Humane PAK5, ein Inhibitor der Kinase MARK2, reguliert die Stabilität des Mikrotubuli- und Aktinnetzwerks

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Bettina Grießhaber
aus Heidelberg

Hamburg
2005

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis **1**

2. Zusammenfassung **5**

3. Einleitung **7**
3.1 Das Zytoskelett **7**
3.1.1 Das Aktinnetzwerk 7
3.1.1.1 F-Aktin assoziierte Proteine 9
3.1.2 Das Mikrotubulinetzwerk 10
3.1.2.1 Mikrotubuli-assoziierte Proteine 12
3.1.2.1.1 Das strukturelle Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau 13
3.2 Die Beeinflussung des Zytoskeletts durch spezifische Proteinkinasen **14**
3.2.1 Destabilisierung des Mikrotubulinetzwerks durch die MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase MARK 14
3.2.1.1 Das Brückenprotein14-3-3 17
3.2.2 Die p21-aktivierten Kinasen (PAKs) - Regulatoren des Aktinnetzwerks 18
3.2.3 Die Ste-20 Kinase LIMK1:ein Aktinstabilisator 22
3.3 Zielsetzung der Arbeit **23**

4. Material **25**
4.1 Geräte **25**
4.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper 25
4.2.1 Chemikalien 25
4.2.2 Enzyme 25
4.2.3 Molekulargewichtsmarker 26
4.2.4 Kits 26
4.2.5 Antikörper 27
4.2.5.1 Primäre Antikörper 27
4.2.5.2 Sekundäre Antikörper 27
4.3 Stämme, Viren, Zellinien **27**
4.3.1 Bakterienstämme 27
4.3.2 Hefestämme 28
4.3.3 Baculoviren 28
4.3.4 Eukaryotische Zellinien 28
4.4 Plasmide **29**
4.4.1 Eukaryotische Expressionsvektoren 29
4.4.2 Eukaryotische Expressionskonstrukte 29
4.4.3 Hefe-Zwei-Hybrid Plasmide 31
4.4.4 Hefe-Zwei-Hybrid Konstrukte 31
4.4.5 Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek 33

4.5 Medien 33
4.5.1 Bakterienmedien 33
4.5.2 Hefemedien 34
4.5.3 Zellkulturmedien 35

5. Methoden 36
5.1 Molekularbiologische Methoden 36
5.1.1 Konstruktion von Expressionsplasmiden 36
5.1.1.1 Restriktionsverdau von DNA 36
5.1.1.2 Gelelektrophorese von DNA 36
5.1.1.3 Eluation von DNA aus Agarosegelen 37
5.1.1.4 Auffüllen von 5´-überhängenden DNA-Fragmenten 37
5.1.1.5 Ligation 37
5.1.1.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen 38
5.1.1.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien 38
5.1.2 Plasmidisolation aus *E.coli* (Mini- und Midimaßstab) 39
5.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA 39
5.1.4 Sequenzierung von DNA 39
5.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion 39
5.1.6 Erstellung von Punktmutationen 40
5.2 Zellbiologische Methoden 40
5.2.1 Sf9-Zellkultur 41
5.2.1.1 Baculovirus Expressionssystem 41
5.2.2 HEK293-Zellkultur 41
5.2.2.1 Calcium-Phosphat-Transfektion 42
5.2.3 CHO-Zellkultur 42
5.2.3.1 Effectene-Transfektion 43
5.2.4 Immunofluoreszenz 43
5.3 Biochemische Methoden 44
5.3.1 Proteinbestimmung 44
5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 44
5.3.2.1 Anfärbung der SDS-Gele 45
5.3.3 Western-Blot 45
5.3.4 Herstellung von Zellhomogenaten 46
5.3.5 Aufreinigung von His-markierten Fusionsproteinen aus Insektenzellen 48
5.3.6 Koimmunopräzipitationsexperimente 48
5.3.7 Kinase-Assay 49
5.4 Zwei-Hybrid-Methoden 50
5.4.1 Amplifikation von cDNA-Bibliotheken 51
5.4.2 Hefetransformation und Direkter Zwei-Hybrid-Test 51
5.4.2.1 Transformation von *S.cerevisiae* mit Plasmiden 52
5.4.2.2 Direkter Zwei-Hybrid-Test 52
5.4.3 Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek-Screen 53
5.4.3.1 Transformation von *S.cerevisiae* für den Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek-Screen 54
5.4.3.1.1 Berechnung der Transformationseffizienz 55

5.4.3.2 Identifizierung der positiven Klone 56
5.4.3.2.1 Hefe-Köder-Verlustkulturen 56
5.4.3.2.2 *E.coli*-Transformation mit Beute-Plasmiden aus Hefezellen 57
5.4.3.2.3 Hefe-Retransformation mit Beute-Plasmiden aus *E.coli* 57
5.4.3.2.4 Sequenzierung der positiven Klone 58

6. Ergebnisse 59
6.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner von MARK2 und MARK3 59
6.1.1 Test der Zwei-Hybrid-Konstrukte auf korrekte Klonierung und Expression in Hefen 60
6.1.2 Screen einer fötalen menschlichen cDNA-Gehirnbank 60
6.1.2.1 Gal4-Zwei-Hybrid-Screen mit MARK3 60
6.1.2.2 Gal4-Zwei-Hybrid-Screen mit MARK2 T208A/S212A 61
6.1.2.3 Identifizierte Klone aus dem MARK3- und MARK2 T208A/S212A-Screen 62
6.1.2.3.1 Die Serin/Threonin Kinase PAK5 62
6.1.2.3.2 Das Brückenprotein 14-3-3 62
6.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2, PAK5 und 14-3-3 63
6.2.1 Kartierung der Interaktionsdomänen von MARK2, PAK5 und 14-3-3 im Zwei-Hybrid-System 63
6.2.2 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen MARK2, PAK5 und 14-3-3 66
6.2.2.1 Interaktion von MARK2 mit PAK5 in Sf9-Zellen 66
6.2.2.2 Kopräzipitation von MARK2 und endogenem 14-3-3 in Sf9-Zellen 68
6.3 *in vitro* Untersuchung der Aktivität von MARK2 und PAK5 69
6.3.1 Aktivitätsvergleich verschiedener PAK5-Konstrukte 69
6.3.2 PAK5 inhibiert die Kinaseaktivität von MARK2 70
6.3.2.1 Die Inhibitionskonstante (K_i) von MARK2 und PAK5 73
6.4 Koexpressionsstudien zur Untersuchung der Interaktion von MARK2 und PAK5 74
6.4.1 Zeitreihenexperimente zur Charakterisierung der PAK5-Expression 74
6.4.2 Kolokalisation von MARK2 und PAK5 in CHO-Zellen 75
6.4.3 PAK5 inhibiert MARK2 und reguliert die Stabilität des Mikrotubuli- und Aktinnetzwerks 77
6.5 *in vitro* Untersuchungen der PAK5-Autoinhibierung 82
6.5.1 Untersuchung der intra- und intermolekularen PAK5-Wechselwirkungen im Zwei-Hybrid-System 82
6.5.2 Überprüfung der PAK5-Autoinhibierung im Aktivitätsassay 84
6.6 LIMK1: ein potentieller Interaktionspartner von PAK5? 85
6.6.1 Interaktionsuntersuchungen zwischen PAK5 und LIMK1 im Zwei-Hybrid-System 86
6.6.2 *in vivo* Koexpressionsstudien zur Untersuchung der Interaktion von PAK5 und LIMK1 87

7. Diskussion **90**
7.1 Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner von MARK **90**
7.2 Die Rolle von MARK und PAK5 in der Regulation des Zytoskeletts **92**
7.3 Untersuchung der Autoregulation von PAK5 **95**
7.4 LIMK1: ein möglicher Interaktionspartner von PAK5? **98**

8. Abkürzungen **101**

9. Literatur **104**

Anhang **112**
A.1 PAK-Proteinsequenzvergleich **112**
A.1.1 Proteinsequenzvergleich von PAK1-3 (Gruppe I) 112
A.1.2 Proteinsequenzvergleich von PAK4-6 (Gruppe II) 113
A.1.3 Proteinsequenzvergleich zwischen PAK1 (Gruppe I) und PAK5 (GruppeII) 115
A.2 Lebenslauf **118**
A.3 Danksagung **119**

2. Zusammenfassung

Die Familie der MARK-Kinasen ist an der Entwicklung und Erhaltung zellulärer Polarität beteiligt. Ursprünglich wurde MARK (MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase) aufgrund seiner Fähigkeit entdeckt, das neuronale Mikrotubuli-assoziierte Tau Protein zu phosphorylieren. Eine durch MARK ausgelöste Phosphorylierung bewirkt die Ablösung des Tau Proteins von den Mikrotubuli (MT) und führt im Folgenden zu deren Destabilisierung. Diese Reaktion könnte zur Bildung der intrazellulären abnormalen Tauaggregate (PHFs, paarige helikale Filamente) führen, welche die Alzheimer Krankheit kennzeichnen.

In dieser Arbeit wurde mittels des Zwei-Hybrid-Systems nach neuen Interaktionspartnern der Serin/Threonin Kinase MARK gesucht. Neben dem in der Literatur bekannten Bindungspartner 14-3-3 konnte die Kinase PAK5 als neuer Interaktionspartner von MARK identifiziert werden.
PAK5 wird gehirnspezifisch exprimiert und gehört der p21-aktivierten Kinase Familie an. Einige ihrer Mitglieder werden durch Rac/Cdc42 reguliert und üben als GTPase-Effektoren eine wichtige Funktion bei der Regulation des Aktinnetzwerks aus. Im Gegensatz dazu sind Funktion und Regulation von PAK5 noch nicht eindeutig geklärt. Eine PAK5-Überexpression in neuronalen Zellen führt zur Bildung von Neuritenauswüchsen, Filopodien und dendritischen Verästelungen. Die Regulation von PAK5 über Cdc42 wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert.

Eine Bestätigung der im Zwei-Hybrid-Screen charakterisierten Interaktion zwischen MARK und PAK5 erfolgte durch biochemische Präzipitationsanalysen und zellbiologische Kolokalisationsstudien. Desweiteren konnte der funktionale Zusammenhang der beiden Kinasen näher bestimmt werden. Überexpressionsexperimente in CHO-Zellen zeigten deutlich, dass PAK5 als Inhibitor der MT-destabilisierenden Kinase MARK fungiert. So konnte in MARK/PAK5 kotransfizierten Zellen ein dynamisches Aktin- und ein stabiles Mikrotubulinetzwerk nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse der *in vitro* Kinaseassays, dass diese Inhibierung durch Bindung und nicht durch Phosphorylierung erfolgt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kinasen MARK und PAK5 eine wichtige

Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts spielen, wobei der „Aktinschalter“ PAK5 den „MT-Schalter“ MARK in seiner MT-destabilisierenden Funktion inhibiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die in der Literatur beschriebene Autoregulation von PAK5 überprüft. Im Gegensatz zu Ching et al. (2003) konnte im Kinaseassay eine Autoinhibierung der PAK5 durch das N-terminale AID-Fragment (AS 1-181) nicht bestätigt werden.

Der Aktinstabilisator LIMK1 wird durch PAK4 phosphoryliert und aktiviert. Aufgrund der großen Sequenzhomologie zwischen PAK4 und PAK5 wurde in Zwei-Hybrid-Experimenten eine mögliche Interaktion zwischen PAK5 und der Kinase LIMK1 untersucht. Eine Wechselwirkung konnte hierbei genauer charakterisiert werden. Allerdings lassen die zellbiologischen Ergebnisse vermuten, dass PAK4 und PAK5 das Aktinnetzwerk auf gegensätzliche Weise regulieren.

3. Einleitung

3.1 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett setzt sich aus drei filamentären Polymeren zusammen: den Aktin-Filamenten (Mikrofilamenten), den Mikrotubuli (MT) und den Intermediärfilamenten (IF). Diese drei Filamenttypen formen im Zusammenspiel mit spezifischen Bindeproteinen ein dynamisches Netzwerk, das in der lebenden Zelle verschiedene essentielle Aufgaben erfüllt. Es reguliert den intrazellulären Transport von Organellen, die Trennung von Chromosomen während der Meiose und Mitose, schützt die Zelle vor äußeren mechanischen Belastungen und ist an der spezifischen Formgebung der Zelle beteiligt (Alberts et al., 2001).

Die Formgebung bzw. Gestaltveränderung der Zelle ist z.B. für die Entwicklung eines Neurons von entscheidender Bedeutung. So wird die Entstehung von Zellausläufern (Neuriten), die axonale Wegfindung, sowie die dendritische Ausdifferenzierung und strukturelle Plastizität (Alberts et al., 2001) durch das Zytoskelett reguliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Beeinflussung der Mikrotubuli- und Aktindynamik durch die Kinasen PAK5 und MARK2 beobachtet werden. Im Folgenden soll daher näher auf das Mikrotubuli- und Aktinnetzwerk eingegangen werden.

