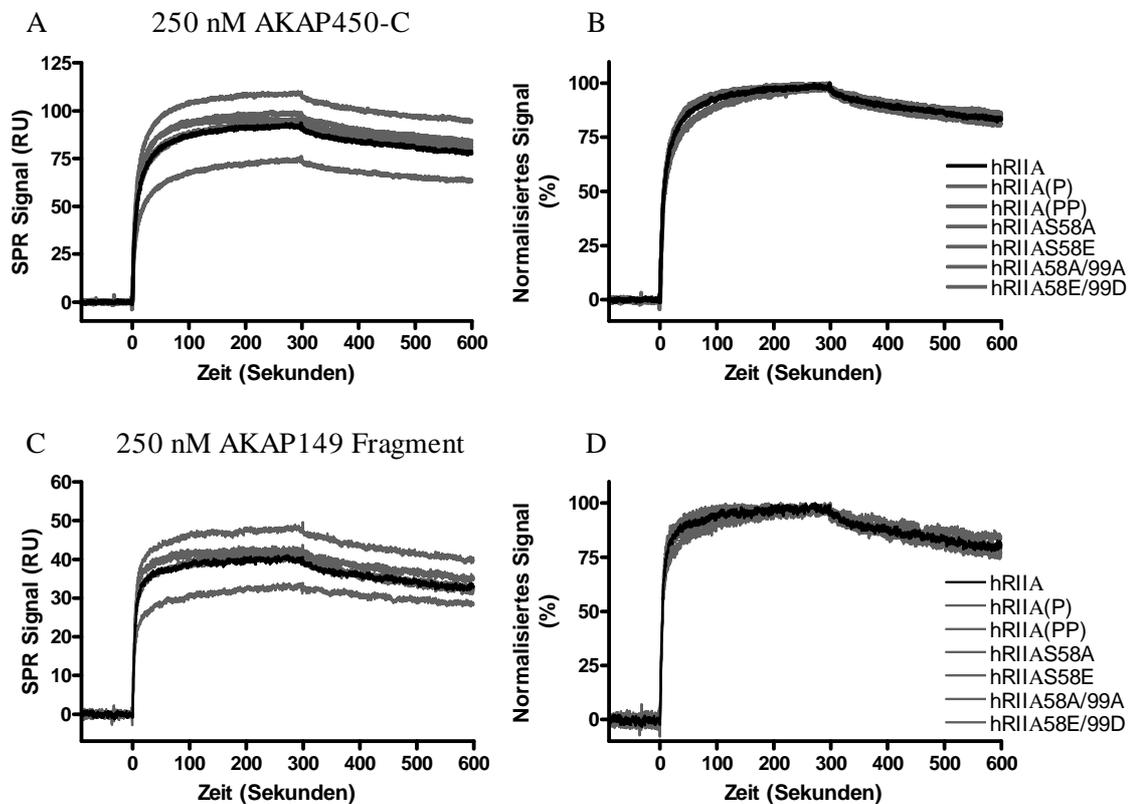


Abb. 4.3.4: Interaktionsmessungen von Fragmenten des AKAP450 und 149 mit phosphorylierten sowie an Position S58/S99 mutierten hRIIA Untereinheiten. 280-340 RU R Untereinheit wurden auf einer 8-AHA-cAMP Oberfläche reversibel gekoppelt und anschließend 250 nM des AKAP450-C (C-terminales Fragment) (A und B) bzw. AKAP149 (C und D) bei $30 \mu\text{l min}^{-1}$ injiziert. (A, C) Originaldaten. (B, D) normalisierte Daten.

Im AKAP450 Protein wurden zwei R Interaktionsstellen identifiziert, eine näher dem N-Terminus und eine weiter C-terminal gelegene (Schmidt et al., 1999; Witczak et al., 1999). Bei AKAP149 handelt es sich um ein dual spezifisches AKAP, das sowohl RII als auch RI Untereinheiten binden kann (Trendelenburg et al., 1996). Für die in Abbildung 4.3.4 gezeigten Interaktionsmessungen dienen die GST-freien R Bindefragmente, die durch zuvorige Thrombinspaltung der Fusionsproteine erhalten wurden (siehe Material und Methoden 3.3.5). Die SPR Messungen erfolgten wie von Herberg und Mitarbeitern publiziert (Herberg et al., 2000). Nach der Immobilisierung der R Untereinheit auf einer 8-AHA-cAMP Chipoberfläche erfolgte anschließend die Injektion des Analyten (250 nM des jeweiligen AKAP Fragments). Die Sensogramme in Abbildung 4.3.4 A und B zeigen die Interaktion der C-terminal gelegenen AKAP450 R Binderegion an die angegebenen

RIIA Untereinheiten. C und D zeigen die Bindung des AKAP149 Fragments. Die Interaktion mit der Wildtyp RIIA ist immer als schwarze Kurve dargestellt. Nach Normalisierung der Bindungskurven wird deutlich, dass sich weder Phosphorylierung an Serin 58/99 noch ein Aminosäureaustausch dieser Positionen auf die Kinetik der Interaktion der getesteten AKAP Fragmente auswirkt.

4.3.4 Mutationen der hRIIA an Threonin 54 in Kombination mit Serin 58 haben keinen Einfluss auf die Bindung von ausgewählten AKAPs

Zusätzlich zu den bisher untersuchten Autophosphorylierungsstellen der hRIIA wird diese noch von der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (CDK1/Cyclin B) an Threonin 54 phosphoryliert (Keryer et al., 1998). Diese, am Anfang der Mitose stattfindende Modifikation, begünstigt die Delokalisation der hRIIA von den Zentrosomen (Carlson et al., 2001). Zudem konnten die Autoren zeigen, dass die Phosphorylierung durch CDK1/Cyc B ebenfalls zu einer apparenten Molekulargewichtserhöhung der hRIIA in der SDS-PAGE führt. Da sich die Aminosäuren T54 und S58 in unmittelbarer Nähe zueinander befinden und die T54 Phosphorylierung vermutlich zur Dissoziation von dem am Zentrosom lokalisierten AKAP450 führt, sollte durch Mutationsanalysen untersucht werden, ob diese beiden Phosphorylierungsstellen sich gegenseitig beeinflussen. Die erzeugten Einzel- und Doppelmutanten sind in Abbildung 4.3.5 A dargestellt.

Im Gegensatz zu der RIIAS58E zeigten die T54E oder T54D Mutanten keine Änderung im Laufverhalten verglichen mit dem Wildtyp-Protein (Abb. 4.3.5 B). In Spur 2 ist die von der hCA doppelt phosphorylierte (an S99 und S58) R Untereinheit aufgetragen (hRIIA(PP)).

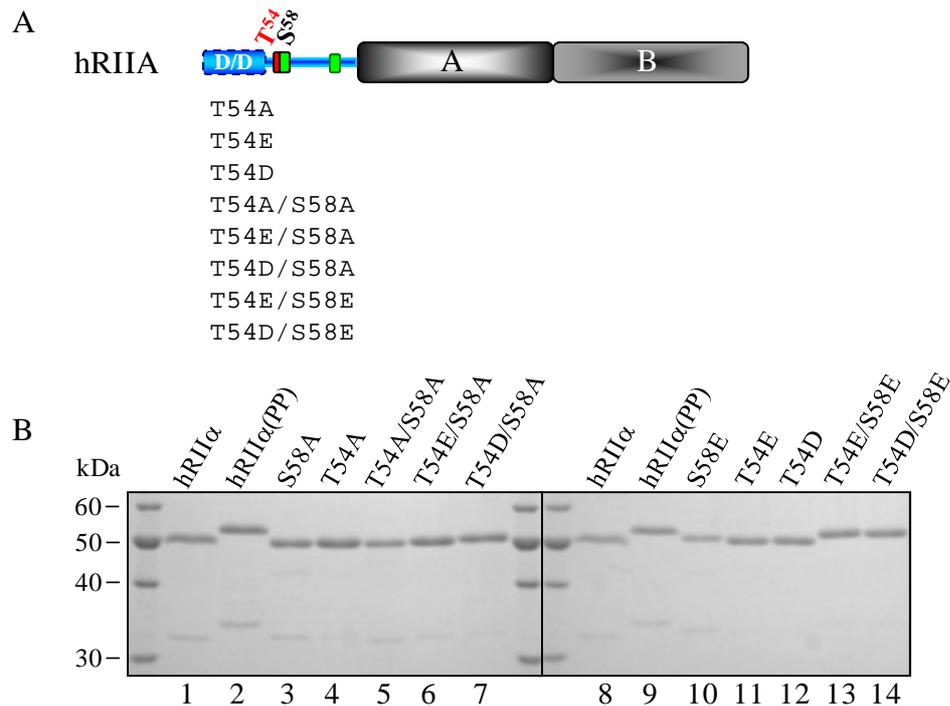


Abb. 4.3.5: Schematische Darstellung der in die cDNA der hRIIA eingeführten T54 bzw. S58 Mutationen sowie Darstellung der Migration der daraus resultierenden rekombinanten Proteine. (A) Die entsprechende Aminosäure wurden zu Alanin oder zu einer negativ geladenen Aminosäure (Glutaminsäure oder Asparaginsäure) ausgetauscht. (B) SDS-PAGE mit den gereinigten hRIIA Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein.

Die Interaktionsstudien der hRIIA Proteine mit den AKAP450 und 149 Fragmenten erfolgten wie im vorigen Abschnitt beschrieben, wobei immer 100 nM des angegebenen GST-Fusionsproteins injiziert wurde. In Abbildung 4.3.6 A, C und E sind die jeweilig erhaltenen Bindungskurven und in B, D und F die normalisierten Daten dargestellt. Verglichen mit der Wildtyp hRIIA (schwarze Linie) zeigen die Threonin 54 und die Doppelmutanten (T54/S58) keinen Unterschied in der Interaktion mit den getesteten AKAP Fragmenten. Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch der hRIIA an T54 und/oder S58 keinen Einfluss auf die Kinetik der Interaktion mit AKAP450 bzw. 149 R Bindefragmenten hat. Lediglich bei der Bindung des C-terminalen AKAP450 und des AKAP149 Fragments an die hRIIA T54A/S58A ist eine etwas langsamere Assoziationsgeschwindigkeit zu beobachten.

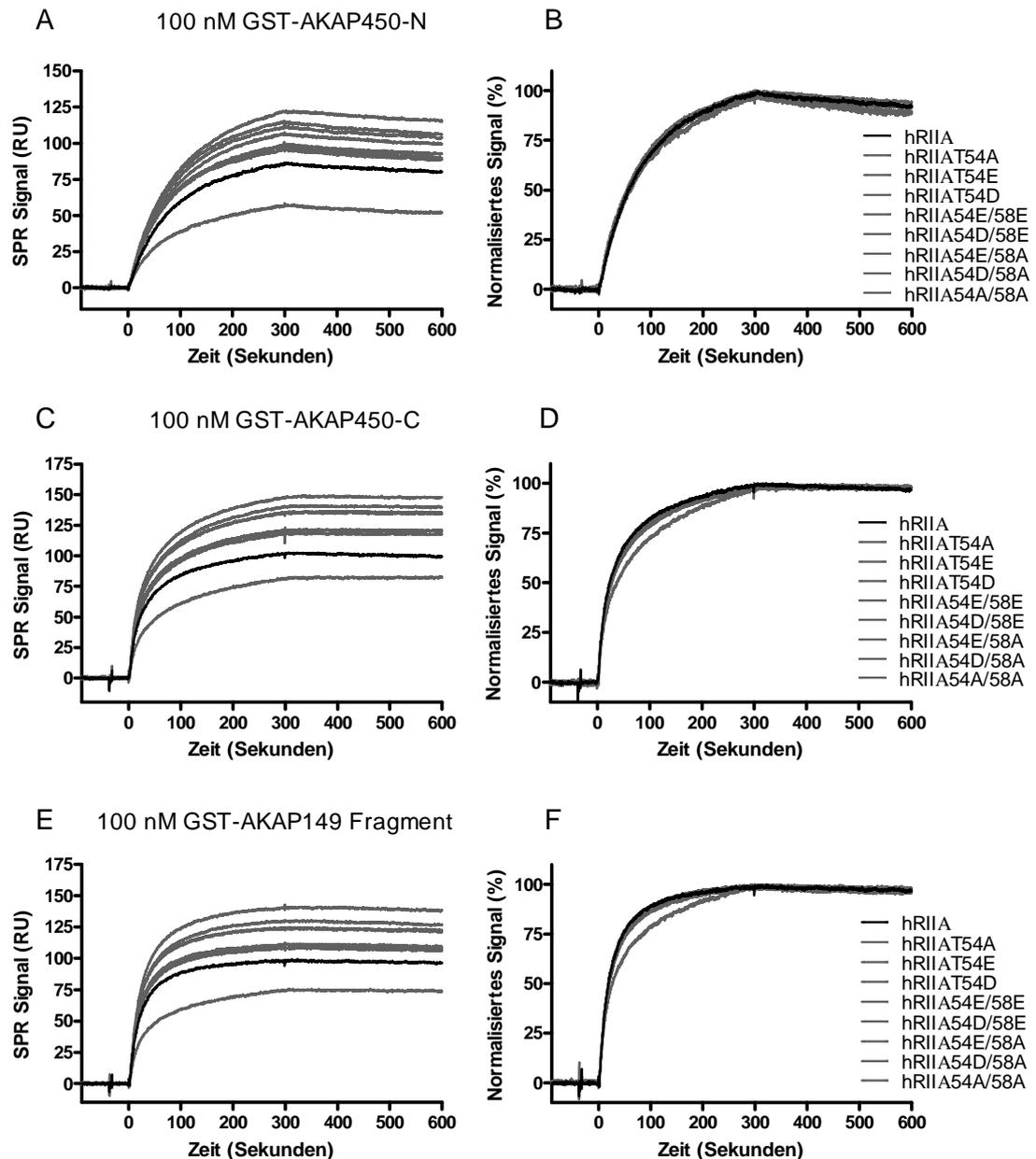


Abb. 4.3.6: SPR Interaktionsmessungen von Fragmenten des AKAP450 und 149 mit T54/S58 mutierten hRIIA Untereinheiten. 250-310 RU R Untereinheit wurden auf einer 8-AHA-cAMP Oberfläche reversibel gekoppelt und anschließend 100 nM des GST-AKAP450-N (N-terminales Fragment) (A, B), GST-AKAP450-C (C-terminales Fragment) (C, D) bzw. GST-AKAP149 (E, F) bei $30 \mu\text{l min}^{-1}$ injiziert. (A, C, E) Originaldaten. (B, D, F) normalisierte Daten.

4.3.5 Der Phosphorylierungsgrad der hRIIA durch CDK1/Cyclin B ist *in vitro* unabhängig von der Vorphosphorylierung durch die PKA-C

Wie in Abschnitt 4.3.4 angedeutet, wird die humane RIIA am Anfang der Mitose von CDK1/Cyclin B phosphoryliert (Carlson et al., 2001; Keryer et al., 1998; Landsverk et al., 2001). In dem Zusammenhang wurden radioaktive Phosphorylierungsexperimente

durchgeführt, die zeigen sollten, ob die Phosphorylierungsrate der CDK1/Cyclin B von dem Serin 58 Phosphostatus der hRIIA beeinflusst wird. Als Substrat für die CDK1 diente daher unphosphorylierte sowie doppelt phosphorylierte (S58 und 99) hRIIA.

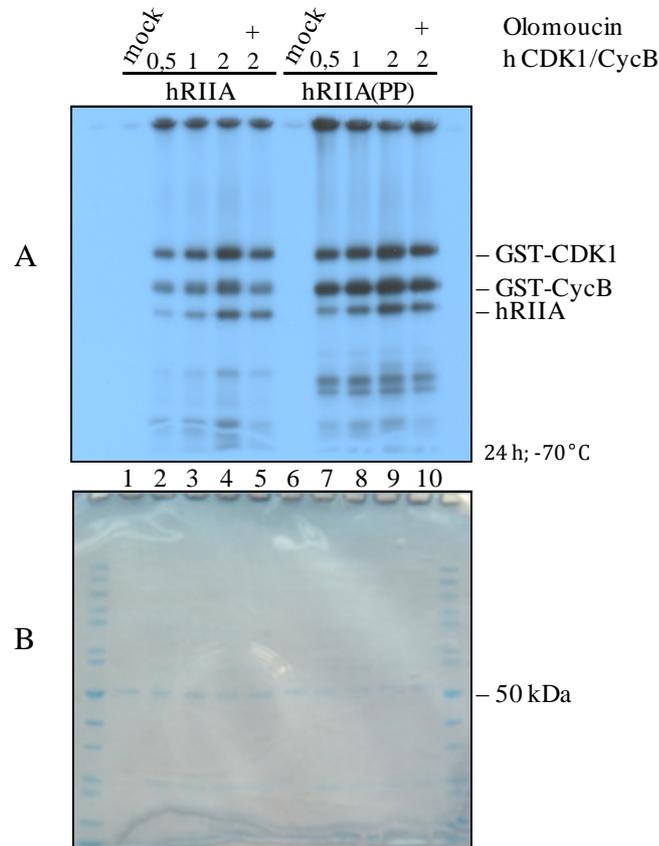


Abb. 4.3.7: Zeitabhängige Phosphorylierung der hRIIA und der hRIIA(PP) durch CDK1/Cyc B. (A) Autoradiogramm. (B) Coomassiefärbung der Proteine im SDS-Gel. Aus je einem größeren Ansatz wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten (0,5, 1 und 2 Stunden) Proben entnommen und die Reaktion durch SDS-Probenpuffer und fünf-minütiges Erhitzen (70 °C) gestoppt. Als Kontrolle erfolgte die Inkubation je eines Ansatzes für 2 Stunden mit dem CDK1 Inhibitor Olomoucine (100 µM). In Spur 1 und 6 (*mock*) wurde hRIIA bzw. hRIIA(PP) aufgetragen, die nicht mit CDK1/Cyc B inkubiert wurde. Die stärkeren Signale in Spur 7 bis 10 im Vergleich zu Spur 2 bis 5 sind auf unterschiedliche Auftragungsvolumina zurückzuführen.

Aus dem Ergebnis (siehe Abb. 4.3.7) geht hervor, dass CDK1 in der Lage ist, sowohl die unphosphorylierte als auch die von der PKA-CA vorphosphorylierte hRIIA zu phosphorylieren (vgl. A Spur 2-4 mit 7-9). Ein Unterschied in der Phosphorylierungsrate durch CDK1 in Abhängigkeit der Vorphosphorylierung der hRIIA ist unter diesen Bedingungen nicht ersichtlich. Es ist festzustellen, dass eine effizientere Autophosphorylierung von CDK1 und Cyclin B im Vergleich zur RIIA auftritt. Keryer und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die RIIA nach Phosphorylierung durch die CDK1 ein verlangsamtes Laufverhalten in der SDS-PAGE zeigt (Keryer et al., 1998). Dies war

hier unter den experimentellen Bedingungen nicht nachzuweisen. Lediglich die beschriebene apparente Molekulargewichtserhöhung von Cyclin B (nach Phosphorylierung) war deutlich zu erkennen. Weiterhin ist zu bemerken, dass durch Zugabe von 100 μ M Olomoucine die Aktivität der CDK1 nicht komplett inhibiert wurde. Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass eine Phosphorylierung der hRIIA an T54 durch CDK1/Cyc B von der 4 Aminosäuren weiter C-terminal gelegenen Phosphorylierung (S58) nicht beeinflusst wird.

4.3.6 Die RIIA als Plattform für Protein/Protein Interaktionen

Durch die bisher gezeigten biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen der hRIIA konnte der Phosphorylierung an Serin 58 keine Funktion zugeordnet werden. Als weiteren Schritt galt es zu überprüfen, ob die phosphorylierte Form der RIIA ein potentiell Motif für Protein/Protein Interaktionen darstellt. Zu diesem Zweck wurden klassische GST *pull-down* Experimente aus NP-40 (Nonylphenylpolyethylenglycol) löslichem Überstand nach Lyse von HeLa Zellen durchgeführt. Als Köder (*bait*) dienten das gereinigte Fusionsprotein GST-hRIIA1-87, die phosphorylierte Form dieses Proteins sowie als Kontrolle GST allein. Die Phosphorylierung des Proteins GST-hRIIA1-87 durch die C Untereinheit (hCA) wurde während der Immobilisierung an die Glutathion-Sepharose vollzogen.

Aus der Abbildung 4.3.8 wird ersichtlich, dass unter den Bedingungen nahezu das gesamte eingesetzte Protein an der Sepharose gebunden verblieb, da in den jeweiligen Proben der Überstände (nach einer zweistündigen Inkubation bei RT) kaum noch Protein zu erkennen ist. Vergleicht man den GST-hRIIA1-87 Phosphorylierungsansatz (Probe 2h) mit der unphosphorylierten Form (Input), wird die vollständige apparente Molekulargewichtserhöhung als Folge des Phosphattransfers ersichtlich.

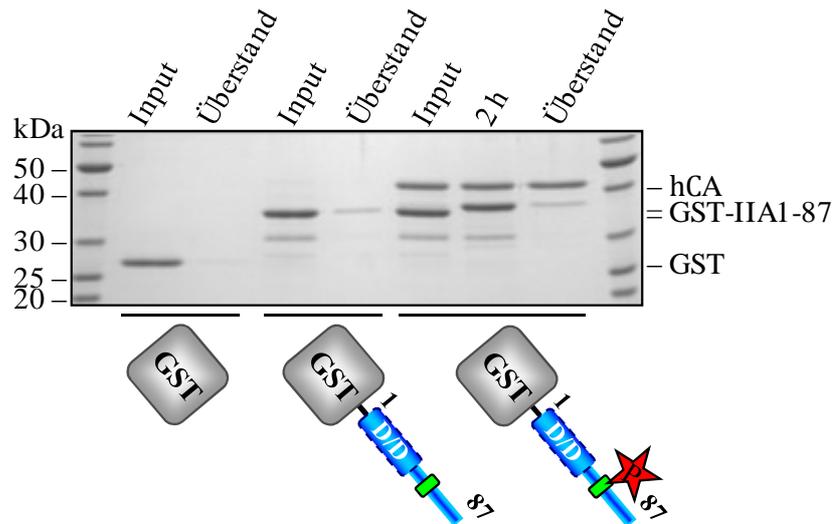


Abb. 4.3.8: Immobilisierung von GST, GST-IIA1-87 und GST-IIA1-87(P) Protein an Glutathion-Sephrose. Die angegebenen Proteine wurden für 2 Stunden bei RT mit Glutathion-Sephrose inkubiert und Proben bei Beginn (Input) bzw. nach Inkubationsende (Überstand) entnommen. Die Inkubation des Fusionsproteins GST-IIA1-87 mit hCA erfolgte in Gegenwart von 5 mM MgCl₂ und 1 mM ATP.

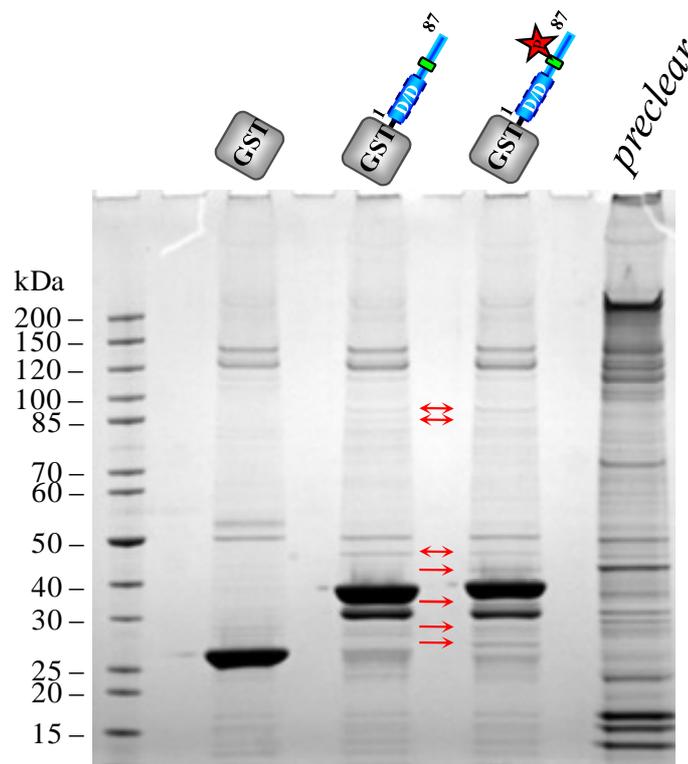


Abb. 4.3.9: Pull-down Experiment mit GST, unphosphoryliertem und phosphoryliertem GST-IIA1-87 Protein. Gezeigt ist ein Coomassie gefärbtes Gradientengel (4-12 %) eines wie im Material und Methodenteil (Abschnitt 3.3.6) beschriebenen *pull-down* Experiments mit GST, unphosphoryliertem und phosphoryliertem GST-IIA1-87 Protein als Köder. Zusätzlich wurde eine Probe der Glutathion-Sephrose nach Vorreinigung (*preclear*) des HeLa Zellen Lysats aufgetragen. Deutlich unterschiedliche Banden im Vergleich zu GST sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die Pfeilrichtung gibt an, bei welchem *pull-down* die Bande zu erkennen ist.

Nach Immobilisierung der Köder-Proteine an Glutathion-Sepharose wurden diese mit vorgereinigtem löslichem Überstand nach Lyse von HeLa Zellen inkubiert. Die Vorreinigung (*preclear*) des löslichen Überstands erfolgte durch Glutathion-Sepharose allein, um spezifisch/unspezifisch an diese Matrix bindende Proteine herauszufiltern. Nach fünf Waschschritten zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine folgten die Elution mit Probenpuffer und die anschließende Auftrennung mittels 4-12 % Gradientengele (siehe Material und Methoden 3.3.9). Abbildung 4.3.9 zeigt das Ergebnis eines *pull-down* Experiments nach Färbung mit Coomassie. Bei rein visueller Betrachtung fällt ein zum Teil deutlicher Unterschied in den Bandenmustern auf (rote Pfeile).

