

ANALISIS URUTAN NUKLEOTIDA DAN EKSPRESI DARI MUSCLE A-KINASE ANCHORING PROTEIN (mAKAP) MENUNJUKKAN KEMUNGKINAN FUNGSI mAKAP PADA DIFERENSIASI KARDIOSIT: PERBANDINGAN EKSPRESI mAKAP PADA JANTUNG MDX DAN KONTROL

(DOMAIN ARCHITECTURE AND EXPRESSION OF mAKAP SUGGEST ITS ROLE IN CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION: COMPARISON mAKAP EXPRESSION IN MDX AND CONTROL HEARTS)

Mohammad Saifur Rohman
Laboratorium Biokimia FK Unibraw Malang

ABSTRACT

Muscle A-Kinase Anchoring Protein (mAKAP) is an A-kinase anchoring protein (AKAP) which targets cAMP-dependent protein kinase (PKA) to the nuclear envelope. mAKAP not only binds to PKA, but also to the ryanodine receptor (RyR2) and the rolipram-inhibited cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4D3). Amino acid sequence analysis revealed that mAKAP possesses LXCXE and FYDYSYL, the consensus-binding domain of pRB and CBP/p300, respectively. pRB and CBP/p300 are known as a key components in cardiomyocyte differentiation processes. Northern blot analysis revealed that mAKAP was expressed in a 13 day old rat heart and its expression increased by 15 days of age when cardiomyocytes reveal a terminal differentiation phenotype. In cultured cardiomyocytes mAKAP was expressed in differentiated but not undifferentiated. Accordingly, mAKAP may play a role in the terminal differentiation process through pRB-CBP/p300 functions. Furthermore, we observed mAKAP expression in old mdx heart, a mouse model of Duchenne muscular dystrophy, compared to control mice. In the control heart, mAKAP transcripts were detected at 6-, 20-, 64- and 76-weeks of age. However, mAKAP expression significantly appeared only in 64- and 76-week old mdx hearts. Delayed mAKAP expression in mdx may contribute to impaired function of pRB, CBP/p300, cAMP and Ca²⁺ complex.

Key words: mAKAP, domain architecture, terminal differentiation, pRB, CBP/p300, mdx.

PENDAHULUAN

A-kinase Anchoring protein (AKAP) adalah kelompok protein protein yang secara fungsional mempunyai fungsi yang hampir sama yaitu kemampuan protein tersebut untuk menangkap molekul PKA, cAMP-dependent protein kinase. PKA adalah protein yang mempunyai kemampuan untuk melakukan aktivasi sebuah molekul dengan cara fosforilasi. PKA membutuhkan cAMP untuk melakukan aktifitas tersebut. AKAP mempunyai urutan asam amino yang khas yang dapat dikenali PKA sehingga PKA dapat diikat oleh AKAP sesuai dengan lokalisasi subseluler dari masing masing A-kinase Anchoring protein (AKAP). Hingga saat ini sudah diketemukan banyak AKAP yang tersebar di mitokondria, membran plasma, *sarcoplasmic reticulum* dan membran inti. AKAP mempunyai dua fungsi yaitu untuk menempatkan PKA pada lokasi untuk secara cepat signal dari cAMP dan untuk menjamin berlangsungnya fosforilasi dengan cara mendekatkan PKA dengan molekul targetnya sesuai dengan tempat lokasi dari AKAP di dalam ruang subseluler (1,2). Oleh karena itu disamping dapat mengikat PKA, AKAP juga mengikat molekul yang menjadi target untuk difosforilasi oleh PKA. Semakin banyak penelitian akhir akhir ini yang membuktikan bahwa AKAP berfungsi sebagai protein yang menjembatani signal cAMP kepada target sasarannya. Bahkan AKAP tidak hanya membantu cAMP signaling namun juga sebagai signal yang lain

seperti kalsium intra sel (3,4).