3.1.1 Das Aktinnetzwerk

Ursprünglich wurde Aktin als Bestandteil des Aktin-Myosin Komplexes identifiziert, der einen geordneten Kontraktionsablauf der Skelettmuskulatur gewährleistet (Straub, 1942).
In vielen Eukaryontenzellen ist Aktin mit einem Anteil von 5 % an der Gesamtproteinmenge das häufigste Zellprotein. In engem Kontakt zur Zellmembran bildet Aktin ein dichtes Netzwerk, das der Zelle mechanische Stabilität verleiht und die Kontakte zwischen Transmembranproteinen und zytoplasmatischen Proteinen aufrecht erhält. Desweiteren spielt das Aktinnetzwerk eine essentielle Rolle bei der Verschiebung des Zytoplasmas sowie der

Bewegungsfähigkeit motiler Zellen (z.B. Leukozyten) (Wong et al., 1983; Lum et al., 1994; Alberts et al., 2001).

Mit einem Durchmesser von ca. 7 nm stellen Aktinfilamente (F-Aktin) die dünnsten filamentären Strukturen des Zytoskeletts dar und werden daher auch als Mikrofilamente bezeichnet (Lodish et al., 1996; Alberts et al., 2001).
Jedes Mikrofilament (F-Aktin) besteht aus polymerisierten Aktinmonomeren (G-Aktin), an die ein ADP-Molekül gebunden ist. Nachdem die wachsenden Aktinfilamente ihre Maximallänge erreicht haben, wird in einem dynamischen Fließgleichgewicht an das eine Filamentende (Plus-Ende) ATP-G-Aktin angelagert bzw. am anderen Ende (Minus-Ende) ADP-G-Aktin abgespalten. Da dies zu einem stetigen Fluss von Aktinuntereinheiten durch das Aktinfilament führt, wird dieser Prozess als Tretmühlenmechanismus („Treadmilling“) bezeichnet (Wegner et al., 1982).

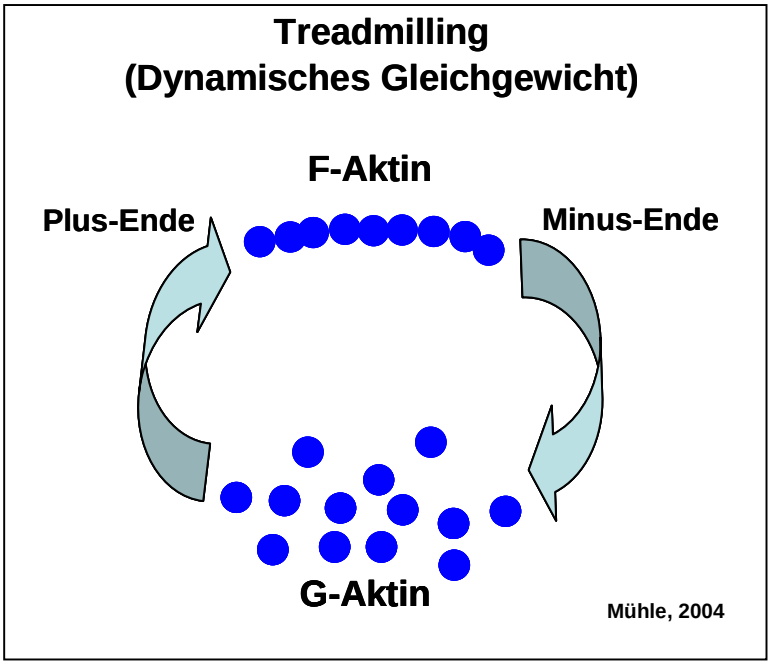


Abbildung 1: Schematische Darstellung des F-Aktin Treadmillings
G-Aktin lagert sich in einem dynamischen Gleichgewichtsprozess an das „Plus-Ende“ an, während ein Abbau des G-Aktins am „Minus-Ende“ erfolgt.

3.1.1.1 F-Aktin assoziierte Proteine

In Nervenzellen und anderen Zelltypen findet man verschiedene Strukturen polymerisierten F-Aktins: lamellenartige Aktinvernetzungen (Lamellipodien) an der Bewegungsfront („leading edge“) motiler Zellen, parallel angeordnete Aktinfasern (Filopodien) in fingerartigen Zellausläufern sowie Aktinfaserbündel (Stressfasern), die mit Zelladhäsionspunkten in Verbindung stehen (Small et al., 2002; Palazzo et al., 2002).
Für die Entstehung von Lamellipodien und Filopodien ist die kontrollierte Aktinpolymerisation unerlässlich. Das schematische Treadmilling-Modell in Abbildung 1 ist stark vereinfacht dargestellt. Tatsächlich existieren mehrere Aktin-assoziierte Proteine, die den dynamischen Umsatz des Aktinnetzwerks kontrollieren und regulieren. Hierbei unterscheidet man die Aktin-stabilisierenden von den Aktin-destabilisierenden Proteinen.
So katalysiert zum Beispiel das Protein Profilin den Austausch von ADP-G-Aktin zu ATP-G-Aktin, wodurch die Polymerisation neuer Aktinfilamente aktiviert wird (Pollard und Cooper, 1984; Pollard und Borisy, 2003).

Proteine der WASP-Familie und der Arp2/3-Komplex üben ebenfalls einen positiven Effekt auf das Wachstum der Aktinfilamente aus. WASP aktiviert den Arp2/3-Komplex, der daraufhin die Polymerisation von Aktinmonomeren an Verzweigungspunkten („branching points“) bestehender Aktinfilamente initiiert (Mullins et al., 1998; Volkmann et al., 2001).
In einem parallelen Signalweg stabilisieren Proteine der PAK-Familie zusammen mit der Kinase LIMK1 (s. 3.2.3) die Aktinfilamente durch die Inhibierung des Aktin-destabilisierenden Faktors Cofilin. Aktives Cofilin erhöht im Gegenzug die Dissoziationsrate von G-Aktin am Minus-Ende der Aktinfilamente (zusammengefasst in Chen et al., 2000).
Eine weitere Determinierung der wachsenden Aktinfilamente erfolgt durch Capping-Proteine wie z.B. CapZ. Dieses lagert sich an das Plus-Ende der Filamente an und verhindert durch Abschirmung das Wachstum der Aktinfilamente (Cooper und Schafer, 2000).
Zum besseren Verständnis der oben beschriebenen Aktin-stabilisierenden und destabilisierenden Prozesse ist in Abbildung 2 eine Übersicht der Aktinmaschinerie aus Pollard und Borisy (2003) dargestellt.

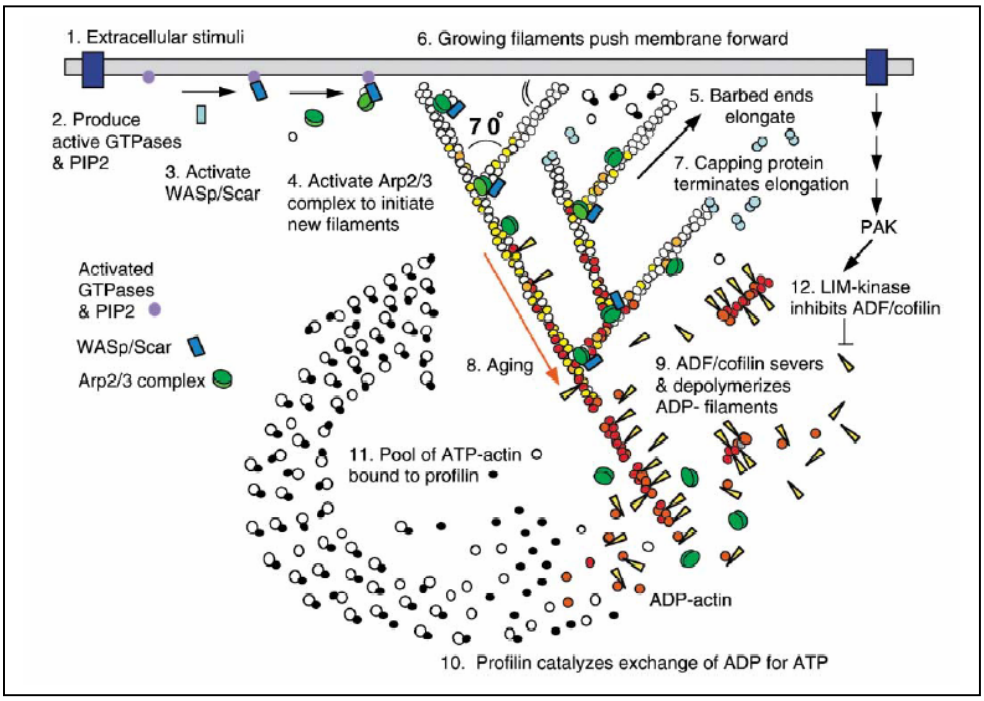


Abbildung 2: Treadmilling-Modell der Aktinmaschinerie an der Bewegungsfront („leading edge“) einer motilen Zelle (Pollard und Borisy, 2003)
(1) Ein extrazelluläres Signal aktiviert einen Rezeptor. **(2)** Dadurch werden GTPasen und PIP2 aktiviert, **(3)** welche wiederum WASP aktivieren. **(4)** WASP bringt Aktinmonomere mit Arp2/3 zusammen, damit eine neue Filamentabzweigung initiiert wird. **(5)** Das rasche Wachstum des „barbed end“ (Plus-Ende) des sich neu bildenden Filaments **(6)** schiebt die Zellmembran vorwärts. **(7)** Capping Proteine terminieren das Filamentwachstum innerhalb von 1 bis 2 Sekunden. **(8)** Am Minus-Ende findet die Hydrolyse von G-Aktin gebundenem ATP zu ADP statt, wodurch die Aktinfilamente depolymerisieren. **(9)** Cofilin bewirkt die Abspaltung von ADP-Aktin von den Enden der Aktinfilamenten. **(10)** Profilin katalysiert den Austausch von ADP zu ATP und **(11)** rekrutiert ATP-Aktinmonomere zum Pool freien ATP-G-Aktins, die für die Elongation der „barbed ends“ (Plus-Enden) zur Verfügung stehen. **(12)** In einem parallelen Signalweg wird der Aktin-Destabilisierungsfaktor Cofilin von LIMK1 phosphoryliert und dadurch inhibiert.

3.1.2 Das Mikrotubulinetzwerk

Mikrotubuli bilden hohle zylindrische Strukturen, die sternförmig vom Zentrosom in die Zellperipherie ausstrahlen. Mit einem Durchmesser von 25 nm stellen sie die stärkste Gerüstfaser des Zytoskeletts dar.

Ein Mikrotubulus setzt sich aus 13 Protofilamenten zusammen, die jeweils aus polymerisiertem α- und β-Tubulin aufgebaut sind. Alle Protofilamente verlaufen parallel zur Längsachse und besitzen die gleiche α/β-Ausrichtung. Durch diese Anordnung erhält jedes MT-Filament eine Polarität mit einem zur Zellmembran gerichteten Plus-Ende und einem im

Zentrosom verankerten Minus-Ende (Mandelkow und Mandelkow, 1995; Stryer, 1996; Alberts, 2001).
Eine weitere Tubulin-Isoform ist das γ-Tubulin, welches im Zentrosom lokalisiert ist. γ-Tubuline werden als Ausgangspunkte wachsender MT beschrieben (Oakley und Oakley, 1998; Oakley und Akkari, 1999).

Mikrotubuli spielen eine essentielle Rolle bei der inneren und äußeren Organisation eukaryontischer Zellen. Sie bilden die strukturelle Hauptkomponente der Mitosespindel und sind an der Trennung der Tochterchromosomen während der Mitose beteiligt. Weiterhin formen sie die „dynamischen Schienen“ für den gezielten intrazellulären Organellen- und Vesikeltransport (z.B. Endosome, Lysosome, Mitochondrien) und wirken maßgeblich am Aufbau und Erhalt der Zellform und Zellpolarität mit (Stryer, 1996; Alberts, 2001).

Für die Veränderungen der Zellform sowie die Ausbildung der Mitosespindel ist ein rascher Auf- und Abbau der Mikrotubuli notwendig (s. Abb. 3).
Entscheidend bei diesem Prozess ist die Hydrolyse des an Tubulin gebundenen GTP`s. GTP-Tubulin bindet mit einer hohen Affinität an die Plus-Enden der Mikrotubuli und stabilisiert diese. Sekunden später kann GTP- zu GDP-Tubulin umgesetzt werden, was zur Destabilisierung der MT-Enden führt. Aufgrund ihrer unterschiedlich markierten Enden (stabilisierendes GTP-Tubulin, destabilisierendes GDP-Tubulin) werden einige Mikrotubuli innerhalb einer Filamentpopulation länger bzw. kürzer. Diese Eigenschaft wird als „dynamische Instabilität“ bezeichnet (Mitchison und Kirschner, 1984; Stryer 1996).