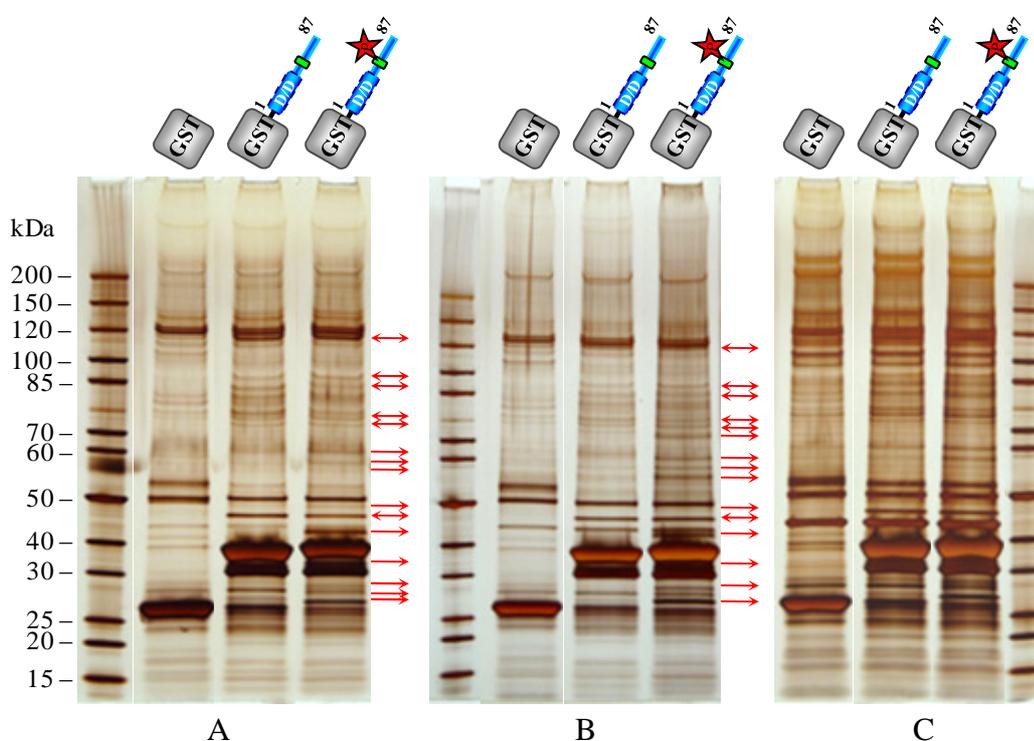


Abb. 4.3.10: Drei vergleichbare *pull-down* Experiment mit GST, unphosphoryliertem und phosphoryliertem GST-IIA1-87 Protein als Köder. Gezeigt sind silbergefärbte 4-12 % Gradientengele (4-12 %) von drei unabhängigen *pull-down* Experimenten (A, B und C) mit GST, unphosphoryliertem und phosphoryliertem GST-IIA1-87 Protein als Köder (siehe Abschnitt 3.3.6). A ist ein nochmaliger Auftrag des in Abb. 4.3.9 gezeigten *pull-downs*. Deutlich unterschiedliche Banden im Vergleich zu GST sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die Pfeilrichtung gibt an, bei welchem *pull-down* die Bande zu erkennen ist.

Die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses konnte durch zwei weitere *pull-down* Experimente unter vergleichbaren Bedingungen gezeigt werden. Wegen der höheren Empfindlichkeit wurden die Gradientengele einer Silberfärbung unterzogen (Abb. 4.3.10). Die Silberfärbung ermöglichte es, zahlreiche weitere Proteine, die nur bei den *pull-down* Experimenten mit den Ködern GST-IIA1-87 oder GST-IIA1-87(P)

co-präzipitiert wurden, sichtbar zu machen. Die einzelnen Proteinbanden konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr massenspektrometrisch analysiert werden.

4.4 Zellbiologische Untersuchung der hRIIA Phosphorylierung an Serin 58

4.4.1 Aktivierung des PKA Holoenzym Typ IIA in lebenden Zellen

Mittels Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET) zur Messung von Protein/Protein Interaktionen konnten Diskar und Mitarbeiter zeigen, dass die P⁰-Stelle der R Untereinheiten (RIA Ala99, RIIA Ser99) eine entscheidende Position für die Dissoziation des jeweiligen Heterotetramers ist (Diskar et al., 2007). Dabei führte der Austausch des Serins zu Alanin dazu, dass das PKA-IIAS99A Holoenzym, im Vergleich zum Wildtyp, insensitiver für cAMP wurde. Die *in vitro* gemessene Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) zwischen den R Untereinheiten und der CA unterschieden sich dagegen kaum (RIIA/CA $K_D = 0,7$ nM; RIIAS99A/CA $K_D = 2$ nM). Dennoch aber hat diese Mutation einen drastischen Einfluss auf die Aktivierbarkeit in lebenden Zellen.

Ziel war es zu untersuchen, ob sich ein Aminosäureaustausch an Position 58 der hRIIA ebenfalls auf die Holoenzym-Dissoziation in lebenden Zellen auswirkt. Die Interaktion der GFP-hCA und der hRIIA-RLuc wurde in unstimulierten COS-7 Zellen und nach der Stimulation mit Forskolin/IBMX verglichen. Da es sich bei Forskolin (FSK) um einen Adenylzyklase-Aktivator und bei IBMX (3-Isobuturyl-1-methylxantin) um einen unspezifischen Phosphodiesterase-Inhibitor handelt (Beavo et al., 1970; Dubey et al., 1981), wird somit die intrazelluläre cAMP Produktion aktiviert und die Hydrolyse inhibiert. Das Typ IIA Holoenzym dissoziierte bei Stimulation mit FSK/IBMX nahezu vollständig (Abb. 4.3.2). Das Heterotetramer aus hRIIAS99A und hCA hingegen dissoziierte unter den Bedingungen nur zu ca. 40-50 % (Diskar et al., 2007). Eine derart drastische Änderung der Aktivierbarkeit in lebenden Zellen ist bei den Holoenzymen mit hRIIAS58A oder S58E nicht zu beobachten (Abb. 4.4.1). Zudem zeigen die Messungen der RIIA S58 und S99 Doppelmutanten, dass die P⁰-Stelle (S99) in der Autoinhibitionsdomäne die Dominante im Bezug auf die Holoenzymdissoziation ist. Die Insensitivität des PKA-IIAS99A Holoenzym gegenüber cAMP wurde durch keine der untersuchten Mutationen an Position 58 beeinflusst.

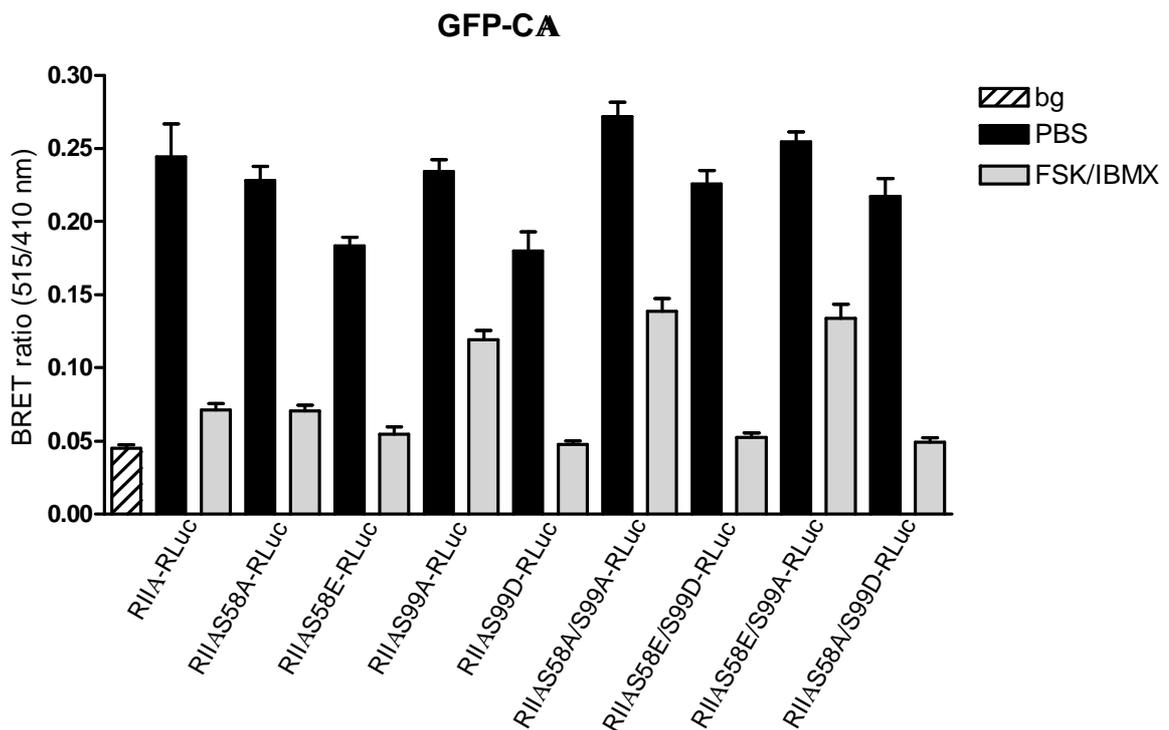


Abb. 4.4.1: PKA Holoenzym Dissoziation in COS-7 Zellen gemessen mittels BRET. COS-7 Zellen wurden mit dem GFP-hCA und den angegebenen hRIIA-RLuc Konstrukten kotransfiziert. 24 Stunden danach erfolgten die BRET Messungen der zuvor für 30 Min in D-PBS (schwarze Balken) oder FSK/IBMX (graue Balken) inkubierten Zellen (siehe Material und Methoden Abschnitt 3.6.4). Das Hintergrundsignal (bg) resultiert aus Messungen, bei denen ein RLuc Leervektor transfiziert wurde.

4.4.2 Die zelluläre Lokalisation des Fusionsproteins hRIIA-GFP wird durch Mutationen an Position 58 nicht beeinflusst

Die Lokalisation der Wildtyp RIIA und der S58 Mutanten wurde in COS-7 Zellen untersucht. Dafür dienten C-terminal mit einem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) versehenen RIIA Konstrukte, die in die Zellen transfiziert und dort transient überexprimiert wurden. Als Kontrolle fungierte ein für GFP kodierender Vektor ohne R Untereinheit. Die Fixierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 3.7.3 beschrieben.

GFP (ohne R Untereinheit) befindet sich im Zytoplasma und im Zellkern (Abb. 4.4.2). In Hinblick auf die intrazelluläre Lokalisation war kein Unterschied zwischen der Wildtyp RIIA-GFP und den Mutanten RIIAS58A- bzw. S58E-GFP zu erkennen. Keines der Fusionsproteine war im Zellkern zu sehen. Auffällig war jedoch, dass die Zellen, die mit dem Konstrukt hRIIAS58A-GFP transfiziert wurden, vermehrt Ausläufer bildeten und dass die Zellkerne deformiert waren. Auffällig war weiterhin, dass diese Zellen oft mehr als ein Zentrosom hatten. Was der Grund für diesen Phänotyp ist, bleibt zu klären.

Untersuchungen, ob bei Überexpression des Fusionsproteins hRIIAS58A-GFP in Zellen Apoptose oder Nekrose induziert wird, sind geplant.

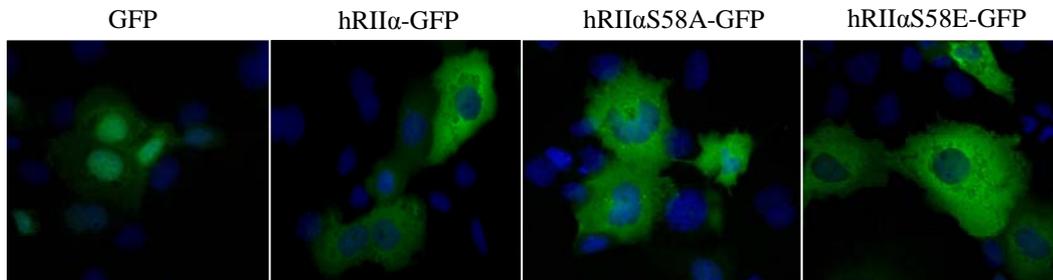


Abb. 4.4.2: Intrazelluläre Lokalisation der Wildtyp hRIIA-GFP und der Mutanten S58A bzw. S58E in COS-7 Zellen. Dargestellt sind COS-7 Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit den angegebenen Konstrukten in einer 63-fachen Vergrößerung (Öl-Immersionsobjektiv). Blau: Färbung der DNA (Zellkerne) mit DAPI. Auffällig ist, dass die Zellen, die das hRIIAS58A-GFP Fusionsprotein überexprimieren, deformierte Zellkerne, vermehrt Ausläufer und mehr als ein Zentrosom aufweisen.

4.4.3 Untersuchung zur Aktivierbarkeit der PKA Holoenzyme im Hinblick auf die intrazelluläre Verankerung durch AKAPs

Hauptsächlich die R Untereinheiten des Typs II können durch A-Kinase Ankerproteine (AKAPs) subzellulär lokalisiert werden (Wong and Scott, 2004). Die Interaktion erfolgt über die N-terminale Dimerisierungs- und Dockingdomäne (D/D) der R Untereinheiten und über eine amphipathische A-Helix der AKAPs (Hausken et al., 1994; Scott et al., 1990). Dieses hat zu Folge, dass das PKA Holoenzym in die räumliche Nähe seiner Substrate, Gegenspieler (Proteinphosphatasen) sowie indirekten Aktivatoren und Regulatoren (Adenylylzyklasen, Phosphodiesterasen) gebracht werden kann (Tasken and Aandahl, 2004). Ein zusätzlicher Effekt der subzellulären Verankerung ist die Lokalisation an Orten unterschiedlicher cAMP-Konzentration hervorgerufen durch Aktivierung verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren (Di Benedetto et al., 2008; Zaccolo and Pozzan, 2002).

Das Typ-IA Holoenzym dissoziiert in lebenden Zellen, selbst nach maximaler Stimulation der cAMP-Produktion und Inhibition von Phosphodiesterasen (Forskolin/IBMX), nur zu etwa 50 % (Diskar et al., 2007; Prinz et al., 2006). In diesem Projekt sollte daher untersucht werden, ob die AKAP vermittelte Zielsteuerung des PKA-IA Holoenzym einen Einfluss auf den Dissoziationsgrad bei Aktivierung durch cAMP hat. Dafür sollte eine RIA Untereinheit, die den N-Terminus der RIIA beinhaltet (IIAIA) sowie eine RIIA Untereinheit, die den N-Terminus der RIA enthält (IAIIA), kloniert

werden (siehe Abb. 4.4.3). Im Rahmen dieser Arbeit ist es nur gelungen, das IIAIA-RLuc Fusionskonstrukt zu klonieren. Dieses wurde im Vergleich zu dem PKA-IIA bzw. PKA-IA Holoenzym in Hinblick auf die Aktivierbarkeit in lebenden Zellen mittels BRET untersucht (siehe Abb. 4.4.4).

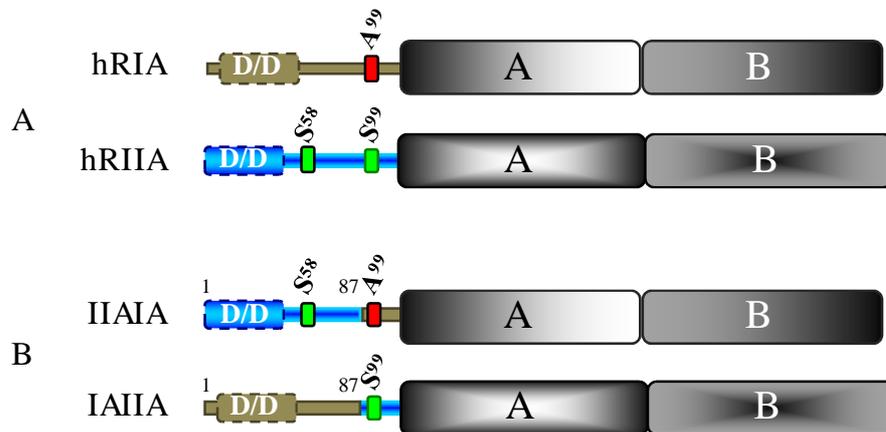


Abb. 4.4.3: Schematischer Aufbau der hRIA/hRIIA sowie der Proteine IIAIA und IAIIA.

(A) Domänenaufbau der humanen RIA und RIIA. (B) Aufbau der Fusionsproteine IIAIA bzw. IAIIA. D/D = Dimerisierungs- und Dockingdomäne. Die cAMP bindende Domäne A und B sind gekennzeichnet. A⁹⁹ bzw. S⁹⁹ verdeutlicht die P⁰-Position in der Autoinhibitionsdomäne. Es wurden jeweils die ersten 87 Aminosäuren gegenseitig ausgetauscht.

Das Typ-IIA Holoenzym dissoziiert in lebenden Zellen nach FSK/IBMX Stimulation nahezu vollständig, wohingegen bei dem Typ-IA Holoenzym ca. 50 % des Proteins weiterhin als Tetramer verbleibt (Abb. 4.4.4 A) (Diskar et al., 2007; Prinz et al., 2006). Überraschenderweise war bei dem IIAIA-Holoenzym, im Vergleich zum RIA Holoenzym, ein um ca. 30 % verringertes BRET Signal zu verzeichnen. Dieses deutet auf eine mögliche Störung der Interaktion mit der hCA nach Einbringen des RIIA N-Terminus in die RIA hin. Das BRET Signal des IIAIA-Holoenzym, nach Stimulation mit FSK/IBMX, ist vergleichbar mit dem des Typ-IA Holoenzym nach gleicher Stimulation. Setzt man das jeweilige BRET Signal unter unstimulierten Bedingungen in Relation mit dem nach Stimulation, so wird deutlich, dass es bei dem IIAIA-Holoenzym nur zu einer ~ 20 %igen Dissoziation kommt. Dieses bedeutet somit, dass ~ 80 % des gebildeten Tetramers komplexiert verbleibt.

Zum Expressionsnachweis der Fusionsproteine wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt (Abb. 4.4.4 B und C). Auffällig dabei war, dass das IIAIA-RLuc als Doppelbande detektiert wurde. Da dieses Protein den N-Terminus der RIIA enthält, lässt sich schließen, dass durch Phosphorylierung an Serin 58 die apparente

Molekulargewichtserhöhung hervorgerufen wird. Ob die Phosphorylierungsstelle (S58) einen Einfluss auf die Interaktion des IIAA-Proteins mit der C Untereinheit hat, muss noch untersucht werden.

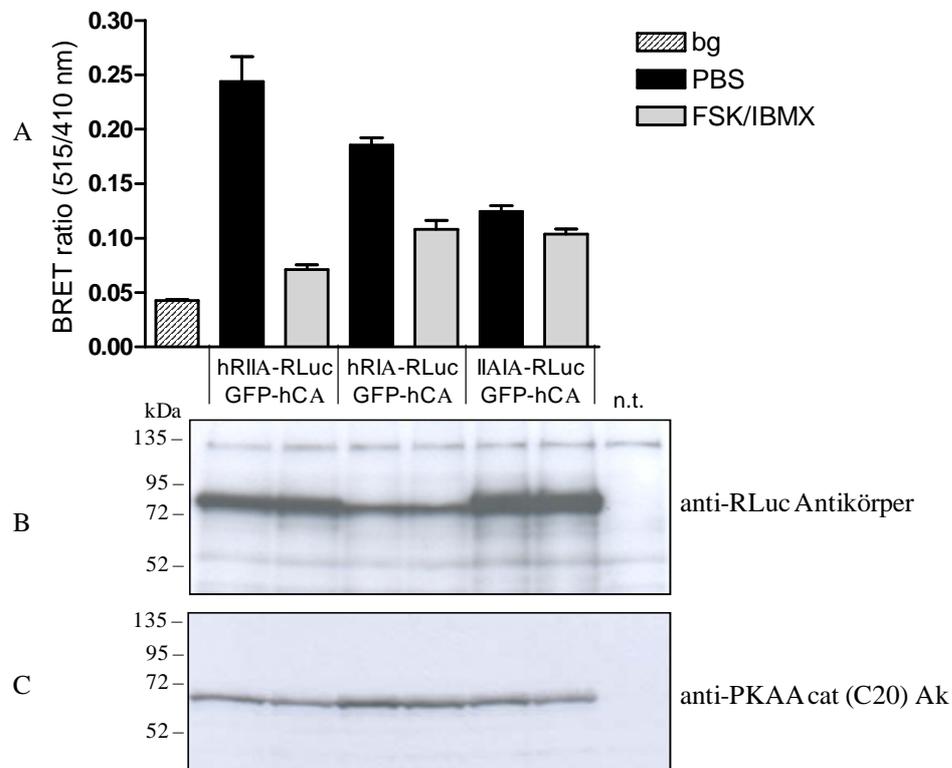


Abb. 4.4.4: Vergleichende BRET Messungen des PKA-IIA, -IA sowie des IIAA Holoenzym in COS-7 Zellen vor und nach Stimulation mit FSK/IBMX. COS-7 Zellen wurden in 96-Well Platten mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. (A) Das Auslesen der Luciferase und GFP Emission erfolgte 48 Stunden danach. Ein Teil der Zellen (jeweils 6 Wells) wurden zuvor für 30 Min. mit FSK/IBMX (graue Balken) und zur Kontrolle mit D-PBS (schwarze Balken), wie in Abschnitt 3.6.4 beschrieben, inkubiert. (B) Western Blot zum Nachweis der RLuc Fusionsproteine (anti-RLuc Antikörper). (C) Nachweis der GFP-hCA (anti-PKAA cat (c20) Antikörper). N.t. steht für nicht transfizierte Zellen und bg (Hintergrund) ist das Signal aus Messungen, bei denen nur ein RLuc Leervektor transfiziert wurde.

4.5 Dephosphorylierung der hRIIA

Bislang konnte der hRIIA Phosphorylierung an Serin 58 keine Funktion im Hinblick auf die Bindung an die CA, die Aktivierung des Holoenzym in lebenden Zellen und die Bindung an AKAPs zugeordnet werden. Darauf, dass die Phosphorylierung eine Funktion hat, deutet die veränderte Morphologie der COS-7 Zellen nach Transfektion und Überexpression des hRIIAS58A Konstrukts.

4.5.1 Proteinphosphatase 1, 2CA (1A) und 2A dephosphorylieren die hRIIA effizient *in vitro*

Im Folgenden werden Experimente aufgeführt, die zum Ziel hatten Proteinphosphatasen (PP) zu identifizieren, die in der Lage sind, an Aminosäure S58 phosphorylierte hRIIA zu dephosphorylieren. Es wurden hierbei die Proteinphosphatasen 1, 2A, 2CA und CIAP getestet. Das besondere Augenmerk lag dabei auf PP1 und PP2A, da diese Phosphatasen über ihre R Untereinheiten ebenfalls an AKAPs gebunden sein können und somit in demselben subzellulären Kompartiment auftreten wie die PKA (Wong and Scott, 2004). Als *readout* für eine erfolgreiche Dephosphorylierung wurde die apparente Molekulargewichtsreduktion (in einer SDS-PAGE) der phosphorylierten RIIA von ~ 53 kDa auf ~ 51 kDa herangezogen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden zeit- oder konzentrationsabhängige Experimente durchgeführt (Abschnitt 3.5). Bei zeitabhängigen Dephosphorylierungsexperimenten wurde konstant 4 µg hRIIA(PP) mit der in der Abbildung aufgeführten Aktivität der jeweiligen Proteinphosphatase (PP1, PP2CA und CIAP) bei 30 °C inkubiert und nach der angegebenen Zeit eine Probe entnommen (Abb. 4.5.1 A, B, C). Bei Phosphatase konzentrationsabhängigen Experimenten erfolgte die Dephosphorylierung von 1 µg hRIIA(PP) für genau 30 Minuten durch die angegebene Aktivität von PP2A (Abb. 4.5.1 D).

Jede dieser getesteten Phosphatasen ist in der Lage, die hRIIA(PP) zu dephosphorylieren, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz. Anhand des Grades der apparenten Molekulargewichtsreduktion und der jeweils eingesetzten Aktivität an Phosphatase kann man eine Rangordnung in der Dephosphorylierungseffizienz erkennen. Abbildung 4.5.2 verdeutlicht dieses.

Die Abbildung 4.5.2 zeigt die Dephosphorylierung einer konstanten Menge hRIIA(PP) durch vergleichbare Mengen Phosphatase. PP1 dephosphoryliert die hRIIA(PP) *in vitro* am effizientesten, gefolgt von PP2CA und PP2A. Die alkalische Phosphatase CIAP ist, bei der eingesetzten Aktivität, ebenfalls in der Lage effizient zu dephosphorylieren. Setzt man diese jedoch in vergleichbarer Menge (0,5 U) ein, erfolgt unter den Bedingungen kaum eine Dephosphorylierung (Daten nicht gezeigt).

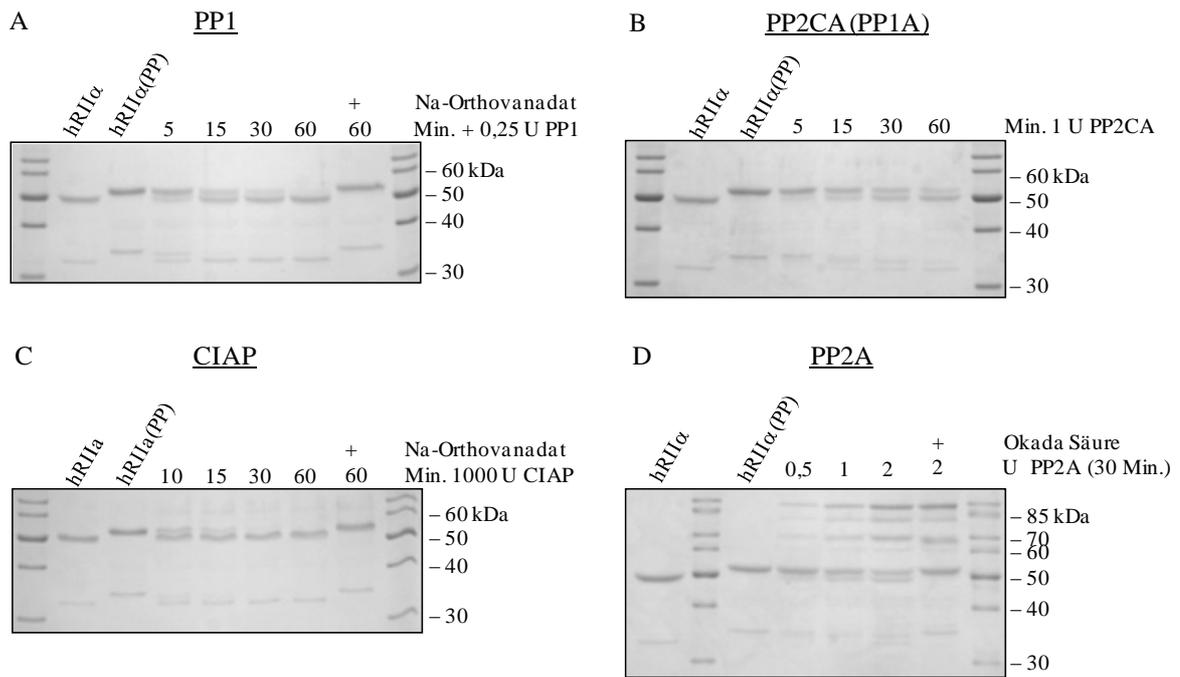


Abb. 4.5.1: Nachweis der zeit- oder konzentrationsabhängigen Dephosphorylierung der hRIIA(PP) durch PP1, PP2CA, CIAP und PP2A in der SDS-PAGE. Für die zeitabhängige Dephosphorylierung wurden 4 µg hRIIA(PP) mit der angegebenen Aktivität (1 U = 1 pmol min⁻¹ mg⁻¹) an PP1(A), PP2CA (B) und CIAP (C) bei 30 °C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte nach der angegebenen Zeit. (D) Je 1 µg hRIIA(PP) wurde mit 0,5, 1 und 2 U PP2A für 30 Minuten versetzt. Die Ansätze mit den Phosphataseinhibitoren Na-Orthovanadat und Okadasäure dienten als Kontrollen.