Muscle A-Kinase Anchoring Protein (mAKAP) adalah anggota dari AKAP yang terdapat di sel otot jantung maupun otot rangka. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa mAKAP mempunyai sifat yang hampir sama dengan anggota AKAP yang lain dalam hal kemampuannya untuk berikatan dengan PKA (5). mAKAP tidak hanya dapat mengikat PKA namun dapat pula berikatan ryanodine receptor (RyR2) dan rolipram-inhibited cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4D3) yang secara spesifik dapat dihambat oleh rolipram di membran inti sel. RyR2 adalah sebuah molekul yang berfungsi untuk mengeluarkan kalsium dari *sarcoplasmic reticulum* ke sitoplasma sehingga menimbulkan kontraksi otot jantung. Sedangkan PDE4D3 adalah protein golongan phosphodiesterase yang me-degradasi cAMP sehingga menjaga keseimbangan kadar cAMP di dalam sel. Oleh karena itu mAKAP dapat berfungsi sebagai protein yang menjembatani antara signal cAMP dan kalsium (6,7,8). Mengingat fisiologis fungsi utama AKAP adalah membantu signaling ditempat terdekatnya, maka keberadaan mAKAP di membran inti membuat suatu hipotesis bahwa mAKAP mempunyai peran penting pada proses yang terjadi di inti, terutama yang berkaitan dengan sel otot. Untuk membuktikan hipotesis tersebut diteliti urutan nukleotida dari mAKAP yang dapat menggambarkan adanya urutan nukleotida atau asam amino tertentu yang khas untuk terjadinya ikatan dengan molekul tertentu.

Dari hasil penelusuran urutan nukleotida seluruh bagian dari DNA mAKAP, ditemukan bahwa mAKAP mempunyai urutan asam amino dimana retinoblastoma protein (pRB) dan CBP/p300 terikat. pRB dan CBP/p300 adalah molekul yang sangat penting untuk proses diferensiasi suatu sel, sehingga penemuan ini

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XX, No.1, April 2004.
Korespondensi: Mohammad Saifur Rohman; FK Unibraw; Jl. Veteran
Malang-65145; telp. (0341) 580993,567192 fax.(0341) 564755;
ippoenk@yahoo.com

memperkuat dugaan bahwa mAKAP terlibat pada proses diferensiasi sel otot. Karena adanya dugaan proses regenerasi atau keterlambatan proses diferensiasi terminal dari sel otot rangka pada mdx, model tikus dari penderita kelainan *neuromuscular duchenne muscular dystrophy* (DMD), maka dibandingkan ekspresi mAKAP di jantung mdx dan kontrol. Ditemukan keterlambatan ekspresi mAKAP di jantung mdx dibandingkan dengan kontrol pada usia yang setara. Keterlambatan ekspresi mAKAP pada jantung ini dapat menyebabkan terganggunya fungsi pRB, CBP/p300, cAMP dan Ca^{2+} multi-unit signaling.

METODOLOGI

Isolasi RNA dan Kultur Sel Otot Jantung (Kardiomiosit)

Total RNA diambil dari jantung mencit tipe *Sprague-Dawley* (SD rat), tikus jenis C6Bl dan mdx dengan larutan isogen (Nippon gene). Sel kultur kardiomiosit disiapkan dari jantung mencit berumur 2-3 hari dengan kepadatan 4.5×10^6 sel per 10 cm dish seperti yang dijelaskan pada jurnal sebelumnya (9). Setelah 1 hari satu plate di ambil dan dilihat derajat diferensiasinya sedangkan sisanya dibiarkan hingga hari ketiga sampai terlihat hampir semua sel terdiferensiasi.