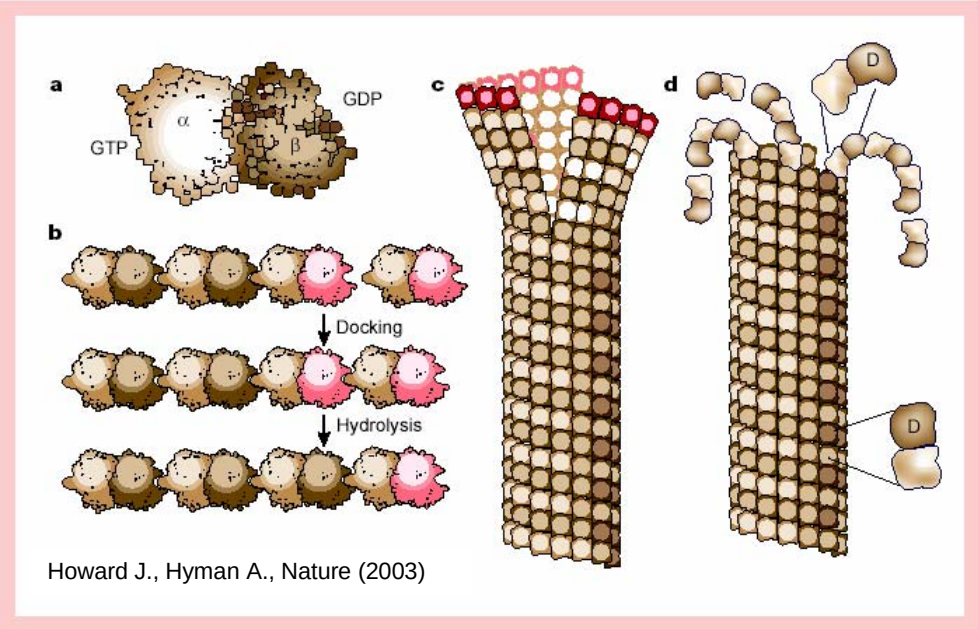


Abbildung 3: Modell für die strukturellen Veränderungen der Mikrotubuli während des GTP-Hydrolyse-Zyklus
(A) Modell eines Tubulin-Dimers, das aus einer α- und β-Untereinheit aufgebaut ist.
(B) Kopplung der α- und β-Tubulinuntereinheiten an das Mikrotubulus-Ende. Das angedockte α-Tubulin (gelb) löst die GTP-Hydrolyse an der endständigen β-Untereinheit (rot) aus.
(C) wachsendes Mikrotubulus-Ende (GTP-Tubulin): Die Protofilamente bilden eine gerade Form.
(D) zerfallendes Mikrotubulus-Ende (GDP-Tubulin): Die Protofilamente beugen sich und depolymerisieren. (D = β-Tubulinuntereinheit) (Mandelkow et al., 1991)

3.1.2.1 Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Zur Ausbildung und Organisation der Mikrotubulistruktur in der Zelle tragen eine Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) bei. Ihrer Funktion nach werden sie in drei Hauptgruppen unterteilt: die erste Gruppe umfasst die strukturellen MAPs, die die dynamische Instabilität der Mikrotubuli beeinflussen. Hierzu zählen die hochmolekularen Proteine (über 200 kDa) MAP1, 2, 3 und 4 sowie die niedermolekularen Tau-Proteine (50-70 kDa). Zur zweiten Gruppe gehören Motor-Proteine wie Kinesin und Dynein, die für den intrazellulären Transport entlang der Mikrotubuli verantwortlich sind. Die dritte Gruppe setzt sich aus relativ heterogenen Proteinen und Enzymen zusammen, die unter anderem den Mikrotubulus als zytoskeletären Anker benutzen (Mandelkow und Mandelkow, 1995).

3.1.2.1.1 Das strukturelle Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau

Innerhalb der strukturellen MAPs bilden die Tau-Proteine bedingt durch ihr niederes Molekulargewicht von 50-70 kDa eine Untergruppe.
Das Tau Protein ist das vorherrschende MAP in den Axonen. Im humanen zentralen Nervensystem werden durch alternatives Spleißen der Tau-mRNA sechs Isoformen exprimiert. Diese unterscheiden sich durch ein bis zwei N-terminale Einschübe (29 AS) in Kombination mit entweder drei oder vier C-terminalen Sequenzwiederholungen von 31-32 AS (3-Repeat oder 4-Repeat Tau (Himmler et al., 1989)).
Das Tau Protein kann in verschiedene funktionelle Domänen unterteilt werden. Der N-terminale Bereich, der nicht an Mikrotubuli bindet und aus der Oberfläche herausragt, wird als Projektionsdomäne bezeichnet. Die C-terminale Assemblierungsdomäne mit den Repeat-Domänen und den flankierenden prolinreichen Regionen bindet an die MT und führt zu deren Polymerisation (Gustke et al., 1994).

Neben der Stabilisierung der Mikrotubuli ist das Tau Protein an weiteren zellulären Prozessen beteiligt. So konnte durch Überexpression eine Beteiligung des Tau-Proteins an dem intrazellulären Transport von Vesikeln und Zellorganellen entlang der MT gezeigt werden (Ebneth et al., 1998). Weiterhin wird eine Tau-Beteiligung an der Ausbildung von Zellfortsätzen und der neuronalen Polarität diskutiert (Binder et al., 1985; Matus, 1988, Biernat und Mandelkow, 1999) sowie eine Interaktion mit Aktinfilamenten vermutet (Cunningham et al., 1997).

Die Bindung von Tau an die Mikrotubuli wird durch zahlreiche Phosphorylierungen reguliert. Tau wird *in vitro* von der Caseinkinase I und II (Pierre und Nunez, 1983; Singh et al., 1995), den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2 und CDK5 (Baumann et al., 1993; Paudel et al., 1993), der Phospholipid-abhängigen Proteinkinase PKC (Correas et al., 1992), der mitogen-aktivierten Proteinkinase MAP (Drewes et al., 1992), der Glykogen-Synthase Kinase GSK3 (Mandelkow et al., 1992) sowie der Ca^{2+}/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase CaMK (Steiner et al., 1990) phosphoryliert.

Während der Alzheimer-Demenz kommt es zu einer Tau-Hyperphosphorylierung (Morishima-Kawashima et al., 1995) sowie zur Ausbildung von Tau-Aggregaten, den paarigen helikalen Filamenten (PHFs, „paired helical filaments“). Diese lagern sich zu neurofibrillären Bündeln (NFTs, „neurofibrillary tangels“) zusammen, die auf intrazellulärer Ebene die Hauptkennzeichen der Alzheimerschen Krankheit darstellen (Hasegawa et al., 1992; Delacourte und Buee, 2000).

Eine besondere Rolle bei der Affinitätsregulierung von Tau an den Mikrotubuli spielt offenbar die Phosphorylierung des Serins 262 innerhalb des KXGS-Motivs der MT-bindenden Domäne von Tau. Von speziellem Interesse ist dabei die Proteinkinase MARK, die das Serin 262 (neben anderen verwandten Motiven) phosphoryliert und ein Ablösen des Tau Proteins von den MT bewirkt (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1997; Illenberger er al., 1998).
Im folgenden Kapitel soll die Struktur, die zelluläre Funktion und die Regulation der Proteinkinase MARK erläutert werden.

3.2 Die Beeinflussung des Zytoskeletts durch spezifische Proteinkinasen

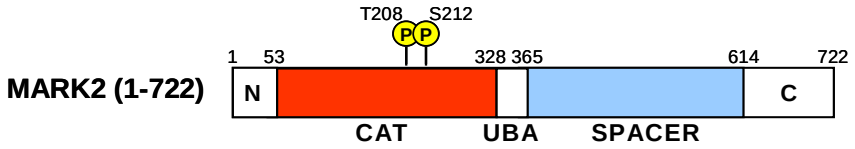
3.2.1 Destabilisierung des Mikrotubulinetzwerks durch die MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase MARK

Die Serin/Threonin Kinase MARK (MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase) wurde ursprünglich aufgrund ihrer Fähigkeit entdeckt, neuronales Tau zu phosphorylieren. In gesunden Neuronen stabilisiert das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau die Mikrotubuli und sichert somit den axonalen Transport. Eine durch MARK ausgelöste Phosphorylierung bewirkt die Ablösung des Tau Proteins von den Mikrotubuli und führt im Folgenden zu deren Destabilisierung (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1997).

Die MARK-Unterfamilie gehört zu der Gruppe der Ca^{2+}/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen. Sie besteht aus vier Isoformen, die sich jeweils in eine N-terminale Kopf-Sequenz, eine konservierte Kinasedomäne von ca. 30 kDa, eine Ubiquitin-assoziierte Domäne

(UBA; Hofman und Bucher, 1996), den Spacer und einen 108 Aminosäuren langen C-terminalen Endbereich gliedern (s. Abb. 4).

A



B

```
                                N-Terminus
  1 MSSARTPLPTLNERDTEQPTLGHLDSKPSSKSNMLRGRNSATSADEQPHIGNYRLLKTIG

 61 KGNFAKVKLARHILTGKEVAVKIIDKTQLNSSSLQKLFREVRIMKVLNHPNIVKLFEVIE
                                CAT
121 TEKTLYLVMEYASGGEVFDYLVAHGRMKEKEARAKFRQIVSAVQYCHQKFIVHRDLKAEN
                                208  212
181 LLLDADMNIKIADFGFSNEFTFGNKLDTFCGSPPYAAPELFQGKKYDGPEVDVWSLGVIL

241 YTLVSGSLPFDGQNLKELRERVLRGKYRIPFYMSTDCENLLKKFLILNPSKRGTLEQIMK
                                                    UBA
301 DRWMNVGHEDDELKPYVEPLPDYKDPRRTELMVSMGYTREEIQDSLVGQRYNEVMATYLL

361 LGYKSSELEGDTITLKPRPSADLTNSSAPSPSHKVQRSVSANPKQRRSSDQAVPAIPTSN

421 SYSKKTQSNNAENKRPEEETGRKASSTAKVPASPLPGLDRKKTTPTPSTNSVLSTSTNRS
                                SPACER
481 RNSPLLDRASLGQASIQNGKDSTAPQRVPVASPSAHNISSSSGAPDRTNFPRGVSSRSTF

541 HAGQLRQVRDQQNLPFGVTPASPSGHSQGRRGASGSIFSKFTSKFVRRNLNEPESKDRVE

601 TLRPHVVGGGGTDKEKEEFREAKPRSLRFTWSMKTTSSMEPNEMMREIRKVLDANSCQSE
                                C-Terminus
661 LHERYMLLCVHGTPGHENFVQWEMEVCKLPRLSLNGVRFKRISGTSMAFKNIASKIANEL

721 KL
```

Abbildung 4: Domänenstruktur und Proteinsequenz von MARK2
(A) MARK2 (Drewes et al., 1997) besitzt eine Länge von 722 Aminosäuren, die in verschiedene Domänen untergliedert werden. Die Zahlen oberhalb der schematischen Struktur (A) kennzeichnen die Aminosäuren der einzelnen Domänen. Die Phosphorylierung der Aminosäurereste T208 und S212 spielen bei der Regulation der Kinase eine bedeutende Rolle. N: N-terminale Domäne, CAT: katalytische Domäne mit Aktivierungs-schleife (grau unterlegt), UBA: Ubiquitin-assoziierte Domäne, SPACER: Spacer-Domäne, C: C-terminale Domäne
(B) Aminosäuresequenz von MARK2.

Die größte Homologie findet man zwischen MARK1 und MARK2 in der katalytischen Domäne (97 %), der UBA (85 %) und dem C-terminalen Endbereich (80 %). Im Spacerbereich konnte eine Sequenzübereinstimmung von nur 50 % festgestellt werden (Drewes et al., 1997).

Die MARKs weisen Homologien zu Kin1+ aus *Schizosaccharomyces pombe*, KIN 1 und 2 aus *Sacharomyces cerevisiae* sowie Par-1 aus *C. elegans* und *D. melanogaster* auf, die alle in der embryonalen Polaritätsentwicklung eine essentielle Rolle spielen (Levin et al., 1987; Levin und Bishop, 1990; Guo und Kemphues, 1995; Shulman et al., 2000; Pelletieri und Seydoux, 2002; Fortini, 2004). Eine Beteiligung der MARK Proteine an Polarität und Wachstum konnte auch in Neuronen festgestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass MARK die dynamische MT-Instabilität fördert, die für die Formation des Wachstumskegels von Neuronen unabdingbar ist (Biernat et al., 2002; Timm et al., 2003).
Mäusen, denen das MARK2-Gen fehlt, zeigten Störungen im Immunsystem, jedoch keine in der Polaritätsentwicklung (Hurov et al., 2001). Dies lässt sich durch mögliche redundante Eigenschaften und Funktionen innerhalb der MARK-Unterfamilie erklären.