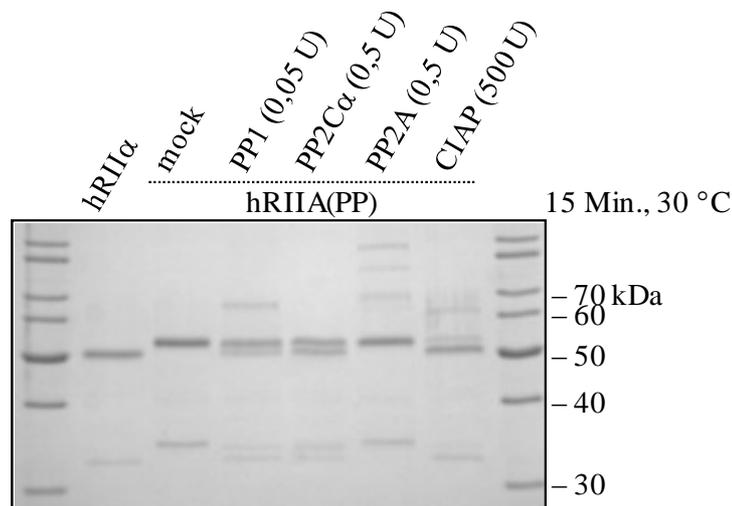


Abb. 4.5.2: RIIA(PP) Dephosphorylierung durch PP1, PP2CA, PP2A und CIAP im direkten Vergleich. 1 µg hRIIA(PP) wurde mit der angegebenen Aktivität der jeweiligen Phosphatase für 15 Minuten bei 30 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt.

4.5.2 Die hRIIA Phosphorylierung an Serin 58 ist im Holoenzymkomplex für Phosphatasen unzugänglich

Wie in Abschnitt 4.2 gezeigt, wird die hRIIA während der Holoenzymformierung an Serin 58 phosphoryliert. Demzufolge sollte untersucht werden, inwiefern die Phosphorylierung im Holoenzymkomplex für die Proteinphosphatase 1 zugänglich ist. Dafür wurde Holoenzym in einem CA/RIIA Verhältnis 1:1,25 gebildet, mit PP1 inkubiert und nach 5, 15, 30 und 60 Minuten Proben entnommen (Abbildung 4.5.3 A).

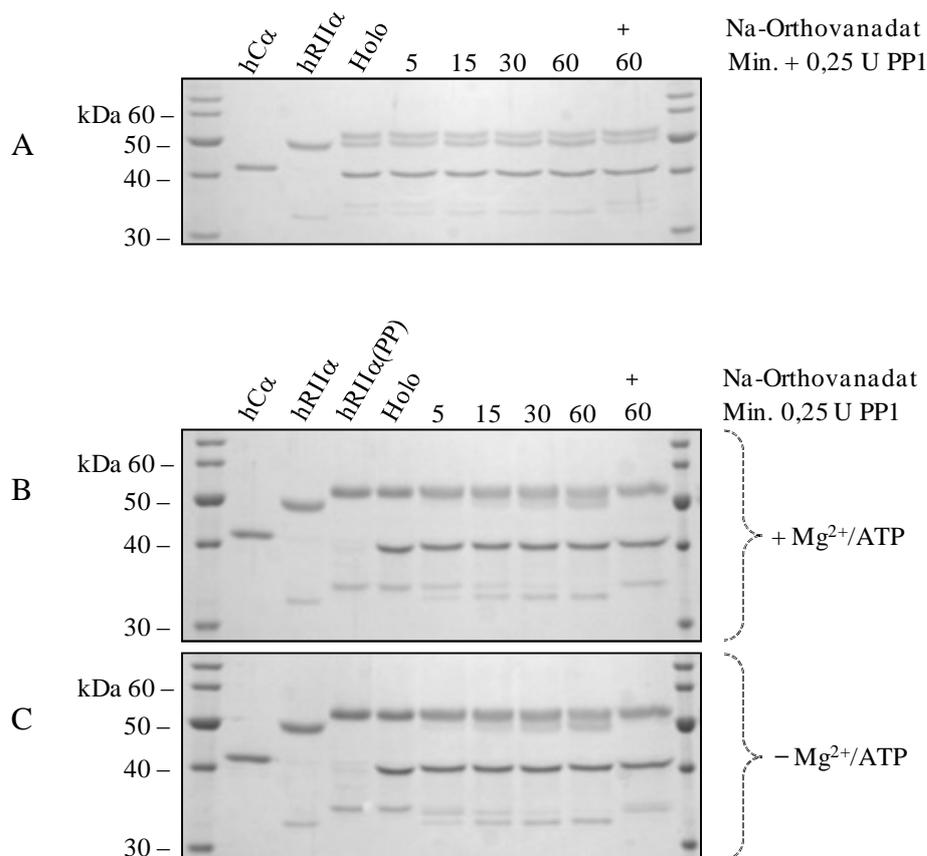


Abb. 4.5.3: Zeitabhängige Dephosphorylierung des Typ-IIA Holoenzym durch PP1. Die Holoenzymbildung erfolgte in einem molaren R/C Verhältnis von 1,25:1 für 60 Minuten bei RT. Aus jeweils einem großen Ansatz mit 0,25 U PP1 wurden Proben nach 5, 15, 30 und 60 Minuten entnommen und die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt. Jeweils ein Ansatz wurde für 60 Minuten mit 10 mM Na-Orthovanadat inkubiert. (A) Holoenzym aus 6 µg hRIIA und 4,45 µg hCA. (B) Holoenzym aus 6 µg hRIIA(PP) und 4,45 µg hCA. (C) entspricht B lediglich ohne Mg²⁺/ATP.

Es ist zu erkennen, dass durch PP1 kaum eine Dephosphorylierung des Serin 58 im Holoenzym auftritt. Lediglich die Hauptdegradationsbande der hRIIA von ca. 32 bzw. 35 kDa wird mit der Zeit vollständig dephosphoryliert. Dieses deutet darauf, dass das Degradationsprodukt kaum oder gar nicht mit der CA interagiert und somit zugänglich für die Phosphatase ist.

Inkubiert man bereits vollständig phosphorylierte hRIIA(PP) mit hCA zur Holoenzymbildung und versetzt dieses mit PP1, wird eine Dephosphorylierung deutlich (Abb. 4.5.3 B und C). Dieses Experiment wurde mit vergleichbaren Ergebnissen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Mg^{2+} /ATP während der Holoenzymbildung und Dephosphorylierung durchgeführt (vgl. B und C). Das Heterotetramer mit bereits vollständig phosphoryliertem hRIIA(PP) Protein ist, im Vergleich zum teilweise phosphorylierten Holoenzym (A), instabiler und somit zugänglicher für die Phosphatase. Zudem ist aus diesen Ergebnissen ersichtlich, dass eine erneute Phosphorylierung der RIIA durch die CA nach etwaiger vorheriger Dephosphorylierung das in A gezeigte Ergebnis nicht verfälscht haben kann.

4.5.3 R Untereinheit IIA in HeLa Zellen

Die apparente Molekulargewichtserhöhung der humanen RIIA in einer SDS-PAGE, hervorgerufen durch die Phosphorylierung an Serin 58, wurde bereits vor nahezu 30 Jahren in HeLa Zellen nachgewiesen (Weber et al., 1982). Diese Änderung im Laufverhalten wurde jedoch fälschlicherweise als Folge der Phosphorylierung in der Autoinhibitionsdomäne angesehen. Zudem konnte in HeLa Zellen nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung an Serin 58 in jedem Zyklus der Zellteilung vorhanden ist und nach Inkubation der Zellen mit einem PKA-C Inhibitor (H89) verschwindet (Keryer et al., 1998).

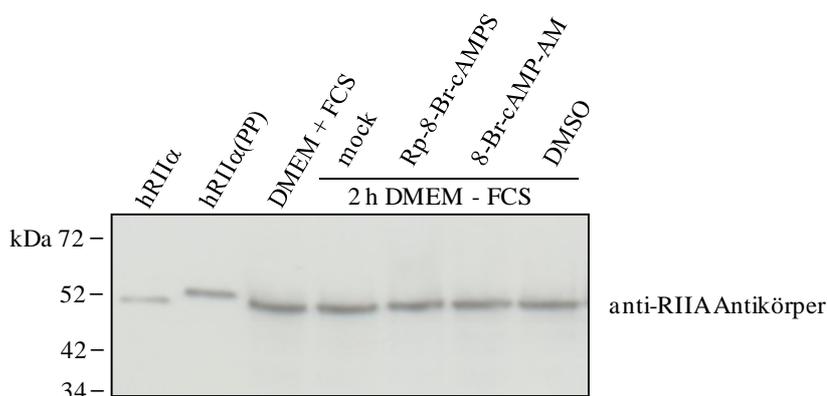


Abb. 4.5.4: Nachweis R IIA in HeLa Zellen mittels Western Blot. In Spur 1 und 2 ist rekombinante un- und doppel-phosphorylierte hRIIA aufgetragen. In Spur 3 bis 7 sind jeweils $\sim 2,5 \times 10^5$ HeLa Zellen nach Inkubation für 2 Stunden in Vollmedium (DMEM+FCS), in serumfreiem Medium (mock) sowie in serumfreiem Medium mit $100 \mu\text{M}$ Rp-8-Br-cAMPS, $100 \mu\text{M}$ 8-Br-cAMP-AM oder 0,1 % DMSO aufgetragen. Der Nachweis der RIIA erfolgte durch einen anti-RIIA Antikörper.

Als nächstes sollte im Rahmen der vorliegenden Studie unter Verwendung spezifischer Inhibitoren untersucht werden, ob die im vorigen Abschnitt identifizierten Proteinphosphatasen im endogenen Kontext die RIIA ebenfalls dephosphorylieren. Dabei diene wiederum die apparente Molekulargewichtsreduktion als Indikator für eine Dephosphorylierung. Zunächst musste die Doppelbande der R Untereinheit in HeLa Zellen nachgewiesen werden. Dieses sollte mittels *Western Blot* Analyse durch einen anti-RIIA Antikörper erfolgen. Die Zellen wurden in 6well Platten in FCS enthaltendem Medium (DMEM + FCS) und in Serum freiem Medium kultiviert (DMEM - FCS). Zudem wurde ein zellpermeables antagonistisch (Rp-8-Br-cAMPS) und agonistisch (8-Br-cAMP-AM) wirkendes cAMP Analog für 2 Stunden zugegeben (Abb. 4.5.4). Die Lyse der HeLa Zellen erfolgte durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und anschließendem Erhitzen.

Vergleichend sind rekombinante hRIIA (Spur 1) und doppelt phosphorylierte RIIA(PP) (Spur 2) aufgetragen. Unter den experimentellen Bedingungen konnte allerdings keine RIIA Doppelbande aus HeLa Zellen nachgewiesen werden. Selbst wenn die Zellen lediglich in Vollmedium (DMEM + FCS) angezogen und anschließend lysiert wurden, war keine Bande bei 53 kDa zu erkennen.

Aus diesem Grund wurde eine indirekte Herangehensweise verfolgt. Hierbei sollte überprüft werden, ob als Phosphatase NP-40 löslicher Überstand eines HeLa Zellysats zu rekombinanter RIIA(PP) zugegeben werden kann, um eine Dephosphorylierung zu erzielen (siehe Material und Methoden 3.5). Eine zeitabhängige Dephosphorylierung ist in Abbildung 4.5.5 gezeigt. Mit dem anti-RIIA Antikörper ist eine mit der Zeit deutlicher werdende Doppelbande als Nachweis einer Dephosphorylierung ersichtlich (vgl. Spur 2 bis 6). Inkubiert man einen Ansatz für zwei Stunden mit einer Mischung von Phosphataseinhibitoren (Okadasäure, Tautomycetin und Na-Orthovanadat) wird eine nur sehr geringe Dephosphorylierung deutlich (Spur 7). Im löslichen HeLa Zellen Überstand allein ist mit dem verwendeten Antikörper keine RIIA nachweisbar (Spur 8).

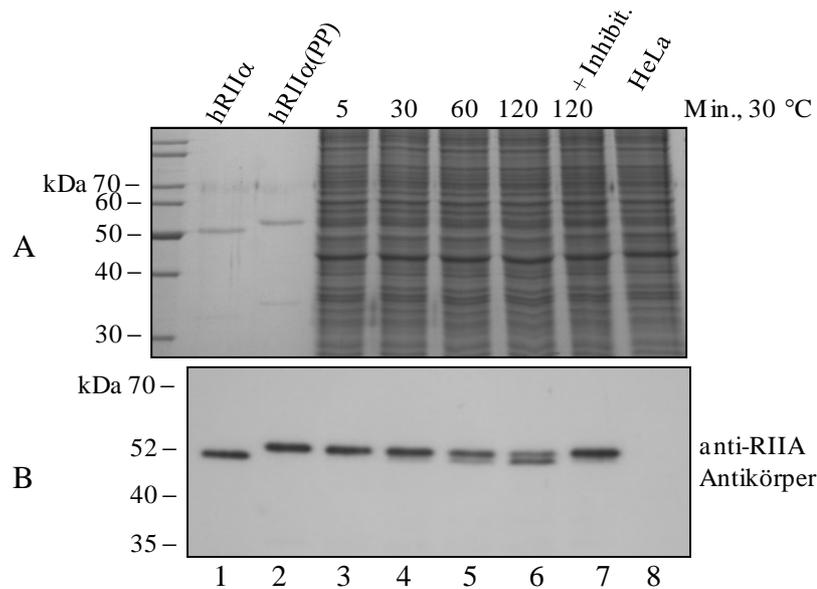


Abb. 4.5.5: Zeitabhängige Dephosphorylierung rekombinanter hRIIA(PP) in HeLa Zelllysat. Der NP-40 löslicher Überstand (220 µg Protein), nach Lyse von HeLa Zellen, wurde mit 0,75 µg rekombinanter hRIIA(PP) versetzt und bei 30 °C inkubiert. Nach 5, 30, 60 und 120 Minuten wurden Proben entnommen und mit SDS-Probenpuffer versetzt. **(A)** Coomassie gefärbtes SDS-Gel. **(B)** *Western Blot* zur Detektion der RIIA mit einem anti-RIIA Antikörper.

Als weiteres wurden vergleichbare Experimente unter Verwendung von Phosphataseinhibitoren durchgeführt (Abb. 4.5.6). Als PP1 Inhibitor diente Tautomycetin (Mitsubishi et al., 2001; Mitsunashi et al., 2003) und als eher PP2A spezifischer Inhibitor wurde Okadasäure verwendet (Gupta et al., 1997). Da für PP2CA bislang keine spezifischen Inhibitoren bekannt sind, wird lediglich die Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen ausgenutzt, um diese Phosphatase durch Zugabe von EDTA/EGTA zu hemmen.

Unter den experimentellen Bedingungen ist nach zwei Stunden eine deutliche Dephosphorylierung der hRIIA(PP) in Abwesenheit von Phosphataseinhibitoren zu erkennen (A Spur 4). Nach gleichzeitiger Inkubation mit EDTA/EGTA, Okadasäure oder Tautomycetin ist keine geringere Dephosphorylierung zu verzeichnen (vgl. A Spur 4 mit 5 bis 7). Erst die Zugabe von Na-Orthovanadat (einem eher unspezifischen Proteinphosphataseinhibitor) oder aller verwendeten Inhibitoren zusammen (A Spur 8 und 9) führt zu einer deutlichen Inhibition der Dephosphorylierung. Durch diese Herangehensweise und mit den verwendeten Phosphataseinhibitoren ließ sich eine alleinige Phosphatase, die für die Dephosphorylierung der an S58 phosphorylierten hRIIA verantwortlich ist, nicht identifizieren.

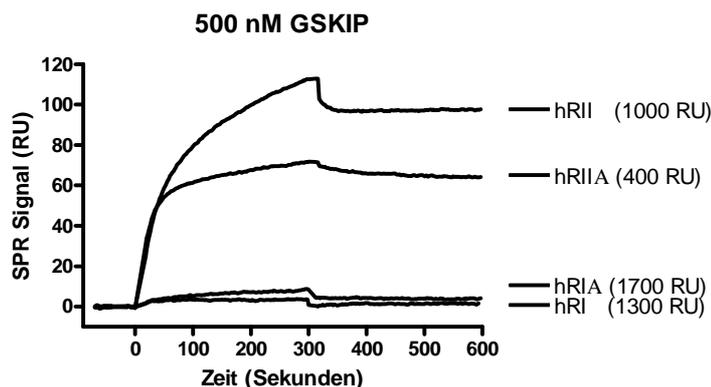


Abb. 4.6.1: Interaktionsmessungen von GSKIP mit allen R Untereinheiten.

Gezeigt ist die Bindung von GSKIP (500 nM) an die RIA, RI, RIIA und an die RII. Die Messungen erfolgten bei einer Flussrate von $30 \mu\text{l min}^{-1}$, wobei der Analyt 5 Minuten injiziert und die Dissoziation ebenfalls 5 Minuten aufgezeichnet wurde.

Zum Nachweis, ob es sich bei GSKIP um ein AKAP *in vitro* handelt, wurden Kompetitionsanalysen mit spezifischen *disrupter* Peptiden durchgeführt. Die verwendeten Peptide entsprechen jeweils der amphipathischen Helix des AKAP7 und Ht31 (Hundsrucker et al., 2006). Als Kontrolle dienten dieselben Peptide mit zwei Prolin Substitutionen. Es wurden $5 \mu\text{M}$ des jeweiligen Peptids gleichzeitig mit GSKIP injiziert. Sowohl das Peptid Ht31 als auch 7 L314E sind in der Lage, die Bindung von GSKIP an die Typ-II R Untereinheiten zu kompetieren (vgl. Abb. 4.6.2 A-D). Das mit zwei Prolinen substituierte Peptid Ht31-PP ist nicht in der Lage, die Bindung zu kompetieren. Überraschenderweise war ein Teil der Bindung von GSKIP an die hRII durch das 7-PP Peptid kompetierbar. Dieses Ergebnis deutet auf eine zweite (weniger affine) Bindungsregion in GSKIP hin, die besonders an der Interaktion mit der hRII beteiligt ist. Durch *peptide mapping* kombiniert mit der Methode des RII *overlay* konnte eine zweite besonders für hRII spezifische Binderegion in GSKIP nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation von Dr. C. Hundsrucker).

In Abbildung 4.6.2 E und F sind die Bindungen einer Konzentrationsreihe von GSKIP (8 bis 256 nM) an die RIIA und RII dargestellt. Diese wurden zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_a) und Dissoziation (k_d) sowie der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) unter Verwendung des Programms BiaEvaluation Version 4.1 herangezogen. Unter der Annahme eines Langmuir 1:1 Bindungsmodells erfolgte die Bestimmung der in Tabelle 4.6.1 aufgeführten Konstanten.

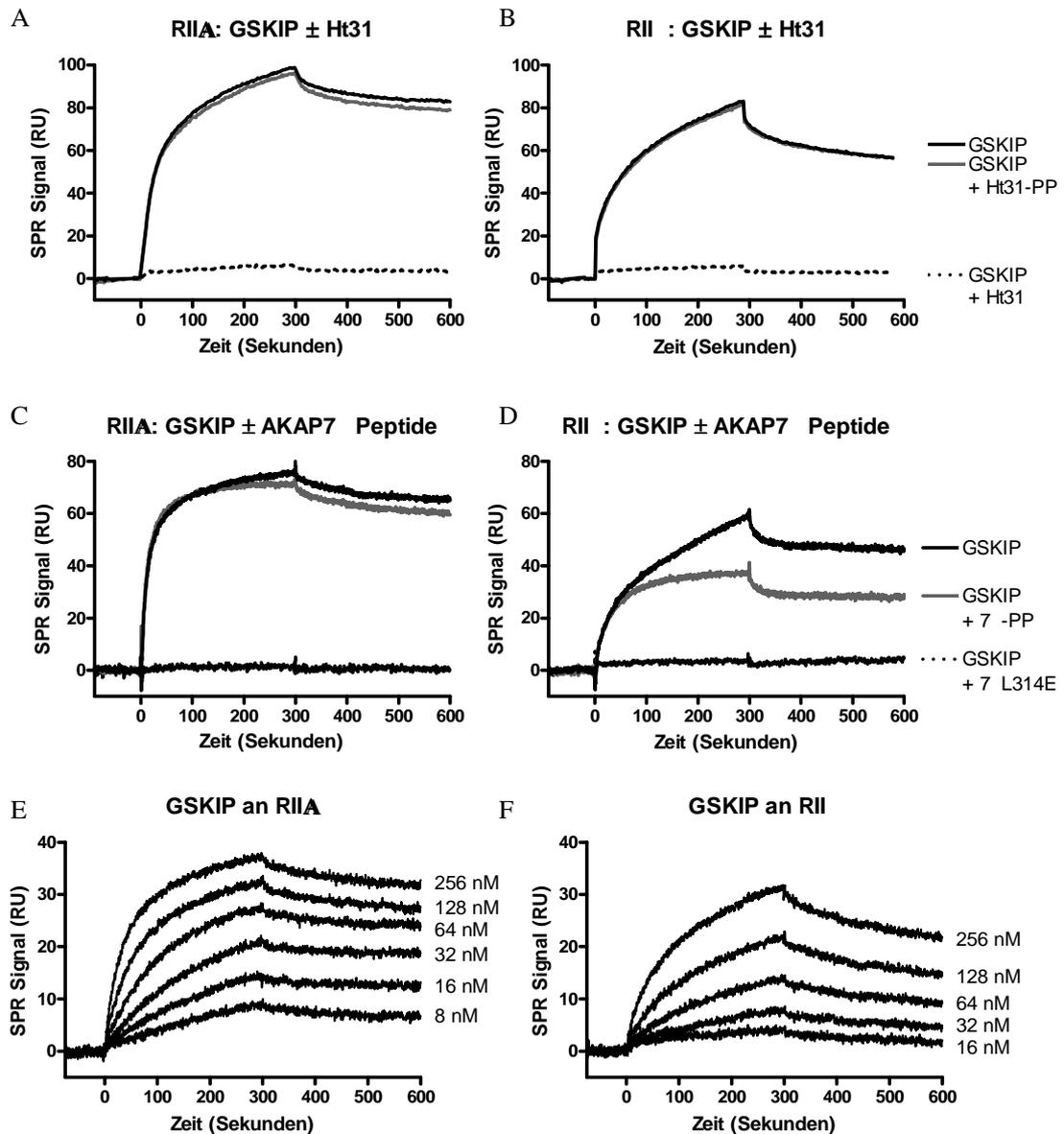


Abb. 4.6.2: Interaktions- und Kompetitionsanalysen von GSKIP mit Typ-II R Untereinheiten. Gezeigt sind Konkurrenzexperimente der Bindung von GSKIP an RIIA (A, C) und RII (B, D) mit den Peptiden Ht31, Ht31-PP, 7 L314E und 7 -PP Peptiden. (E, F) Bindung der angegebenen Konzentrationen GSKIP an 200 RU RIIA und RII zur Bestimmung der kinetischen Konstanten.

Tab. 4.6.1: Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten sowie Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Bindung von GSKIP an die RII Untereinheiten der PKA (Hundsrucker et al., 2010).

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
RIIA	1.3×10^5	6.6×10^{-4}	5
RII	2.8×10^4	1.2×10^{-3}	43

4.6.2 Negativ geladene Aminosäuren, die die amphipathische Helix des AKAP7 flankieren, tragen zur Bindung an die RIIA bei

Die Spleißvariante des AKAP7, AKAP7_Δ, wurde erstmals 2004 beschrieben und in den Zusammenhang mit der PKA vermittelten Wasserreabsorption in Nieren gebracht (Henn et al., 2004). Eine weitere Funktion des AKAP7 ist die Verankerung des PKA Holoenzym in Kardiomyozyten am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (Lygren et al., 2007). In diesem Kontext wird die PKA in räumliche Nähe der Ca²⁺-ATPase SERCA2 und deren Negativregulator Phospholamban (PLN) verankert. SERCA2 ist für den Ca²⁺-Rücktransport in das SR verantwortlich, und wird durch Bindung von PLN inhibiert. Phosphorylierung von PLN durch die PKA führt zur Dissoziation und somit Aktivierung der Ca²⁺-ATPase.

In Kooperation mit Dr. Marco Berrera und Prof. Manuela Zaccolo (Universität Glasgow) wurden zwei Mutanten des AKAP7 im Vergleich zum Wildtyp Protein bezüglich der Bindung an die RIIA untersucht. Bei den beiden mutierten Proteinen wurde das Kodon für Asparaginsäure an Position 298 und Glutaminsäure an Position 323 jeweils zu einem für Alanin (D298A/E323A) und Arginin (D298R/E323R) ausgetauscht. Die negativ geladenen Aminosäuren D298 und E323 flankieren die amphipathische Helix des AKAP7 (Henn et al., 2004).