Northern blot

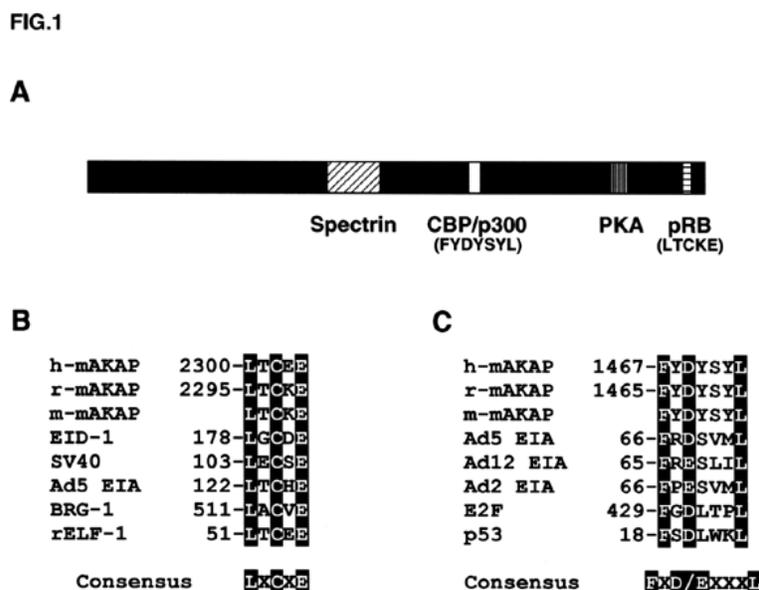
Total RNA dari control dan mdx dimasukkan ke dalam gel yang mengandung formaldehyde untuk dilakukan elektroforesis selama 2 jam, hingga RNA dapat terpisah secara sempurna. Setelah itu RNA yang ada di gel ditransfer ke membran yang terbuat dari nilon bermuatan positif (Boehringer Mannheim) dengan cara semi kering dan dibiarkan selama semalam. Kemudian dilakukan UV crosslink untuk menjamin agar RNA dapat tetap kuat menempel pada membran. Untuk membuat probe mAKAP dirancang primer sbb; 5'-ACCGCATTTGAAGTCTCCGAC-3' yang merupakan nukleotida urutan ke 800-820 dari rat mAKAP dan 5'-AATCTGTTTCTGGTCTCATCGTGG-3' sesuai dengan urutan nukleotida ke 1766-1743 dari rat mAKAP mRNA (Accession number AF 139518). Probe kemudian di label dengan menggunakan [P^{32}]. Membran dan larutan hibridisasi dimasukkan ke dalam tube. Hibridisasi dilakukan di dalam inkubator dengan suhu 68°C selama 1 jam dengan menggunakan larutan hibridisasi dari stratagen. Membran kemudian di cuci dengan larutan yang mengandung 2x SSC and 0.1% SDS selama 2 X 15 menit di suhu ruangan dua kali dan selanjutnya dicuci dengan 0.1% SSC and 0.1 % SDS selama 2x 15 menit pada 60°C untuk menghilangkan artefak/background. Pengukuran secara semikuantitatif dari hasil hibridisasi diukur dengan menggunakan software FUJIX Bas2000 image scanner EWS. Seluruh perhitungan di normalisasi dengan GAPDH housekeeping gene, untuk menghindari kesalahan karena ketidaksamaan jumlah RNA yang di ukur setiap sampel. Data urutan nukleotida yang dipakai pada penelitian ini diambil dari *GenBank*, *Homo sapiens* mAKAP, U17195 dan *Rattus norvegicus* mAKAP, Accession number AF139518. Untuk menkonfirmasi hasil temuan consensus urutan asam amino LXCXE dan FXD/EXXXL dipakai PATTINPROT, sebuah analisis dari urutan asam amino yang disediakan oleh Pole Bio-Informatique Lyonais.

HASIL PENELITIAN

Muscle A-Kinase Anchoring Protein (mAKAP) mempunyai LXCXE dan FXD/EXXXL yang merupakan consensus urutan asam amino tempat terikatnya pRB dan CBP/p300

Fungsi utama dari golongan AKAP adalah mendekatkan PKA pada molekul sasarannya di tempat sesuai AKAP berada di bagian tertentu di dalam sel (10). Mengingat lokasi subseluler dari mAKAP di membran inti sel, penelitian ini berupaya mencari kemungkinan fungsi mAKAP yang berhubungan dengan fungsi inti sel. Untuk itu langkah pertama yang diambil adalah mencari consensus sequences tempat terikatnya molekul/protein yang terlibat dalam regulasi siklus sel pada saat proliferasi atau diferensiasi pada urutan asam amino dari mAKAP. Analisis terhadap urutan nukleotida/asam amino dari mAKAP menunjukkan bahwa mAKAP mempunyai deretan asam amino LTCEE pada bagian ujung C terminal, seperti terlihat pada gambar 1a dan 1b. Motif ini dikenal juga sebagai LXCXE, dimana X asam amino yang bervariasi. Motif ini dikenal luas sebagai motif tempat terikatnya protein retinoblastoma (pRB) (11). pRB telah terbukti terlibat dan berperan penting pada pemberhentian siklus sel pada proliferasi sehingga ekspresinya meningkat pada jaringan yang mengalami diferensiasi terminal (12). Motif LXCXE tidak hanya didapatkan pada urutan asam amino mAKAP di mencit (*rat*) namun juga didapatkan ditempat yang sama pada DNA manusia dan tikus (*mouse*). Hal ini menunjukkan bahwa motif LXCXE konsisten pada berbagai jenis spesies, yang biasanya mempunyai fungsi yang sangat penting dalam keadaan fisiologis. Seperti terlihat pada gambar 1b, perbandingan dari sejumlah protein yang motif LXCXE dan telah terbukti berikatan dengan pRB serta terlibat secara langsung dalam proses *cell cycle* atau diferensiasi sel yaitu, EID-1, BRG1, Elf-1, SV40, Ad5E1A dan HPV-16 E7 (13,14,15,16). Oleh karena itu kemungkinan mAKAP terikat dengan pRB dan terlibat dalam *cell cycle* atau diferensiasi.

