

The Catalytic Subunit of Protein Kinase A Interacts with Testis-Brain RNA-Binding Protein (TB-RBP)

Hyun-Hee Ju and Sung-Ho Ghil[†]

Department of Life science, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

cAMP-dependent protein kinase A (PKA) is the best-characterized protein kinases and has served as a model of the structure and regulation of cAMP-binding protein as well as of protein kinases. To determine the function of PKA in development, we employed the yeast two-hybrid system to screen for catalytic subunit of PKA ($C\alpha$) interacting partners in a cDNA library from mouse embryo. A Testis-brain RNA-binding protein (TB-RBP), specifically bound to $C\alpha$. This interaction was verified by several biochemical analysis. Our findings indicate that $C\alpha$ can modulate nucleic acid binding proteins of TB-RBP and provide insights into the diverse role of PKA.

Key Words: TRAX, Development, Yeast two-hybrid

서 론

cAMP-dependent protein kinase (PKA)는 대표적인 단백질 인산화 효소로 알려져 있으며, cAMP와 결합하여 그 활성이 조절된다 (Taylor et al., 2004). PKA는 두 개의 조절 소단위체 (R)와 두 개의 촉매 소단위체 (C)가 R_2C_2 로 구성되어 있는 heterotetrameric 단백질이다. 현재까지 네 종류의 조절 소단위체 ($RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$, $RII\beta$)와 네 종류의 촉매 소단위체 ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$, PrXX)가 각각 클로닝 되었다 (Zimmermann et al., 1999; Taylor et al., 2004). cAMP가 조절 소단위체에 결합하게 되면, 촉매 소단위체가 조절 소단위체로부터 유리되어 나온다 (Taylor et al., 1990). 유리된 촉매 소단위체는 세포질에서 남아 다른 기질들을 인산화시키거나 핵으로 이동하여 전사인자들의 인산화를 유발한다. 특히 전사인자인 cAMP-response element binding protein의 인산화를 유도함으로써 하위단계의 유전자 발현을 조절한다 (Ghil et al., 2000).

PKA는 구성되어 있는 조절 소단위체의 종류에 따라 I형 PKA과 II형 PKA으로 나뉜다. I형 PKA는 $RI\alpha$ 또는 $RI\beta$ 를 조절 소단위체로 가지고 있으며, 수용성이고 거의

모든 조직에 광범위하게 발현되며, II형 PKA는 $RII\alpha$ 또는 $RII\beta$ 를 조절 소단위체로 가지며 대부분 세포의 막성분에 고정되어 존재하고 특히 신경내분비세포에 발현량이 높다 (Hofmann et al., 1997; Glantz et al., 1992). PKA의 촉매 소단위체는 포유류의 조직에서 광범위하게 발현된다 (Uhler et al., 1987).

본 연구에서는 발생과정에서 PKA의 역할을 알아보기 위해 촉매 소단위체의 한 종류인 $C\alpha$ 를 bait로 하고 생쥐 배자 (E7.5 dpc)에서 유래한 cDNA library를 사용하여 yeast two-hybrid 스크리닝을 수행하였다. 그 결과 testis brain RNA-binding protein (TB-RBP)을 발굴하였고, 여러 가지 생화학적 기법을 통하여 이들의 결합을 재차 검증하였다.

재료 및 방법

1. 재료

생쥐 배자 (E7.5 dpc)에서 유래한 cDNA library와 herring testis DNA는 Clontech (Palo Alto, CA, USA), yeast 성장 배지는 Bio101 (Vista, CA, USA), Alexa 488과 568 항체는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), TA 클로닝 벡터 (pGEMT/Easy)는 Promega (Madison, MI, USA), 제한효소와 T4 DNA 결합효소는 Roche (Mannheim, Germany), PVDF membrane은 Schleicher & Schuell Bioscience (Dassel, Germany), Super-signal West Pico Chemiluminescent Substrate는 Pierce (Rockford, IL), glutathione sepharose 4B bead는 Amersham Bio-

*논문 접수: 2007년 10월 12일

수정재접수: 2007년 11월 23일

[†]교신저자: 김성호, (우) 442-760 경기도 수원시 영통구 이의동, 경기대학교 생명과학과

Tel: 031-249-9646, Fax: 031-249-9646

e-mail: shghil@kyonggi.ac.kr

sciences (Uppsala, Sweden), 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine Dihydrochloride (DAPI)는 Vector Laboratories (Burlingame CA, USA), 그 외에 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