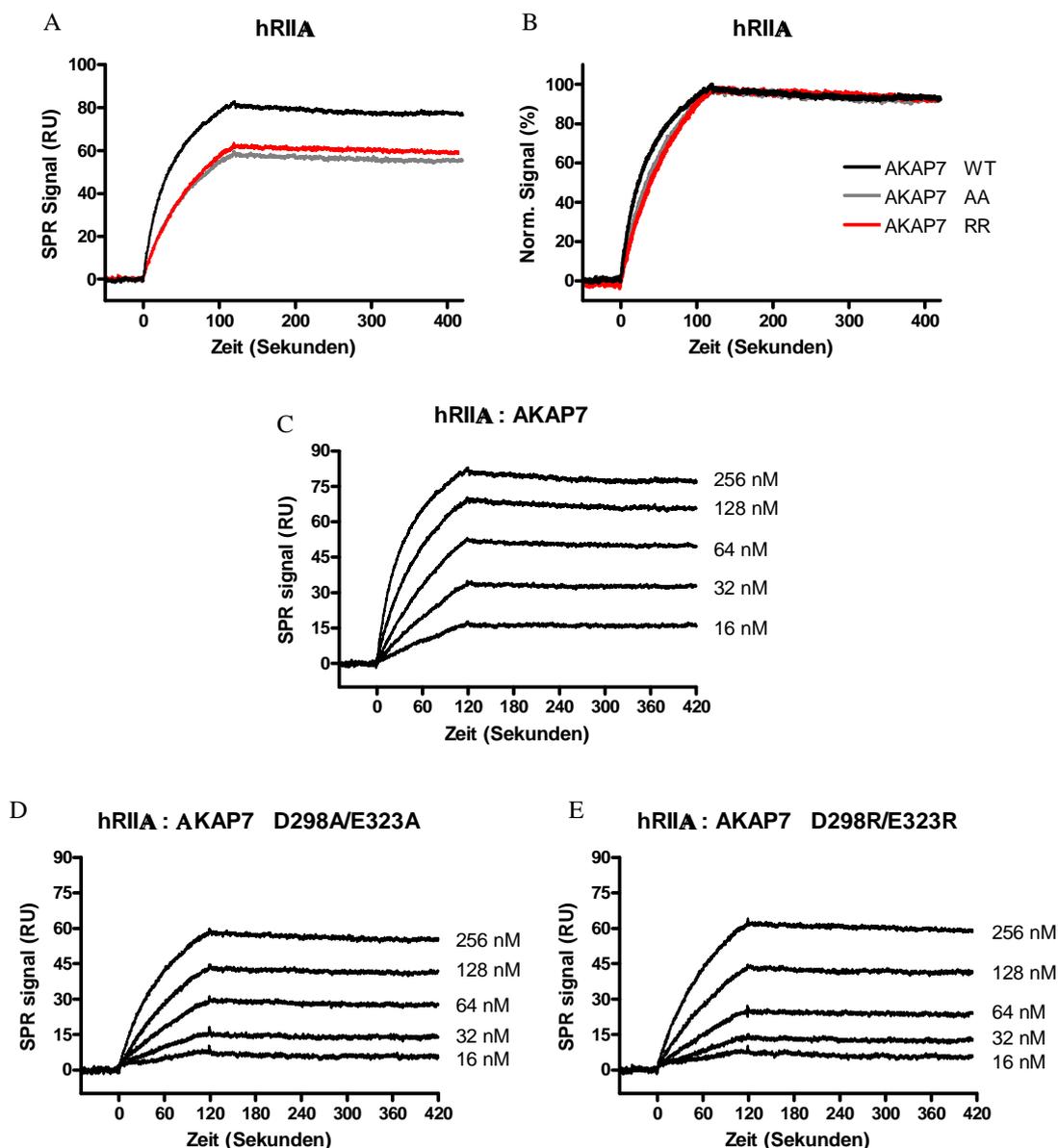


Abb. 4.6.3: SPR Interaktionsmessungen des AKAP7 , sowie zweier Doppelmutanten (D298A/E323A; D298R/E323R), mit der R Untereinheit IIA. (A) Bindung einer konstanten Konzentration des jeweiligen AKAPs an die hRIIA. (B) normalisierte Signal aus A. (C) Bindung einer Konzentrationsreihe des Wildtyp AKAP7 . (D) Bindung der D298A/E323A Mutante an RIIA. (E) Bindung der D298R/E323R Mutante an die hRIIA.

Diese Interaktionsmessungen mittels SPR erfolgten wie bisher beschrieben, jedoch mit dem Unterschied, dass aufgrund unspezifischer Bindung des AKAPs an die hochdichte 8-AHA-cAMP Sensorchipoberfläche die cAMP Beladung reduziert werden musste. Dafür wurde ein C1-Chip verwendet (Biacore, GE Healthcare), der keine Dextranmatrix enthält und somit auch viel weniger Carboxylgruppen zur kovalenten Kopplung von 8-AHA-cAMP. Durch diese Herangehensweise konnte die unspezifische Bindung des AKAP7 auf ein Minimum reduziert werden. Dennoch wurden die in Abbildung 4.6.3

gezeigten Bindungskurven einer Dreifach-Referenzierung unterzogen. Als erstes wurde das Signal einer cAMP-freien Oberfläche abgezogen, als zweites das Signal eines Pufferlaufs und als drittes die unspezifische Bindung an die cAMP-Oberfläche.

Tab. 4.6.2: Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten sowie Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Bindung der AKAP7 Varianten an die RIIA.

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
GST-AKAP7	$1,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^{-4}$	2,6
GST-AKAP7 D298A/E323A	$6,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^{-4}$	5
GST-AKAP7 D298R/E323R	$5,4 \times 10^4$	$3,7 \times 10^{-4}$	7

In A und B ist die Bindung derselben Konzentration des Wildtyp Proteins und der beiden mutierten AKAP7 Proteine an die RIIA gezeigt. Nach Normalisierung der Daten (B) fällt auf, dass die Assoziationsgeschwindigkeit der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Protein verlangsamt ist. C bis E zeigen Sensogramme zur Bestimmung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten und der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D). In Tabelle 4.6.2 sind die unter Annahme eines Langmuir 1:1 Bindungsmodells bestimmten Konstanten aufgeführt. Aus diesen Geschwindigkeitskonstanten wird deutlich, dass die Mutationen an Positionen 298 und 323 eine Verlangsamung der Assoziationsgeschwindigkeit um einen Faktor von ~ 2 hervorruft. Dieser Effekt ist unabhängig davon, ob sich ein Alanin oder ein basisches Arginin an der jeweiligen Position befindet.

5. Diskussion

5.1 Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) wird ein Hauptteil der durch den sekundären Botenstoff cAMP vermittelten Effekte zugeschrieben. Zu diesen zählen so grundlegende zelluläre Prozesse wie Genexpression, Zellwachstum, Zellteilung, Differenzierung und Motilität (Skalhegg and Tasken, 2000). Im inaktiven Zustand liegt die PKA als ein heterotetramerer Komplex vor, bestehend aus einem Dimer R Untereinheiten und zwei C Untereinheiten. Die Aktivierung der Holoenzyme ist ein hoch kooperativer Prozess, bei dem als erstes die Bindung von cAMP an die Bindedomäne B erfolgt, wodurch eine Konformationsänderung der R Untereinheit verursacht wird, die die Bindedomäne A erst für cAMP zugänglich macht (Herberg et al., 1994; Herberg et al., 1996). Die Dissoziation und somit Aktivierung der C Untereinheiten wird durch die Bindung von cAMP an die Domäne A ausgelöst (Gill and Garren, 1969; Ogreid and Doskeland, 1981a; Ogreid and Doskeland, 1981b).

5.1.1 Aktivierung des PKA Typ-I Holoenzym

In erster Linie erfolgten Untersuchungen zur Aktivierung der PKA Holoenzyme *in vitro* durch biochemische (Aktivitätsmessungen) und biophysikalische Methoden (NMR, Röntgenkristallographie, etc.). Die so gewonnenen Erkenntnisse wurden daraufhin in Relation zu *in vivo* Beobachtungen gesetzt. Unter Verwendung von Methoden, die auf der Bestimmung der Kinaseaktivität basieren, wurden für die Typ-II Holoenzyme höhere Aktivierungskonstanten ($K_{act} \text{ cAMP}$) im Vergleich zu den Typ-I Holoenzymen ermittelt (Dostmann et al., 1990; Skalhegg and Tasken, 1997). Die gemessenen Aktivierungskonstanten für cAMP führten zu der Annahme, dass Typ-II Holoenzyme auch in lebenden Zellen mehr cAMP zur halbmaximalen Aktivierung benötigen als Typ-I Holoenzyme. Diese Hypothese konnte durch unsere Arbeitsgruppe widerlegt werden. Mittels BRET war es möglich, die Dynamik des Typ-IA und -IIA Holoenzym in lebenden Zellen vor und nach Stimulation mit FSK/IBMX zu vergleichen (Prinz et al., 2006). Dabei stellte sich heraus, dass nach maximaler Stimulation der intrazellulären cAMP-Produktion durch Forskolin und Inhibition von Phosphodiesterasen durch IBMX das Typ-IA Holoenzym nur zu ca. 50 % zu dissoziieren ist, hingegen das Typ-IIA

Holoenzym nahezu vollständig. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine höhere Aktivierungskonstante (*in vitro*) nicht mit der Aktivierbarkeit in Zellen gleich zu setzen ist. Die Arbeitsgruppe von S. O. Døskeland konnte *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass nicht-dissoziiertes, katalytisch inaktives Typ-IA Holoenzym in Gegenwart einer hohen cAMP-Konzentration existieren kann (Kopperud et al., 2002). Zusätzlich war es ihnen möglich, eine apparente Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) von ~ 200 nM zwischen R und C Untereinheit in Anwesenheit von cAMP zu bestimmen. Dieser K_D -Wert erscheint im zellulären Zusammenhang plausibel, da die intrazelluläre Holoenzymkonzentration auf über $1 \mu\text{M}$ bestimmt wurde (Hofmann et al., 1977).

In einer biophysikalischen *in vitro* Untersuchung von Vigil und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass das Typ-IA Holoenzym durch Inkubation mit einer sehr hohen cAMP-Konzentration (bis 1 mM) nicht vollständig dissoziiert (Vigil et al., 2004a). Erst durch Inkubation mit cAMP in Gegenwart des Substratpeptids Kemptide wurde ein höherer Dissoziationsgrad und somit eine Destabilisierung des Holoenzym erreicht. Die Arbeitsgruppe von Roger Y. Tsien konnte die destabilisierende Wirkung von Substrat auf das Typ-IA Holoenzym in lebenden Zellen nachweisen, indem der zu einem Substrat mutierte Proteinkinaseinhibitor PKI (A20S) koexprimiert wurde (Martin et al., 2007). In einer weiteren Studie von Kristin Viste und Mitarbeitern wurde die Zugänglichkeit von Substrat während der Holoenzym-Aktivierung durch cAMP weiter untersucht (Viste et al., 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von Substratpeptid (Kemptide) oder Substratproteinen die gemessene Aktivierungskonstante für cAMP des Typ-IA Holoenzym kleiner wird, und somit die Zugänglichkeit von Substrat eine Destabilisierung des Typ-IA Holoenzym bewirkt.

Diese Erkenntnisse wurden zum Anlass genommen, im Rahmen der vorliegenden Studie eine von der Bestimmung der Kinaseaktivität unabhängige Messmethode zu entwickeln, die es ermöglicht Aktivierungskonstanten für cAMP in Abwesenheit von Substrat zu bestimmen (siehe Abschnitt 4.1.1). Zur Validierung der auf Bindung beruhenden Methode wurde unter Verwendung von SPR-Sensoren der Marke Biacore die K_{act} -Werte für das Typ-IA Holoenzym (His-hCA:hRIA) in An- und Abwesenheit einer konstanten Konzentration an Kemptide bestimmt. Die Gegenwart des Substratpeptids führte, wie bereits von Viste und Mitarbeitern gezeigt (Viste et al., 2005), zur Bestimmung eines kleineren K_{act} -Werts für cAMP (siehe Abschnitt 4.1.1). Zudem konnte hier ebenfalls reproduziert werden, dass mit steigender Konzentration von Kemptide eine stetige Verkleinerung des K_{act} -Werts einhergeht (ohne Kemptide $K_{\text{act}} \sim 110 \text{ nM}$; $260 \mu\text{M}$

Kemptide $K_{\text{act}} \sim 80 \text{ nM}$; 1 mM Kemptide $K_{\text{act}} \sim 20 \text{ nM}$). Dieser Effekt auf die Aktivierungskonstante des Typ-IA Holoenzym beruht auf einer Kompetition des Substrats mit der R Untereinheit (Vigil et al., 2004a; Viste et al., 2005). Ein weiterer Faktor könnte die strikte Abhängigkeit der RI/C Interaktion von $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ sein (Hofmann et al., 1975; Neitzel et al., 1991). $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ stabilisiert das Typ-IA Holoenzym, indem es als ein „Schloss“ fungiert und die C Untereinheit somit in der geschlossenen Konformation hält (Kim et al., 2007; Kim et al., 2005; Neitzel et al., 1991). In Abwesenheit dieser Kofaktoren ist der Komplex weitaus instabiler, was durch einen ca. 1000 fach höheren K_D -Wert widergespiegelt wird (Herberg and Taylor, 1993). Vorstellbar ist, dass die Konformation der C Untereinheit im cAMP gesättigten Holoenzym soweit gelockert ist, dass Substrat dadurch kompetitiv zu einer weiteren Destabilisierung führen kann.

5.1.2 Aktivierung des PKA Typ-II Holoenzym

In den im Abschnitt 5.1.1 aufgeführten Untersuchungen zum Einfluss von Substrat auf die PKA Holoenzyme konnten lediglich Effekte auf den Grad der Dissoziation oder die gemessene Aktivierungskonstante des Typ-IA Holoenzym nachgewiesen werden. Für das Typ-II Holoenzym war, in Gegenwart von Substrat, keine Änderung des apparenten K_{act} -Wertes, jedoch ein leicht erhöhter Dissoziationsgrad detektierbar (Vigil et al., 2004a; Viste et al., 2005).

Typ-II R Untereinheiten können mit der C Untereinheit sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ hochaffin interagieren und Holoenzym bilden. Die mit dem Typ-IA Holoenzym validierte Messmethode wurde daher für das Typ-IIA Holoenzym in erster Linie verwendet, um die Aktivierungskonstante in Abhängigkeit dieser Kofaktoren zu bestimmen (siehe Abschnitt 4.1.2).

Die in Abschnitt 4.1.2 bestimmte K_{act} war in Gegenwart von $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ deutlich kleiner ($\sim 50 \text{ nM}$) als in Abwesenheit ($\sim 235 \text{ nM}$). Dies bedeutet, dass für die halbmaximale Aktivierung des PKA-IIA Holoenzym in Abwesenheit der Kofaktoren die nahezu fünffache Menge cAMP benötigt wird. Somit ist das Holoenzym unter diesen Bedingungen deutlich insensitiver gegenüber cAMP. Der mit dieser Methode ermittelte K_{act} -Wert von 50 nM in Gegenwart von $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ ist um einen Faktor von ca. 3 kleiner als der von Diskar und Mitarbeitern bestimmte (Diskar et al., 2007). In jeder Studie wurde allerdings der spektrophotometrische Assay nach Cook zur Bestimmung von

Aktivierungskonstanten verwendet (Cook et al., 1982). Dieser gekoppelte enzymatische Assay beruht auf Kinase Aktivitätsbestimmung und wird somit in Gegenwart von Mg^{2+}/ATP und Substrat (260 μM Kemptide) durchgeführt. Auf Grund der, je nach verwendeter Methode, deutlich unterschiedlichen Aktivierungskonstante erfolgten zusätzlich Messungen des His-hCA/hRIIA Holoenzym in Gegenwart von Mg^{2+}/ATP mit Kemptide. Überraschenderweise wurden höhere Aktivierungskonstanten gemessen, wenn Kemptide verfügbar war. Bei einer konstanten Konzentration von 260 μM Substratpeptid konnte eine K_{act} von ~ 130 nM und bei 1 mM Kemptide sogar eine K_{act} von ~ 190 nM bestimmt werden. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Verfügbarkeit von Substrat während der Aktivierung des Typ-IIA Holoenzym einen umgekehrten Effekt auf die gemessene Aktivierungskonstante im Vergleich zum Typ-IA Holoenzym hat.

Der Unterschied in der Aktivierungskonstante in Ab- und Anwesenheit von Mg^{2+}/ATP kann durch Autophosphorylierung der R Untereinheit durch die C Untereinheit erklärt werden (Manni et al., 2008; Rangel-Aldao et al., 1979; Rangel-Aldao and Rosen, 1976b; Takio et al., 1980). Während der Holoenzymbildung in Gegenwart von Mg^{2+}/ATP wird die Autoinhibitionsdomäne der RIIA (und RII) phosphoryliert (siehe Abschnitt 4.2.1), was in einem instabileren und für cAMP sensitiveren Holoenzym resultiert (Rangel-Aldao and Rosen, 1976a) (diese Arbeit). Zusätzlich hat die Phosphorylierung einen Einfluss auf die Bindung der RIIA an die C Untereinheit, gekennzeichnet durch eine ca. 50 fach geringere Affinität ($K_D = 40$ nM für Phospho-RIIA/hCA und 0,7 nM für RIIA/hCA) (Diskar et al., 2007).

Die Wirkung von Kemptide, die in einer größeren apparenten Aktivierungskonstante resultiert, kann ebenfalls erklärt werden. In Anwesenheit von Mg^{2+}/ATP und Kemptide oder Mg^{2+}/ADP kann die PKA-CA die RII-Untereinheiten effizient autodephosphorylieren (Gjertsen et al., 1993). Die unphosphorylierte R Untereinheit kann wiederum schneller mit der C Untereinheit reassoziieren (Rangel-Aldao and Rosen, 1976a). Die Ergebnisse deuten auf eine antagonistische Wirkung von Substrat auf die Aktivierung des Typ-IIA Holoenzym hin.

Daraus ergibt sich die Frage, wie sich dieser Effekt in den zellulären Kontext bringen lässt. In erster Linie werden die Typ-II Holoenzyme durch AKAPs an subzellulären Kompartimenten verankert (Beene and Scott, 2007; Jarnaess and Tasken, 2007). AKAPs bringen die PKA in räumliche Nähe zu ihren indirekten Aktivatoren (Adenylylzyklasen), Inhibitoren (Phosphodiesterasen), Gegenspielern (Proteinphosphatasen), aber auch zu ihren Substraten. Ausgehend von einem leicht aktivierbaren Typ-IIA Holoenzym (K_{act}

cAMP ~ 50 nM), das zudem in der Zelle an Orten mit hoher cAMP-Konzentration lokalisiert vorliegen kann (Di Benedetto et al., 2008; Rich et al., 2001; Zaccolo and Pozzan, 2002), würde zu einer sehr schnellen und vollständigen Dissoziation des Holoenzym führen. Eine sehr schnelle Reaktion auf einen externen Stimulus kann von Vorteil sein, muss aber auch reguliert werden. Die räumliche Nähe und hohe Konzentration von Substraten könnte, neben Phosphodiesterasen und Proteinphosphatasen, als ein Regulationsmechanismus fungieren. Das würde bedeuten, dass eine hohe Konzentration an Substraten einer übermäßigen Aktivierung des PKA-IIA Holoenzym entgegenwirkt, indem dieses mehr cAMP zur halbmaximalen Aktivierung benötigt. Zudem wäre eine Feinregulation der PKA Aktivität durch Unterschiede in der lokalen Substratkonzentration denkbar.

5.1.3 Bedeutung der Autoinhibitionsdomäne für die Aktivierung des Typ-IA und IIA Holoenzym in Gegenwart von Substrat

Die besondere Bedeutung der Autoinhibitionsdomäne von RI und RII-Untereinheiten ist schon mehrfach gezeigt worden (Diskar et al., 2007; Dostmann and Taylor, 1991; Durgerian and Taylor, 1989; Manni et al., 2008). Mutationen der P⁰-Stelle in RIA und RIIA Untereinheiten (hRIAA99S oder hRIIAS99A) haben einen Einfluss auf die Bindung an die PKA-C, die Aktivierung des Holoenzym und die Stabilität der Proteine in höheren Salzkonzentrationen. Zudem bewirkt ein Aminosäureaustausch des Alanin 99 zu einem Serin, im Fall der humanen RIA (oder auch bRIAA97S), eine Mg²⁺/ATP unabhängige Holoenzymbildung (Diskar et al., 2007; Durgerian and Taylor, 1989).

Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit getestet, ob die P⁰-Aminosäure in der Autoinhibitionsdomäne auch für die Verkleinerung (Typ-IA Holoenzym) bzw. Vergrößerung (Typ-IIA Holoenzym) der apparenten Aktivierungskonstanten in Gegenwart von Kemptide von Bedeutung ist. Dafür erfolgte die Bestimmung der K_{act} für das hRIAA99S und hRIIAS99A Holoenzym in Abwesenheit und in Gegenwart von 260 µM Kemptide (siehe Abschnitt 4.1.3). Für beide Holoenzyme konnte ein signifikant unterschiedlicher Wert der Aktivierungskonstante ermittelt werden. Im Fall des RIAA99S Heterotetramers war eine Vergrößerung des K_{act}-Werts von 77 nM (ohne Kemptide) auf 90 nM (mit Kemptide) bestimmbar. Die Inkubation mit Kemptide führte bei dem RIIAS99A Holoenzym zu einer Verkleinerung des K_{act}-Werts von 190 nM (ohne

Kemptide) auf 152 nM. Diese Unterschiede sind zwar statistisch signifikant, jedoch im Vergleich zu den Wildtyp-Holoenzymen eher gering.

Im Vergleich zum Wildtyp benötigt das RIAA99S Holoenzym nur annähernd halb so viel cAMP zur halbmaximalen Aktivierung ($K_{\text{act}}\text{RIAWT} = 114 \text{ nM}$, $K_{\text{act}}\text{RIAA99S} = 77 \text{ nM}$). Mittels SPR war es möglich, eine deutlich schnellere Dissoziation der RIAA99S und der CA zu messen, was eine mögliche Ursache für den kleineren K_{act} -Wert wäre (Diskar et al., 2007). Zusätzlich muss hierbei die mögliche Autophosphorylierung der RIAA99S und die damit einhergehende Destabilisierung des Holoenzymen in Betracht gezogen werden. Eine Stabilisierung des Heterotetramers, hervorgerufen durch die Gegenwart von Kemptide, könnte auch im Fall der mutierten RIA mit der Autodephosphorylierungsaktivität der PKA-C erklärt werden (Gjertsen et al., 1993).

Die apparenten, nur in Gegenwart von $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ bestimmten Aktivierungskonstanten des RIIA ($K_{\text{act}} = 50 \text{ nM}$) und des RIIAS99A Holoenzymen ($K_{\text{act}} = 190 \text{ nM}$) unterscheiden sich sehr deutlich (vgl. Abschnitt 4.1.2 und 4.1.3). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Austausch des Serin an Position 99 zu einem Alanin eine deutlich verringerte cAMP-Sensitivität zur Folge hat. Somit wird ein stabilerer Holoenzymkomplex gebildet, wenn keine phosphorylierbare Aminosäure in der P^0 -Position vorhanden ist. Dieses wird zudem durch die große gemessene Aktivierungskonstante des RIIA Holoenzymen in Abwesenheit von $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ bestätigt, wobei keine Phosphorylierung stattfinden kann.

Der Einfluss von Kemptide, der zur Verkleinerung der apparenten Aktivierungskonstante des RIIAS99A Holoenzymen führt, kann wie für das Typ-IA Holoenzym durch Konkurrenz und Destabilisierung des Komplexes erklärt werden (siehe Abschnitt 5.1.1). Somit konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass in Gegenwart von Substrat die P^0 -Aminosäure mit verantwortlich ist für die Verkleinerung oder Vergrößerung der apparenten Aktivierungskonstante für cAMP des Typ-IA und IIA Holoenzymen.

5.2 Phosphorylierung der Typ-II R Untereinheiten

Einer der bedeutendsten Unterschiede zwischen den R Untereinheiten des Typs I und II liegt in der Autoinhibitionsdomäne (Takio et al., 1984; Titani et al., 1984). RII-Untereinheiten besitzen in P^0 -Stelle ein phosphorylierbares Serin und repräsentieren echte Substrate der PKA-C (Rangel-Aldao and Rosen, 1976b). Hingegen sind RI

Untereinheiten Pseudosubstratinhibitoren und besitzen ein Alanin (RIA) oder Glycin (RI) in der P⁰-Stelle.

Ein offensichtlicher Unterschied zwischen RIIA und RII nach Autophosphorylierung durch die PKA-C ist, dass die alpha Isoenzyme aus verschiedenen Spezies eine apparente Molekulargewichtserhöhung in der SDS-PAGE aufweisen, die bei den beta Isoenzymen nicht auftritt (Robinson-Steiner et al., 1984; Skalhegg et al., 1992). Beim Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen RIIA mit der aus unterschiedlichen Säugern wird deutlich, dass die Autoinhibitionsdomänen identisch sind (siehe Abb. 5.2.1 rote Umrahmung). Die Linkerregion zwischen Dimerisierungs-/Dockingdomäne und Autoinhibitionsdomäne weist die geringste Konservierung auf (Oyen et al., 1989). Bei RIIA aus Rind wurden in diesem Bereich zahlreiche Phosphorylierungen identifiziert. Die Aminosäuren Serin 74 und 76 der bRIIA (gelbe Umrahmung) können *in vitro* durch die Casein Kinase II (CKII) und die Glykogen Synthase Kinase 5 (GSK5) phosphoryliert werden (Carmichael et al., 1982; Hemmings et al., 1982). Zudem werden Serin 44 und 47 (blaue Umrahmung) durch die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert (Hemmings et al., 1982). Bis auf Serin 44 sind diese Aminosäuren auch in der hRIIA konserviert, jedoch konnte den Phosphorylierungen bislang keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Die Phosphorylierung durch die Glykogen Synthase Kinase 3 könnte von Bedeutung sein, da in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Enno Klußmann (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) das GSK3 Binde-Protein (GSKIP) als Typ-II spezifisches AKAP identifiziert wurde (Hundsrucker et al., 2010). Zudem bindet das AKAP220 ebenfalls GSK3 (Tanji et al., 2002). GSKIP interagiert direkt mit GSK3 und den RII-Untereinheiten. Die Phosphorylierung durch die PKA-C führt zur Inaktivierung von GSK3. Da die Phosphorylierungsstelle für GSK3 (Hemmings et al., 1982) nahe der Dimerisierungs- und Dockingdomäne liegt, ist es denkbar, dass diese Modifikation die Bindung von GSKIP und/oder von AKAP220 beeinflusst. Eine etwaige Dissoziation von GSKIP und RIIA nach Phosphorylierung durch GSK3 würde bedeuten, dass die PKA-C und GSK3 sich nicht mehr in räumlicher Nähe befänden und somit eine inhibitorische Phosphorylierung durch die PKA-C unwahrscheinlicher würde.