Penelitian ini juga menemukan motif FYDYSYL, yang sama dengan urutan asam amino tempat terikatnya molekul CBP/p300 (FXD/EXXXL), pada deretan asam amino ke 1467 - 1473 pada DNA manusia dan asam amino yang ke 1465 - 1471 pada rat mAKAP, (gambar 1c). Urutan asam amino yang sama terdapat juga di protein mAKAP pada manusia, tikus dan mencit, dengan urutan yang sama 100%. CBP/p300 pertama diidentifikasi sebagai sebuah protein yang berikatan dengan cAMP-response-element-binding protein (CREB) dan adenoviral E1A (17,18). CBP/p300 bekerja sebagai kofaktor untuk factor transkripsi yang berhubungan dengan proliferasi dan diferensiasi (19). Seperti yang terlihat pada gambar 1c urutan asam amino dari berbagai protein yang berikatan dengan CBP dan mempunyai kesamaan serta telah terbukti berfungsi pada proses diferensiasi (E1A, p53 and E2F) (20). Motif FYD ditemukan pula pada bagian aktif dari MyoD, myogenin dan Myf-5, protein protein yang terlibat dalam proses diferensiasi Myosit. Pada penelitian terdahulu dibuktikan bahwa mutasi satu dari ketiga asam amino tersebut mengakibatkan proses pengaktifan dan interaksi dengan p300 sehingga proses diferensiasi sel otot terhambat (21). Oleh karena itu FYD pada urutan FYDYSYL pada protein mAKAP dapat mempunyai peran penting untuk proses diferensiasi pada sel otot, hal ini ditunjang oleh kekhasan ekspresi mAKAP yang terkpres di sel otot.



Gambar 1. Skema mAKAP dan Urutan asam amino yang merupakan konsensus protein retinoblastoma dan CBP

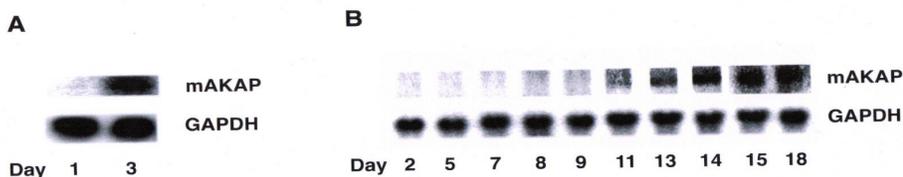
Keterangan: Urutan asam amino dari mAKAP mempunyai bagian yang merupakan urutan konsensus untuk terikatnya protein retinoblastoma (pRB) dan CBP/p300. (A) Skema dari mAKAP dengan bagian tempat terikatnya beberapa protein. pRB *binding domain* terletak pada ujung C terminal dari rat mAKAP protein (asam amino ke 2295-2299), CBP/p300 (asam amino ke 1465-1471), *spectrin-like repeat* (asam amino 772-915 and 915-1065) and PKA (asam amino 2055-2072). (B) Perbandingan dari urutan asam amino dari protein- protein yang berikatan dengan pRB seperti; EID-1, SV40, Ad5 EIA, BRG-1 and rELF-1, menunjukkan urutan asam amino yang mempunyai kerangka LXCXE yang sama. (C) Perbandingan asam amino dari protein-protein yang berikatan dengan CBP/p300 seperti Ad5 EIA, Ad12 EIA, Ad2 EIA, E2F dan p53 menunjukkan kesamaan kerangka FXE/DXXL.

Ekspresi mAKAP di Kardiomiosit yang Telah Terdiferensiasi

Berpijak pada penemuan di atas, bahwa mAKAP mempunyai urutan asam amino yang merupakan tempat terikatnya protein CBP/p300 dan pRB, maka kemungkinan besar mAKAP terlibat dalam proses diferensiasi sel otot. Salah satu cara tidak langsung adalah mendeteksi keberadaan mAKAP pada sel otot yang belum terdiferensiasi dan yang sudah terdiferensiasi. Analisis ekspresi mRNA dari mAKAP dengan metoda *Northern blot* menunjukkan bahwa mAKAP baru muncul

pada hari ketiga ketika sel otot jantung (kardiomiosit) menunjukkan tanda terdiferensiasi, yang menunjukkan kontraksi spontan dan terdapat jalinan myofibrilar (22). Sedangkan pada kultur kardiomiosit pada hari pertama dimana kardiomiosit masih menunjukkan tanda tanda belum diferensiasi (23) tidak didapatkan ekspresi mRNA dari mAKAP (gambar 2a). Oleh karena itu dapat dikemukakan bahwa mAKAP hanya terdapat pada sel otot jantung yang mengalami diferensiasi, dan belum muncul pada sel yang belum terdiferensiasi.