Die Regulation der im menschlichen Gehirn exprimierten MARK erfolgt durch die Ste20-Kinase MARKK (MARK-Kinase). Hierbei spielt die Aminosäure Threonin 208 (T208) innerhalb der Aktivierungsschleife eine wichtige Rolle. Durch die Phosphorylierung von T208 wird der Zugang der katalytischen Tasche stabilisiert, wodurch die aktiven Reste von MARK in räumliche Nähe zu dem Substrat gebracht werden (Timm et al., 2003).
Die Aktivierung von MARKK resultiert ebenso wie die von MARK2 in der Ablösung des Tau Proteins von den Mikrotubuli und der damit einhergehenden Degeneration neuronaler Zellen.
Neben der erwähnten Regulation durch MARKK sind weitere Regulationsmechanismen für MARK denkbar. So findet z.B. im Falle anderer Multi-Domänen Kinasen die Regulation der Kinaseaktivität auf verschiedenen Ebenen statt (Huse und Kuriyan, 2002). Bekannte Beispiele sind Pseudo-Substrat-Peptide in der katalytischen Tasche, die mit einem Inhibitor- oder Aktivatorprotein einen Komplex bilden, regulierende Dimerisierungen oder die Bindung an Brückenproteine, welche die Lokalisation der Kinasen in bestimmten Kompartimenten beeinflussen.

Unter Berücksichtigung dieses Hintergrundes sollte nach neuen Interaktions- und Regulierungspartnern von MARK gesucht werden. Im Folgenden wird das im Zwei-Hybrid-Screen isolierte Brückenprotein 14-3-3 kurz charakterisiert. In Kapitel 3.2.2 wird dann genauer auf den neu identifizierten Interaktionspartner von MARK2, die Serin/Threonin Kinase PAK5, eingegangen.

3.2.1.1 Das Brückenprotein 14-3-3

Die verschiedenen Isoformen der 14-3-3 Familie repräsentieren hoch konservierte, ubiquitär exprimierte Proteine, die in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Signaltransduktion (Zhang et al., 1997), Zell-Zyklus Regulation (Yang et al., 1999), neuronale Entwicklungsprozesse (Chang et al., 1997) und Apoptose (Zha et al., 1996) eine wichtige Rolle spielen. 14-3-3 Proteine existieren als Homo- oder Heteromere mit einem monomeren Molekulargewicht von 30 kDa (Aitken et al., 1992). In Säugetieren wurden mittlerweile sieben 14-3-3 Isoformen identifiziert, die in Anlehnung an ihre jeweiligen HPLC-Eluationspositionen mit griechischen Buchstaben ($\beta,\varepsilon,\gamma,\eta,\sigma,\tau,\zeta$) bezeichnet werden (Fu et al., 2000).

Aufgrund der Vielzahl von verschiedenen Bindungspartnern (unter anderem Kinasen, Phosphatasen, Transmembranrezeptoren und anderen Signalmolekülen (Fu et al., 2000)) wird angenommen, dass 14-3-3 die Funktion eines Brückenproteins übernimmt. So könnte es unter anderem für die räumliche Anordnung von Signaltransduktionskomplexen von Bedeutung sein (Aitken, 1996; Morrison, 1994).

Benton et al. (2002) identifizierten die MARK-homologe Kinase PAR-1 aus *D. melanogaster* als einen neuen Interaktionspartner von 14-3-3. Mit Hilfe von biochemischen und zellbiologischen Verfahren konnte dargestellt werden, dass 14-3-3 als ein essentieller Kofaktor für die von PAR-1 regulierte Ausbildung der Zellachse fungiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 14-3-3 und PAK5 mittels Zwei-Hybrid- und Koimmunopräzipitationsanalysen als Interaktionspartner der humanen Kinase MARK2

beschrieben. Für eine vollständige Aufklärung der MARK-Regulierung könnten in Zukunft weitere Experimente wie z.B. die Untersuchung eines potentiellen MARK2/PAK5/14-3-3-Ternär-Komplexes sowie die Funktionsanalyse der einzelnen Komponenten von Interesse sein.

3.2.2 Die p21-aktivierten Kinasen (PAKs) - Regulatoren des Aktinnetzwerks

Die p21-aktivierten Serin/Threonin Kinasen (PAKs) sind Mitglieder der Rac/Cdc42-assoziierten Serin/Threonin Kinase Familie und üben als GTPase-Effektoren eine wichtige Funktion bei der Regulation des Aktinnetzwerks aus.
Bis jetzt wurden sechs menschliche PAKs identifiziert, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie in Gruppe I (PAK1-3) und Gruppe II (PAK4-6) unterteilt werden.

Die Proteinstruktur der PAKs gliedert sich in eine N-terminale regulatorische Domäne, die die hoch konservierte p21-Bindedomäne (PBD) beinhaltet, sowie eine C-terminale Kinase-domäne. Die PBD, auch als GTPase-Bindedomäne (GBD) bezeichnet, beinhaltet das CRIB-Motiv (Cdc42/Rac-Interaktionsbindedomäne), welches für die Regulation der Kinaseaktivität der Gruppe I (PAK 1-3) notwendig ist (Bagrodia und Cerione, 1999; Daniels et al., 1999; Dan et al., 2001; Jaffer et al., 2002). Direkt im Anschluß an die PBD folgt in Gruppe I das Kinase-Inhibitor-Motiv (KI-Motiv), das bei der Autoinhibierung der Kinasen eine Rolle spielt.
Zwischen dem katalytischen und dem regulatorischen Bereich befindet sich eine prolinreiche Domäne, die mit SH3-Motiven anderer Moleküle wie z.B. PIX oder Nck wechselwirkt (Daniels et al., 1999).

Die Röntgenstrukturanalyse von PAK1 zeigt, dass die Kinase als Dimer vorliegt. Durch die reziproke Wechselwirkung zweier regulatorischer Domänen entsteht eine Proteinkonformation, bei der das Kinase-Inhibitor-Motiv des einen Monomers in die katalytische Tasche des anderen hineinragt und dabei die Aktivierungsschleife der Kinase blockiert (s. Abb. 5). Eine Bindung der G-Proteine Cdc42/Rac an die p21-Bindedomäne verursacht die Dissoziation des Dimers und damit die Öffnung der katalytischen Tasche (Lei at al., 2000; Parrini et al., 2002; Lei et al., 2005).

Für die vollständige Kinaseaktivität wird die Autophosphorylierung in der Aktivitätsschleife benötigt. Eine erneute Kinase-Inhibierung durch Dimerisierung wird durch nachfolgende Autophoshorylierungsreaktionen in der regulatorischen Domäne unterbunden (Buchwald et al., 2001; Chong et al., 2001).

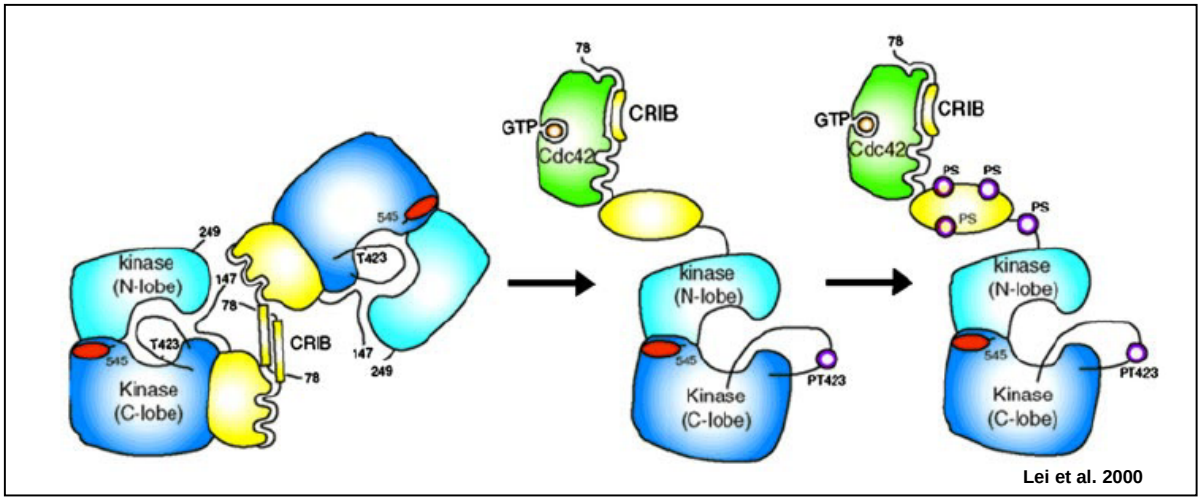
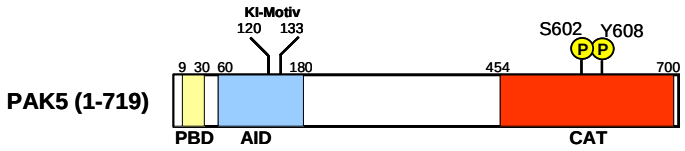


Abbildung 5: Modell der PAK1-Aktivierung (nach Lei at al., 2000; Parrini et al., 2002)
Links: PAK1 liegt als autoinhibiertes Dimer vor. Das Kinaseinhibitor (KI)-Motiv (AS 137-149) besetzt die Öffnung der katalytischen Tasche und stabilisiert dabei eine inhibierte katalytische Konformation. Gelb kennzeichnet die N-terminale regulatorische Domäne, die verschiedenen Blautöne die Kinasedomäne. Ein C-terminales $G_{\beta\gamma}$-Bindemotiv ist rot dargestellt. Die Zahlen stehen für die Aminosäurereste. (Die Aminosäuren 149-249 sind in der Abbildung nicht dargestellt).
Mitte: Durch die Bindung von GTP-Cdc42 (-Rac) an die CRIB-Domäne dissoziiert das Dimer auseinander und entfaltet die regulatorische Domäne. Diese Konformationsänderung verursacht das Zurückweichen des KI-Motivs und somit die Öffnung der katalytischen Tasche bzw. das Freilegen der Aktivierungsschleife. Die Phosphorylierung des Threonins 423 (T423) aktiviert schließlich das Enzym.
Rechts: Sobald T423 phosphoryliert ist, kann sich PAK an verschiedenen Stellen innerhalb der ersten 250 AS autophosphorylieren. Diese Modifikation hält die Kinase davon ab, in eine inhibierte Konformation zurückzukehren.

Im Gegensatz zur Gruppe I (PAK 1-3) sind die Regulationsmechanismen der Gruppe II (PAK 4-6) noch nicht eindeutig geklärt. Ching et al. (2003) beschrieben zum ersten Mal die Aktivierung von PAK5 durch Cdc42 sowie das Vorhandensein einer autoinhibitorischen Domäne (AID, AS 1-181) mit dem KI-Motiv (AS 120-133). Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu den Veröffentlichungen von Pandey et al. (2002) und Cotteret at al. (2003), die eine PAK5-Aktivierung durch Cdc42 nicht beobachten konnten. Bei PAK4 und PAK6 konnte weder die Aktivierung durch GTPasen noch ein KI-Motiv nachgewiesen werden (Jaffer

et al., 2001). Erst kürzlich wurde in den Sequenzen von PAK1-6 ein konserviertes Substratmotiv (TxY) der MKK6 identifiziert. Eine Aktivierung durch MKK6 konnte jedoch nur bei PAK4-6 nachgewiesen werden (Kaur et al., 2004).

A



B

```
                                PBD
  1 MFGKKKKKIEISGPSNFEHRVHTGFDPQEQKFTGLPQQWHSLLADTANRPKPMVDPSCIT

 61 PIQLAPMKTIVRGNKPCKETSINGLLEDFDNISVTRSNSLRKESPPTPDQGASSHGPGHA
      KI-Motiv                  AID
121 EENGFITFSQYSSESDTTADYTTEKYREKSLYGDDLDPYYRGSHAAKQNGHVMKMKHGEA

181 YYSEVKPLKSDFARFSADYHSHLDSLSKPSEYSDLKWEYQRASSSSPLDYSFQFTPSRTA

241 GTSGCSKESLAYSESEWGPSLDDYDRRPKSSYLNQTSPQPTMRQRSRSGSGLQEPMMPFG

301 ASAFKTHPQGHSYNSYTYPRLSEPTMCIPKVDYDRAQMVLSPPLSGSDTYPRGPAKLPQS

361 QSKSGYSSSSHQYPSGYHKATLYHHPSLQSSSQYISTASYLSSLSLSSSTYPPPSWGSSS

421 DQQPSRVSHEQFRAALQLVVSPGDPREYLANFIKIGEGSTGIVCIATEKHTGKQVAVKKM

481 DLRKQQRRELLFNEVVIMRDYHHDNVVDMYSSYLVGDELWVVMEFLEGGALTDIVTHTRM
                              CAT
541 NEEQIATVCLSVLRALSYLHNQGVIHRDIKSDSILLTSDGRIKLSDFGFCAQVSKEVPKR
      602     608
601 KSLVGTPYWMAPEVISRLPYGTEVDIWSLGIMVIEMIDGEPPYFNEPPLQAMRRIRDSLP

661 PRVKDLHKVSSVLRGFLDLMLVREPSQRATAQELLGHPFLKLAGPPSCIVPLMRQYRHH
```

Abbildung 6: schematische Domänenstruktur und Proteinsequenz von PAK5
(A) PAK5 (Dan et al., 2002) lässt sich in verschiedene Domänen unterteilen: die p21-Bindedomäne (PBD) für die Interaktion mit Cdc42/Rac, eine autoinhibitorische Domäne (AID) mit dem Kinase-Inhibitor-Motiv (KI) sowie eine C-terminale Kinasedomäne. Die Phosphorylierung der Aminosäure Serin 602 in der Aktivierungsschleife ist für die vollständige Kinaseaktivierung notwendig. Die Aminosäure Tyrosin 608 ist Teil eines konservierten Substrat-Motivs (TxY) der MKK6.
(B) Aminosäuresequenz von PAK5 (NCBI-Genbanknummer AB040812). Für die Beschreibung der Domänenabkürzungen siehe (A). Das KI-Motif der autoinhibitorischen Domäne (AID) ist blau unterstrichen. Die Aktivierungsschleife innerhalb der Kinasedomäne ist grau unterlegt.