	1		60
KAP2_HUMAN		MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARAPASVLPAA T PRQSLG	
KAP2_PIG		MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVDFAVDYFTRLREARSRASTPPAAPPSSGSQ-	
KAP2_BOVIN		MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVDFAVDYFTRLREAR S RAS T PPAAPPSSGSQ-	
KAP2_RAT		MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQESDSFIAPPTTFHA	
KAP2_MOUSE		MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVG-QQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQESDTFIVSPTTFHT	
		***** : : ***** : * : ***** * .. *	
	61		120
KAP2_HUMAN		HPPPEPGPDRVADAKGDSSESEDEDEDLEVPVPSRFN RRVSV CAETYNPDEEEEDTDPRVIH	
KAP2_PIG		--DLEPSSGLVTDIAIDSESEDEDEDLDVPIPSRFDR RRVSV CAETYNPDEEEEDTDPRVIH	
KAP2_BOVIN		--DFDPGAGLVADAVAD SESE DEDEDLDVPIPGRFDR RRVSV CAETYNPDEEEEDTDPRVIH	
KAP2_RAT		Q--ESSGVPVIEEDGESESDSDDEDLEVPVPSKFT RRVSV CAETFNPDREE--DNDPRVVH	
KAP2_MOUSE		Q--ESSAVPVIEEDGESEDSDSEDADLEVPVPSKFT RRVSV CAETFNPDREEEDNDPRVVH	
		... : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Abbildung 5.2.1: Alignment der ersten 120 Aminosäuren der R Untereinheit IIA aus Mensch, Schwein, Rind, Ratte und Maus. Rot umrahmt ist die Autoinhibitionsdomäne, gelb die Phosphorylierungsstelle für die Casein Kinase II und Glykogen Synthase Kinase 5, blau die Phosphorylierungsstelle für die Glykogen Synthase Kinase 3. Grün markiert ist das durch CDK1/Cyc B phosphorylierte T54 und rot markiert ist die in dieser Arbeit identifizierte Autophosphorylierungsstelle S58 für die PKA-C.

Die von Keryer und Mitarbeitern beschriebene Phosphorylierung der hRIIA an Threonin 54 durch die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1/Cyclin B) kommt, an dieser Position, nur in dem humanen Protein vor (Keryer et al., 1998). Allerdings konnte in jener Studie gezeigt werden, dass auch die RIIA aus Rind durch CDK1/Cyc B phosphoryliert werden kann. Die Funktion der Phosphorylierung durch CDK1, die am Anfang der Mitose auftritt, ist gut untersucht. Zum einen wird die Dissoziation der RIIA von dem am Zentrosom lokalisierten AKAP450 gefördert und zum anderen die Interaktion mit dem am Chromatin befindlichen AKAP95 begünstigt (Carlson et al., 2001; Landsverk et al., 2001). Desweiteren wird die bRII *in vitro* an Threonin 69 durch CDK1/Cyc B phosphoryliert, was eine Beeinträchtigung der Interaktion mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein 2 (MAP2) zur Folge hat (Keryer et al., 1993).

Der Grad der Autophosphorylierung der Typ-II R Untereinheit durch die PKA-C und die Dephosphorylierungsrate unterscheiden sich organismus-, gewebe- und zellabhängig (Robinson-Steiner et al., 1984). Die RII-Untereinheiten aus unstimulierten Ratten Hepatozyten liegen zu 90 % autophosphoryliert vor (Scott and Mumby, 1989). Stimulation der Zellen mit 8-Br-cAMP führt zur Aktivierung der Holoenzyme, der Grad der Autophosphorylierung bleibt jedoch konstant. Im Gegensatz dazu wird die RII Untereinheit nach Stimulation von glatten Muskelzellen aus Rind viel schneller dephosphoryliert. Dieser Unterschied könnte damit erklärt werden, dass zelltypspezifisch eine schnellere Inhibition der C Untereinheit erfolgen muss und eine Reassoziaton des

Typ-II Holoenzym schneller abläuft, wenn die RII Untereinheit nicht autophosphoryliert vorliegt (Rangel-Aldao and Rosen, 1976a).

Neben der Bedeutung der Autophosphorylierung auf die Interaktion der R mit der C Untereinheit, sowie der Aktivierung des Holoenzym sind auch noch Einflüsse auf die Interaktion mit AKAPs in der Literatur beschrieben. Die Autophosphorylierung der RIIA soll eine 7 bis 52 fache Erhöhung der Affinität zu bestimmten Peptiden, die den amphipathischen Helices verschiedener AKAPs entsprechen, zur Folge haben (Manni et al., 2008; Zakhary et al., 2000a; Zakhary et al., 2000b). Desweiteren konnte in *pull-down* Experimenten mehr AKAP15/18 aus Kardiomyozyten mit der RIIAS96D co-immunopräzipitiert werden als mit der entsprechenden Alanin Mutante (Manni et al., 2008). In jener Arbeit wurde zusätzlich der Einfluss der mutierten RIIA auf die Phosphorylierung anderer Substrate der PKA-C untersucht. Dabei konnte eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von Phospholamban und des Ryanodinrezeptors nach Überexpression der RIIAS96D im Vergleich zu S96A in Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Manni et al., 2008). Dieser Effekt könnte mit einer geringeren Affinität der S96D Mutante zu der PKA-C und somit mit einer erhöhten Basalaktivität erklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Autophosphorylierung der humanen RIIA durch die humane CA Untereinheit genauer untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die R Untereinheit während der Holoenzymbildung nicht nur an der P⁰-Position (Serin 99) phosphoryliert wird, sondern auch an Serin 58 (siehe Abschnitte 4.4.2, 4.2.3 und Abb. 5.2.1 rote Markierung). Zudem konnte gezeigt werden, dass nur eine Modifikation, nämlich diejenige an Serin 58, zu dem verlangsamten Laufverhalten in der SDS-PAGE führt. Diese Phosphorylierung ist im indirekten Sinne in der Literatur bereits bekannt. Die Doppelbande der RIIA wurde in HeLa Zellen zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus nachgewiesen, jedoch als Autophosphorylierung der P⁰-Stelle gedeutet (Keryer et al., 1998). In phosphoproteomischen Studien konnten ebenfalls an Serin 58 phosphorylierte Peptide der hRIIA nachgewiesen werden (Dephoure et al., 2008; Molina et al., 2007). Auch durch *in vitro* Untersuchungen an gereinigtem Protein aus männlichen Keimzellen wurde die durch Phosphorylierung hervorgerufene apparente Molekulargewichtserhöhung nachgewiesen (Skalhegg et al., 1992). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Phosphorylierung an S58 in HeLa Zellen nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.5.4). Es bleibt also weiterhin zu klären, ob die PKA-C die einzige Kinase ist, die für die Phosphorylierung verantwortlich ist, denn der Bereich entspricht auch einer PKC

(Proteinkinase C) Konsensussequenz (Nishikawa et al., 1997). Dieses kann mit dem spezifischen Inhibitor PKI untersucht werden, indem ein myristyliertes Peptid (PKI 5-24) auf Zellen gegeben wird, um eine spezifische Inhibition der PKA-C zu erreichen.

Die Aminosäure Serin an Position 58 ist in Schwein und Rind konserviert, jedoch entspricht dieser Bereich keiner Konsensussequenz der PKA-C (Kemp et al., 1977). Die RIIA aus Ratte und Maus enthält die Aminosäure nicht. Erst die dem Menschen näher verwandten Primaten wie Schimpansen (*Pan troglodytes*, PANTR) oder Makaken (*Macaca mulatta*, MAKMU) enthalten die Phosphorylierungsstelle (Abb. 5.2.2 rot hervorgehoben). Die P⁺¹ Position der RIIA aus Makaken enthält jedoch keine hydrophobe Aminosäure sondern ein Prolin und repräsentiert dadurch kein optimales Substrat (Kemp and Pearson, 1990).

```

1                                     60
KAP2_HUMAN   MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARAPASVLPAATPRQSLG
KAP2_PANTR   MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARAPASVLPAATPRQSLG
KAP2_MAKMU   MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVDYFTRLREARAPASVLPAATPRQSPG
*****:***** *

61                                     120
KAP2_HUMAN   HPPPEPGPDRVADAKGDSESEEDLEVPVPSRFNRRVSVCAETYNPDEEEEDTDPRVIH
KAP2_PANTR   HPPPEPGPDRVADTKGDSESEEDLEVPVPSRFNRRVSVCAETYNPDEEEEDTDPRVIH
KAP2_MAKMU   HPPPEPGPDRVADAKGDSESEEDLEGAIPSRFVLKCSVCAETYNPDEEEEDTDPRVIH
*****.:**** :*****

```

Abbildung 5.2.2: Alignment der ersten 120 Aminosäuren der R Untereinheit IIA aus Mensch, Schimpanse und Makake. Grün markiert ist die Phosphorylierungsstelle für CDK1/Cyc B und rot markiert ist die in dieser Arbeit identifizierte Autophosphorylierungsstelle für die PKA-C.

Die Tatsache, dass die RIIA aus unterschiedlichen Spezies nach Autophosphorylierung durch die PKA-C eine apparente Molekulargewichtserhöhung in der SDS-PAGE zeigt, wirft die Frage auf, ob dieses Verhalten auch auf eine andere Phosphorylierung als die der P⁰-Stelle zurückzuführen ist. Durch eine ELM (*Eukaryotic Linear Motif resource for functional sites in proteins*) Datenbanksuche konnte in der RIIA aus Rind, Schwein, Ratte oder Maus keine zweite putative Autophosphorylierungsstelle identifiziert werden. Experimentell könnte dieses leicht untersucht werden, in dem man das P⁰-Serin der RIIA zu einem Alanin austauscht und die mutierten Proteine durch die PKA-C phosphoryliert.

Eine eindeutige Funktion konnte in dieser Arbeit der Phosphorylierung der hRIIA an Serin 58 nicht zugeordnet werden. Aus den durchgeführten Experimenten wird deutlich, dass diese Modifikation keinen Einfluss auf die Bindung an die C Untereinheit (*in vitro*)

oder auf den Dissoziationsgrad des Holoenzym in lebenden Zellen hat. Zudem war kein Unterschied in der Interaktion mit den getesteten AKAP Fragmenten (AKAP450 und 149) zu erkennen.

5.3 Die Linkerregion der hRIIA als Motiv für Protein/Protein Interaktionen

Die R Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase weisen eine konservierte Domänenstruktur auf. In Säugern sind die Dimerisierungs- und Dockingdomäne (D/D), die Autoinhibitionsdomäne und die Zyklonukleotid-bindenden Domänen sehr homolog. In der Linkerregion zwischen der D/D und der Autoinhibitionsdomäne tritt die geringste Homologie auf. Das Gen für die hRIIA wurde 1989 kloniert, wobei ein noch deutlicherer Unterschied im N-terminalen Bereich (Aminosäure 45-87), im Vergleich zu der RIIA aus anderen Spezies, erkannt wurde (Oyen et al., 1989) (vgl. Abb. 5.2.1). Oyen und Mitarbeiter deuteten den Speziesunterschied mit einem aktiven Selektionsdruck auf genau diesen Bereich und postulierten einen putativen Einfluss auf die subzelluläre Verankerung.

Auffällig ist, dass diese Region viele Proline enthält. Die RIIA der in Abbildung 5.2.1 aufgeführten Säugern, sowie die hRI und die hRII enthalten keinen derart Prolinreichen Bereich in der Linkerregion. Eine Ausnahme ist dabei die RIA, die kurz vor der Autoinhibitionsdomäne (hRIA Aminosäure 84-87 und 89) fünf Proline enthält. Dieser Bereich ist in Säugern und sogar im Huhn komplett konserviert und wird als putatives SH3-Domänen Interaktionsmotiv beschrieben (Boeshans et al., 1999). Zusätzlich ist ein Serin direkt vor der Prolin-reichen Region hoch konserviert (hRIA S83, bRIA S81). In massenspektrometrischen Untersuchungen mit bRIA (gereinigt aus Skelettmuskel oder Herz) wurde das Serin 81 zu 30-40 % phosphoryliert vorgefunden (Boeshans et al., 1999). Eine Kinase, die für die Phosphorylierung verantwortlich ist, sowie eine Funktion der Modifikation konnten bislang noch nicht gezeigt werden.

Ein weiterer Unterschied in der Linkerregion der humanen RIIA im Vergleich zu Säugern wie Rind, Schwein, Ratte und Maus konnte im Rahmen dieser Arbeit mit der Autophosphorylierung an der Aminosäure Serin 58 nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.2.2 und 4.3.3). Bislang war es nicht möglich, die Struktur der Linkerregion von irgendeiner R Untereinheit aufzuklären, da diese in Lösung ungeordnet ist (Li et al., 2000; Vigil et al., 2004b). Somit ist nicht bekannt, ob oder wie der Bereich im

Holoenzym angeordnet ist. Die dreidimensionale Struktur der D/D (Banky et al., 2003; Gold et al., 2006; Newlon et al., 1999), verkürzter R Untereinheiten (Diller et al., 2001; Su et al., 1995) sowie des Typ IA, IIA und II Heterodimers konnten mittels NMR oder Röntgen-Kristallographie aufgeklärt werden (Brown et al., 2009; Kim et al., 2007; Wu et al., 2007). *Small angle X-ray scattering* Messungen und *in silico* Berechnung von Vigil und Mitarbeitern deuten auf eine unterschiedliche Form des RIA, RIIA und RII Homodimers hin (Vigil et al., 2004b). Das RIA Dimer weist wahrscheinlich eher eine kompakte, Y-förmige Struktur auf, das RIIA bzw. RII Dimer soll hingegen eine eher ausgestreckte, stabförmige Struktur ausbilden. Diese vorausgesagten Unterschiede werden von den Autoren mit der Linkerregion in Zusammenhang gebracht.

Die bisher noch nicht aufgeführte mögliche Funktion einer Phosphorylierung, nämlich die Ausbildung von Plattformen für phosphorylierungsabhängige Protein/Protein Interaktionen, wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. In *pull-down* Experimenten mit dem Fusionsprotein GST-RIIA1-87 als Köderprotein (sowohl in phosphorylierter als auch in unphosphorylierter Form) konnten reproduzierbar unterschiedliche Proteine aus HeLa Zellen co-präzipitiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht mehr möglich, die Proteinbanden massenspektrometrisch zu untersuchen. Im Folgenden sollen mögliche Protein/Protein Interaktionen mit der Linkerregion der hRIIA diskutiert werden.

5.3.1 *Src-homology 3* Domänen (SH3)

Wie weiter oben aufgeführt, können Prolin-reiche Sequenzen als Bindemotive von SH3 Domänen (*Src-homology 3*) erkannt werden. SH3 Domänen sind 40-70 Aminosäuren lang und kommen in einer Vielzahl von Proteinen vor. Ursprünglich, daher auch die Namensgebung, wurden sie in der Src-Familie von Tyrosin-Kinasen gefunden (Mayer et al., 1988; Stahl et al., 1988). Das minimale Interaktionsmotiv von SH3 Domänen ist Pro-x-x-Pro, wobei x einer beliebigen Aminosäure entspricht (Ren et al., 1993). Aufgrund ihrer Ligandenspezifität werden die Domänen in zwei generelle Klassen eingeteilt. Klasse I SH3 Domänen binden Liganden mit der Sequenz R/KxxPxxP und Klasse II binden PxxPxR Motive (Feng et al., 1994; Feng et al., 1995; Lim et al., 1994). Zudem können die Liganden in beiden Orientierungen (N-term. ↔ C-term.) gebunden werden. Es sind allerdings auch Interaktionen mit Sequenzmotiven beschrieben worden, die sich nicht in eine der beiden generellen Klassen einordnen lassen (Mayer, 2001). SH3 Domänen binden im allgemeinen mit geringer Affinität (K_D -Werte im μM -Bereich) an

Ligandenpeptide (Tran et al., 2005). Der Prolin-reiche Bereich (PRQS⁵⁸LGHPPEPGPDR⁷⁰) in der Linkerregion der hRIIA entspricht einem minimalen Interaktionsmotiv (PxxP) von SH3 Domänen. Somit ist die Bereitstellung einer Plattform für Interaktion mit SH3 Domänen enthaltenden Proteinen eine mögliche Funktion der ungewöhnlichen Linkerregion der hRIIA. Die Phosphorylierung an Serin 58 könnte, in dem Zusammenhang, eine mögliche R Funktion (im positiven oder negativen Sinne) auf eine Interaktion haben.

5.3.2 14-3-3 Proteine

Eine weitere Gruppe potentieller Interaktionspartner, die an die Linkerregion der hRIIA binden könnte, sind 14-3-3 Proteine. In Säugern kodieren sieben 14-3-3 Gene (β , γ , ϵ , η , σ , τ und ζ) für ubiquitäre, hochkonservierte 25-30 kDa Proteine, die als Dimere vorliegen und spezifisch an Phospho-Serin/Threonin enthaltende Polypeptide binden (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997a). Als Konsensussequenz werden die Motive RSxpSxP und RxY/FxpSxP gebunden, wobei pS für Phospho-Serin und x für eine beliebige Aminosäure steht (Yaffe et al., 1997a). 14-3-3 Proteine sind in erster Linie Adapter, die die subzelluläre Lokalisation und/oder die Stabilität ihrer Liganden beeinflussen können (Muslin and Xing, 2000; van Hemert et al., 2001). Sie sind an zellulären Prozessen wie Signaltransduktion, Apoptose, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung beteiligt (Mhawech, 2005). Unter allen 14-3-3 Proteinen kann die Isoform σ , als Tumorsupressor-Gen, direkt mit Krebs in Zusammenhang gebracht werden (Li et al., 2009b). Unter anderem binden 14-3-3 Proteine auch Substrate der PKA-C. Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase Kinase (CaMKK) wird von der PKA-C an drei Serinresten phosphoryliert (Ser 74, 108 und 458), wobei nur die Modifikationen an Serin 108 und 458 zur Inaktivierung führen. Die Phosphorylierung an Serin 74 führt zur Bindung von 14-3-3 und dadurch zu einer Inhibition der CaMKK. Zusätzlich bewirkt die Interaktion, dass Serin 108 für Phosphatasen unzugänglich wird und somit die Inhibition der CaMKK länger aufrechterhalten bleibt (Davare et al., 2004). Ein Beispiel für eine „Kokalisation“ von 14-3-3 Proteinen mit der PKA stellt das AKAP-Lbc dar. Die Phosphorylierung an Serin 1565 durch die verankerte PKA mit anschließender Bindung von 14-3-3 führt zu einer Inhibition der Rho-GEF Aktivität von AKAP-Lbc (Diviani et al., 2004; Jin et al., 2004). Dario Diviani und Mitarbeiter konnten somit zeigen, dass die PKA und 14-3-3 durchaus im gleichen subzellulären Kompartiment auftreten können. Aus dem Grund wäre auch eine Interaktion mit der an Serin 58 phosphorylierten hRIIA

denkbar. Dieses würde bedeuten, dass die RIIA selbst als ein Adapterprotein fungieren könnte und z.B. 14-3-3 Proteine in räumliche Nähe seiner durch die PKA-C phosphorylierten Interaktionspartner bringen könnte. Die Region der hRIIA um Serin 58 entspricht keiner der beiden Konsensussequenzen für phosphorylierungsabhängige Interaktionen mit 14-3-3 Proteinen, allerdings wurden auch schon Ausnahmen von diesen beiden optimalen Erkennungsmotiven publiziert, sowie von phosphorylierungs-unabhängigen Interaktionen (Mackintosh, 2004; Pozuelo Rubio et al., 2004; Pozuelo Rubio et al., 2003).

5.3.3 WW Domänen

WW Domänen enthaltende Proteine sind eine weitere Klasse von möglichen Interaktionspartnern der humanen RIIA, die ebenfalls Prolin-reiche Sequenzen erkennen. Diese Protein/Protein Interaktionsmodule sind typischerweise 30-40 Aminosäuren lang und weisen eine antiparallele Anordnung von drei β -Faltblättern mit zwei Liganden-Interaktionsflächen auf (Huang et al., 2000; Kanelis et al., 2001; Macias et al., 1996). Sie beinhalten zwei konservierte Tryptophane (W) in einem Abstand von ~ 20 Aminosäuren, aufgrund derer die Bezeichnung abgeleitet wurde. Proteine, die eine WW Domäne enthalten, sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Transkription, RNA-Prozessierung, Proteintransport, Signaltransduktion sowie an der Kontrolle des Zytoskeletts beteiligt (Ilsley et al., 2002; Ingham et al., 2004; Sudol et al., 2001). Aufgrund ihrer Spezifität zu bestimmten Bindemotiven werden WW Domänen in vier Gruppen eingeteilt. Gruppe I WW Domänen binden das Motiv PY, Gruppe II binden PPLP und Gruppe III interagieren über ein PR Motiv (Bedford et al., 1997; Bedford et al., 2000; Chen and Sudol, 1995; Staub et al., 1996; Sudol et al., 1995). Die Gruppe IV WW Domänen stellen eine Sonderform dar, die phosphorylierungsabhängig an pS/TP Motive binden (Phospho-Serin oder Threonin gefolgt von einem Prolin) (Verdecia et al., 2000). Zu dieser Gruppe gehört die Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase (Pin1) (Lu et al., 1999b). Pin1 ist ein kleines ~ 18 kDa Protein mit der WW Domäne am N-Terminus (Aminosäure 1-39) und einer darauf folgenden Isomerasedomäne. Es katalysiert die cis/trans Isomerisierung der Peptidbindung zwischen dem pS/T-Prolin und beeinflusst dadurch die Proteinfaltung, -aktivität, -stabilität und die subzelluläre Lokalisation seiner Zielproteine. Ein Pin1 *knockout* in Hefe und in HeLa Zellen löst einen Stillstand der Mitose aus und eine Überexpression führt zu einer Arretierung in der G2 Phase (Lu et al., 1996; Yaffe et

al., 1997b). Desweiteren ist Pin1 in Zusammenhang mit Asthma-, Krebs- und Alzheimererkrankungen gebracht worden (Akiyama et al., 2005; Liou et al., 2002; Liou et al., 2003; Lu et al., 1999a; Pastorino et al., 2006). Eine Regulation von Pin1 kann durch Oxidation und Phosphorylierung erreicht werden (Butterfield et al., 2006; Sultana et al., 2006). Phosphorylierung von Pin1 in der Isomerasedomäne durch die Polo-like Kinase 1 (Plk-1) führt nicht zu einer Inhibition der Isomeraseaktivität, sondern zu einer Erhöhung der Stabilität, indem die Ubiquitinylierung und somit der Abbau inhibiert wird (Eckerdt et al., 2005). Erst die Phosphorylierung an Serin 16 (WW-Domäne) durch die PKA-C führt zu einer Inhibition, indem Pin1 seine Substrate nicht mehr binden kann (Lu et al., 2002). Zudem führt diese Phosphorylierung zu einer Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Ein Aminosäureaustausch des Serin 16 zu einem Alanin hat einen Block in der Mitose und Apoptose der Zellen zur Folge (Lu et al., 2002).

Eine ELM Datenbanksuche deutete auf eine putative Interaktion von WW-Domänen der Gruppe IV an die ⁵⁴TP Sequenz der hRIIA hin. Threonin 54 wird von der CDK1/Cyc B phosphoryliert und mit dem darauf folgenden Prolin entspricht diese Region einer putativen Interaktionsstelle für z.B. Pin1. Eine weitere Möglichkeit putative Interaktionen mit WW-Domänen vorauszusagen ist das *web tool* iSPOT (Brannetti and Helmer-Citterich, 2003). iSPOT identifizierte das Peptid ⁶⁰GHPPEPG⁶⁷ der hRIIA als möglichen Interaktionsbereich für die WW-Domäne von Pin1.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine genauere Untersuchung der putativen Interaktion von Pin1 mit der hRIIA. Dafür wurden die Aminosäure Threonin 54 durch Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure ausgetauscht und diese Mutanten, mittels SPR, auf Bindung an Pin1 getestet. Allerdings konnte dabei keine Interaktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses muss jedoch nicht bedeuten, dass tatsächlich keine Interaktion auftreten kann, da Carlson und Mitarbeiter bereits zeigten, dass der Austausch des T54 zu einer negativ geladen Aminosäure nicht zu einer Nachahmung der Phosphorylierung führt (Carlson et al., 2001). Eine Möglichkeit, dieses intrazellulär zu untersuchen, ohne mutierte Proteine zu verwenden, wäre die Synchronisation der Zellen in der M-Phase des Zellzyklus, so dass die CDK1/Cyc B die hRIIA phosphoryliert und eine etwaige phosphorylierungsabhängige Kollokalisierung mit Pin1 auftreten könnte. Als Negativkontrolle müsste dasselbe Experiment mit einer unphosphorylierbaren hRIIA Mutante durchgeführt werden.