FIG.2



Gambar 2. Ekspresi mRNA dan mAKAP pada kultur kardiomiosit dan pada jantung tikus Sprague-Dawley

Keterangan: Hasil northern blot dari mRNA mAKAP pada kultur sel otot jantung dan jantung SD rat. (A) Ekspresi mAKAP terlihat pada hari ketiga ketika kultur sel otot jantung menunjukkan tanda terdiferensiasi tetapi belum terlihat pada hari pertama kultur ketika belum terdiferensiasi. (B) *In vivo*, mAKAP tampak sejak hari ke 13 pada jantung Sprague-Dawley rat ketika proses diferensiasi menurun tajam hingga terhenti (24). Seluruh hasil di normalisasi dengan GAPD sebagai standart.

Selanjutnya untuk membuktikan keterkaitan ekspresi mAKAP setelah diferensiasi tidak hanya *invitro* namun juga *invivo*, *Sprague-Dawley rat* pada usia 2-18 hari di ambil jantungnya untuk diekstrak RNanya. Hasil *northern blot* menunjukkan bahwa mAKAP baru terdeteksi pada hari ke 13 setelah kelahiran dan terus meningkat hingga hari ke 15, setelah itu ekspresi mAKAP relatif sama jumlahnya (gambar 2b). Dari penelitian terdahulu terbukti bahwa pada jantung *Sprague-Dawley (SD) rat*, proses diferensiasi menurun tajam pada saat berusia 13 hari dan terhenti hingga hari ke 15-17 (24). Dari dua fakta diatas didapatkan bukti bahwa ekspresi mAKAP bertepatan dengan terhentinya proses diferensiasi sel otot jantung.

Ekspresi mAKAP pada Jantung Tikus mdx

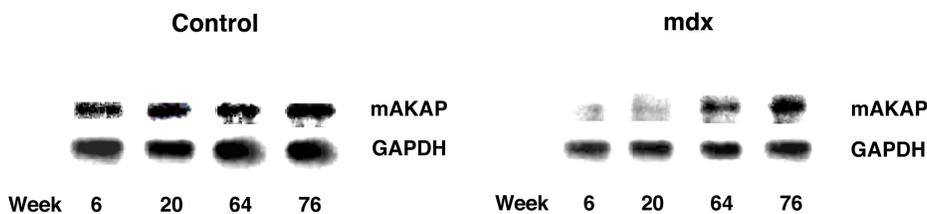
Berdasarkan penelitian terdahulu terbukti bahwa otot rangka (*skeletal muscle*) dari mdx mengalami regenerasi pada tikus muda sebelum proses degenerasi dan *apoptosis* pada tikus dewasa. Namun masih banyak perdebatan terhadap kemampuan otot jantung untuk regenerasi karena sebagian besar sudah mengalami terminal diferensiasi. Pada penelitian ini diuji ekspresi dari mAKAP pada level mRNA dengan membandingkan antara jantung tikus normal dan mdx pada umur yang setara. Pada jantung tikus normal mAKAP terlihat pada seluruh umur dari tikus percobaan. Namun mAKAP belum terlihat pada jantung tikus mdx berusia 6 minggu dan sangat kecil/sedikit pada usia 20 minggu (gambar 3). Dari observasi ini menunjukkan bahwa mAKAP di jantung mdx mengalami kemunduran waktu ekspresi dibandingkan jantung tikus normal.

diferensiasi. Terminal diferensiasi adalah sebuah proses dimana sel sangat khusus berhenti berkembang secara ireversibel dan meningkatnya gen yang spesifik untuk fungsi normal/fisiologis sel tersebut. pRB adalah molekul penting yang diketahui memfasilitasi kejadian tersebut (12, 25, 26). pRB terlibat dalam proses supresi tumor secara ganda yaitu berhubungan dengan *cell cycle* dan fungsi kontrol proses diferensiasi. Pada pengontrolan *cell cycle*, pRB menghambat transkripsi E2F yang dibutuhkan untuk replikasi DNA. pRB mengontrol kelangsungan dan transisi keluar masuk ke *cell cycle*. Selama proses diferensiasi pRB berfungsi sebagai ko aktifator proses transkripsi (27, 28).