2. 발현 벡터의 제작

Yeast two-hybrid 스크리닝에 사용된 bait 플라스미드인 pHybTrp/Zeo-Ca는 pcDNA3-Ca 플라스미드를 *KpnI* 제한 효소로 절단하여 pHybTrp/Zeo 플라스미드에 삽입하여 제작하였다. TB-RBP의 진핵세포 발현 플라스미드인 pcFlag-TB-RBP는 cDNA library 플라스미드인 pACT2-TB-RBP를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 제작하였다. 이때 사용한 primer는 5'-TACCACTACAATGGATG-3'와 5'-CGATTCATAGATCTCTAGAG-3'이며, PCR 결과물을 TA 벡터인 pGEMT/Easy 플라스미드에 삽입한 후, *BamHI*과 *XhoI* 제한 효소로 절단하여 pcFlag 플라스미드에 삽입하여 제작하였다. pcFlag-TB-RBP 플라스미드는 그 N-말단에 Flag epitope이 tagging되어 있어, 세포 내에서 단백질로 발현하게 되면, Flag-TB-RBP가 융합된 형태로 발현하게 된다.

3. Yeast two-hybrid 스크리닝

Yeast two-hybrid 스크리닝은 이전 보고와 같은 방법으로 수행되었다 (Park and Ghil., 2006). 이를 간략히 설명하면, L40 효모세포주에 bait 플라스미드를 형질전환시킨 후, 트립토판이 결여된 (-T) 고체성장배지에서 3일간 배양하였다. 배양된 colony를 -T 액체성장배지에서 16시간 배양한 후, 세포를 수집하여 competent 세포로 제작하였다. 제작된 competent 세포에 50 µg의 cDNA library를 형질전환시킨 후, 히스티딘, 류신, 트립토판이 결여된 (-HLT) 고체성장배지에서 일주일간 배양하였다. 성장한 colony를 -HLT 고체성장배지에 3-AT (3 amino-1, 2, 4-triazole)가 첨가된 배지 (-HLT+3-AT)와 류신, 트립토판이 결여된 (-LT) 고체성장배지에 X-gal이 첨가된 배지 (-LT+X-gal)에 접종하여 colony 성장여부와 변색 유무를 각각 확인함으로써 false-positive 클론을 제거하였다. 선별된 colony에서 library 플라스미드 DNA만을 추출하기 위해 류신 결여된 (-L) 액체성장배지로 1:100으로 희석하여 24시간 배양한 후, 다시 1:1000으로 희석하여 -L 고체성장배지에서 배양하였다. 성장한 colony로부터 DNA를 추출하여 *DH5a* 박테리아 세포에 형질전환시킨 후, 유전자 서열을 분석한 후, NCBI의 Blast search 프로그램을 사용하여 분

석된 유전자 서열을 동정하였다.

4. 세포 배양 및 transfection

COS.M6세포와 293T 세포는 10% fetal bovine serum과 1% penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였으며, 2~3일에 한번씩 HBSS로 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 사용하여 세포를 배양용기의 바닥으로부터 분리시킨 다음 계대 배양하였다. 293T 세포의 transfection은 배양용기 (100 mm)당 1.5×10⁶개의 세포를 18~24시간 배양한 후, calcium-phosphate 방법을 사용하여 DNA를 transfection 하였다. calcium-phosphate 방법은 적당량의 발현 플라스미드를 62 µl의 2 M CaCl₂와 함께 혼합한 후, 동량의 2×HBS (50 mM Hepes pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄)를 vortex을 해주면서 섞어주었다. 이 DNA 혼합용액을 30분간 상온에 정치한 후, 세포 배양액에 혼합하여 반응시켰다. Transfection한 다음 40시간 후에 세포를 PBS (10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)로 2회 씻어준 후, 다음 실험에 사용하였다. COS.M6 세포의 transfection은 배양용기 (15 mm)당 3×10⁴개의 세포를 24시간 배양한 후, DEAE/Dextran 방법 (Iida-Klein et al., 1997)을 사용하였다.

5. GST-pulldown assay

BL21 박테리아 세포주에 GST와 GST-Ca 융합단백질을 발현하는 유전자를 형질전환시켜 배양하였다. 단백질의 과발현을 유도하기 위해 배양한 세포주에 0.5 mM IPTG를 첨가하여 30°C에서 4시간 동안 추가 배양한 후, 세포를 수집하였다. 세포를 PBTX 용액 (1% Triton X-100과 단백질분해효소 억제제가 첨가된 PBS)으로 부유시킨 후, 초음파분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄된 세포를 원심분리 (12,000 rpm, 10분, 4°C)하여 상등액을 glutathione sepharose 4B beads와 4°C에서 2시간 30분 반응시킨 다음 PBTX로 3회 수세하였다. Bead를 293T 세포에 pcFlag-TB-RBP 플라스미드를 과발현시킨 세포추출물과 37°C에서 1시간 반응시키고 PBTX로 5회 수세하였다. 수세 후, 침전된 beads에 SDS loading dye를 첨가하여 10% SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동된 단백질을 poly-vinyl difluoride membrane에 옮긴 후 Flag 항체를 사용해 immunoblot을 실시하였다. Input lane은 GST pulldown assay에 사용된 세포추출액의 10%를 사용하였다.