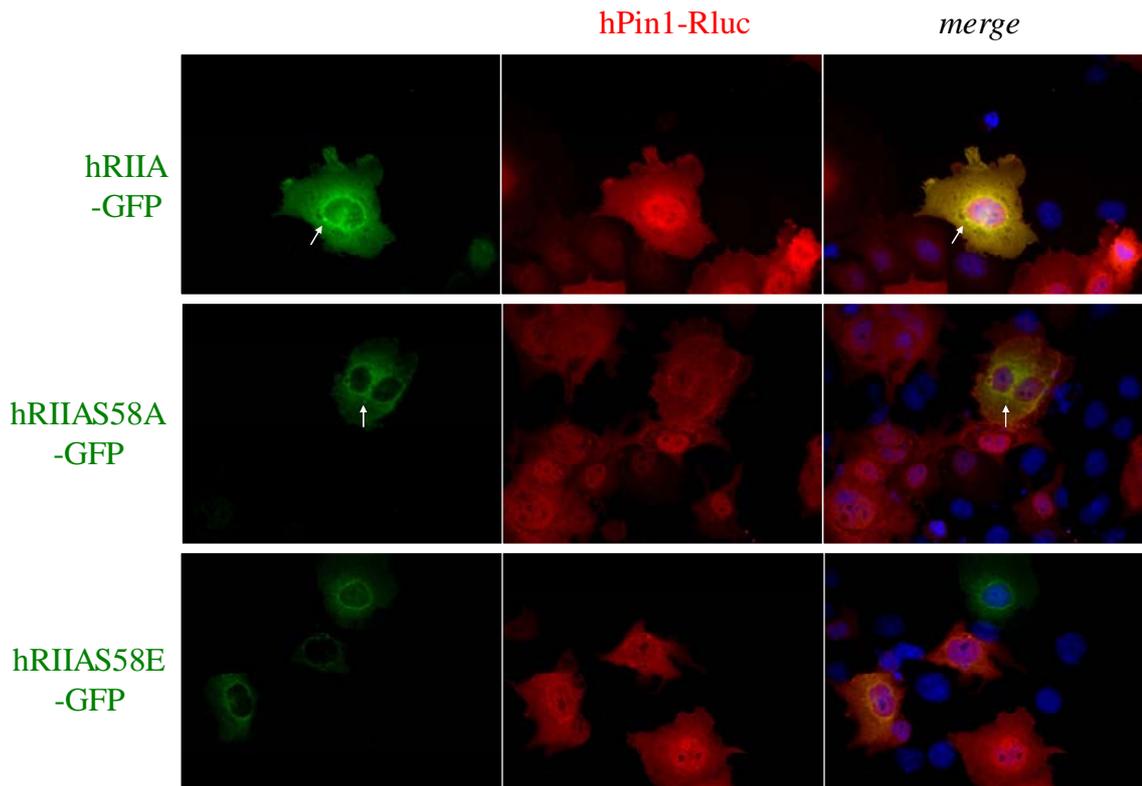


Abb. 5.3.1: Kolokalisation der hRIIA-GFP mit hPin1-RLuc in COS-7 Zellen. Die angegebenen Konstrukte wurden in COS-7 Zellen kotransfiziert, 24 Stunden inkubiert und anschließend einer Immunfärbung unterzogen. Der Nachweis von Pin1-RLuc erfolgte durch einen anti-RLuc Antikörper und einen Cy3 konjugierten Zweitantikörper. Die DNA (Zellkern) wurden mit DAPI angefärbt. Die weißen Pfeile markieren die Zentrosome. Dargestellt sind Aufnahmen bei einer 63-fachen Vergrößerung (Öl-Immersionsobjektiv).

Die Untersuchung der zweiten putativen Interaktionsstelle in der hRIIA (⁶⁰GHPPPEPG⁶⁷) erfolgte, indem Bindungsstudien von allen humanen R Untereinheiten mit Pin1 durchgeführt wurden. Auch dabei konnte keine Interaktion detektiert werden. In einem Experiment, bei dem einfach- (an Serin 99) sowie doppelt phosphorylierte (S58 und S99) hRIIA auf Bindung an Pin1 getestet wurde, konnte eine deutliche Interaktion mit der an S58 und 99 phosphorylierten R Untereinheit gemessen werden, jedoch nicht mit der nur an S99 phosphorylierten (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht reproduzieren. Aufgrund der einmalig gemessenen Bindung von Pin1 an die hRIIA erfolgten Untersuchungen zur Kolokalisation in COS-7 Zellen. Dafür wurden die Konstrukte hRIIA-GFP, sowie die Mutanten S58A und S58E mit dem Konstrukt Pin1-RLuc kotransfiziert, die Zellen 24 Stunden inkubiert und anschließend fixiert. Die Detektion des Fusionsproteins Pin1-RLuc erfolgte durch einen anti-RLuc Antikörper und einen Cy3 konjugierten Zweitantikörper (siehe Abbildung 5.3.1).

Wie die Abbildung verdeutlicht, lokalisieren sowohl das Wildtyp RIIA-GFP als auch die an S58 mutierten Fusionsproteine im Zytoplasma zum Großteil am Golgi-Apparat und Zentrosom (Keryer et al., 1999). Ob es sich bei den mit Pfeilen markierten Bereichen tatsächlich um Zentrosome handelt, müsste allerdings noch mittels spezifischer Marker verifiziert werden. Pin1-RLuc lokalisiert im Zellkern und Zytoplasma. Beide Fusionsproteine kolokalisieren eindeutig am Golgi-Apparat und um den Zellkern. Diese Kolokalisation scheint unabhängig von der Aminosäure an Position 58 der hRIIA zu sein. Auffällig bei diesem Ergebnis ist, dass beim Wildtyp und bei der S58A Mutante keine Kolokalisation am Zentrosom auftritt. Es ist bekannt, dass die hRIIA am Anfang der Mitose durch CDK1/Cyc B an T54 phosphoryliert wird und dass diese Modifikation die Dissoziation der R Untereinheit vom Zentrosom (AKAP450) erleichtert (Carlson et al., 2001; Keryer et al., 1998; Landsverk et al., 2001). Dieses bedeutet, dass die Fraktion der RIIA, die sich am Zentrosom befindet, nicht phosphoryliert sein darf. Da keine Kolokalisation am Zentrosom zu sehen ist, deutet dieses Ergebnis auf das ⁵⁴TP Motiv als potentiellen Interaktionsbereich von Pin1. In diesem Zusammenhang ist allerdings nicht klar, ob die am Golgi-Apparat lokalisierte Fraktion der hRIIA an T⁵⁴ phosphoryliert vorliegt. Falls der Phosphostatus von Threonin 54 für die beobachtete Kolokalisation verantwortlich ist, sollte ein Austausch von Threonin 54 zu Alanin in dem hRIIA-GFP Fusionsprotein keine Interaktion und somit Kolokalisation mit Pin1 zeigen.

Die mögliche Interaktion von Pin1 mit der hRIIA im Zusammenhang mit der Phosphorylierung an Threonin 54 durch die CDK1/Cyc B ist es wert, weiter untersucht zu werden.

5.4 Dephosphorylierung der hRIIA

Wie in Abschnitt 4.5.3 aufgeführt, ist die Phosphorylierung der humanen R Untereinheit IIA an Serin 58 in der Literatur bereits bekannt. Das auffälligste Merkmal dieser Autophosphorylierung durch die PKA-C ist eine apparente Molekulargewichtserhöhung in der SDS-PAGE, die bislang mit der Phosphorylierung in der Autoinhibitionsdomäne erklärt wurde (Keryer et al., 1998; Weber et al., 1982).

Zu der funktionellen Charakterisierung einer Phosphorylierung gehört auch die Identifizierung von Proteinphosphatasen, die die Modifikation wieder entfernen können.

Dieses ist in der Signaltransduktion von entscheidender Bedeutung, wo extrazelluläre Signale intrazellulär häufig durch Phosphorylierungskaskaden in ihrer Stärke potenziert und durch Proteinphosphatasen reguliert werden (Hunter, 1995).

AKAPs bilden eine intrazelluläre Interaktionsplattform für eine Vielzahl von Proteinen. Ein entscheidender Aspekt dabei ist die Verankerung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (auch andere Kinasen) und deren Gegenspielern in Form von Serin/Threonin spezifischen Phosphatasen. Dieses wurde erstmals 1995 für das neuronale AKAP79 gezeigt, indem die Interaktionen mit der A Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Phosphatase PP2B und mit der Proteinkinase C nachgewiesen wurden (Coghlan et al., 1995; Klauck et al., 1996). Das AKAP350/450 ist in der Lage, die Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1, PP2A) zu binden und verankert diese mit der PKA am Golgi-Apparat und am Zentrosom (Takahashi et al., 1999). Die Glykogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3) kann von AKAP220 und dem erst kürzlich publizierten AKAP GSKIP (*glycogen synthase kinase interacting protein*) gebunden werden (Hundsrucker et al., 2010; Tanji et al., 2002). Mit dem AKAP220 ist zudem die Proteinphosphatase 1 assoziiert (Schillace and Scott, 1999). Weitere AKAPs die PP1 verankern können sind WAVE1 (Wiskott-Aldrich Verprolin Homologie Protein-1) und das dualspezifische AKAP1 (D-AKAP1) (Danial et al., 2003; Steen et al., 2003; Steen et al., 2000). Somit bilden AKAPs „Gerüste“, die sowohl Effektoren (Kinasen) als auch Terminatoren (Proteinphosphatasen) in die Nähe zu ihren Substraten bringen und somit eine zeitlich und räumlich präzise Koordination vermitteln.

Die Dephosphorylierung der an Serin 99 und 58 autophosphorylierten hRIIA wurde in dieser Arbeit hauptsächlich *in vitro* untersucht. Die Fragestellung dabei war, ob die durch AKAPs verankerte Proteinphosphatase 1 bzw. 2A die S58 Phosphorylierung reguliert. Desweiteren wurden PP2CA (Klumpp et al., 2006; Schwarz et al., 2006) und die alkalische Phosphatase (CIAP) getestet.

Dass PP1 und PP2A die Autoinhibitionsdomäne der RIIA aus Rind dephosphorylieren können, wurde bereits von György Vereb und Mitarbeitern *in vitro* gezeigt (Vereb et al., 1986). Die Autoren konnten für PP1 einen K_m Wert von 5 μM und für PP2A einen von 0,3 μM bestimmen.

Alle vier in der vorliegenden Arbeit *in vitro* getesteten Phosphatasen konnten die hRIIA dephosphorylieren, was durch die apparente Molekulargewichtsreduktion von 53 auf 51 kDa gekennzeichnet war. PP1 zeigte die höchste Dephosphorylierungsrate gefolgt von PP2CA und PP2A (Abschnitt 4.5.1). Somit wurde deutlich, dass die beiden an AKAPs

vorkommenden Phosphatasen PP1 und PP2A die an S58 phosphorylierte hRIIA *in vitro* unterschiedlich effizient dephosphorylieren.

Wie in Abschnitt 4.2.1 gezeigt, wird die Aminosäure Serin 58 der hRIIA während der Holoenzymbildung bereits phosphoryliert. PP1 war allerdings nicht in der Lage, die RIIA im Holoenzymkomplex zu dephosphorylieren (Abschnitt 4.5.2). Daraus wird geschlossen, dass die Phosphorylierung im Heterotetramer für Phosphatasen unzugänglich ist und erst nach Dissoziation dephosphoryliert werden kann.

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, inwiefern sich die *in vitro* identifizierten Phosphatasen im zellulären Zusammenhang verifizieren lassen. HeLa Zellen sollten mit unterschiedlichen (membrangängigen) Phosphataseinhibitoren behandelt und anschließend der Einfluss auf die 53 kDa RIIA Proteinbande mittels *Western Blot* detektiert werden. Die von Keryer und Mitarbeitern in HeLa Zellen bereits nachgewiesene 53 kDa Form der RIIA konnte jedoch unter den angewendeten Bedingungen nicht detektiert werden (Abschnitt 4.5.3). Dieses lässt sich mit einer unterschiedliche Probenvorbereitung und der Verwendung eines anderen anti-RIIA Antikörpers erklären. Daraufhin wurden hier Experimente mit HeLa Zelllysate als Phosphatase und rekombinanter hRIIA(PP) als Substrat durchgeführt. Durch Inkubation mit Tautomycin, einem eher PP1 spezifischen Inhibitor (Mitsuhashi et al., 2003) und Okadasäure, die als PP2A spezifisch gilt (Gupta et al., 1997), konnte jedoch keine deutliche Inhibition der Dephosphorylierung erzielt werden. PP2CA ist eine Mg^{2+} -abhängige Phosphatase und eine Inhibition kann nur durch Zugabe der Komplexbildner EDTA/EGTA erfolgen. Allerdings führte auch die Inkubation mit EDTA/EGTA zu keiner Inhibition der Dephosphorylierung rekombinanter hRIIA in HeLa Lysat. Erst durch Na-Orthovanadat oder alle Inhibitoren zusammen konnte die Dephosphorylierung gestoppt werden. Somit konnte keine der *in vitro* untersuchten Proteinphosphatasen als alleiniger Kandidat für die Dephosphorylierung der hRIIA-Phospho identifiziert werden, was mit dem Prozess der Lyse und einem damit einhergehenden Verlust der Kompartimentierung, sowie der Gegenwart einer Vielzahl weiterer Protein Phosphatasen erklärt werden kann (Moorhead et al., 2009). Die subzelluläre Kolo-kalisation der PKA mit den Phosphatasen über AKAPs lässt aber den Schluss zu, dass sowohl PP1, PP2A und natürlich auch Calcineurin (PP2B) den Serin 58 Phosphostatus in lebenden Zellen regulieren könnten.

6. Zusammenfassung

Die cAMP-abhängige Proteinkinase ist an der Regulation grundlegender zellulärer Prozesse, wie Entwicklung und Differenzierung, sowie Stoffwechselprozessen, beteiligt. Das Holoenzym bestehend aus einem Dimer regulatorischer (R) und zwei katalytischer C (C) Untereinheiten wird durch den sekundären Botenstoff cAMP reguliert. Die molekulare Grundlage der Holoenzymdynamik, sowie die räumliche und zeitliche Koordination der Holoenzyme in der cAMP-vermittelten Signaltransduktion sind zentrale Themen der aktuellen Forschung. Die Dynamik wird in erster Linie durch die cAMP-Konzentration, die Isoenzymzusammensetzung und die Verfügbarkeit von Kinasesubstraten bestimmt. Klassischerweise wurde die Holoenzymdynamik auf Grundlage der Phosphotransferaseaktivität der C Untereinheit untersucht. Der Effekt von Substrat auf die apparenten Aktivierungskonstanten (cAMP) konnte aber so nicht bestimmt werden, sodass in dieser Arbeit eine alternative Methode entwickelt werden musste, die unabhängig von der Messung der Substratphosphorylierung ist. Eine Validierung dieser SPR-basierten Methode erfolgte mit Typ-IA Holoenzym, wobei eine leichtere Aktivierung in Gegenwart von Substrat bestätigt werden konnte. Überraschenderweise wurde mit dieser Methode der umgekehrte Effekt von Substratpeptid auf die Aktivierung des Typ-IIA Holoenzym gemessen, wobei mit steigender Substratkonzentration größere apparente Aktivierungskonstanten bestimmt wurden. Durch gerichtete Mutationen der P⁰-Stelle in der Autoinhibitionsdomäne konnte diese Position als eine Hauptdeterminante für die Dynamik der Holoenzyme identifiziert werden. Im Allgemeinen führen Pseudosubstratinhibitoren (RIA, RIIAS99A) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zu einer Verkleinerung, und Substratinhibitoren (RIIA, RIIAA99S) zu einer Vergrößerung der apparenten Aktivierungskonstanten der entsprechenden Holoenzyme. Bei Untersuchungen zum Phosphostatus der hRIIA im Holoenzymkomplex sowie während der Dissoziation in Gegenwart oder Abwesenheit von Substrat, konnte mit Serin 58 eine zweite Autophosphorylierungsstelle in der Linkerregion identifiziert werden, die ein deutlich langsames Laufverhalten in der SDS-PAGE hervorruft. Allerdings konnte dieser Stelle keine Funktion im Bezug auf die Interaktion mit der katalytischen Untereinheit sowie ausgewählten AKAPs zugesprochen werden. In dieser Arbeit konnte ein gegensätzlicher Mechanismus zur Feinregulation der Dynamik des Typ-IA und -IIA Holoenzym durch Substrat gezeigt und die molekulare Grundlage aufgeklärt werden. Diese bisher nicht beschriebene Autophosphorylierungsstelle könnte eine wichtige Rolle in der Konformationskontrolle des N-Terminus spielen, oder als Plattform zur Wechselwirkung mit bisher unbekanntem Interaktionspartnern der hRIIA dienen.

7. Literaturverzeichnis

- Akiyama, H., R.W. Shin, C. Uchida, T. Kitamoto, and T. Uchida. 2005. Pin1 promotes production of Alzheimer's amyloid beta from beta-cleaved amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 336:521-9.
- Amieux, P.S., D.E. Cummings, K. Motamed, E.P. Brandon, L.A. Wailes, K. Le, R.L. Idzerda, and G.S. McKnight. 1997. Compensatory regulation of RIalpha protein levels in protein kinase A mutant mice. *J Biol Chem.* 272:3993-8.
- Amieux, P.S., D.G. Howe, H. Knickerbocker, D.C. Lee, T. Su, G.S. Laszlo, R.L. Idzerda, and G.S. McKnight. 2002. Increased basal cAMP-dependent protein kinase activity inhibits the formation of mesoderm-derived structures in the developing mouse embryo. *J Biol Chem.* 277:27294-304.
- Angelo, R., and C.S. Rubin. 1998. Molecular characterization of an anchor protein (AKAPCE) that binds the RI subunit (RCE) of type I protein kinase A from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 273:14633-43.
- Angelo, R.G., and C.S. Rubin. 2000. Characterization of structural features that mediate the tethering of *Caenorhabditis elegans* protein kinase A to a novel A kinase anchor protein. Insights into the anchoring of PKAI isoforms. *J Biol Chem.* 275:4351-62.
- Antoni, F.A. 2000. Molecular diversity of cyclic AMP signalling. *Front Neuroendocrinol.* 21:103-32.
- Banky, P., M.G. Newlon, M. Roy, S. Garrod, S.S. Taylor, and P.A. Jennings. 2000. Isoform-specific differences between the type Ialpha and IIalpha cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring domains revealed by solution NMR. *J Biol Chem.* 275:35146-52.
- Banky, P., M. Roy, M.G. Newlon, D. Morikis, N.M. Haste, S.S. Taylor, and P.A. Jennings. 2003. Related protein-protein interaction modules present drastically different surface topographies despite a conserved helical platform. *J Mol Biol.* 330:1117-29.
- Beavo, J.A., and L.L. Brunton. 2002. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:710-8.
- Beavo, J.A., N.L. Rogers, O.B. Crofford, J.G. Hardman, E.W. Sutherland, and E.V. Newman. 1970. Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Mol Pharmacol.* 6:597-603.
- Bedford, M.T., D.C. Chan, and P. Leder. 1997. FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *Embo J.* 16:2376-83.
- Bedford, M.T., D. Sarbassova, J. Xu, P. Leder, and M.B. Yaffe. 2000. A novel pro-Arg motif recognized by WW domains. *J Biol Chem.* 275:10359-69.
- Beebe, S.J., O. Oyen, M. Sandberg, A. Froysa, V. Hansson, and T. Jahnsen. 1990. Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol.* 4:465-75.
- Beebe, S.J., P. Salomonsky, T. Jahnsen, and Y. Li. 1992. The C gamma subunit is a unique isozyme of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 267:25505-12.
- Beene, D.L., and J.D. Scott. 2007. A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr Opin Cell Biol.* 19:192-8.
- Berthet, J., T.W. Rall, and E.W. Sutherland. 1957a. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem.* 224:463-75.
- Berthet, J., E.W. Sutherland, and T.W. Rall. 1957b. The assay of glucagon and epinephrine with use of liver homogenates. *J Biol Chem.* 229:351-61.
- Bertinetti, D., S. Schweinsberg, S.E. Hanke, F. Schwede, O. Bertinetti, S. Drewianka, H.G. Genieser, and F.W. Herberg. 2009. Chemical tools selectively target components of the PKA system. *BMC Chem Biol.* 9:3.
- Boeshans, K.M., K.A. Resing, J.B. Hunt, N.G. Ahn, and J.B. Shabb. 1999. Structural characterization of the membrane-associated regulatory subunit of type I cAMP-

- dependent protein kinase by mass spectrometry: identification of Ser81 as the in vivo phosphorylation site of RIalpha. *Protein Sci.* 8:1515-22.
- Bolwell, G.P. 1995. Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants. *Trends Biochem Sci.* 20:492-5.
- Bossemeyer, D. 1995. Protein kinases--structure and function. *FEBS Lett.* 369:57-61.
- Bossemeyer, D., R.A. Engh, V. Kinzel, H. Ponstingl, and R. Huber. 1993. Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *Embo J.* 12:849-59.
- Botsford, J.L., and J.G. Harman. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev.* 56:100-22.
- Brandon, E.P., M. Zhuo, Y.Y. Huang, M. Qi, K.A. Gerhold, K.A. Burton, E.R. Kandel, G.S. McKnight, and R.L. Idzerda. 1995. Hippocampal long-term depression and depotentiation are defective in mice carrying a targeted disruption of the gene encoding the RI beta subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8851-5.
- Brannetti, B., and M. Helmer-Citterich. 2003. iSPOT: A web tool to infer the interaction specificity of families of protein modules. *Nucleic Acids Res.* 31:3709-11.
- Brown, S.H., J. Wu, C. Kim, K. Alberto, and S.S. Taylor. 2009. Novel isoform-specific interfaces revealed by PKA RIIbeta holoenzyme structures. *J Mol Biol.* 393:1070-82.
- Bubis, J., T.S. Vedvick, and S.S. Taylor. 1987. Antiparallel alignment of the two protomers of the regulatory subunit dimer of cAMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem.* 262:14961-6.
- Burton, K.A., B.D. Johnson, Z.E. Hausken, R.E. Westenbroek, R.L. Idzerda, T. Scheuer, J.D. Scott, W.A. Catterall, and G.S. McKnight. 1997. Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca²⁺ channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:11067-72.
- Burton, K.A., D.A. McDermott, D. Wilkes, M.N. Poulsen, M.A. Nolan, M. Goldstein, C.T. Basson, and G.S. McKnight. 2006. Haploinsufficiency at the protein kinase A RI alpha gene locus leads to fertility defects in male mice and men. *Mol Endocrinol.* 20:2504-13.
- Burton, K.A., B. Treash-Osio, C.H. Muller, E.L. Dunphy, and G.S. McKnight. 1999. Deletion of type IIalpha regulatory subunit delocalizes protein kinase A in mouse sperm without affecting motility or fertilization. *J Biol Chem.* 274:24131-6.
- Butterfield, D.A., A. Gnjec, H.F. Poon, A. Castegna, W.M. Pierce, J.B. Klein, and R.N. Martins. 2006. Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in inherited Alzheimer's disease: an initial assessment. *J Alzheimers Dis.* 10:391-7.
- Cadd, G., and G.S. McKnight. 1989. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron.* 3:71-9.
- Cadd, G.G., M.D. Uhler, and G.S. McKnight. 1990. Holoenzymes of cAMP-dependent protein kinase containing the neural form of type I regulatory subunit have an increased sensitivity to cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 265:19502-6.
- Carlson, C.R., O. Witczak, L. Vossebein, J.C. Labbe, B.S. Skalhegg, G. Keryer, F.W. Herberg, P. Collas, and K. Tasken. 2001. CDK1-mediated phosphorylation of the RIIalpha regulatory subunit of PKA works as a molecular switch that promotes dissociation of RIIalpha from centrosomes at mitosis. *J Cell Sci.* 114:3243-54.
- Carmichael, D.F., R.L. Geahlen, S.M. Allen, and E.G. Krebs. 1982. Type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. Phosphorylation by casein kinase II at a site that is also phosphorylated in vivo. *J Biol Chem.* 257:10440-5.
- Carr, D.W., Z.E. Hausken, I.D. Fraser, R.E. Stofko-Hahn, and J.D. Scott. 1992. Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. *J Biol Chem.* 267:13376-82.
- Carr, D.W., R.E. Stofko-Hahn, I.D. Fraser, S.M. Bishop, T.S. Acott, R.G. Brennan, and J.D. Scott. 1991. Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J Biol Chem.* 266:14188-92.

- Carr, S.A., K. Biemann, S. Shoji, D.C. Parmelee, and K. Titani. 1982. n-Tetradecanoyl is the NH₂-terminal blocking group of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:6128-31.
- Chen, H.I., and M. Sudol. 1995. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7819-23.
- Clegg, C.H., G.G. Cadd, and G.S. McKnight. 1988. Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:3703-7.
- Clegg, C.H., H.S. Haugen, and L.F. Boring. 1996. Promoter sequences in the RI beta subunit gene of cAMP-dependent protein kinase required for transgene expression in mouse brain. *J Biol Chem.* 271:1638-44.
- Clegg, C.H., W. Ran, M.D. Uhler, and G.S. McKnight. 1989. A mutation in the catalytic subunit of protein kinase A prevents myristylation but does not inhibit biological activity. *J Biol Chem.* 264:20140-6.
- Coghlan, V.M., B.A. Perrino, M. Howard, L.K. Langeberg, J.B. Hicks, W.M. Gallatin, and J.D. Scott. 1995. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science.* 267:108-11.
- Colledge, M., and J.D. Scott. 1999. AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.* 9:216-21.
- Conti, M., and J. Beavo. 2007. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.* 76:481-511.
- Cook, P.F., M.E. Neville, Jr., K.E. Vrana, F.T. Hartl, and R. Roskoski, Jr. 1982. Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit. *Biochemistry.* 21:5794-9.
- Corbin, J.D., S.L. Keely, and C.R. Park. 1975. The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *J Biol Chem.* 250:218-25.
- Corbin, J.D., P.H. Sugden, L. West, D.A. Flockhart, T.M. Lincoln, and D. McCarthy. 1978. Studies on the properties and mode of action of the purified regulatory subunit of bovine heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 253:3997-4003.
- Craven, K.B., and W.N. Zagotta. 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol.* 68:375-401.
- Cummings, D.E., E.P. Brandon, J.V. Planas, K. Motamed, R.L. Idzerda, and G.S. McKnight. 1996. Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. *Nature.* 382:622-6.
- Dalrymple, M.B., K.D. Pflieger, and K.A. Eidne. 2008. G protein-coupled receptor dimers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacol Ther.* 118:359-71.
- Danial, N.N., C.F. Gramm, L. Scorrano, C.Y. Zhang, S. Krauss, A.M. Ranger, S.R. Datta, M.E. Greenberg, L.J. Licklider, B.B. Lowell, S.P. Gygi, and S.J. Korsmeyer. 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature.* 424:952-6.
- Davare, M.A., T. Saneyoshi, E.S. Guire, S.C. Nygaard, and T.R. Soderling. 2004. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase by protein 14-3-3. *J Biol Chem.* 279:52191-9.
- de Rooij, J., F.J. Zwartkruis, M.H. Verheijen, R.H. Cool, S.M. Nijman, A. Wittinghofer, and J.L. Bos. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 396:474-7.
- Demaille, J.G., K.A. Peters, and E.H. Fischer. 1977. Isolation and properties of the rabbit skeletal muscle protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases. *Biochemistry.* 16:3080-6.
- Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S.A. Beausoleil, C.E. Bakalarski, S.J. Elledge, and S.P. Gygi. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:10762-7.