Penelitian terakhir menunjukkan pentingnya urutan asam amino LXCXE yang berfungsi untuk tetap terhentinya pertumbuhan pada proses diferensiasi sel otot. Mutasi dari urutan asam amino menyebabkan tidak terbentuknya ikatan dengan pRB dan tidak terjadi pemberhentian pertumbuhan di sel otot (29). Disamping itu pemberian *adenovirus E1a dan cyclin D1 anti-sense*, yang mempunyai LXCXE telah dipakai di sel otot untuk menentukan pentingnya protein tersebut dalam menghentikan fase G1 dan keluar dari siklus sel (30, 31, 32).

Pada penelitian ini didapatkan hasil pengamatan bahwa mAKAP yang mempunyai LXCXE dan FYDYSYL terlihat ekspresinya pada hari ke 13 yaitu pada saat proses diferensiasi menurun tajam hampir mencapai nol pada tikus berumur 13- 17 hari (24). Data ini diperkuat oleh pengamatan sebelumnya bahwa mAKAP tidak terlihat pada saat sel otot yang sedang mengalami diferensiasi (pada hari 1 kultur sel otot jantung) dan terlihat jelas

FIG.3



Gambar 3. Ekspresi mRNA dari mAKAP pada tikus mdx dan tikus kontrol

Keterangan : Perbandingan ekspresi mAKAP di jantung tikus mdx dan tikus kontrol. Ekspresi dari mRNA mAKAP belum nampak pada jantung tikus mdx berusia 6 bulan dan hanya sedikit pada jantung tikus berumur 20 minggu. Hal ini menunjukkan keterlambatan ekspresi dari mAKAP pada jantung tikus mdx. Seluruh hasil dinormalisasi dengan GAPDH sebagai standar.

PEMBAHASAN

Motif LXCXE dan FYDYSYL pada mAKAP protein kemungkinan terlibat dalam proses diferensiasi terminal sel otot.

Analisis urutan asam amino dari mAKAP menunjukkan bahwa mAKAP mempunyai daerah yang dapat menjadi tempat melekatnya pRB dan CBP/p300. Beberapa asam amino yang mempunyai urutan seperti itu mempunyai peran pada proses

pada sel otot yang sudah mengalami diferensiasi sempurna (pada hari ke 3). Karena itu dari data data yang terkumpul menunjukkan bahwa ekspresi mAKAP berhubungan dengan proses diferensiasi. Seperti pada protein lain yang mempunyai LXCXE, kemungkinan mAKAP diperlukan untuk terhentinya proses diferensiasi menetap atau mAKAP berfungsi juga setelah sel otot sudah terdiferensiasi, mengisyaratkan bahwa mAKAP diperlukan pada proses fisiologis khusus di sel otot. Hasegawa dkk.

menunjukkan pula bahwa E1a yang mempunyai ikatan dengan p300 mempunyai peran menekan transkripsi pada gen yang spesifik untuk sel otot jantung dimana fungsi ini dimainkan oleh p300 yang terikat dengannya. Kedua protein tersebut berfungsi untuk menjaga terhentinya siklus sel dan ekspresi dari gen yang spesifik di sel otot jantung (33, 34). Sehingga mAKAP yang mempunyai tempat ikatan dengan CBP/p300 mendukung fungsi pRB. Motif FXD/EXXXL ini selalu konsisten meskipun pada spesies yang berbeda, yaitu manusia, mencit dan tikus. Diantara protein protein yang berikatan dengan CBP/p300 juga terdapat konsistensi kesamaan kerangka motif tersebut. Mutasi salah satu asam amino dari FXD/EXXXL misalnya F atau D/E atau L mengakibatkan ketidakmampuan protein tersebut berikatan dengan CBP/p300, namun tidak demikian halnya bila posisi X digantikan dengan yang lain. Oleh karena itu motif tersebut diperlukan untuk mengikat CBP/p300 (20). E1a adalah sebuah *adenovirus oncoprotein* yang juga mempunyai LXCXE, ikatan E1a dengan CBP mengakibatkan CBP inaktif dan menekan aktivitas *elemen which enhancer and promoter* (35). E1a menghambat aktivasi transkripsi dengan cara melepaskan faktor transkripsi dari CBP/p300 (20). Mekanisme ini kemungkinan juga terjadi bila mAKAP terekspresi akan menggeser faktor transkripsi yang lain yang juga mempunyai motif FXD/EXXXL yang berikatan dengan CBP yang pada akhirnya merupakan kompetisi negatif pada proses transkripsi. Konsisten dengan hipotesis ini dilaporkan sebuah penelitian *E1A-like inhibitor of differentiation 1* (EID-1) yang mempunyai kedua motif yaitu pRB dan CBP/p300 terbukti menghambat diferensiasi sel otot karena kemampuannya menghambat aktivitas CBP (36). Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk membuktikan ikatan langsung antara prove mAKAP dengan pRB dan atau CBP. Untuk penelitian fungsional dapat dilakukan dengan cara mutasi dari salah satu asam amino LXCXE dan FYDYSYL dari mAKAP dan diamati pengaruhnya terhadap proses diferensiasi di sel otot.