6. Immuno-colocalization

15 mm dish에 type I collagen과 Poly-D-Lysin (PDL)을 1:1의 비율로 섞은 용액으로 coating한 후, 3×10^4 개의 COS.M6 세포를 분주하여 24시간 배양하였다. 10 μ g의 pcFlag-TB-RBP와 10 μ g의 pcDNA-C α 를 DEAE-dextran transfection 방법으로 co-transfection한 후, 48시간 동안 추가 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 수세한 후, 4% paraformaldehyde를 사용하여 상온에서 10분간 고정시켰다. PBS로 재차 수세한 후, blocking 용액 (10% normal goat serum, 0.1% BSA, 0.1% Triton X-100)을 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후 1차 항체용액을 첨가하여 상온에서 2시간 또는 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 0.1%의 Triton X-100이 포함된 PBS로 10분간 3번 수세하고 2차 항체용액을 상온에서 1시간 반응시킨 후, 0.1%의 Triton X-100이 포함된 PBS로 10분간 3번 수세하고 DAPI 염색을 통해 전체 세포핵을 염색하였고 confocal microscopy (Zeiss LSM 501, Neuherberg, Germany)로 관찰하였다. 1차 항체로는 anti-Flag (1:200) 항체와 anti-C α (1:

200) 항체를, 2차 항체로는 Alexa fluor -488과 -568 (1:500)을 사용하였다.

결 과

생쥐의 발생과정 중 PKA의 촉매 소단위체의 일종인 C α 와 상호작용하는 단백질들을 탐색하기 위하여 생쥐의 배자에서 유래한 cDNA library를 사용하여 yeast two-hybrid 스크리닝을 수행하였다. 스크리닝 결과 총 49개의 클론을 획득하였으며, 그 중 1개의 TB-RBP 유전자를 발굴하였다. TB-RBP는 인간의 translin의 mouse orthologue이다. TB-RBP는 228개의 아미노산으로 구성되어 있으며 (Fig. 1A), 인간의 경우 염색체 2번에 존재하고, 생쥐의 경우 염색체 1번에 위치하며, 인간의 translin과 생쥐의 TB-RBP는 3개의 아미노산이 상이하다 (Aoki et al., 1997; Wu et al., 1997; Wu et al., 1998). TB-RBP는 28 kDa의 분자량을 가지며, nuclear export signal (NES), GTP 결합 도메인 (G), leucine zipper 도메인 그리고 N-말단에 두 개의 basic 도메인 (Nb와 Cb)을 가진다 (Chennathukuzhi et al., 2001)