- Desseyn, J.L., K.A. Burton, and G.S. McKnight. 2000. Expression of a nonmyristylated variant of the catalytic subunit of protein kinase A during male germ-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:6433-8.
- Di Benedetto, G., A. Zoccarato, V. Lissandron, A. Terrin, X. Li, M.D. Houslay, G.S. Baillie, and M. Zaccolo. 2008. Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ Res*. 103:836-44.
- Diller, T.C., Madhusudan, N.H. Xuong, and S.S. Taylor. 2001. Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit. *Structure*. 9:73-82.
- Diskar, M., H.M. Zenn, A. Kaupisch, A. Prinz, and F.W. Herberg. 2007. Molecular basis for isoform-specific autoregulation of protein kinase A. *Cell Signal*. 19:2024-34.
- Diviani, D., L. Abuin, S. Cotecchia, and L. Pansier. 2004. Anchoring of both PKA and 14-3-3 inhibits the Rho-GEF activity of the AKAP-Lbc signaling complex. *Embo J*. 23:2811-20.
- Diviani, D., L.K. Langeberg, S.J. Doxsey, and J.D. Scott. 2000. Pericentrin anchors protein kinase A at the centrosome through a newly identified RII-binding domain. *Curr Biol*. 10:417-20.
- Dodge-Kafka, K.L., L. Langeberg, and J.D. Scott. 2006. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res*. 98:993-1001.
- Dodge-Kafka, K.L., J. Soughayer, G.C. Pare, J.J. Carlisle Michel, L.K. Langeberg, M.S. Kapiloff, and J.D. Scott. 2005. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature*. 437:574-8.
- Dodge, K.L., S. Khouangsathiene, M.S. Kapiloff, R. Mouton, E.V. Hill, M.D. Houslay, L.K. Langeberg, and J.D. Scott. 2001. mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *Embo J*. 20:1921-30.
- Doskeland, S.O. 1978. Evidence that rabbit muscle protein kinase has two kinetically distinct binding sites for adenosine 3' ; 5'-cyclic monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun*. 83:542-9.
- Doskeland, S.O., E. Maronde, and B.T. Gjertsen. 1993. The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase--functionally different or redundant? *Biochim Biophys Acta*. 1178:249-58.
- Dostmann, W.R., and S.S. Taylor. 1991. Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry*. 30:8710-6.
- Dostmann, W.R., S.S. Taylor, H.G. Genieser, B. Jastorff, S.O. Doskeland, and D. OGREID. 1990. Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinases I and II with analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioates. *J Biol Chem*. 265:10484-91.
- Dransfield, D.T., A.J. Bradford, J. Smith, M. Martin, C. Roy, P.H. Mangeat, and J.R. Goldenring. 1997. Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *Embo J*. 16:35-43.
- Dubey, R.S., A.K. Bhattacharya, and S.C. Sanyal. 1981. Elevation of adenosine 3' 5' cyclic monophosphate level by *Aeromonas hydrophila* enterotoxin. *Indian J Med Res*. 74:668-74.
- Durgerian, S., and S.S. Taylor. 1989. The consequences of introducing an autophosphorylation site into the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 264:9807-13.
- Eckerdt, F., J. Yuan, K. Saxena, B. Martin, S. Kappel, C. Lindenau, A. Kramer, S. Naumann, S. Daum, G. Fischer, I. Dikic, M. Kaufmann, and K. Strebhardt. 2005. Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells. *J Biol Chem*. 280:36575-83.
- Fantozzi, D.A., A.T. Harootunian, W. Wen, S.S. Taylor, J.R. Feramisco, R.Y. Tsien, and J.L. Meinkoth. 1994. Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J Biol Chem*. 269:2676-86.
- Fantozzi, D.A., S.S. Taylor, P.W. Howard, R.A. Maurer, J.R. Feramisco, and J.L. Meinkoth. 1992. Effect of the thermostable protein kinase inhibitor on intracellular localization of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 267:16824-8.

- Feng, S., J.K. Chen, H. Yu, J.A. Simon, and S.L. Schreiber. 1994. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science*. 266:1241-7.
- Feng, S., C. Kasahara, R.J. Rickles, and S.L. Schreiber. 1995. Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:12408-15.
- Fraser, I.D., S.J. Tavalin, L.B. Lester, L.K. Langeberg, A.M. Westphal, R.A. Dean, N.V. Marrion, and J.D. Scott. 1998. A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *Embo J*. 17:2261-72.
- Gangal, M., T. Clifford, J. Deich, X. Cheng, S.S. Taylor, and D.A. Johnson. 1999. Mobilization of the A-kinase N-myristate through an isoform-specific intermolecular switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:12394-9.
- Gesellchen, F., B. Zimmermann, and F.W. Herberg. 2005. Direct optical detection of protein-ligand interactions. *Methods Mol Biol*. 305:17-46.
- Gill, G.N., and L.D. Garren. 1969. On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone: the binding of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate to an adrenal cortical protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 63:512-9.
- Gillingham, A.K., and S. Munro. 2000. The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep*. 1:524-9.
- Gjertsen, B.T., B. Fauske, and S.O. Doskeland. 1993. Exogenous substrate stimulates autodephosphorylation of cyclic-AMP-dependent protein kinase II. *Biochem J*. 294 (Pt 2):497-503.
- Gold, M.G., B. Lygren, P. Dokurno, N. Hoshi, G. McConnachie, K. Tasken, C.R. Carlson, J.D. Scott, and D. Barford. 2006. Molecular basis of AKAP specificity for PKA regulatory subunits. *Mol Cell*. 24:383-95.
- Gronholm, M., L. Vossebein, C.R. Carlson, J. Kuja-Panula, T. Teesalu, K. Alftan, A. Vaheri, H. Rauvala, F.W. Herberg, K. Tasken, and O. Carpen. 2003. Merlin links to the cAMP neuronal signaling pathway by anchoring the R1beta subunit of protein kinase A. *J Biol Chem*. 278:41167-72.
- Guan, K.L., and J.E. Dixon. 1991. Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem*. 192:262-7.
- Gupta, V., A.K. Ogawa, X. Du, K.N. Houk, and R.W. Armstrong. 1997. A model for binding of structurally diverse natural product inhibitors of protein phosphatases PP1 and PP2A. *J Med Chem*. 40:3199-206.
- Guthrie, C.R., B.S. Skalhegg, and G.S. McKnight. 1997. Two novel brain-specific splice variants of the murine Cbeta gene of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 272:29560-5.
- Hanks, S.K., A.M. Quinn, and T. Hunter. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 241:42-52.
- Hausken, Z.E., V.M. Coghlan, C.A. Hastings, E.M. Reimann, and J.D. Scott. 1994. Type II regulatory subunit (RII) of the cAMP-dependent protein kinase interaction with A-kinase anchor proteins requires isoleucines 3 and 5. *J Biol Chem*. 269:24245-51.
- Hemmings, B.A., A. Aitken, P. Cohen, M. Rymond, and F. Hofmann. 1982. Phosphorylation of the type-II regulatory subunit of cyclic-AMP-dependent protein kinase by glycogen synthase kinase 3 and glycogen synthase kinase 5. *Eur J Biochem*. 127:473-81.
- Henn, V., B. Edemir, E. Stefan, B. Wiesner, D. Lorenz, F. Theilig, R. Schmitt, L. Vossebein, G. Tamma, M. Beyermann, E. Krause, F.W. Herberg, G. Valenti, S. Bachmann, W. Rosenthal, and E. Klussmann. 2004. Identification of a novel A-kinase anchoring protein 18 isoform and evidence for its role in the vasopressin-induced aquaporin-2 shuttle in renal principal cells. *J Biol Chem*. 279:26654-65.
- Henn, V., E. Stefan, G.S. Baillie, M.D. Houslay, W. Rosenthal, and E. Klussmann. 2005. Compartmentalized cAMP signalling regulates vasopressin-mediated water reabsorption by controlling aquaporin-2. *Biochem Soc Trans*. 33:1316-8.
- Herberg, F.W., W.R. Dostmann, M. Zorn, S.J. Davis, and S.S. Taylor. 1994. Crosstalk between domains in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase: influence of amino terminus on cAMP binding and holoenzyme formation. *Biochemistry*. 33:7485-94.

- Herberg, F.W., M.L. Doyle, S. Cox, and S.S. Taylor. 1999. Dissection of the nucleotide and metal-phosphate binding sites in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*. 38:6352-60.
- Herberg, F.W., A. Maleszka, T. Eide, L. Vossebein, and K. Tasken. 2000. Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *J Mol Biol*. 298:329-39.
- Herberg, F.W., and S.S. Taylor. 1993. Physiological inhibitors of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: effect of MgATP on protein-protein interactions. *Biochemistry*. 32:14015-22.
- Herberg, F.W., S.S. Taylor, and W.R. Dostmann. 1996. Active site mutations define the pathway for the cooperative activation of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*. 35:2934-42.
- Herberg, F.W., B. Zimmermann, M. McGlone, and S.S. Taylor. 1997. Importance of the A-helix of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase for stability and for orienting subdomains at the cleft interface. *Protein Sci*. 6:569-79.
- Hoffmann, R., G.S. Baillie, S.J. MacKenzie, S.J. Yarwood, and M.D. Houslay. 1999. The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *Embo J*. 18:893-903.
- Hofmann, F., J.A. Beavo, P.J. Bechtel, and E.G. Krebs. 1975. Comparison of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle. *J Biol Chem*. 250:7795-801.
- Hofmann, F., P.J. Bechtel, and E.G. Krebs. 1977. Concentrations of cyclic AMP-dependent protein kinase subunits in various tissues. *J Biol Chem*. 252:1441-7.
- Huang, L.J., K. Durick, J.A. Weiner, J. Chun, and S.S. Taylor. 1997a. D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:11184-9.
- Huang, L.J., K. Durick, J.A. Weiner, J. Chun, and S.S. Taylor. 1997b. Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *J Biol Chem*. 272:8057-64.
- Huang, X., F. Poy, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Sudol, and M.J. Eck. 2000. Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol*. 7:634-8.
- Hulme, J.T., M. Ahn, S.D. Hauschka, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 2002. A novel leucine zipper targets AKAP15 and cyclic AMP-dependent protein kinase to the C terminus of the skeletal muscle Ca²⁺ channel and modulates its function. *J Biol Chem*. 277:4079-87.
- Hulme, J.T., T.W. Lin, R.E. Westenbroek, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 2003. Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13093-8.
- Hundsrucker, C., G. Krause, M. Beyermann, A. Prinz, B. Zimmermann, O. Diekmann, D. Lorenz, E. Stefan, P. Nedvetsky, M. Dathe, F. Christian, T. McSorley, E. Krause, G. McConnachie, F.W. Herberg, J.D. Scott, W. Rosenthal, and E. Klussmann. 2006. High-affinity AKAP7delta-protein kinase A interaction yields novel protein kinase A-anchoring disruptor peptides. *Biochem J*. 396:297-306.
- Hundsrucker, C., P. Skroblin, F. Christian, H.M. Zenn, V. Popara, M. Joshi, J. Eichhorst, B. Wiesner, F.W. Herberg, B. Reif, W. Rosenthal, and E. Klussmann. 2010. Glycogen synthase kinase 3beta interaction protein functions as an A-kinase anchoring protein. *J Biol Chem*. 285:5507-21.
- Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 80:225-36.
- Hunter, T. 2000. Signaling--2000 and beyond. *Cell*. 100:113-27.
- Ilsley, J.L., M. Sudol, and S.J. Winder. 2002. The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cell Signal*. 14:183-9.
- Ingham, R.J., G. Gish, and T. Pawson. 2004. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene*. 23:1972-84.

- Jahnsen, T., L. Hedin, V.J. Kidd, W.G. Beattie, S.M. Lohmann, U. Walter, J. Durica, T.Z. Schulz, E. Schiltz, M. Browner, and et al. 1986. Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem.* 261:12352-61.
- Jarnaess, E., A. Ruppelt, A.J. Stokka, B. Lygren, J.D. Scott, and K. Tasken. 2008. Dual specificity A-kinase anchoring proteins (AKAPs) contain an additional binding region that enhances targeting of protein kinase A type I. *J Biol Chem.* 283:33708-18.
- Jarnaess, E., and K. Tasken. 2007. Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans.* 35:931-7.
- Jason-Moller, L., M. Murphy, and J. Bruno. 2006. Overview of Biacore systems and their applications. *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 19:Unit 19 13.
- Jin, J., F.D. Smith, C. Stark, C.D. Wells, J.P. Fawcett, S. Kulkarni, P. Metalnikov, P. O'Donnell, P. Taylor, L. Taylor, A. Zougman, J.R. Woodgett, L.K. Langeberg, J.D. Scott, and T. Pawson. 2004. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol.* 14:1436-50.
- Kamsteeg, E.J., I. Heijnen, C.H. van Os, and P.M. Deen. 2000. The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers. *J Cell Biol.* 151:919-30.
- Kanelis, V., D. Rotin, and J.D. Forman-Kay. 2001. Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat Struct Biol.* 8:407-12.
- Kaupp, U.B., and R. Seifert. 2001. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol.* 63:235-57.
- Kawasaki, H., G.M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D.E. Housman, and A.M. Graybiel. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.* 282:2275-9.
- Kemp, B.E., D.J. Graves, E. Benjamini, and E.G. Krebs. 1977. Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 252:4888-94.
- Kemp, B.E., and R.B. Pearson. 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci.* 15:342-6.
- Keryer, G., Z. Luo, J.C. Cavadore, J. Erlichman, and M. Bornens. 1993. Phosphorylation of the regulatory subunit of type II beta cAMP-dependent protein kinase by cyclin B/p34cdc2 kinase impairs its binding to microtubule-associated protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5418-22.
- Keryer, G., B.S. Skalhegg, B.F. Landmark, V. Hansson, T. Jahnsen, and K. Tasken. 1999. Differential localization of protein kinase A type II isozymes in the Golgi-centrosomal area. *Exp Cell Res.* 249:131-46.
- Keryer, G., O. Witzak, A. Delouee, W.A. Kemmner, D. Rouillard, K. Tasken, and M. Bornens. 2003. Dissociating the centrosomal matrix protein AKAP450 from centrioles impairs centriole duplication and cell cycle progression. *Mol Biol Cell.* 14:2436-46.
- Keryer, G., M. Yassenko, J.C. Labbe, A. Castro, S.M. Lohmann, D. Evain-Brion, and K. Tasken. 1998. Mitosis-specific phosphorylation and subcellular redistribution of the RIIalpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 273:34594-602.
- Kim, C., C.Y. Cheng, S.A. Saldanha, and S.S. Taylor. 2007. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell.* 130:1032-43.
- Kim, C., N.H. Xuong, and S.S. Taylor. 2005. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science.* 307:690-6.
- Kinderman, F.S., C. Kim, S. von Daake, Y. Ma, B.Q. Pham, G. Spraggon, N.H. Xuong, P.A. Jennings, and S.S. Taylor. 2006. A dynamic mechanism for AKAP binding to RII isoforms of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell.* 24:397-408.
- Kinzel, V., N. Konig, R. Pipkorn, D. Bossemeyer, and W.D. Lehmann. 2000. The amino terminus of PKA catalytic subunit--a site for introduction of posttranslational heterogeneities by deamidation: D-Asp2 and D-isoAsp2 containing isozymes. *Protein Sci.* 9:2269-77.

- Kirschner, L.S., J.A. Carney, S.D. Pack, S.E. Taymans, C. Giatzakis, Y.S. Cho, Y.S. Cho-Chung, and C.A. Stratakis. 2000a. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet.* 26:89-92.
- Kirschner, L.S., F. Sandrini, J. Monbo, J.P. Lin, J.A. Carney, and C.A. Stratakis. 2000b. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet.* 9:3037-46.
- Klauck, T.M., M.C. Faux, K. Labudda, L.K. Langeberg, S. Jaken, and J.D. Scott. 1996. Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science.* 271:1589-92.
- Klink, A., K. Schiebel, M. Winkelmann, E. Rao, B. Horsthemke, H.J. Ludecke, U. Claussen, G. Scherer, and G. Rappold. 1995. The human protein kinase gene PKX1 on Xp22.3 displays Xp/Yp homology and is a site of chromosomal instability. *Hum Mol Genet.* 4:869-78.
- Klumpp, S., M.C. Thissen, and J. Krieglstein. 2006. Protein phosphatases types 2Calpha and 2Cbeta in apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 34:1370-5.
- Klussmann, E., K. Maric, B. Wiesner, M. Beyermann, and W. Rosenthal. 1999. Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J Biol Chem.* 274:4934-8.
- Knighton, D.R., J.H. Zheng, L.F. Ten Eyck, V.A. Ashford, N.H. Xuong, S.S. Taylor, and J.M. Sowadski. 1991a. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* 253:407-14.
- Knighton, D.R., J.H. Zheng, L.F. Ten Eyck, N.H. Xuong, S.S. Taylor, and J.M. Sowadski. 1991b. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* 253:414-20.
- Kopperud, R., A.E. Christensen, E. Kjarland, K. Viste, H. Kleivdal, and S.O. Doskeland. 2002. Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions. *J Biol Chem.* 277:13443-8.
- Kornev, A.P., and S.S. Taylor. 2010. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1804:440-4.
- Kussel-Andermann, P., A. El-Amraoui, S. Safieddine, J.P. Hardelin, S. Nouaille, J. Camonis, and C. Petit. 2000. Unconventional myosin VIIA is a novel A-kinase-anchoring protein. *J Biol Chem.* 275:29654-9.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Landsverk, H.B., C.R. Carlson, R.L. Steen, L. Vossebein, F.W. Herberg, K. Tasken, and P. Collas. 2001. Regulation of anchoring of the RIalpha regulatory subunit of PKA to AKAP95 by threonine phosphorylation of RIalpha: implications for chromosome dynamics at mitosis. *J Cell Sci.* 114:3255-64.
- Lee, D.C., D.F. Carmichael, E.G. Krebs, and G.S. McKnight. 1983. Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:3608-12.
- Lefkowitz, R.J. 2004. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 25:413-22.
- Leon, D.A., F.W. Herberg, P. Banky, and S.S. Taylor. 1997. A stable alpha-helical domain at the N terminus of the RIalpha subunits of cAMP-dependent protein kinase is a novel dimerization/docking motif. *J Biol Chem.* 272:28431-7.
- Levitcki, A. 1988a. From epinephrine to cyclic AMP. *Science.* 241:800-6.
- Levitcki, A. 1988b. Transmembrane signalling to adenylate cyclase in mammalian cells and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem Sci.* 13:298-301.
- Levy, F.O., O. Oyen, M. Sandberg, K. Tasken, W. Eskild, V. Hansson, and T. Jahnsen. 1988. Molecular cloning, complementary deoxyribonucleic acid structure and predicted full-length amino acid sequence of the hormone-inducible regulatory subunit of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase from human testis. *Mol Endocrinol.* 2:1364-73.

- Li, F., M. Gangal, J.M. Jones, J. Deich, K.E. Lovett, S.S. Taylor, and D.A. Johnson. 2000. Consequences of cAMP and catalytic-subunit binding on the flexibility of the A-kinase regulatory subunit. *Biochemistry*. 39:15626-32.
- Li, H., B. Degenhardt, D. Tobin, Z.X. Yao, K. Tasken, and V. Papadopoulos. 2001. Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIalpha)-associated protein. *Mol Endocrinol*. 15:2211-28.
- Li, X., D.P. Hyink, B. Radbill, M. Sudol, H. Zhang, N.N. Zheleznova, and P.D. Wilson. 2009a. Protein kinase-X interacts with Pin-1 and Polycystin-1 during mouse kidney development. *Kidney Int*. 76:54-62.
- Li, Z., J.Y. Liu, and J.T. Zhang. 2009b. 14-3-3sigma, the double-edged sword of human cancers. *Am J Transl Res*. 1:326-40.
- Lim, C.J., J. Han, N. Yousefi, Y. Ma, P.S. Amieux, G.S. McKnight, S.S. Taylor, and M.H. Ginsberg. 2007. Alpha4 integrins are type I cAMP-dependent protein kinase-anchoring proteins. *Nat Cell Biol*. 9:415-21.
- Lim, W.A., F.M. Richards, and R.O. Fox. 1994. Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature*. 372:375-9.
- Liou, Y.C., A. Ryo, H.K. Huang, P.J. Lu, R. Bronson, F. Fujimori, T. Uchida, T. Hunter, and K.P. Lu. 2002. Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:1335-40.
- Liou, Y.C., A. Sun, A. Ryo, X.Z. Zhou, Z.X. Yu, H.K. Huang, T. Uchida, R. Bronson, G. Bing, X. Li, T. Hunter, and K.P. Lu. 2003. Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature*. 424:556-61.
- Liu, J., H. Li, and V. Papadopoulos. 2003. PAP7, a PBR/PKA-RIalpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 85:275-83.
- Lohmann, S.M., P. DeCamilli, I. Einig, and U. Walter. 1984. High-affinity binding of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase to microtubule-associated and other cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:6723-7.
- Lu, K.P., S.D. Hanes, and T. Hunter. 1996. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature*. 380:544-7.
- Lu, P.J., G. Wulf, X.Z. Zhou, P. Davies, and K.P. Lu. 1999a. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*. 399:784-8.
- Lu, P.J., X.Z. Zhou, Y.C. Liou, J.P. Noel, and K.P. Lu. 2002. Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *J Biol Chem*. 277:2381-4.
- Lu, P.J., X.Z. Zhou, M. Shen, and K.P. Lu. 1999b. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science*. 283:1325-8.
- Luttrell, L.M. 2006. Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol*. 332:3-49.
- Lygren, B., C.R. Carlson, K. Santamaria, V. Lissandron, T. McSorley, J. Litzenberg, D. Lorenz, B. Wiesner, W. Rosenthal, M. Zaccolo, K. Tasken, and E. Klussmann. 2007. AKAP complex regulates Ca²⁺ re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 8:1061-7.
- Macias, M.J., M. Hyvonen, E. Baraldi, J. Schultz, M. Sudol, M. Saraste, and H. Oshkinat. 1996. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*. 382:646-9.
- Mackintosh, C. 2004. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J*. 381:329-42.
- Maldonado, F., and S.K. Hanks. 1988. A cDNA clone encoding human cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit C alpha. *Nucleic Acids Res*. 16:8189-90.
- Mangoni, M.E., and J. Nargeot. 2001. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res*. 52:51-64.
- Manni, S., J.H. Mauban, C.W. Ward, and M. Bond. 2008. Phosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulates PKA-AKAP interaction,

- substrate phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells. *J Biol Chem.* 283:24145-54.
- Manning, G., G.D. Plowman, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002a. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci.* 27:514-20.
- Manning, G., D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002b. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298:1912-34.
- Martin, B.R., T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, S.S. Taylor, and R.Y. Tsien. 2007. Isoform-specific PKA dynamics revealed by dye-triggered aggregation and DAKAP1 α -mediated localization in living cells. *Chem Biol.* 14:1031-42.
- Matulef, K., and W.N. Zagotta. 2003. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:23-44.
- Mayer, B.J. 2001. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci.* 114:1253-63.
- Mayer, B.J., M. Hamaguchi, and H. Hanafusa. 1988. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature.* 332:272-5.
- Mhawech, P. 2005. 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res.* 15:228-36.
- Mitsuhashi, S., N. Matsuura, M. Ubukata, H. Oikawa, H. Shima, and K. Kikuchi. 2001. Tautomycetin is a novel and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase type 1, PP1. *Biochem Biophys Res Commun.* 287:328-31.
- Mitsuhashi, S., H. Shima, N. Tanuma, N. Matsuura, M. Takekawa, T. Urano, T. Kataoka, M. Ubukata, and K. Kikuchi. 2003. Usage of tautomycetin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1), reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 in vivo. *J Biol Chem.* 278:82-8.
- Molina, H., D.M. Horn, N. Tang, S. Mathivanan, and A. Pandey. 2007. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:2199-204.
- Mongillo, M., T. McSorley, S. Evellin, A. Sood, V. Lissandron, A. Terrin, E. Huston, A. Hannawacker, M.J. Lohse, T. Pozzan, M.D. Houslay, and M. Zaccolo. 2004. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res.* 95:67-75.
- Moorhead, G.B., V. De Wever, G. Templeton, and D. Kerk. 2009. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J.* 417:401-9.
- Muslin, A.J., J.W. Tanner, P.M. Allen, and A.S. Shaw. 1996. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell.* 84:889-97.
- Muslin, A.J., and H. Xing. 2000. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal.* 12:703-9.
- Neitzel, J.J., W.R. Dostmann, and S.S. Taylor. 1991. Role of MgATP in the activation and reassociation of cAMP-dependent protein kinase I: consequences of replacing the essential arginine in cAMP binding site A. *Biochemistry.* 30:733-9.
- Newlon, M.G., M. Roy, Z.E. Hausken, J.D. Scott, and P.A. Jennings. 1997. The A-kinase anchoring domain of type II α cAMP-dependent protein kinase is highly helical. *J Biol Chem.* 272:23637-44.
- Newlon, M.G., M. Roy, D. Morikis, D.W. Carr, R. Westphal, J.D. Scott, and P.A. Jennings. 2001. A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes. *Embo J.* 20:1651-62.
- Newlon, M.G., M. Roy, D. Morikis, Z.E. Hausken, V. Coghlan, J.D. Scott, and P.A. Jennings. 1999. The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nat Struct Biol.* 6:222-7.
- Nishikawa, K., A. Toker, F.J. Johannes, Z. Songyang, and L.C. Cantley. 1997. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem.* 272:952-60.
- Nolan, M.A., D.F. Babcock, G. Wennemuth, W. Brown, K.A. Burton, and G.S. McKnight. 2004. Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:13483-8.