Muscle A-Kinase Anchoring Protein (mAKAP) telah terbukti berikatan langsung dengan PKA, *calcium release channel*

ryanodine receptor (RyR), *Phosphodiesterase* PDE4D3 dan *phosphatase2A* (PP2A). Dengan melihat fungsi famili AKAP sebagai protein yang menghubungkan signal cAMP pada protein sasarannya, maka kemungkinan besar mAKAP berfungsi sebagai penghubung antara signal cAMP dan Ca^{2+} signals pada proses yang terjadi di inti sel karena mAKAP berlokasi di membran inti sel (8). Termasuk keterlibatan mAKAP pada proses kendali diferensiasi di sel otot mungkin melalui signal cAMP and Ca^{2+} .

Keterlambatan Ekspresi mAKAP pada Jantung Tikus mdx Dapat Mempengaruhi Signal cAMP dan Ca^{2+}

Cyclic Adenosine Mono Phosphate (cAMP) dan kalsium sangat dibutuhkan untuk proses proses seluler di dalam inti. Keterlambatan ekspresi mAKAP sebagai penghubung signal transduksi dari cAMP untuk diteruskan menjadi signal yang sensitif terhadap kalsium melalui fungsi reseptor ryanodin dapat mengganggu proses diferensiasi maupun proses fisiologis lainnya di jantung mdx. Diperlukan penelitian lebih mendalam untuk mengetahui pengaruh mAKAP pada signal cAMP dan Ca terutama di jantung tikus mdx.

Dari penelitian ini telah ditemukan bahwa mAKAP mempunyai urutan asam amino yang dapat mengikat pRb dan CBP/p300. Penemuan ini diperkuat dengan hasil *northern blot* yang menunjukkan bahwa ekspresi mAKAP hanya terlihat pada sel oto jantung yang telah terdiferensiasi secara *in vivo* maupun *in vitro*. mAKAP kemungkinan terlibat pada proses diferensiasi yang melibatkan kompleks pRB, CBP/p300, cAMP dan Ca^{2+} . Keterlambatan ekspresi mAKAP dapat mempengaruhi kompleks tersebut pada jantung mdx.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Noriaki Emoto, MD, PhD yang membantu dalam persiapan paper ini.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Edwards AS, Scott JD. *A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond*. Curr.Opin.Cell Biol 2000; 12: 217-221.
2. Colledge M, Scott JD. *AKAPs: from structure to function*. Trends Cell Biol 1999; 9: 216-221.
3. Fraser ID, Cong M, Kim J, Rollins EN, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Scott JD. *Assembly of an A kinase-anchoring protein-beta(2)-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling*. Curr. Biol 2000; 10: 409-412.
4. Herrgard S, Jambeck P, Taylor SS, Subramaniam S. *Domain architecture of a Caenorhabditis elegans AKAP suggests a novel AKAP function*. FEBS Lett 2000; 486: 107-111.
5. Kapiloff MS, Schillace RV, Westphal AM, Scott JD. *mAKAP: an A-kinase anchoring protein targeted to the nuclear membrane of differentiated myocytes*. J.Cell. Sci 1999; 112: 2725-2736.
6. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembli N, Marks AR. *PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts*. Cell 2000; 101: 365-376.
7. Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK, Scott JD. *mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module*. EMBO J 2001; 20: 1921-1930.
8. Kapiloff MS, Jackson N, Airhart N. *mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope*. J. Cell. Sci 2001; 114: 3167-3176.
9. T Ueyama, T Sakoda, S Kawashima, E Hiraoka, K Hirata, H Akita, M Yokoyama. Circ. Res 81 1997; 81: 672-678.
10. Mochly-Rosen D. *Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction*. Science 1995; 268: 247-251.
11. Lee JO, Russo AA, Pavletich NP. *Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7*. Nature 1998; 391: 859-865.
12. MacLellan WR, Xiao G, Abdellatif M, Schneider MD. *A novel Rb- and p300-binding protein inhibits transactivation by MyoD*. Mol.Cell. Biol 2000; 20: 8903-8915.