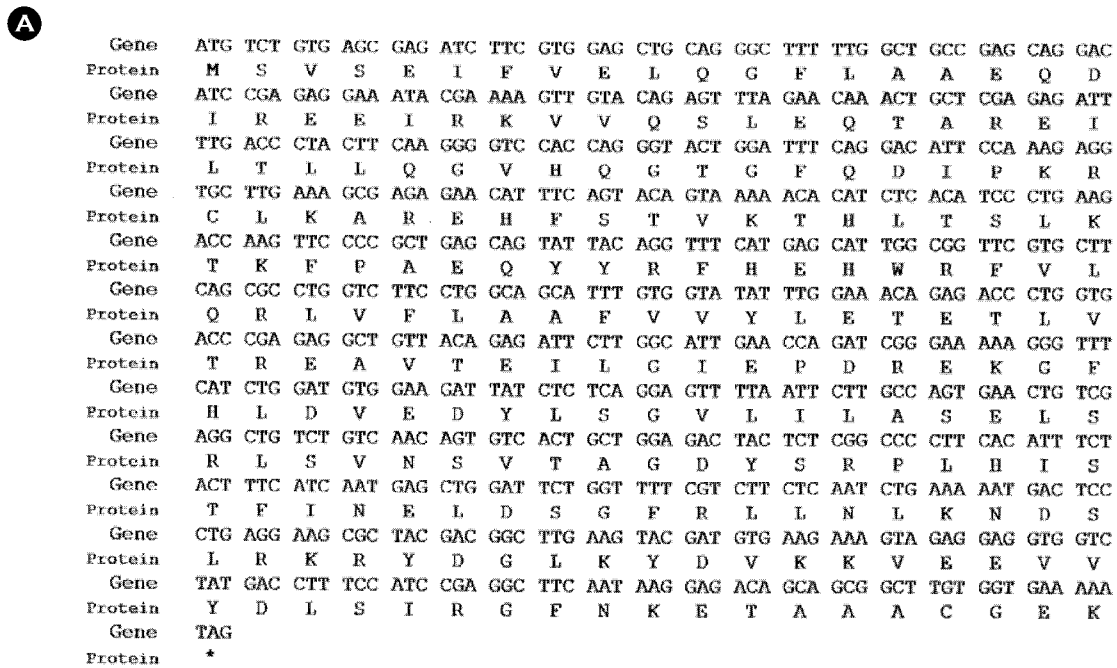


Fig. 1. Gene and amino acid sequence of the TB-RBP. A. The TB-RBP is 684 bp long and encodes a protein of 228 amino acids. B. Domains of TB-RBP including two basic domains, Nb and Cb, in the N-terminus; NES, a nuclear export signal; G, GTP-binding domain; and leucine zipper domain.

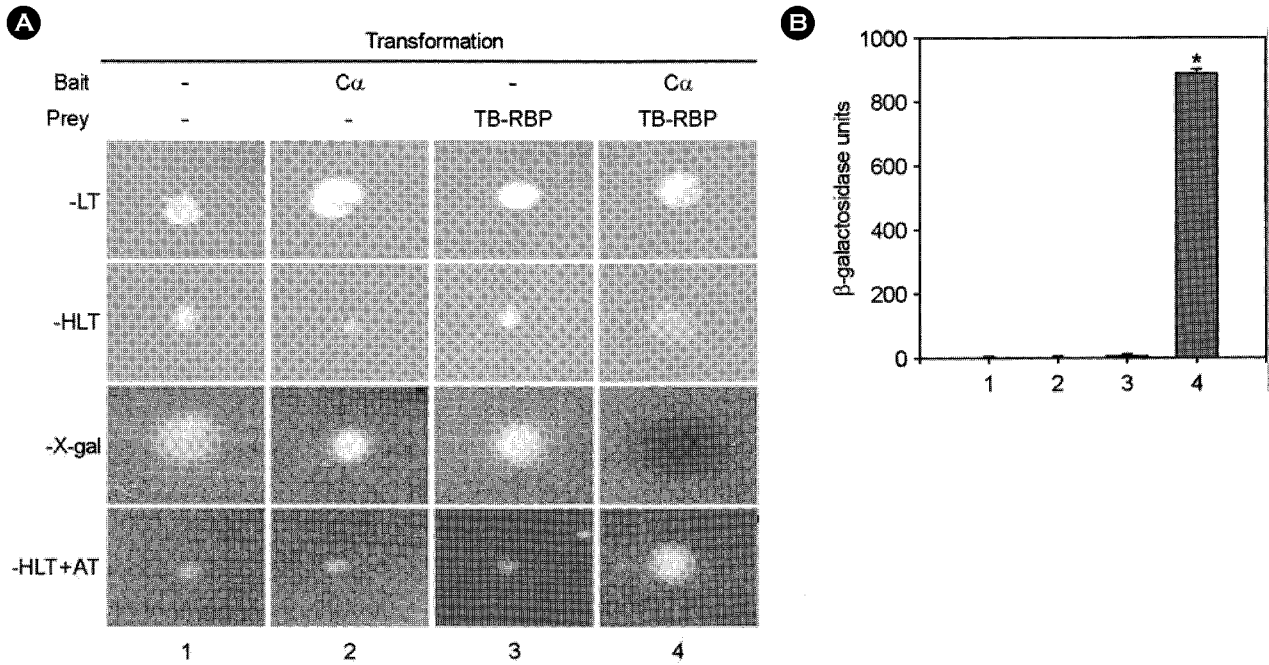


Fig. 2. The interaction of TB-RBP and $C\alpha$ in yeast. The L40 yeast strain transformed with the full length TB-RBP and $C\alpha$ as indicated were **A**. Incubated into indicated media the positive interaction between $C\alpha$ and TB-RBP were determined by representing blue colony in -LT+X-gal plates and by cell growth in -HLT+3AT media. **B**. Quantification of binding strength by ONPG assay to measure the levels of β -galactosidase activity. Data are shown as the average \pm S.E. of at least three independent experiments. *, $P < 0.001$ compared to control. LT, Leucine and Tryptophan drop out medium; -HLT, Histidine, Leucine, and Tryptophan drop out medium; and 3-AT, 3-amino-1,2,4-triazole.

(Fig. 1B). NES는 TB-RBP가 핵에서 세포질로 빠져 나오는 과정에 요구되며, leucine zipper domain, Nb 및 Cb는 RNA와의 결합에 필요하다. 또한 DNA와의 결합에는 Nb와 Cb 중 하나의 도메인만이 요구된다 (Chennathukuzhi et al., 2001).