Die Kinase PAK5 wird gehirnspezifisch exprimiert und besitzt eine Länge von 719 AS. Die größte AS-Sequenzhomologie findet man zwischen PAK5 und PAK4 in der N-terminalen PBD-Domäne (80 %) und der Kinasedomäne (84 %). In den dazwischen liegenden Bereichen unterscheidet sich die PAK5-Sequenz sehr stark von den beiden anderen Gruppenmitgliedern PAK4 und PAK6 (Dan et al., 2002).
Für die vollständige Kinaseaktivität von PAK5 ist die Phosphorylierung des konservierten Aminosäurerestes Serin 602 (homolog zu PAK1 T423) in der Aktivierungsschleife notwendig (s. Abb. 6)(Dan et al., 2002; Kaur et al., 2005).

Die funktionale Rolle von PAK5 in der Zelle ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass das homologe Drosophila-Protein MBT („mushroom body tiny“, kleiner Pilzkörper) an der Differenzierung und Entwicklung von Nervenzellen in einer spezifischen Gehirnregion der Drosophila-Fliege, „dem Pilzkörper“, beteiligt ist (Melzig et al., 1998). Ähnliche Resultate wurden nach einer Überexpression von PAK5 in Neuroblastoma-Zellen und hippokampalen Neuronen beobachtet. Die transfizierten Zellen bildeten Neuriten-auswüchse, Filopodien sowie dendritische Verästelungen (Dan et al., 2002; Bryan et al., 2004). Weiterhin konnte eine Aktivierung der Stress-Kinase JNK bzw. des JNK-Signalweges durch PAK5 nachgewiesen werden (Dan et al., 2002; Pandey et al., 2002).
Ein Zusammenhang zwischen PAK5 und dem Apoptosefaktor BAD wurde in Cotteret at al. (2003) beschrieben. PAK5 kolokalisiert mit Mitochondrien und inhibiert dort die Apoptose-Kaskade durch die Phosphorylierung des Apoptosefaktors BAD. (Eine Kolokalisation von PAK5 und Mitochondrien konnte in unserem Labor nicht verifiziert werden).

Im Vergleich zu PAK5 ist über die zelluläre Funktion anderer PAK-Mitglieder näheres bekannt. Als GTPase-Effektoren üben einige von ihnen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts aus. So stellt z.B. PAK1 ein Verbindungsglied zwischen dem Mikrotubuli- und dem Aktinnetzwerk dar, indem es mit Mikrotubuli-gebundenen GTP-Austauschfaktoren und verschiedenen GTPasen interagiert. Hierdurch wird das Wachstum der Mikrotubuli und der Aktinfilamente an Zellanhaftungspunkten („focal adhesions“) und an der Bewegungsfront („leading edge“) wandernder Zellen verknüpft (Krendel et al., 2002; Wittmann et al., 2004).

Die Expression von PAK4 führt zur Umstrukturierung des Aktinnetzwerks. Zum einen verursacht die Bindung von Cdc42 an die PAK4 CRIB-Domäne die Bildung von Filopodien (Abo et al., 1998), zum anderen kann nach einer Aktivierung der Kinase LIMK1 durch PAK4 die Bildung von Aktinclustern in der Zelle beobachtet werden (Dan et al., 2001).

3.2.3 Die Ste-20 Kinase LIMK1: ein Aktinstabilisator

LIM Kinasen (LIM Motiv-beinhaltende Protein Kinase, LIMK) gehören einer neuen Klasse von Serin/Threonin-Kinasen an, die zwei N-terminale LIM-Domänen und eine C-terminale Kinasedomäne aufweisen. Die LIM (Lin-11, Isl-1 und Mec-3)-Domäne besteht aus zwei Zinkfinger-Motiven, die sich aus 50-60 AS aufbauen und eine bestimmte Reihenfolge von Cystein- und Histidinresten besitzen (Okano et al., 1995). Obwohl die Funktion der meisten Zinkfinger-Motive in der Bindung von DNA und RNA liegt, wird aufgrund vieler Proteinstudien angenommen, dass das LIM-Motiv hauptsächlich an Proteininteraktionen beteiligt ist (Wadman et al., 1994). So konnte das LIM-Motiv bei zahlreichen Proteinen identifiziert werden. Hierzu zählen z.B. Transkriptionsfaktoren sowie Zytoskelett- und Signalproteine, die durch Proteinbindung bei der Zelldetermination und Wachstumsregulation eine Rolle spielen (zusammengefasst in Sanchez-Garcia und Rabitts, 1994).

Die beiden Hauptvarianten der LIM-Kinase-Familie, die hirnspezifische LIMK1 und die ubiquitär exprimierte LIMK2, zeigen auf der Aminosäuresequenzebene eine Übereinstimmung von 50 % (Okano et al., 1995; Stanyon und Bernhard, 1998).
Eine Überexpression der LIMK1 in Zellen verursacht die Akkumulation von filamentösem F-Aktin („Aktincluster“) und somit dramatische Veränderungen in der Struktur des Zytoskeletts. LIMK1 agiert durch die Phosphorylierung des Aktin-polymerisierenden Faktors Cofilin (Serin 3). Dieser ist daraufhin nicht mehr in der Lage, F-Aktin zu binden und zu depolymerisieren (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998).

Wie in Kapitel 3.2.2 erwähnt, wird die Kinase LIMK1 durch PAK4 phosphoryliert und aktiviert (Dan et al., 2001). Bereits 1999 konnte Edwards et al. (1999) die Aktivierung der

LIMK1 durch PAK1 beschreiben. Diese fiel jedoch im Vergleich zur Aktivierung durch PAK4 signifikant schwächer aus (Dan et al., 2001). Bei Betrachtung der geringen Sequenzhomologie von PAK1 und PAK4 (50 %), ist dieser Unterschied in der Substratspezifität nicht weiter verwunderlich.
Da einerseits die beiden gehirnspezifischen Kinasen LIMK1 und PAK5 einen Einfluss auf das Aktinnetzwerk ausüben, andererseits LIMK1 von PAK4 phosphoryliert und aktiviert wird, könnte LIMK1 auch als potentieller Interaktionspartner von PAK5 fungieren.

3.3 Zielsetzung der Arbeit

Die MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase (MARK) bewirkt durch eine Phosphorylierung des neuronalen Mikrotubuli-assoziierten Tau Proteins die Destabilisierung der Mikrotubuli (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1997). Im pathologischen Zustand aggregiert das hyperphosphorylierte Tau zu den intrazellulären "paarigen helikalen Filamenten" (PHFs), die neben den extrazellulären Amyloidplaques die Alzheimer-Krankheit kennzeichnen (Hasegawa et al., 1992).

Gegenstand dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Interaktionspartner von MARK, um bessere Erkenntnisse über die Regulation der Kinaseaktivität zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden Hefe-Zwei-Hybrid Versuche durchgeführt, in denen unter anderem die gehirnspezifische Serin/Threonin-Kinase PAK5 als neuer Interaktionspartner von MARK identifiziert werden konnte.
Da die Mitglieder der PAK-Familie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Aktinnetzwerks spielen, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit mittels biochemischer und zellbiologischer Verfahren der funktionale Charakter der MARK/PAK5-Interaktion sowie eine mögliche Beeinflussung des Aktin- und Mikrotubulinetzwerks durch die beiden Kinasen untersucht.

Obwohl es bereits einige Publikationen über PAK5 gibt, sind die Regulierungsmechanismen noch nicht eindeutig geklärt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, die Autoinhibierung von PAK5 im Aktivitätsassay zu untersuchen.

In Kapitel 3.2.3 wurde auf die Aktivierung von LIMK1 durch PAK4 eingegangen. Da PAK5 die größte Sequenzhomologie zu PAK4 aufweist, sollte in Zwei-Hybrid- und Zellkulturexperimenten eine mögliche Interaktion zwischen PAK5 und LIMK1 überprüft werden.

4. Material

4.1 Geräte

Analysenwaage, Blottingkammer, DNA-Sequnezierungsgrät: ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) Elektrophoresekammer, Feinwaage, French-Press (Amico), Heizblock, Hybridisierungsofen, Kühlzentrifuge: 5415C (Eppendorf), konfokales Fluoreszenzmikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss), Luminescent Image Analyzer (LAS 3000, Fujifilm), Mikroskop (Olympus CK2), Minizentrifuge, UV-Crosslinker, PCR-Gerät: „Mastercycle personal“ (Eppendorf), pH-Meter, Phospho-Imager, Szintillationszähler: Tricarb 1900 CA (Packard Camberra Ltd).

4.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper

4.2.1 Chemikalien

Chemikalien in p.a.-Qualität wurden bezogen von:
Amersham Pharmacia Biotech, Bio-Rad, Difco, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Roth, Sigma.

4.2.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Klenow-Fragment	New England Biolabs
Herculase enhanced DNA-Polymerase	Stratagene
PWU-Herculase	Stratagene

4.2.3 Molekulargewichtsmarker

Proteinmarker:

Prestained Molecular Weight Standard Mixture (Sigma, kDa):

α2-Makroglobulin (180), β-Galaktosidase (116), Fructose-6-phosphat Kinase (84), Pyruvat-Kinase (58), Fumarase (48,5), Laktatdehyrogenase (36,5), Triosephosphatisomerase (26,6)

RainbowTM Coloured Protein Molecular Weight Markers (Amersham, kDa):

Myosin (220, blau), Phosphorylase b (97, braun), BSA (66, rot), Ovalbumin (45, gelb), Kohlenstoffanhydrase (30, orange), Trypsin Inhibitor (20, blau), Lysozym (14, tiefrot).

DNA-Marker:

Smart-ladder (Clontech)

Fragmentgrößen (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200

4.2.4 Kits

BaculoPlatinum™ Transfection Kit	Orbigen
ECL Western Blotting Detection	Amersham
Midi Nucleobond PC100	Macherey + Nagel
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	Invitek
Gel Extraction Kit (Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit)	Dianova
Quick Change™ Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Effectene Transfection Reagenz	Qiagen

4.2.5 Antikörper

4.2.5.1 primäre Antikörper

- α-HA-Tag (Clontech):
  polyklonaler Kaninchen-Antikörper , Western-Blot-Verdünnung 1:100
- α-His-Tag (Novagen):
  monoklonaler Maus-Antikörper, Western-Blot-Verdünnung 1:1000
- α-Myc-Tag (9E10, Santa Cruz):
  monoklonaler Maus-Antikörper; Western-Blot-Verdünnung 1:300
- α-14-3-3 (Santa Cruz):
  polyklonaler Kaninchen-Antikörper; Western-Blot-Verdünnung 1:100
- YL1/2 (Serotec):
  monoklonaler Ratten-Antikörper gegen Tubulin, Immunofluoreszenz-Verdünnung 1:800
- α-β-Aktin (Sigma):
  monoklonaler Maus-Antikörper, Immunofluoreszenz-Verdünnung 1:800

4.2.5.2 sekundäre Antikörper

- mHRP (Amersham Biosciences):
  α-Maus-Antikörper mit Meeretichoxidase gekoppelt, Western-Blot-Vedünnung 1:3000
- rHPR (Amersham Biosciences):
  α-Kaninchen-Antikörper mit Meeretichoxidase gekoppelt, Western-Blot-Vedünnung 1:2000
- Fluorochrom-konjugierte Antikörper (Molecular Probes):
  α-Maus/α-Ratte-Antikörper konjugiert mit Cy5 oder TRITC, Immunofluoreszenz-Verdünnung 1:200
- F-Aktin-Marker:
  Rhodamin-konjugiertes Phalloidin (Molecular Probes), Fluoreszenz-Verdünnung 1:400

4.3 Stämme, Viren, Zellinien

4.3.1 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

Bezeichnung	Genotyp	Quelle
DH5α	F^- ϕ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *deo*R *rec*A1 *end* A1*hsd*R17 (r_k^-, m_k^-) *pho*A *sup*E44 λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1	Gibco BRL

XL1-blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F´ *proAB lacI*^{q}*Z*Δ*M15* Tn*10* (Tet^r)].	Stratagene

4.3.2 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Bezeichnung	Genotyp	Quelle
AH109	*MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his 3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1*$_{UAS}$*-GAL1*$_{TATA}$*-HIS3 GAL2*$_{UAS}$*-GAL2*$_{TATA}$*-ADE2 URA3::MEL1*$_{UAS}$*-MEL1*$_{TATA}$*-lacZ*	Clontech