- Ogreid, D., and S.O. Doskeland. 1981a. The kinetics of association of cyclic AMP to the two types of binding sites associated with protein kinase II from bovine myocardium. *FEBS Lett.* 129:287-92.
- Ogreid, D., and S.O. Doskeland. 1981b. The kinetics of the interaction between cyclic AMP and the regulatory moiety of protein kinase II. Evidence for interaction between the binding sites for cyclic AMP. *FEBS Lett.* 129:282-6.
- Olsen, S.R., and M.D. Uhler. 1989. Affinity purification of the C alpha and C beta isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 264:18662-6.
- Orstavik, S., N. Reinton, E. Frengen, B.T. Langeland, T. Jahnsen, and B.S. Skalhegg. 2001. Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit Cbeta of cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem.* 268:5066-73.
- Oyen, O., A. Froyso, M. Sandberg, W. Eskild, D. Joseph, V. Hansson, and T. Jahnsen. 1987. Cellular localization and age-dependent changes in mRNA for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases in rat testis. *Biol Reprod.* 37:947-56.
- Oyen, O., F. Myklebust, J.D. Scott, V. Hansson, and T. Jahnsen. 1989. Human testis cDNA for the regulatory subunit RII alpha of cAMP-dependent protein kinase encodes an alternate amino-terminal region. *FEBS Lett.* 246:57-64.
- Parker, P.J., and S.J. Parkinson. 2001. AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochem Soc Trans.* 29:860-3.
- Pastorino, L., A. Sun, P.J. Lu, X.Z. Zhou, M. Balastik, G. Finn, G. Wulf, J. Lim, S.H. Li, X. Li, W. Xia, L.K. Nicholson, and K.P. Lu. 2006. The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature.* 440:528-34.
- Pawson, T., and P. Nash. 2000. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* 14:1027-47.
- Pawson, T., and J.D. Scott. 2005. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci.* 30:286-90.
- Pidoux, G., and K. Tasken. 2010. Specificity and spatial dynamics of PKA signaling organized by A kinase anchoring proteins. *J Mol Endocrinol.*
- Pozuelo Rubio, M., K.M. Geraghty, B.H. Wong, N.T. Wood, D.G. Campbell, N. Morrice, and C. Mackintosh. 2004. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J.* 379:395-408.
- Pozuelo Rubio, M., M. Peggie, B.H. Wong, N. Morrice, and C. MacKintosh. 2003. 14-3-3s regulate fructose-2,6-bisphosphate levels by binding to PKB-phosphorylated cardiac fructose-2,6-bisphosphate kinase/phosphatase. *Embo J.* 22:3514-23.
- Prinz, A., M. Diskar, A. Erlbruch, and F.W. Herberg. 2006. Novel, isotype-specific sensors for protein kinase A subunit interaction based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Cell Signal.* 18:1616-25.
- Rall, T.W., and E.W. Sutherland. 1958. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem.* 232:1065-76.
- Rangel-Aldao, R., J.W. Kupiec, and O.M. Rosen. 1979. Resolution of the phosphorylated and dephosphorylated cAMP-binding proteins of bovine cardiac muscle by affinity labeling and two-dimensional electrophoresis. *J Biol Chem.* 254:2499-508.
- Rangel-Aldao, R., and O.M. Rosen. 1976a. Dissociation and reassociation of the phosphorylated and nonphosphorylated forms of adenosine 3':5' -monophosphate-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem.* 251:3375-80.
- Rangel-Aldao, R., and O.M. Rosen. 1976b. Mechanism of self-phosphorylation of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem.* 251:7526-9.
- Rangel-Aldao, R., and O.M. Rosen. 1977. Effect of cAMP and ATP on the reassociation of phosphorylated and nonphosphorylated subunits of the cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem.* 252:7140-5.
- Rao, Y., Q.S. Fischer, Y. Yang, G.S. McKnight, A. LaRue, and N.W. Daw. 2004. Reduced ocular dominance plasticity and long-term potentiation in the developing visual cortex of protein kinase A RII alpha mutant mice. *Eur J Neurosci.* 20:837-42.

- Reimann, E.M., C.O. Brostrom, J.D. Corbin, C.A. King, and E.G. Krebs. 1971a. Separation of regulatory and catalytic subunits of the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase(s) of rabbit skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 42:187-94.
- Reimann, E.M., D.A. Walsh, and E.G. Krebs. 1971b. Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 246:1986-95.
- Reinton, N., P. Collas, T.B. Haugen, B.S. Skalhegg, V. Hansson, T. Jahnsen, and K. Tasken. 2000. Localization of a novel human A-kinase-anchoring protein, hAKAP220, during spermatogenesis. *Dev Biol.* 223:194-204.
- Ren, R., B.J. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science.* 259:1157-61.
- Rich, T.C., K.A. Fagan, T.E. Tse, J. Schaack, D.M. Cooper, and J.W. Karpen. 2001. A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13049-54.
- Robidoux, J., T.L. Martin, and S. Collins. 2004. Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:297-323.
- Robinson-Steiner, A.M., S.J. Beebe, S.R. Rannels, and J.D. Corbin. 1984. Microheterogeneity of type II cAMP-dependent protein kinase in various mammalian species and tissues. *J Biol Chem.* 259:10596-605.
- Rogers, K.V., L.F. Boring, G.S. McKnight, and C.H. Clegg. 1992. Promoter for the regulatory type I beta subunit of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase directs transgene expression in the central nervous system. *Mol Endocrinol.* 6:1756-65.
- Roscioni, S.S., C.R. Elzinga, and M. Schmidt. 2008. Epac: effectors and biological functions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 377:345-57.
- Roskoski, R., Jr. 1983. Assays of protein kinase. *Methods Enzymol.* 99:3-6.
- Sandberg, M., F.O. Levy, O. Oyen, V. Hansson, and T. Jahnsen. 1988. Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for the hormone-induced regulatory subunit (RII beta) of cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 154:705-11.
- Sandberg, M., K. Tasken, O. Oyen, V. Hansson, and T. Jahnsen. 1987. Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from human testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 149:939-45.
- Sastri, M., D.M. Barraclough, P.T. Carmichael, and S.S. Taylor. 2005. A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:349-54.
- Schiebel, K., A. Mertz, M. Winkelmann, B. Glaser, W. Schempp, and G. Rappold. 1997a. FISH localization of the human Y-homolog of protein kinase PRKX (PRKY) to Yp11.2 and two pseudogenes to 15q26 and Xq12-->q13. *Cytogenet Cell Genet.* 76:49-52.
- Schiebel, K., M. Winkelmann, A. Mertz, X. Xu, D.C. Page, D. Weil, C. Petit, and G.A. Rappold. 1997b. Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue, PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females. *Hum Mol Genet.* 6:1985-9.
- Schillace, R.V., and J.D. Scott. 1999. Association of the type 1 protein phosphatase PP1 with the A-kinase anchoring protein AKAP220. *Curr Biol.* 9:321-4.
- Schmidt, P.H., D.T. Dransfield, J.O. Claudio, R.G. Hawley, K.W. Trotter, S.L. Milgram, and J.R. Goldenring. 1999. AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *J Biol Chem.* 274:3055-66.
- Schreyer, S.A., D.E. Cummings, G.S. McKnight, and R.C. LeBoeuf. 2001. Mutation of the RIIBeta subunit of protein kinase A prevents diet-induced insulin resistance and dyslipidemia in mice. *Diabetes.* 50:2555-62.
- Schwarz, S., B. Hufnagel, M. Dworak, S. Klumpp, and J. Kriegstein. 2006. Protein phosphatase type 2Calpha and 2Cbeta are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial cells. *Apoptosis.* 11:1111-9.
- Schwede, F., A. Christensen, S. Liauw, T. Hippe, R. Kopperud, B. Jastorff, and S.O. Doskeland. 2000a. 8-Substituted cAMP analogues reveal marked differences in adaptability, hydrogen bonding, and charge accommodation between homologous binding sites (AI/AII and BI/BII) in cAMP kinase I and II. *Biochemistry.* 39:8803-12.

- Schwede, F., E. Maronde, H. Genieser, and B. Jastorff. 2000b. Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacol Ther.* 87:199-226.
- Schweinsberg, S., D. Moll, N.C. Burghardt, C. Hahnefeld, F. Schwede, B. Zimmermann, S. Drewianka, L. Werner, F. Kleinjung, H.G. Genieser, J. Schuchhardt, and F.W. Herberg. 2008. Systematic interpretation of cyclic nucleotide binding studies using KinetXBase. *Proteomics.* 8:1212-20.
- Scott, C.W., and M.C. Mumby. 1989. Autophosphorylation of rat liver type II cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol.* 3:1815-22.
- Scott, J.D., M.B. Glaccum, M.J. Zoller, M.D. Uhler, D.M. Helfman, G.S. McKnight, and E.G. Krebs. 1987. The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:5192-6.
- Scott, J.D., R.E. Stofko, J.R. McDonald, J.D. Comer, E.A. Vitalis, and J.A. Mangili. 1990. Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 265:21561-6.
- Shabb, J.B., and J.D. Corbin. 1992. Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J Biol Chem.* 267:5723-6.
- Showers, M.O., and R.A. Maurer. 1986. A cloned bovine cDNA encodes an alternate form of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 261:16288-91.
- Shuntoh, H., N. Sakamoto, S. Matsuyama, M. Saitoh, and C. Tanaka. 1992. Molecular structure of the C beta catalytic subunit of rat cAMP-dependent protein kinase and differential expression of C alpha and C beta isoforms in rat tissues and cultured cells. *Biochim Biophys Acta.* 1131:175-80.
- Skalhegg, B.S., B. Landmark, K.B. Foss, S.M. Lohmann, V. Hansson, T. Lea, and T. Jahnsen. 1992. Identification, purification, and characterization of subunits of cAMP-dependent protein kinase in human testis. Reverse mobilities of human RII alpha and RII beta on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis compared with rat and bovine RIIs. *J Biol Chem.* 267:5374-9.
- Skalhegg, B.S., and K. Tasken. 1997. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 2:d331-42.
- Skalhegg, B.S., and K. Tasken. 2000. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 5:D678-93.
- Solberg, R., M. Sandberg, V. Natarajan, P.A. Torjesen, V. Hansson, T. Jahnsen, and K. Tasken. 1997. The human gene for the regulatory subunit RI alpha of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase: two distinct promoters provide differential regulation of alternately spliced messenger ribonucleic acids. *Endocrinology.* 138:169-81.
- Solberg, R., K. Tasken, A. Keiserud, and T. Jahnsen. 1991. Molecular cloning, cDNA structure and tissue-specific expression of the human regulatory subunit RI beta of cAMP-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 176:166-72.
- Stahl, M.L., C.R. Ferenz, K.L. Kelleher, R.W. Kriz, and J.L. Knopf. 1988. Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature.* 332:269-72.
- Staub, O., S. Dho, P. Henry, J. Correa, T. Ishikawa, J. McGlade, and D. Rotin. 1996. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *Embo J.* 15:2371-80.
- Steen, R.L., M. Beullens, H.B. Landsverk, M. Bollen, and P. Collas. 2003. AKAP149 is a novel PP1 specifier required to maintain nuclear envelope integrity in G1 phase. *J Cell Sci.* 116:2237-46.
- Steen, R.L., S.B. Martins, K. Tasken, and P. Collas. 2000. Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol.* 150:1251-62.
- Stenberg, E., Perrson, H., Roos, H., Urbaniczky, C. 1991. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* 143:513-526.

- Su, Y., W.R. Dostmann, F.W. Herberg, K. Durick, N.H. Xuong, L. Ten Eyck, S.S. Taylor, and K.I. Varughese. 1995. Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science*. 269:807-13.
- Sudol, M., H.I. Chen, C. Bougeret, A. Einbond, and P. Bork. 1995. Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett*. 369:67-71.
- Sudol, M., K. Sliwa, and T. Russo. 2001. Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett*. 490:190-5.
- Sultana, R., D. Boyd-Kimball, H.F. Poon, J. Cai, W.M. Pierce, J.B. Klein, W.R. Markesbery, X.Z. Zhou, K.P. Lu, and D.A. Butterfield. 2006. Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis. *Neurobiol Aging*. 27:918-25.
- Sutherland, E.W., and T.W. Rall. 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem*. 232:1077-91.
- Switzer, R.C., 3rd, C.R. Merrill, and S. Shifrin. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 98:231-7.
- Szentesi, P., C. Pignier, M. Egger, E.G. Kranias, and E. Niggli. 2004. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling controls recovery from Ca²⁺-induced Ca²⁺ release refractoriness in heart muscle. *Circ Res*. 95:807-13.
- Takahashi, M., H. Shibata, M. Shimakawa, M. Miyamoto, H. Mukai, and Y. Ono. 1999. Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem*. 274:17267-74.
- Takio, K., S.B. Smith, E.G. Krebs, K.A. Walsh, and K. Titani. 1984. Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry*. 23:4200-6.
- Takio, K., K.A. Walsh, H. Neurath, S.B. Smith, E.G. Krebs, and K. Titani. 1980. The amino acid sequence of a hinge region in the regulatory subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase II. *FEBS Lett*. 114:83-8.
- Tanji, C., H. Yamamoto, N. Yorioka, N. Kohno, K. Kikuchi, and A. Kikuchi. 2002. A-kinase anchoring protein AKAP220 binds to glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) and mediates protein kinase A-dependent inhibition of GSK-3beta. *J Biol Chem*. 277:36955-61.
- Tasken, K., and E.M. Aandahl. 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*. 84:137-67.
- Tasken, K., B.S. Skalhegg, R. Solberg, K.B. Andersson, S.S. Taylor, T. Lea, H.K. Blomhoff, T. Jahnsen, and V. Hansson. 1993. Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *J Biol Chem*. 268:21276-83.
- Taylor, S.S. 1989. cAMP-dependent protein kinase. Model for an enzyme family. *J Biol Chem*. 264:8443-6.
- Taylor, S.S., J.A. Buechler, and W. Yonemoto. 1990. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*. 59:971-1005.
- Taylor, S.S., C. Kim, D. Vigil, N.M. Haste, J. Yang, J. Wu, and G.S. Anand. 2005. Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta*. 1754:25-37.
- Tholey, A., R. Pipkorn, D. Bossemeyer, V. Kinzel, and J. Reed. 2001. Influence of myristoylation, phosphorylation, and deamidation on the structural behavior of the N-terminus of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*. 40:225-31.
- Thomis, D.C., G. Floyd-Smith, and C.E. Samuel. 1992. Mechanism of interferon action. cDNA structure and regulation of a novel splice-site variant of the catalytic subunit of human protein kinase A from interferon-treated human cells. *J Biol Chem*. 267:10723-8.
- Thullner, S., F. Gesellchen, S. Wiemann, W. Pyerin, V. Kinzel, and D. Bossemeyer. 2000. The protein kinase A catalytic subunit Cbeta2: molecular characterization and distribution of the splice variant. *Biochem J*. 351:123-32.
- Titani, K., T. Sasagawa, L.H. Ericsson, S. Kumar, S.B. Smith, E.G. Krebs, and K.A. Walsh. 1984. Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry*. 23:4193-9.

- Toner-Webb, J., S.M. van Patten, D.A. Walsh, and S.S. Taylor. 1992. Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 267:25174-80.
- Tran, T., S. Hoffmann, K. Wiesehan, E. Jonas, C. Luge, A. Aladag, and D. Willbold. 2005. Insights into human Lck SH3 domain binding specificity: different binding modes of artificial and native ligands. *Biochemistry.* 44:15042-52.
- Trendelenburg, G., M. Hummel, E.O. Riecken, and C. Hanski. 1996. Molecular characterization of AKAP149, a novel A kinase anchor protein with a KH domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 225:313-9.
- Trotter, K.W., I.D. Fraser, G.K. Scott, M.J. Stutts, J.D. Scott, and S.L. Milgram. 1999. Alternative splicing regulates the subcellular localization of A-kinase anchoring protein 18 isoforms. *J Cell Biol.* 147:1481-92.
- Uhler, M.D., D.F. Carmichael, D.C. Lee, J.C. Chrivia, E.G. Krebs, and G.S. McKnight. 1986a. Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:1300-4.
- Uhler, M.D., J.C. Chrivia, and G.S. McKnight. 1986b. Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 261:15360-3.
- van Hemert, M.J., H.Y. Steensma, and G.P. van Heusden. 2001. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays.* 23:936-46.
- Verdecia, M.A., M.E. Bowman, K.P. Lu, T. Hunter, and J.P. Noel. 2000. Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol.* 7:639-43.
- Vereb, G., F. Erdodi, B. Toth, and G. Bot. 1986. Regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase as substrate and inhibitor of protein phosphatase-1 and -2A. *FEBS Lett.* 197:139-42.
- Vigil, D., D.K. Blumenthal, S. Brown, S.S. Taylor, and J. Trehwella. 2004a. Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. *Biochemistry.* 43:5629-36.
- Vigil, D., D.K. Blumenthal, W.T. Heller, S. Brown, J.M. Canaves, S.S. Taylor, and J. Trehwella. 2004b. Conformational differences among solution structures of the type Ialpha, IIalpha and IIbeta protein kinase A regulatory subunit homodimers: role of the linker regions. *J Mol Biol.* 337:1183-94.
- Vigil, D., D.K. Blumenthal, S.S. Taylor, and J. Trehwella. 2006. Solution scattering reveals large differences in the global structures of type II protein kinase A isoforms. *J Mol Biol.* 357:880-9.
- Viste, K., R.K. Kopperud, A.E. Christensen, and S.O. Doskeland. 2005. Substrate enhances the sensitivity of type I protein kinase A to cAMP. *J Biol Chem.* 280:13279-84.
- Walsh, D.A., C.D. Ashby, C. Gonzalez, D. Calkins, and E.H. Fischer. 1971. Krebs EG: Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 246:1977-85.
- Walsh, D.A., J.P. Perkins, and E.G. Krebs. 1968. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem.* 243:3763-5.
- Weber, W., G. Schwach, and H. Hilz. 1982. Isolation of a 50,000 dalton cAMP binding protein and its characterization as a regulatory subunit of protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 104:1134-41.
- Weitz, D., N. Ficek, E. Kremmer, P.J. Bauer, and U.B. Kaupp. 2002. Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron.* 36:881-9.
- Wen, W., J.L. Meinkoth, R.Y. Tsien, and S.S. Taylor. 1995. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell.* 82:463-73.
- Wen, W., and S.S. Taylor. 1994. High affinity binding of the heat-stable protein kinase inhibitor to the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase is selectively abolished by mutation of Arg133. *J Biol Chem.* 269:8423-30.
- Westphal, R.S., S.J. Tavalin, J.W. Lin, N.M. Alto, I.D. Fraser, L.K. Langeberg, M. Sheng, and J.D. Scott. 1999. Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science.* 285:93-6.
- Whitehouse, S., and D.A. Walsh. 1983. Mg X ATP2-dependent interaction of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase with the catalytic subunit. *J Biol Chem.* 258:3682-92.

- Wiemann, S., V. Kinzel, and W. Pyerin. 1991. Isoform C beta 2, an unusual form of the bovine catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 266:5140-6.
- Willard, F.S., and D.P. Siderovski. 2006. Covalent immobilization of histidine-tagged proteins for surface plasmon resonance. *Anal Biochem.* 353:147-9.
- Witczak, O., B.S. Skalhegg, G. Keryer, M. Bornens, K. Tasken, T. Jahnsen, and S. Orstavik. 1999. Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *Embo J.* 18:1858-68.
- Wong, W., and J.D. Scott. 2004. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:959-70.
- Wu, J., S.H. Brown, S. von Daake, and S.S. Taylor. 2007. PKA type IIalpha holoenzyme reveals a combinatorial strategy for isoform diversity. *Science.* 318:274-9.
- Yaffe, M.B., K. Rittinger, S. Volinia, P.R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S.J. Gamblin, S.J. Smerdon, and L.C. Cantley. 1997a. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell.* 91:961-71.
- Yaffe, M.B., M. Schutkowski, M. Shen, X.Z. Zhou, P.T. Stukenberg, J.U. Rahfeld, J. Xu, J. Kuang, M.W. Kirschner, G. Fischer, L.C. Cantley, and K.P. Lu. 1997b. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science.* 278:1957-60.
- Yeagle, P.L., and A.D. Albert. 2003. A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor. *Biochemistry.* 42:1365-8.
- Yonemoto, W., M.L. McGlone, and S.S. Taylor. 1993. N-myristylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase conveys structural stability. *J Biol Chem.* 268:2348-52.
- Zaccolo, M., G. Di Benedetto, V. Lissandron, L. Mancuso, A. Terrin, and I. Zamparo. 2006. Restricted diffusion of a freely diffusible second messenger: mechanisms underlying compartmentalized cAMP signalling. *Biochem Soc Trans.* 34:495-7.
- Zaccolo, M., and T. Pozzan. 2002. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science.* 295:1711-5.
- Zakhary, D.R., M.A. Fink, M.L. Ruehr, and M. Bond. 2000a. Selectivity and regulation of A-kinase anchoring proteins in the heart. The role of autophosphorylation of the type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 275:41389-95.
- Zakhary, D.R., C.S. Moravec, and M. Bond. 2000b. Regulation of PKA binding to AKAPs in the heart: alterations in human heart failure. *Circulation.* 101:1459-64.
- Zhang, W., G.Z. Morris, and S.J. Beebe. 2004. Characterization of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Cgamma expressed and purified from sf9 cells. *Protein Expr Purif.* 35:156-69.
- Zheng, J., D.R. Knighton, N.H. Xuong, S.S. Taylor, J.M. Sowadski, and L.F. Ten Eyck. 1993. Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci.* 2:1559-73.
- Zheng, L., L. Yu, Q. Tu, M. Zhang, H. He, W. Chen, J. Gao, J. Yu, Q. Wu, and S. Zhao. 2000. Cloning and mapping of human PKIB and PKIG, and comparison of tissue expression patterns of three members of the protein kinase inhibitor family, including PKIA. *Biochem J.* 349:403-7.
- Zimmermann, B., J.A. Chiorini, Y. Ma, R.M. Kotin, and F.W. Herberg. 1999. PrKX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I. *J Biol Chem.* 274:5370-8.
- Zimmermann, B., S. Schweinsberg, S. Drewianka, and F.W. Herberg. 2008. Effect of metal ions on high-affinity binding of pseudosubstrate inhibitors to PKA. *Biochem J.* 413:93-101.

8. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

8-AHA-cAMP	8-(6-Aminohexylamino)adenosin-3', 5'- zyklomonophosphat
8-Br-cAMP	8-Bromoadenosin- 3', 5'- zyklomonophosphat
8-Br-cAMP-AM	8-Bromoadenosin- 3', 5'- zyklomonophosphat, Azetoxymethylester
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AKAP	A-Kinase Ankerprotein
AKIP	A-Kinase Interaktionsprotein
Amp ^r	Ampizillin-Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
b	bovin, aus dem Rind (<i>Bos taurus</i>)
BRET	<i>bioluminescence resonance energy transfer</i> = Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
BSA	Bovines Serumalbumin
C Untereinheit	katalytische Untereinheit der PKA
cAMP	Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
CNB	<i>cyclic nucleotide binding domain</i> = Zyklonukleotid- Bindedomäne
CNB-A	Zyklonukleotid-Bindedomäne A, in der regulatorischen Untereinheit der PKA
CNB-B	Zyklonukleotid-Bindedomäne B, in der regulatorischen Untereinheit der PKA
CNG	<i>cyclic nucleotide-gated ion channel</i>
COS-7	Nierenfibroblastenzellen aus <i>Cercopithecus aethiops</i> , CRL- 1651
C-Terminus	Carboxyterminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-PBS	<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EPAC	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i> = zyklonukleotidregulierter Guaninnukleotid-Austauschfaktor
FSK	Forskolin, Adenylylzyklasenaktivator
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> = G-Protein gekoppelter Rezeptor
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
G α	α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins
G α_i	inhibitorische α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins

G α_s	stimulierende α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins
h	human, aus dem Menschen (<i>Homo sapiens</i>)
H89	ein unspezifischer PKA- und Rho-Kinase-Inhibitor
HCN	<i>hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-modulated ion channel</i>
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen, Henrietta Lacks, CCL-2
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
His ₆	Hexahistidin- <i>tag</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin, unspezifischer Phosphodiesterasehemmer
k _a	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
K _{act}	Aktivierungskonstante
kb	Kilobase
k _d	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
min	Minute
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
NES	<i>nuclear export signal</i> = nukleäres Exportsignal
NHS	<i>N</i> -hydroxysulfosuccinimid
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NTA	<i>nickel nitrilo-triacetic acid</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDE	Phosphodiesterase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase G
PKI	hitze- und säurestabiler Proteinkinaseinhibitor
PrKX	Proteinkinase X
PrKY	Proteinkinase Y
r	aus der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)
R Untereinheit	regulatorische Untereinheit der PKA
RLuc	Luziferase aus <i>Renilla reniformis</i>
Rp8Br-cAMPS	8-Bromoadenosin- 3', 5'- zyklomonophosphorothioat, Rp-Isomer
RT	Raumtemperatur
RU	<i>resonance units</i>
SD	<i>standard deviation</i> = Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sp-8-AHA-cAMPS	8-(2-Aminoethylamino)adenosin- 3', 5'-zyklomonophosphorothioat, Sp-Isomer
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> = Oberflächenplasmonresonanz
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Publikationen

Molecular basis for isoform-specific autoregulation of protein kinase A.

Diskar, M., H.M. Zenn, A. Kaupisch, A. Prinz, and F.W. Herberg (2007)

Cell Signal. 19:2024-34.

Glycogen synthase kinase 3beta interaction protein functions as an A-kinase anchoring protein.

Hundsrucker, C., P. Skroblin, F. Christian, H.M. Zenn, V. Popara, M. Joshi, J. Eichhorst,

B. Wiesner, F.W. Herberg, B. Reif, W. Rosenthal, and E. Klussmann (2010)

J Biol Chem. 285:5507-21

Buchartikel

Anti-Histidine Antibodies as Tools for Reversible Capturing of His-Tagged Fusion Proteins for Subsequent Binding Analysis

H.M. Zenn, S. Hutschenreiter, and F.W. Herberg

Antibody Engineering, R. Kontermann and S. Dübel (eds.)

Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010 (in press)

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Friedrich W. Herberg für die Möglichkeit, sowohl meine Diplom- als auch meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ich danke für die Freiheiten, alles ausprobieren zu dürfen, ohne dass es gleich funktionieren musste.

An dieser Stelle danke ich Dr. Enno Klußmann, nicht nur für das Begutachten dieser Arbeit, sondern auch für die langjährige und erfolgreiche Kooperation.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Mireille A. Schäfer und bei Prof. Dr. Wolfgang Nellen bedanken, dass sie sich bereit erklärt haben, meine Dritt- und Viertprüfer zu sein.

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Anke Prinz und Dr. Mandy Diskar. Ohne euch wäre es schon Mittwoch, und ich hätte noch immer nichts geschafft. Ich danke euch für den Spaß an unserer Arbeit, den unbändigen Enthusiasmus und die vielen Ideen.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit und dafür, dass jeder seine Expertisen mit den anderen geteilt hat.

Allen Mitarbeitern der Biaffin GmbH & Co KG danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit so manches Mal meine Zelte bei ihnen aufzuschlagen zu dürfen.

Mein größter Dank gilt meiner kleinen und nicht mehr so kleinen Familie.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den in dieser Arbeit angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche gekennzeichnet. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, den

Hans-Michael Zenn