13. Larose A, Dyson N, Sullivan M, Harlow E, Bastin M. *Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization*. J. Virol 1991; 65: 2308-2313.
14. Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E. *Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins*. J. Virol 1992; 66: 6893-6902.
15. Jones RE, Wegrzyn RJ, Patrick DR, Balishin NL, Vuocolo GA, Riemen MW, Defeo-Jones D, Garsky VM, Heimbrook DC, Oloff A. *Identification of HPV-16 E7 peptides that are potent antagonists of E7 binding to the retinoblastoma suppressor protein*. J. Biol. Chem 1990; 265: 12782-12785.
16. Taya Y. *RB kinases and RB-binding proteins: new points of view*. Trends Biochem. Sci 1997; 22: 14-17.
17. Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, Livingston DM. *Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor*. Genes Dev 1994; 8: 869-884.
18. Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. *Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP*. Nature 1993; 365: 855-859.
19. Chakraborty S, Senyuk V, Sitailo S, Chi Y, Nucifora G. *Interaction of EVI1 with cAMP-responsive element-binding protein-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor (P/CAF) results in reversible acetylation of EVI1 and in co-localization in nuclear speckles*. J. Biol.Chem 2001; 276: 44936-44943.
20. O'Connor MJ, Zimmermann H, Nielsen S, Bernard HU, Kouzarides T. *Characterization of an E1A-CBP interaction defines a novel transcriptional adapter motif (TRAM) in CBP/p300*. J. Virol 1999; 73: 3574-3581.
21. Sartorelli V, Huang J, Hamamori Y, Kedes L. *Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C*. Mol. Cell. Biol 1997; 17: 1010-1026.
22. Thorburn J, Carlson M, Mansour SJ, Chien KR, Ahn NG, Thorburn A. *Inhibition of a signaling pathway in cardiac muscle cells by active mitogen-activated protein kinase kinase*. Mol. Biol.Cell 1995; 6: 1479-1490.
23. Sugden PH, Clerk A. *Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy*. J. Mol. Med 1998; 76: 725-746.
24. Claycomb WC. *Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Deoxyribonucleic acid synthesis and nuclear and cytoplasmic deoxyribonucleic acid polymerase activity*. J. Biol. Chem 1975; 250: 3229-3235.
25. Tam SK, Gu W, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. *Cardiac myocyte terminal differentiation. Potential for cardiac regeneration*. Ann. N Y Acad. Sci 1995; 752: 72-79.
26. Lipinski MM, Jacks T. *The retinoblastoma gene family in differentiation and development*. Oncogene 1999; 18: 7873-7882.
27. Sellers WR, Novitsch BG, Miyake S, Heith A, Otterson GA, Kaye FJ, Lassar AB, Kaelin WG Jr. *Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth*. Genes Dev 1998; 12: 95-106.
28. Wiman KG. *The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation*. Faseb J 1993; 7: 841-845.
29. Chen TT, Wang JY. *Establishment of irreversible growth arrest in myogenic differentiation requires the RB LXCXE-binding function*. Mol.Cell. Biol 2000; 20: 5571-5580.
30. Braun T, Bober E, Arnold HH. *Inhibition of muscle differentiation by the adenovirus E1a protein: repression of the transcriptional activating function of the HLH protein Myf-5*. Genes Dev 1992; 6: 888-902.
31. Taylor DA, Kraus VB, Schwarz JJ, Olson EN, Kraus WE. *E1A-mediated inhibition of myogenesis correlates with a direct physical interaction of E1A12S and basic helix-loop-helix proteins*. Mol.Cell. Biol 1993; 13: 4714-4727.
32. Grana X, Garriga J, Mayol X. *Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth*. Oncogene 1998; 17: 3365-3383.
33. Hasegawa K, Meyers MB, Kitsis RN. *Transcriptional coactivator p300 stimulates cell type-specific gene expression in cardiac myocytes*. J. Biol. Chem 1997; 272: 20049-20054.
34. Puri PL, Avantaggiati ML, Balsano C, Sang N, Graessmann A, Giordano A, Levrero M. *p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription*. EMBO J 1997; 16: 369-383.
35. Stein RW, Corrigan M, Yaciuk P, Whelan J, Moran E. *Analysis of E1A-mediated growth regulation functions: binding of the 300-kilodalton cellular product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity*. J. Virol 1990; 64: 4421-4427.
36. Miyake S, Sellers WR, Safran M, Li X, Zhao W, Grossman SR, Gan J, DeCaprio JA, Adams PD, Kaelin WG Jr. *Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle*. Mol. Cell. Biol 2000; 20: 8889-8902.