TB-RBP와 $C\alpha$ 의 강한 상호작용 여부를 확인하기 위해 full-length TB-RBP와 $C\alpha$ 가 co-transformation된 L40 효모 세포주를 -LT, -HLT, -HLT+3-AT, 그리고 -LT+X-gal 성장 배지에 접종하여 성장 및 변색 유무를 확인하였다 (Fig. 2A). TB-RBP와 $C\alpha$ 가 yeast 내에서 서로 상호작용한다면, *HIS3* 유전자의 전사가 활성화되고 histidine이 결여된 성장배지 (-HLT)에서 성장할 수 있다. 3-AT는 imidazole-glycerolphosphate dehydratase의 경쟁적인 저해제로, *HIS3* 유전자의 생산을 억제한다 (Kanazawa et al., 1988). 비특이적이거나 약한 상호작용일 경우 3-AT에 의한 저해작용으로 적은 dehydratase가 생성되고, 그 결과로 histidine이 결여된 배지에서 성장하지 못한다. 강한 상호작용일 경우 많은 dehydratase가 생성되고 histidine이 결여된 배지에서 성장한다. 또한 L40 효모세포주는 *HIS3* 유전자뿐만 아니라 *LacZ* 유전자를 가지고 있어 상호작용이 강할 경우 β -galactosidase가 발현된다. TB-RBP와 $C\alpha$ 가 함께

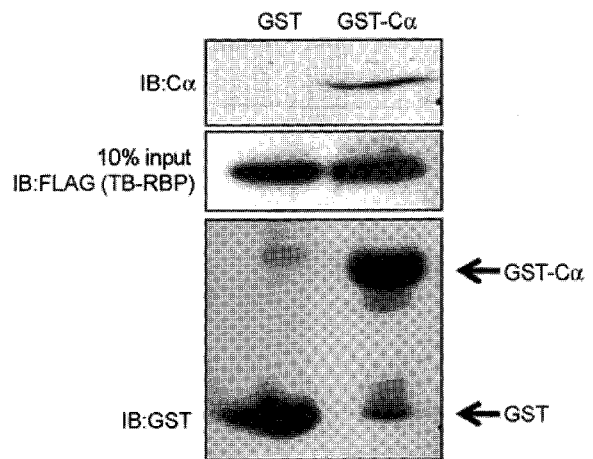


Fig. 3. GST-pull down assay showing the interaction between TB-RBP and $C\alpha$. Gluthathion beads charged with GST alone or GST- $C\alpha$ incubated with 293T extract transfected with TB-RBP. Bound Flag tagged TB-RBP was detected by immunoblotting using an anti-Flag antibody. The TB-RBP of the 293T cell extracts specifically bound to GST- $C\alpha$ but not to GST alone.

발현된 세포에서만 -HLT+3-AT 성장배지에서 성장을 보였다. 또한 -LT+X-gal 성장배지에서는 푸른색의 콜로니를 형성하면서 성장하는 것을 관찰하였다. 이 결과를 재차 검증하기 위해 β -galactosidase의 발현 수준을 기질

을 사용하여 측정하였다. β -galactosidase assay 결과 명확하게 Ca와 TB-RBP가 서로 상호작용함을 알 수 있었다 (Fig. 2B).

Ca와 TB-RBP의 결합을 *in vitro*에서 분석하기 위해, GST-pulldown assay를 수행하였다. BL21 박테리아 세포주에 GST와 GST-Ca 융합단백질을 각각 과발현시켜 얻은 추출물을 bead에 반응시키고, 293T 세포에 pcFlag-TB-RBP를 발현시켜 획득한 세포추출물을 혼합시킨 후, 단백질 전기영동을 실시하고 anti-Flag 항체로 Western blotting 분석을 실시하였다 (Fig. 3). 그 결과, GST-Ca와 Flag-TB-RBP는 서로 결합하였으나, GST 단독으로는 Flag-TB-RBP와 결합하지 않았다. 이 때, GST-pulldown assay에 사용된 Flag-TB-RBP의 발현양은 모두 동일하였으며, GST 및 GST-Ca의 융합단백질의 발현양은 역시 동일하였다.

세포 내에서 TB-RBP와 Ca가 발현되는 위치가 서로 동일한지를 알아보기 위해 면역조직화학 염색을 실시하였다 (Fig. 4). Flag-TB-RBP (10 μ g)와 Ca (10 μ g)를 같이 transfection시킨 세포에서 TB-RBP와 Ca는 세포질 또는 세포막 등에서 함께 발현되었다. 이것은 TB-RBP와 Ca

는 세포 내에서 서로 상호작용함을 시사한다.