4.3.3 Baculoviren

Es wurden Baculoviren hergestellt, die für folgende Proteine kodieren:

- PAK5
- PAK5-AID (1.-181. AS)
- PAK5-CAT (410.-719. AS)
- PAK5 S573N/S602E
- PAK5 S602M/T606M
- MARKK (von Dr. T. Timm zur Verfügung gestellt, MPG-ASMB)

4.3.4 Eukaryotische Zellinien

Bezeichnung	Organismus	Spezifikation/Anwendung
HEK293	*Homo sapiens*	Embryonale Nierenzellen/ Expressionsystem
CHO	Hamster	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster/ Untersuchung der Zytoskelett-organisation
Sf9	*Spodoptera frugiperda*	Insekteneierstockzellen/ Expressionssystem

4.4 Plasmide

4.4.1 Eukaryotische Expressionsvektoren

Bezeichnung	Charakterisierung	Anwendung	Quelle
pNG2	4,3 kb, Amp^R	Arbeitsvektor für Klonierungen *E.coli*-Expressionsvektor	MPG-ASMB
pEU	5,475 kb, Amp^R myc-Tag am N-Term.	Arbeitsvektor für Klonierungen	MPG-ASMB
pVL1392*	9,6 kb, Amp^R, veränderte MCS, His-Tag am N-Term.	Baculovirus-Transfervektor	MPG-ASMB
pYFP-C1	4,7 kb, Kan^R	Yellow-fluorescent Expressions-vektor für Säugerzellen	Clontech
pCFP-C1	4,7 kb, Kan^R	Cyan-fluorescent Expression-vektor für Säugerzellen	Clontech

4.4.2 Eukaryotische Expressionskonstrukte

In dieser Arbeit wurden folgende Expressionskonstrukte hergestellt:

- **YFP:PAK5 S573N/S602E akt.**
  Die konstitutiv aktive Mutante wurde mit Hilfe des Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) unter Verwendung des Primers 5`-CACAGGGACATAAAAAG TGACAACATCCTCCTGACAAGCGATGGC-3` (DM 65) und des entsprechenden Gegenstranges (Primer: DM 66) hergestellt.
- **YFP:PAK5 S602M/T606M inakt.**
  Die dominant negative Mutante wurde mit Hilfe des Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) unter Verwendung des Primers 5`-GTGCCGAAGAGGAAAAT GTTGGTTGGCATGCCCTACTGGATGGCC-3` (DM 63) und des entsprechenden Gegenstranges (Primer: DM 64) hergestellt.
- **pVL-His:PAK5**
  PAK5 wurde aus dem Konstrukt pEU:PAK5 (Quelle: MPG-ASMB) mit *NdeI/NheI* isoliert und über *NdeI/NheI* in pVL subkloniert.

- **pVL-His:PAK5 S573N/S602E akt.**
  Durchführung siehe YFP:PAK5 S573N/S602E akt.
- **pVL-His:PAK5 S602M/T606M inakt.**
  Durchführung siehe YFP:PAK5 S602M/T606M inakt.
- **pVL-His:PAK5-CAT (410.-719. AS)**
  PAK5-CAT wurde aus dem Konstrukt pEU:PAK5-CAT (Quelle: MPG-ASMB) mit *NdeI/NheI* isoliert und über *NdeI/NheI* in pVL subkloniert.
- **pVL-His:PAK5-AID (AS 1-181)**
  PAK5-AID wurde mittels PCR-Amplifikation mit den Restriktionsseiten *NdeI/NheI* versehen und in pVL subkloniert.
  (Primer DM 7-*NdeI*: 5`-GGTTTTGGCATCCATATGTTTGGGAAG-3`
  Primer DM 85.1-*NheI*: 5`-GCTTCACCTCAGAATAGCTAGCGCCTC-3`)
- **pVL-His: LIMK1**
  LIMK1 wurde mittels PCR-Amplifikation mit den Restriktionsseiten *NdeI/NheI* versehen und in pVL subkloniert.
  (Primer LIMK1.3-*NdeI*: 5`-AGAGAGTGCATATGAGGTTGACGCTAC-3`
  Primer LIMK1.4-*NheI*: 5`-GGGCCCGCTAGCTCAGTCAG-3`)
  Ausgangskonstrukt: GFP-LIMK1 (von J. Condeelis, AECM, Bronx/NY)
- **YFP-LIMK1**
  LIMK1 wurde mittels PCR-Amplifikation mit den Restriktionsseiten *BglII/HindII/* versehen und in pYFP-C1 subkloniert.
  (Primer LIMK1.11-*BglII*: 5`-TTTAGAGAGAGATCTATGAGGTTGACGC-3`
  Primer LIMK1.12-*HindIII*: 5`-GCCCGCTGAAGCTTTCAGTCAG-3`)
- **CFP-LIMK1**
  Durchführung siehe YFP-LIMK1

Es wurden folgende bestehende Expressionskonstrukte verwendet (auf Wunsch können die verwendeten Primersequenzen und Klonierungsstrategien nachgereicht werden):

- YFP-PAK5
- YFP-PAK5 S573N/S602E akt.
- YFP-PAK5 S602M/T606M inakt.
- YFP-MARK2
- CFP-MARK2 T208E akt.
- pVL-His:MARK2
- pVL-His: MARK2 T208A/S212A

4.4.3 Hefe-Zwei-Hybrid Plasmide

Bezeichnung	Charakterisierung	Anwendung	Quelle
pGBKT7	7,3 kb, Kan^R, Tryptophan-Selektionsmarker, Gal4-DNA- Bindedomäne vor Polylinker	Hefe-Zwei-Hybrid Interaktions-untersuchungen	Clontech
pGADT7	7,3 kb, Amp^R, Leucin-Selektionsmarker, Gal4-Aktivierungsdomäne vor Polykinker	Hefe-Zwei-Hybrid Interaktions-untersuchungen	Clontech
pACT2	8,1 kb, Amp^R, Leucin-Selektionsmarker, Gal4-Aktivierungsdomäne vor Polylinker	Hefe-Zwei-Hybrid Interaktions-untersuchungen, cDNA-Bibliotheksplasmid für das Hefe-Zwei-Hybrid System	Clontech

4.4.4 Hefe-Zwei-Hybrid Konstrukte

Alle Klonierungsarbeiten wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Dorthe Matenia, Anja Thiessen und Cindy Johne (MPG-ASMB) durchgeführt.

- **pGBKT7:MARK3**
  MARK3 wurde aus dem Konstrukt pNG2:MARK3 (Quelle: MPG-ASMB) mit *NdeI/XhoI* isoliert und nach Auffüllung der *XhoI*-Seite mit Hilfe des Klenow Fragments über *NdeI/Sma* in pGBKT7 subkloniert.
- **pGBKT7:MARK2 (1-722) wt**
  MARK2 wurde unvollständig mit *NdeI/BamHI* aus pGADT7:MARK2 (Quelle: MPG-ASMB) herausgeschnitten (interne *BamHI*-Schnittstelle) und über *NdeI/BamHI* in pGBKT7 subkloniert.
- **pGBKT7:MARK2 T208A/S212 inakt**.
  MARK2 T208A/S212 wurde mit *NdeI/ClaI* aus pEU: MARK2 T208A/S212 (Quelle: MPG-ASMB) isoliert. Die *ClaI*-Schnittstelle wurde mit dem Klenow Fragment aufgefüllt und danach das Insert über *NdeI/SmaI* in pGBKT7 kloniert.
- **pGBKT7:MARK2 T208E akt.**
  Die konstitutiv aktive Mutante wurde mit Hilfe des Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) unter Verwendung des Primers 5`-AACAAGCTGGATG AGTTCTGTGGTAGTCCTCCATAT-3`(TT TE1) und des entsprechenden Gegenstranges (Primer: TT TE2) hergestellt.

- **pGADT7:PAK5 (1-719) wt**
  PAK5 wt wurde aus pEU:PAK5 mittels *NdeI/NheI* isoliert, die *NheI*-Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt und danach das Insert über *NdeI/SmaI* in pGADT7 subkloniert.
- **pGADT7:PAK5 K478A/479A inakt.**
  Ausgangskonstrukt: pEU: PAK5 K478A/479A inakt.
  Durchführung siehe pGADT7:PAK5 (1-719) wt
- **pGADT7:PAK5 S602M/T606M inakt.**
  Ausgangskonstrukt: pVL-His: PAK5 S602M/T606M inakt.
  Durchführung siehe pGADT7:PAK5 (1-719) wt
- **pGADT7:PAK5 S573N/S602E akt.**
  Ausgangskonstrukt: pVL-His:PAK5 S573N/S602E inakt.
  Durchführung siehe pGADT7:PAK5 (1-719) wt
- **pGADT7:PAK5 (502-719)**
  Ausgangskonstrukt: pEU-myc:PAK5 (502-719) (Quelle: MPG-ASMB)
  Durchführung siehe pGADT7:PAK5 (1-719) wt
- **pGBKT7:14-3-3β**
  Ausgangskonstrukt: pEU-myc:14-3-3β (Quelle: MPG-ASMB)
  Durchführung siehe pGADT7:PAK5 (1-719) wt
- **pGBKT7:14-3-3ζ**
  Ausgangskonstrukt: pEU-myc:14-3-3ζ (Quelle: MPG-ASMB)
  Durchführung siehe pGADT7:PAK5 (1-719) wt
- **pGBKT7:LIMK1**
  Ausgangskonstrukt: pVL-His:LIMK1
  Durchführung siehe pGADT7:PAK5 (1-719) wt

Die folgenden MARK2- und PAK5-Deletionsmutanten wurden mittels PCR-Amplifikation mit spezifischen Restriktionsseiten versehen und in pGBKT7 bzw. pGADT7 subkloniert (auf Wunsch können die verwendeten Primersequenzen und Klonierungsstrategien nachgereicht werden):

- pGBKT7:MARK2 (1-370)
- pGBKT7:MARK2 (1-326)
- pGBKT7:MARK2 (1-326) T208A/S212 inakt.
- pGBKT7:MARK2 (1-202)
- pGBKT7:MARK2 (53-303)
- pGBKT7:MARK2 (53-303) T208A/S212 inakt.
- pGBKT7:MARK2 (186-328)
- pGBKT7:MARK2 (324-722)
- pGBKT7:MARK2 (365-614)

- pGADT7:PAK5 (1-477)
- pGADT7:PAK5 (1-181)
- pGADT7:PAK5 (410-719)
- pGADT7:PAK5 (610-719)
- pGADT7:PAK5 (512-719) S5723N/S602E akt.
- pGADT7:PAK5 (512-719) S602M/T606M inakt.

4.4.5 Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek

Poly(dt) geprimte cDNAs aus fötalen menschlichen Gehirnen wurden über XhoI- und EcoRI-Restriktionsschnittstellen in den Zwei-Hybrid Vektor pACT2 (4.4.3) als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne kloniert. Die cDNA-Bibliothek umfasst $3{,}5 \times 10^6$ unhabhängige Klone mit 0,5-4,0 kb großen cDNA-Fragmenten.
Quelle: Clontech (HL4028AH)

4.5 Medien

4.5.1 Bakterienmedien

Ampicilin:	Ampicilin (sterilfiltriert in H_2O)	100 mg/ml
Kanamycin:	Kanamycin (sterilfiltriert in H_2O)	100 mg/ml
LB-Medium:	LB Broth	25 g/1
LB-Agar:	LB Broth	25 g/l
	Bacto-Agar	25 g/l
LBamp-Medium,-Agar:	100 mg Ampicilin/l LB-Medium,-Agar	
SOC-Medium:	Bacto Trypton	20 g/l
	Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	10 mM
	$MgCl_2$	10 mM
	$MgSO_4$	10 mM
	in H_2O, pH 7.0	980 ml/l
	nach dem Autoklavieren:	
	Glucose (1 M, steril)	20 ml

Die Sterilisation aller Medien (falls nicht anders vermerkt) erfolgte bei 120 °C für 20 min. Ampicilin und Kanamycin wurden nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

4.5.2 Hefemedien

Aminosäure-Dropout-Lösung (100 × Stock):

Arginin	0,2 g
Histidin	0,1 g
Isoleucin	0,6 g
Leucin	0,6 g
Lysin	0,4 g
Methionin	0,1 g
Phenylalanin	0,6 g
Threonin	0,5 g
Tryptophan	0,4 g

wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Die in der jeweiligen Drop-out-Lösung nicht benötigten Aminosäuren wurden weggelassen.