고 찰

본 연구에서는 yeast two-hybrid 스크리닝을 통해 아직 알려지지 않은 Ca의 새로운 세포 내 결합 파트너인 TB-RBP를 발굴하였다. 그 후 생화학적 실험과정을 거쳐 Ca와 TB-RBP의 상호작용이 세포 내 환경에서 이루어진다는 것을 확인하였다.

지금까지 알려진 DNA 결합단백질로서 TB-RBP는 lymphoid tumor에서 chromosomal translocation의 breakpoint junction 부분과 감수분열중인 생식세포의 recombination hot spot 부분에 결합하며 (Aoki et al., 1995; Badge et al., 2000; Aoki et al., 1999; Wu et al., 1997), DNA 손상시 TB-RBP의 핵 내 이동이 급격히 증가된다고 알려져 있다 (Kasai et al., 1997). 또한 쥐의 정소와 뇌에서 주로 발현하여 protamine 1, protamine 2, transition protein 1과 같은 단백질들의 mRNA에 결합함으로써 이들의 번역과정을 조절한다 (Kwon et al., 1991; Kwon et al., 1993; Wu et al., 2000).

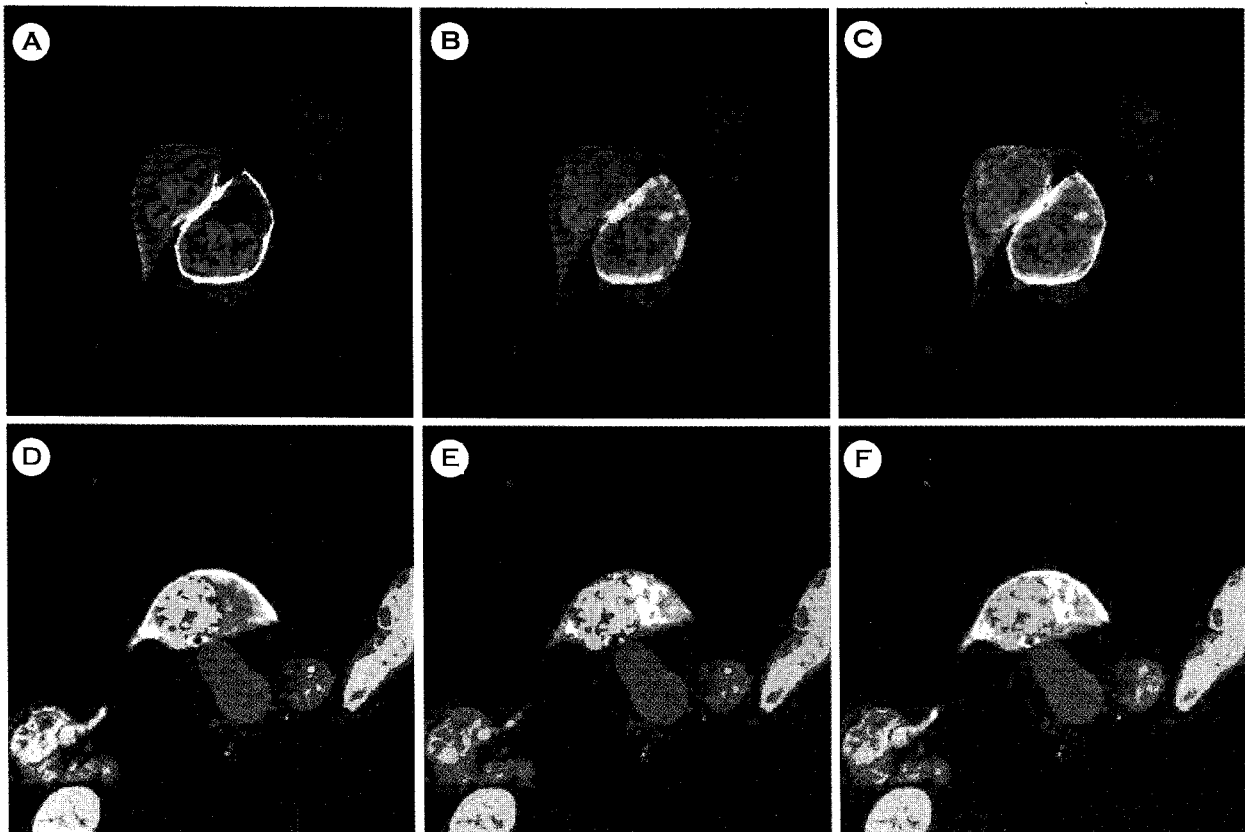


Fig. 4. Colocalization of TB-RBP and Ca. COS.M6 cells transfected with Ca and Flag-TB-RBP were labelled with anti-Flag and -Ca antibodies. Red, Flag-TB-RBP; green, Ca; blue, nucleus.