Glucose-Lösung:	Glucose	20 % (w/v)
Selektionsmedium (SM):	Difco-Hefe-Stickstoffbasis oh. AS	8 g/l
	Tyrosin	55 mg/l
	Uracil	55 mg/l
	Adenin	55 mg/l
	nach dem Autoklavieren auf 60 °C abkühlen lassen:	
	100 × AS-Dropout-Lösung	10 ml/l
	20 % Glucose-Lösung	100 ml/l
Selektionsmedium-Agar:	Bacto-Agar (in Selektionsmedium)	25 g/l
Vollmedium (YEPD):	Hefe-Extrakt	11 g/l
	Bacto-Pepton	22 g/l
	Adenin	55 mg/l
	nach dem Autoklavieren:	
	20 % Glucose-Lösung	100 ml/l

Vollmedium (YEPD)-Agar:	Bacto-Agar (in Vollmedium)	25 g/l

4.5.3 Zellkulturmedien

Sf9-Medium:	Grace`s Insekten Medium (Gibco)	
	Zusätze:	
	FCS	100 ml/l
	Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml)	10 ml/l
293-Medium:	Dulbecco`s modif. Eagle-Medium (Gibco)	
	Zusätze:	
	FCS	100 ml/l
	Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml)	10 ml/l
	L-Glutamin 200 mM (100 ×)	10 ml/l
CHO-Medium:	F12-Nutrient Mixture **(**HAM; Gibco)	
	Zusätze:	
	FCS	100 ml/l
	Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml)	10 ml/l

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Konstruktion von Expressionsplasmiden

5.1.1.1 Restriktionsverdau von DNA

Mit Hilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen (NEB) wurde Plasmid-DNA hydrolytisch gespalten. Für einen analytischen Verdau wurden 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA mit einer Einheit Enzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1-2 h bei 37 °C (in wenigen Fällen bei 25 °C) inkubiert. Präperative Schnitte wurden unter identischen Bedingungen mit 1,0-3,0 µg DNA und 5-10 Einheiten Enzym durchgeführt.
Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/6 Volumen 6 × Probenpuffer (9 mM Tris/HCl pH 7.4, 0,45 mM EDTA, 46 % (v/v) Glycerol, Spatelspitze (0,005 % (w/v) Bromphenolblau) gestoppt und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt.

5.1.1.2 Gelelektrophorese von DNA

Mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese wurden linearisierte DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt. Für alle Arbeiten wurden 0,8 %ige Agarosegele verwendet (Sambrook et al., 1989), die bei konstanter Spannung von 100 V liefen. Als Laufpuffer diente 1 × TAE (40 mM Tris-Acetat pH 8.0, 2 mM EDTA). Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend unter UV-Licht photographiert. Ethidiumbromid ist als interkalierende Substanz in der Lage, sich in die DNA-Doppelhelix einzulagern und die DNA im UV-Licht sichtbar werden zu lassen.
Um die Größe der aufgetrennten Banden abschätzen zu können, wurde ein standardisierter DNA-Längenmarker (Smart-Ladder von Clontech) aufgetragen.

5.1.1.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution linearer DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte mit dem „Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers (Dianova). Die restringierte DNA wurde dazu im Agarosegel aufgetrennt und die gewünschte DNA-Bande mit dem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Extraktion und Reinigung der DNA-Fragmente basiert auf der Lösung der Agarose und selektiver Absorption der Nukleinsäure an Silica-Gel Partikel in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration. Die Elution der DNA erfolgt in einer Lösung mit niedriger Salzkonzentration (Aqua bidest.). Die eluierte DNA wurde anschließend für Ligationsversuche eingesetzt.

5.1.1.4 Auffüllen von 5´-überhängenden DNA-Fragmenten

Für blunt-end-Ligationen wurden 5'-überhängende DNA-Enden mit Hilfe des Enzyms „DNA-Polymerase I Large Fragment“ (Klenow) aufgefüllt. Zum Restriktionsansatz (20 µl) wurde 1 µl einer 2,5 mM dNTP-Lösung, 3,0 µl Klenow-Puffer und 1 µl Klenow gegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit Aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt und für 15 min. bei 25 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des „Ultra Clean™ 15 DNA-Purification Kits“.

5.1.1.5 Ligation

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase ist in der Lage, freie 3`-Hydroxylenden mit 5`-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA zu verknüpfen, indem sie die Bildung einer Phosphodiesterbindung katalysiert. T4-DNA-Ligase kann sowohl überhängende (sticky) Enden als auch glatte (blunt) Enden miteinander ligieren.
Restringierter Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 gemischt und in einem Ansatzvolumen von 20 µl mit 2,0 µl 10 × Ligationspuffer, 4,0 µl 50 % PEG 4000 und 1 µl T4-Ligase (2 U/µl) für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente DH5α-Zellen transformiert.

5.1.1.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Durch die Behandlung mit zweiwertigen Ionen, in diesem Falle Calcium, wurden die Zellwände des *E.coli* Stammes DH5α durchlässig gemacht und zur Aufnahme von DNA befähigt.

250 ml steriles SOB-Medium (2 % Bacto Trypton, 0,5 % Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, pH 6.7-7.0) wurden mit ca. 10 DH5α Kolonien einer Übernachtkulturplatte angeimpft und bei 18 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde 10 min. auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min. bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 ml $CaCl_2$, 250 mM KCl, pH mit KOH auf 6.7 einstellen, 55 mM $MnCl_2$ hinzufügen) resuspendiert. Nach Wiederholung des Kühl- und Zentrifugationsschrittes wurde das Pellet in 20 ml TB-Puffer aufgenommen und dem Ansatz unter leichtem Schwenken DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (= 1,4 ml) zugefügt. Nach einer abschließenden Inkubation für 10 min. auf Eis wurden die kompetenten Zellen zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.1.1.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Als Transformation bezeichnet man in diesem Zusammenhang die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien.

30 µl/200 µl der kompetenten DH5α -Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 2 µl/10-20 µl Plasmid-DNA/Ligationsansatz vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden für 30 min. auf Eis inkubiert, danach für 45 Sekunden einem Hitzeschock von 37 °C ausgesetzt und erneut 2 min. auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 100 µl/500 µl SOC-Flüssigmedium wurden die Zellsuspensionen für 1 h bei 37 °C geschüttelt.

Der Transformationsansatz wurde auf eine zwei LB+Amp-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

5.1.2 Plasmidisolation aus *E.coli* (Mini- und Midimaßstab)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im Minimaßstab wurde DNA aus einer 5 ml *E.coli*-Übernachtkultur mit dem „Invisorb Spin Plasmid Mini-Kit“ nach Vorschrift des Herstellers präpariert (Invitek). Diese Plasmid-Isolationsmethode fand Anwendung, wenn eine Klonierung anhand von Kontrollschnitten überprüft oder eine Hefe-Transformation durchgeführt werden sollte.
Für präperative Schnitte und Sequenzierungen wurde die DNA aus einer 50-100 ml *E.coli*-Übernachtkultur mit dem „ Nucleobond AX Kit“ der Firma Macherey-Nagel nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

5.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA in wässriger Lösung erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers. Die Absorption der DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum) und 280 nm gemessen. Nach Sambrook et al. (1989) wurde vorausgesetzt, dass eine OD von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} erlaubt eine Aussage über die Verunreinigung der DNA mit Proteinen. Hierbei gilt 1.8 als guter Reinheitsgrad für DNA.

5.1.4 Sequenzierung von DNA

Die automatisierte DNA-Sequenzanalyse basiert auf einer DNA-Kettenverlängerunsreaktion nach der Sanger-Dideoxy-Methode (Sanger et al., 1977). Der Reaktionsansatz (20 µl) enthielt 1 µg Plasmid-DNA als Matrize, 2 µl PCR-Reaktionsgemisch („BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix“, Applied Biosystems), 6 µl Reaktionspuffer („Half Term“, Applied Biosystems) und 10 pmol Sequenzier-Oligonukleotide. Reaktionsbedingungen: 25 Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 40 °C und 4 min. Verlängerung bei 60 °C.

Die Sequenzierungsprodukte wurden von den nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden (Terminatoren) durch Ethanolfällung getrennt. Die anschließende Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) nach dem Protokoll des Herstellers.

5.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction) können selektiv DNA-Sequenzen vervielfältigt werden. Diese Technik basiert darauf, dass sich DNA-Dopplestränge beim Erhitzen trennen und durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in Gegenwart komplementärer Primer verdoppelt werden können. Wird dieser Prozess mehrfach wiederholt, steigt die Anzahl der Kopien exponentiell an.

Für die Reaktion wurden pro Ansatz (50 µl) 5,0 µl 10 × Herculase-Reaktionspuffer, 0,4 µl dNTPs (25 mM-Stock), jeweils 1,0 µl der beiden Primer (10 pmol-Stock), 50-150 ng Plasmid-DNA und 0,5 µl Herculase-DNA-Polymerase eingesetzt.

PCR-Reaktionsbedingungen: Denaturierung bei 92 °C für 30 s, Primerannealing bei der Primer- T_m – 5 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C, wobei sich die Elongationszeit nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes richtet und ca. 1 Minute pro kb DNA betragen sollte. Dieser Zyklus wurde 35 mal wiederholt.

Ein Aliquot der amplifizierten DNA wurde zur Kontrolle der PCR gelelektrophoretisch aufgetrennt.

5.1.6 Erstellung von Punktmutationen

Der „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene ist ein auf der PCR-basierender Kit, mit dessen Hilfe Punktmutationen in bekannte DNA-Sequenzen eingefügt werden können. Es werden Primer generiert, die homolog zu der zu mutierenden DNA-Sequenz sind, zusätzlich aber eine oder mehrere der gewünschten Punktmutationen tragen. In

einer PCR-Reaktion wird dann das gesamte Plasmid amplifiziert und die Mutation inseriert. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Sf9-Zellkultur

Spodoptera frugiperda (Sf9)-Zellen verdoppeln sich normalerweise alle 18-24 Stunden, wenn sie in Medium mit 10 % FCS wachsen (s. 4.5.3). Die Anzucht der Sf9-Zellen erfolgte in Spinnerkulturflaschen (Suspensionkultur) oder in Zellkulturflaschen (adherente Zellen), wobei bei 27 °C und Dunkelheit kultiviert wurde. Die Zellen wurden 3 × pro Woche gezählt und auf eine Zelldichte von $0{,}5 \times 10^6$ verdünnt.

5.2.1.1 Baculovirus Expressionssystem

Für die Expression rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen wurde das Baculovirussystem „BaculoGold“ von PharMingen gewählt.
Als Transferplasmid diente eine modifizierte Form des pVL1392, der das Fusionsprotein mit einem aminoterminalen Polyhistidinpeptid (His_{10}) exprimiert.
Virogene Partikel wurden durch gemeinsame Präzipitation von 1 µg des Transferplasmid-Konstrukts mit 0,25 µg linearisierter „BV BaculoGold DNA“ auf 2×10^6 Sf9-Zellen und anschließender Inkubation bei 27 °C in TNM-FH Medium (Pharmingen) erzeugt. (Durchführung siehe Angaben des Herstellers)
Nach fünf Tagen wurde der die Viren enthaltende Zellüberstand auf 5×10^6 frische Zellen (in 5 ml TNM-FH Medium) gegeben und für weitere drei Tage bei 27 °C kultiviert. Im Lysat dieser Zellen konnte die Expression des rekombinanten Proteins mittels Western-Blot durch einem Antikörper gegen den aminoterminalen Polyhistidinrest nachgewiesen werden. Der Überstand der Zellen, d.h. das Medium mit den Viren, wurde durch eine Membran mit 0,22-0,45 µm Porengröße filtriert und als Arbeitslösung bei 4 °C gelagert.

5.2.2 HEK293-Zellkultur

293-Zellen sind embryonale, epitheliale Nierenzellen des Menschen, die sich sowohl für eine transiente als auch eine stabile Transfektion mit eukaryotischen Expressionsplasmiden gut eignen.

293-Zellen wurden für die Experimente in DMEM mit 10 % FCS als Monolayerkulturen in T75 Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO_2 im Kulturschrank vermehrt. Sobald die Zellen eine 70-80 %ige Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 5 ml PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen. Es folgte eine Behandlung mit 1 ml Trypsin/EDTA für 2-5 min. im Kulturschrank, wodurch sich die Zellen ablösten. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen 1:5 bis 1:10 gesplittet und in neue Kulturflaschen überführt.

5.2.2.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Säugerzellen wird als Transfektion bezeichnet.

Bei der Calcium-Phosphatmethode wird die DNA in Calciumchlorid-Präzipitate eingeschlossen. Die Präzipitate setzen sich auf der Zelloberfläche ab und können von den Zellen durch Endozytose inkorporiert werden.

Für die Transfektionsexperimente wurden $0{,}6 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät und für ca. 24 h bei 37 °C kultiviert (Zellkonfluenz ca. 60-70 %).

Bis zu 10 µg Plasmid-DNA wurde mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 180 µl aufgefüllt und mit 180 µl $2 \times CaCl_2$-Lösung (500 mM $CaCl_2$, 1 mM Tris pH 7.5), 0,1 mM EDTA, pH 7-8) vermischt. Dieser Ansatz wurde auf dem Vortex langsam tropfenweise mit 360 µl $2 \times$ HBS (50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4, pH 7.1) versetzt.

Nach einer Inkubation von 45 min. bei RT hatte sich ein Präzipitat gebildet, das tropfenweise zu den einige Stunden zuvor mit je 10 ml frischem Medium versorgten HEK293-Zellen gegeben wurde. Am nächsten Morgen wurde das Medium aus den Kulturschalen abgesaugt und die transfizierten Zellen mit 0,3 % FCS-DMEM gefüttert.