또한 뇌와 정소에 존재하는 많은 mRNA의 5' H element에 결합한다고 알려져 있다 (Kwon et al., 1993; Han et al., 1995; Han et al., 1995). 남성의 생식세포에서 microtubule의 RNA 수송에도 작용한다 (Han et al., 1995; Wu and Hecht, 2000). 뇌에서는 dendritic RNA processing에도 관여한다 (Finkenstadt et al., 2000). 최근 연구에서는 single과 double strand RNase 활성화에 작용을 한다고 보고되었다 (Wang et al., 2004).

본 연구에서는 정소 및 뇌의 발생에 중요한 역할을 담당하고 있는 TB-RBP의 기능을 PKA가 조절할 가능성을 제시하고 있다. Ca와 TB-RBP 상호작용이 갖는 생리학적인 의미는 다음과 같이 두 가지로 나누어 추측할 수 있다. 첫번째는 Ca가 TB-RBP와 직접 상호작용하여 TB-RBP를 세포질에서 핵으로 이동시킨다. 이전 연구에서 TB-RBP는 translin-associated factor X (TRAX)와 상호작용하는 것으로 알려졌다 (Aoki et al., 1997). TRAX는 33-kDa의 단백질로 TB-RBP의 아미노산과 매우 높은 상동성을 가지고 있다. TB-RBP와 유사하게 TRAX는 정소와 뇌에서 많이 발현하지만 DNA와 직접 결합하지는 않는다 (Chennathukuzhi et al., 2001). 특히, TRAX는 nuclear localization signal (NLS)를 가지고 있지만 TB-RBP는 NLS를 가지고 있지 않다. 따라서 TB-RBP가 핵으로 이동할 때, TRAX와 결합하여 세포질에서 핵으로 이동할 수 있다 (Cho et al., 2004). Ca도 TRAX와 마찬가지로 Ca의 N-말단에 NLS를 가지고 있다 (Briggs et al., 1998). 이러한 사실을 통해 Ca는 TB-RBP와 결합함으로써 Ca의 NLS를 이용하여 핵으로 전위될 수 있는 있을 것이다. 두 번째는 Ca는 전형적인 단백질 인산화 효소이기 때문에 TB-RBP를 인산화 시키거나 TB-RBP와 관련된 단백질들을 인산화시킬 수 있을 것이다. 이러한 결과로 TB-RBP의 핵산 결합 능력 또는 세포 내 위치에 영향을 줄 수 있을 것이다. PKA는 Id1, Msn2, Marf1과 같은 PKA 표적 단백질을 인산화시켜 핵과 세포질을 이동할 수 있게 조절한다 (Moir et al., 2006; Garmendia-Torres et al., 2007; Nishiyama et al., 2007). 또한 몇몇의 단백질은 PKA의 인산화에 의해 DNA 결합 능력에 영향을 받는다 (Burns and Vanden Heuvel, 2007; Nieto et al., 2007). 그러나 TB-RBP와 TRAX는 아미노산 서열상 PKA에 의한 인산화 부위를 가지고 있지 않다. 따라서 PKA는 TB-RBP의 활성화와 관련된 다른 단백질을 인산화 할 가능성을 배제하지 못할 것이다.

본 연구에서는 yeast two-hybrid 스크리닝을 통해 Ca와 상호작용하는 단백질인 TB-RBP를 발굴하였고, β -

galactosidase assay와 GST-pulldown assay를 통해 두 단백질이 서로 결합하고, 면역화학염색을 통해 세포의 같은 위치에서 발현한다는 사실을 알 수 있었다. 이어지는 연구를 통해 Ca가 TB-RBP의 핵산 결합 능력을 조절할 수 있는지 여부가 확인된다면, 발생과정에서 Ca와 TB-RBP의 기능을 좀더 자세히 연구할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2006년 과학기술부 뇌신경 생물학 사업단 지원에 의해 수행되었음.

REFERENCES

- Aoki K, Inazawa J, Takahashi T, Nakahara K, Kasai M. Genomic structure and chromosomal localization of the gene encoding translin, a recombination hotspot binding protein. *Genomics* 1997. 43: 237-241.
- Aoki K, Suzuki K, Ishida R, Kasai M. The DNA binding activity of Translin is mediated by a basic region in the ring-shaped structure conserved in evolution. *FEBS Lett.* 1999. 443: 363-366.
- Badge RM, Yardley J, Jeffreys AJ, Armour JA. Crossover breakpoint mapping identifies a subtelomeric hotspot for male meiotic recombination. *Hum Mol Genet.* 2000. 9: 1239-1244.
- Briggs LJ, Stein D, Goltz J, Corrigan VC, Efthymiadis A, Hubner S, Jans DA. The cAMP-dependent protein kinase site (Ser-312) enhances dorsal nuclear import through facilitating nuclear localization sequence/importin interaction. *J Biol Chem.* 1998. 273: 22745-22752.
- Chennathukuzhi VM, Kurihara Y, Bray JD, Hecht NB. Trax (translin-associated factor X), a primarily cytoplasmic protein, inhibits the binding of TB-RBP (translin) to RNA. *J Biol Chem.* 2001. 276: 13256-13263.
- Chennathukuzhi VM, Kurihara Y, Bray JD, Yang J, Hecht NB. Altering the GTP binding site of the DNA/RNA-binding protein, Translin/TB-RBP, decreases RNA binding and may create a dominant negative phenotype. *Nucleic Acids Res.* 2001. 29: 4433-4440.
- Finkenstadt PM, Kang WS, Jeon M, Taira E, Tang W, Baraban JM. Somatodendritic localization of Translin, a component of the Translin/Trax RNA binding complex. *J Neurochem.* 2000. 75: 1754-1762.
- Frank DA, Greenberg ME. Signal transduction pathways activated by ciliary neurotrophic factor and related cytokines. *Perspect*

- Dev Neurobiol. 1996. 4: 3-18.
- Garmendia-Torres C, Goldbeter A, Jacquet M. Nucleocytoplasmic oscillations of the yeast transcription factor Msn2: evidence for periodic PKA activation. *Curr Biol*. 2007. 17: 1044-1049.
- Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim H. Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. *J Neurochem*. 2000. 74: 151-158.
- Glantz SB, Amat JA, Rubin CS. cAMP signaling in neurons: patterns of neuronal expression and intracellular localization for a novel protein, AKAP 150, that anchors the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II beta. *Mol Biol Cell*. 1992. 3: 1215-1228.
- Han JR, Gu W, Hecht NB. Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3' untranslated regions of transported brain mRNAs. *Biol Reprod*. 1995. 3: 707-717.
- Han JR, Yiu GK, Hecht NB. Testis/brain RNA-binding protein attaches translationally repressed and transported mRNAs to microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92: 9550-9554.
- Kanazawa S, Driscoll M, Struhl K. ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol Cell Biol*. 1988. 8: 664-673.
- Kasai M, Matsuzaki T, Katayanagi K, Omori A, Maziarz RT, Strominger JL, Aoki K, Suzuki K. The translin ring specifically recognizes DNA ends at recombination hot spots in the human genome. *J Biol Chem*. 1997. 272: 11402-11407.
- Kwon YK, Hecht NB. Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation. *Mol Cell Biol*. 1993. 10: 6547-6657.
- Kwon YK, Hecht NB. Cytoplasmic protein binding to highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mouse protamine 2 mRNA, a translationally regulated transcript of male germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991. 88: 3584-3588.
- Moir RD, Lee J, Haeusler RA, Desai N, Engelke DR, Willis IM. Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. 103: 15044-15049.
- Morales CR, Wu XQ, Hecht NB. The DNA/RNA-binding protein, TB-RBP, moves from the nucleus to the cytoplasm and through intercellular bridges in male germ cells. *Dev Biol*. 1998. 201: 113-123.
- Nieto L, Joseph G, Stella A, Henri P, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B, Clottes E, Erard M. Differential effects of phosphorylation on DNA binding properties of N Oct-3 are dictated by protein/DNA complex structures. *J Mol Biol*. 2007. 370: 687-700.
- Nishiyama K, Takaji K, Uchijima Y, Kurihara Y, Asano T, Yoshimura M, Ogawa H, Kurihara H. Protein kinase A-regulated nucleocytoplasmic shuttling of Id1 during angiogenesis. *J Biol Chem*. 2007. 282: 17200-17209.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*. 1990. 59: 971-1005.
- Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E, Anand G. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2004. 1697: 259-269.
- Uhler MD, McKnight GS. Expression of cDNAs for two isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1987. 262: 15202-15207.
- Wang J, Boja ES, Oubrahim H, Chock PB. Testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin possesses both single-stranded and double-stranded ribonuclease activities. *Biochemistry* 2004. 43: 13424-13431.
- Wu XQ, Gu W, Meng X, Hecht NB. The RNA-binding protein, TB-RBP, is the mouse homologue of translin, a recombination protein associated with chromosomal translocations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997. 94: 5640-5645.
- Wu XQ, Hecht NB. Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biol Reprod*. 2000. 62: 720-725.
- Wu XQ, Xu L, Hecht NB. Dimerization of the testis brain RNA-binding protein (translin) is mediated through its C-terminus and is required for DNA- and RNA-binding. *Nucleic Acids Res*. 1998. 26: 1675-1680.
- Zimmermann B, Chiorini JA, Ma Y, Kotin RM, Herberg FW. PrKX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I. *J Biol Chem*. 1999. 274: 5370-5378.