Nach weiteren 24-48 h erfolgte die Zellernte wie unter 5.3.4 beschrieben.

5.2.3 CHO-Zellkultur

CHO-Zellen stammen aus den Ovarien chinesischer Hamster. Die Zellen wurden für die Experimente in HAM-Medium mit 10 % FCS in T75 Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO_2 im Kulturschrank vermehrt. Die weiteren Kulturbedingungen sind unter 5.2.2 (293-Zellkultur) beschrieben.

5.2.3.1 Effectene-Transfektion

Das Effectene Reagenz (Quiagen) besteht aus einem Gemisch von synthetischen Membranvesikeln (Liposomen) und eignet sich sowohl für transiente als auch für stabile Transfektionen. Die kationische Kopfgruppe der Lipidkomponenten assoziiert mit den negativ geladenen Phosphaten der DNA, die so in die Vesikel aufgenommen wird. Dieser DNA-Liposom Komplex kann dann mit der Zellmembran fusionieren und das Plasmid zur Expression kommen.
Für die Experimente wurden 1×10^4 Zellen pro 24-Loch-Platte ausgesät. Nachdem die Zellkonfluenz 50-60 % betrug (nach ca. 25 h), wurden die Zellen mit dem „Effectene-Transfektions-Reagenz Kit“ nach Angaben des Herstellers transfiziert.

5.2.4 Immunofluoreszenz

Zur Visualisierung des Aktin- und Mikrotubulinetzwerks wurden 1×10^4 CHO-Zellen/24-Lochplatte auf Coverslips ausgesät und nach ca. 24 h transfiziert. Die transfizierten CHO-Zellen wurden am folgenden Tag (nach 16 h) mit 4 % PFA (4 % Formaldehyd in 1 × PBS-Puffer) für 15 min. bei RT fixiert und anschließend 3 mal mit 1 × PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit eiskaltem (-20 °C) 80 % Methanol für 5 min. bei -20 °C. Die fixierten Zellen wurden erneut 3 mal mit 1 × PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde mit 10 % Ziegen-Serum in 1 × PBS für 30 min. bei 37 °C blockiert. Die Coverslips wurden anschließend direkt mit dem 1. Antikörper (α-β-actin,

YL1/2) für 1 h bei 37 °C behandelt, 3 mal mit 1 × PBS gewaschen und danach mit einem Cy5-konjugiertem 2. Antikörper für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit 1 × PBS wurden die Coverslips in einem Tropfen Permafluor (Immuntech, Marseille) eingebettet. Neben der Aktinvisualisierung mittels zweier Antikörper wurde als weiterer Aktin-Marker Rhodamin-konjugiertes Phalloidin eingesetzt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit dem LSM510-Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt, wobei ein 63 × Objektiv verwendet wurde.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Reagenz der Firma Sigma („BCA Protein Kit“) nach Angaben der zugehörigen Standardvorschrift.

5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli 1970).
Die Proben wurden in einem 4 % Sammelgel (5,4 ml Acrylamid-Bis 40 %, 27 ml 0,25 M Tris-HCl pH 6.8, 21 ml H_20, 0,54 10 % SDS, 0,108 ml TEMED, 0,150 10 % APS) fokussiert und in einem 10 % Trenngel (15,0 ml Acrylamid-Bis 40 %, 22 ml 1 M Tris-HCl pH 8.8, 22 ml H_20, 600 µl 10 % SDS, 120 µl Temed, 65 µl 10 % APS) getrennt. Die Proteine wurden in 2 × SDS-Probenpuffer (0,2 M Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 20 % Glycerin, 2 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau) aufgenommen und für 3 min. bei 100 °C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard wurden 5 µl „Prestained Molecular Weight Standart Mixture“ der Firma Sigma aufgetragen.
Die Elektrophorese erfolgte bei RT für 50 min. bei 150 V (Sammelgel) bzw. 200-225 V (Trenngel). Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend angefärbt oder auf eine PVDF-Membran transferiert.

5.3.2.1 Anfärbung der SDS-Gele

Coomassie-Färbung:
Die Färbung der Gele erfolgte durch 20-minütiges Schwenken in einer Lösung aus 0,1 % (w/v) Coomassie Blau R-250, 45 % Methanol und 9 % Essigsäure. Entfärbt wurde 20 min. in einer Lösung aus 50 % Methanol und 10 % Essigsäure.

Silberfärbung:
Die Silberfärbung von Gelen wurde wie folgt durchgeführt: 1. Fixierung der Proteine (20-45 min.) in einer Lösung aus 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure. 2. Vernetzung (20 min. oder über Nacht) in 30 % Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5 % Glutaraldehyd-Lösung (25 %ig) und 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat. 3. Viermaliges Waschen (5 min.) in Aqua dest. 4. Färbung (20 min.) in Silbernitrat-Lösung (0,1 % (w/v), 0,02 % Formaldehyd-Lösung (35 %ig). 5. Kurzes (1 min.) Waschen in Aqua dest.. 6. Entwicklung (ca. 1-5 min.) in 2,5 %iger Natriumcarbonat-Lösung plus 0,01 % 35 %iger Formaldehyd-Lösung. 7. Stoppen der Reaktion (15 min.) in 0,05 M EDTA.

5 × Roti-Blue (kolloidale Coomassie-Färbung, Firma Roth):
Die Anfärbung radioaktiver Gele erfolgte in einer 1 × Rothi-Blue-Lösung (60 ml H_2O, 20 ml MeOH, 20 ml 5 × Roti-Blue) über Nacht (mind. 5 h). Entfärbt wurde 10 min. in 75 ml H_2O und 25 ml MeOH. Die gefärbten Gele wurden anschließend für 2 h im Geltrockner getrocknet (Programm: konstanter Zyklus, 80 °C, 2 h).

5.3.3 Western-Blot

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach Towbin et al. (1979) auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert, um einen anschließenden immunologischen Proteinnachweis durchführen zu können.
Das ungefärbte Gel sowie die in Methanol aktivierte PVDF-Membran („Imobilon“, Millipore) wurden in Blotting-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 5 % Methanol, 0,0375 % (w/v) SDS)

äquilibriert. Das Blotten erfolgte mit einer Semi-Dry-Blotkammer der Firma Brenzel-Bio-Analytik bei einer Stromstärke von 1mA/cm^2.
Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden durch einstündiges Schwenken in entfetteter Milch (5 % (w/v) in TBS (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween20) abgesättigt.
Die Membran wurde 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach gründlichem Waschen in TBS wurde die Membran 45 min. bei 37 °C mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Anti-Maus Antikörper bzw. Anti-Kaninchen Antikörper, je 1:2000 in TBS) behandelt. Die Meerettich-Peroxidase der gebundenen Antikörper wurde nach gründlichem Waschen der Membran in TBS mit dem „ECL plus Western-Blot Detection System“ (Amersham Bioscience) nach Vorschrift des Herstellers auf ECL-Filmen (Hyperfilm, Amersham/Buchler) detektiert.
Nach erfolgter Antikörperreaktion können diese wieder vom Blot abgewaschen werden (Strippen), damit mit anderen Antikörpern eine Detektion weiterer Proteine auf dem selben Blot durchgeführt werden kann. Dazu wurde der Blot in Strip-Puffer (10 % SDS, 0,25 M Tris-HCl pH 6.8, 14,5 M β-Mercaptoethanol) für 60 min. bei 60 °C geschwenkt und anschließend 3 × 10 min. in TBS-Puffer gewaschen.

5.3.4 Herstellung von Zellhomogenaten

Zum Nachweis von Proteinexpressionen (s. 5.3.3 Western-Blot) sowie Untersuchungen von Proteininteraktionen (s. 5.3.6 Koimmunopräzipitation) und Proteinphosphorylierungsstudien (s. 5.3.7 Kinase-Assay) wurden *S.cerevisiae*-, Sf9- und 293-Zellen mechanisch oder mit dem entsprechenden Lysispuffer aufgebrochen und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert.

Aufschluss von *S.cerevisiae*-Zellen:
Eine zwei Tage zuvor transformierte Hefekultur (5 ml –Leu bzw. –Trp Selektionsmedium) wurde 1 min. bei 14000 rpm (RT) abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 30 µl 1 × SDS-Probenpuffer (s. 5.3.2) resuspendiert und sofort für 3 min. auf 100 °C erhitzt (Proteaseinaktivierung). Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Hefezellen mit Hilfe von

Glasperlen (Sigma) und Vortex (1 min.) mechanisch aufgebrochen. Dieser Vorgang (Eisinkubation, Vortex) wurde jeweils für 1 min. ca. 2-3 wiederholt. Nach der erneuten Zugabe von 30 µl 1 × SDS-Probenpuffer wurde das Zellysat für 1 min. gevortext. Die Lysatflüssigkeit wurde anschließend zwischen den Glasperlen mittels kreisender Pipettenbewegungen aufgesaugt und für 5 min. bei RT zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde im Western-Blot für Proteinexpressionsnachweise in der Hefe verwendet.

Aufschluss von Sf9-Zellen:

Mit Baculovirus infizierte Sf9-Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und durch Zentrifugation (10 min. bei 1000 x g) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in 50-100 µl Lysispuffer (50 mM Natriumphosphat pH 8.5, 200 mM NaCl, 25 mM Imidazol pH 7.3, 1 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Pepstatin A, 1 µg/ml Leupeptin, 5 mM Chaps und 1 mM PMSF) pro ml Kulturvolumen aufgenommen. Die Zellen wurden mit der French Press aufgeschlossen und die löslichen Proteine durch Zentrifugation (15 min. bei 4 °C, 14000 rpm) von den Zelltrümmern getrennt. Der Überstand wurde für Koimmunopräzipitationsexperimente (s. 5.3.6) oder Kinaseassays (s. 5.3.7) verwendet.

Aufschluss von HEK293-Zellen:

Transfizierte 293-Zellen (10 cm Gewebekulturschalen) wurden nach 24-48 h 2 x mit 1 × PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1 × PBS abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde 10 min. bei 3450 rpm zentrifugiert und anschließend wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in 1 ml Lysispuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0,5 % NP-40, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 2 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 20 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM *tri*-Natrium-*ortho*-Vanadat, 1 µg/ml Leupeptin) aufgenommen und für 30 min. auf Eis inkubiert. Die Lysate wurde für 15 min. bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert und der erhaltene Überstand für Koimmunopräzipitations-experimente (s. 5.3.6) eingesetzt.

5.3.5 Aufreinigung von His-markierten Fusionsproteinen aus Insektenzellen

Zur Gewinnung von rekombinantem PAK5wt Protein sowie der PAK5-Mutanten aus Sf9-Zellen wurden T150-Kulturflaschen (60-80 % konfluent, Kulturvolumen 25 ml) mit 0,5-2 ml der jeweiligen Virusarbeitslösung (s. 5.2.1.1) transfiziert und für 72 h bei 27 °C in Dunkelheit kultiviert.
Die Lyse der Zellen erfolgte wie unter 5.3.4 (Aufschluss von Sf9-Zellen) beschrieben
Der Überstand wurde 1 h bei 4 °C mit 50 µL Ni-NTA-Beads (Quiagen) pro ml Lysispuffer inkubiert. Die Beads wurden durch mehrmaliges Zentrifugieren (4000 rpm, 5 min. bei 4 °C) und Aufnahme in gleichem Volumen Lysispuffer gewaschen.
Die Elution erfolgte durch zweimalige Inkubation mit je gleichem Volumen Elutionspuffer (Lysispuffer mit 500 mM Imidazol). Das Eluat wurde über Nacht gegen einen Glycerol-Puffer (50 mM Natriumphosphat pH 8.5, 200 mM NaCl, 50 % Gycerol) dialysiert und bei -20 °C gelagert.

5.3.6 Koimmunopräzipitationsexperimente

Eine häufig angewandte Methode zum Nachweis von Proteininteraktionen ist die Kopräzipitation zweier Interaktionspartner.
Für die Interaktionsstudien wurden myc- und HA-markierte Fusionsproteine in HEK293- bzw. Sf9-Zellen exprimiert.
50 µl Protein-G-Agarose (Amersham) und 10 µl α-myc-Antikörper bzw. 25 µl A-Agarose (Amersham) und 25 µl α-HA-Antikörper wurden mit je 1 ml HEK293-Lysat (s. 5.3.4, Lysatvolumen aus 10cm Kulturschale) vermischt und für 2-4 h auf einem Drehmischer inkubiert.
Wurden die Proteine in Sf9-Zellen exprimiert, wurden 300 µl Lysat (s. 5.3.4, Lysatvolumen aus T25 Kulturflasche) mit der Hälfte der oben angegebenen Agarose-/Antikörpermengen vermischt.
Der gebildete Agarose-Antikörper-Protein Komplex wurde durch einen kurzen Zenrtrifugationsschritt (1 min. bei 4 °C , 4000 rpm) sedimentiert, 3 mal mit 1 × PBS oder dem

entsprechenden Lysispuffer gewaschen und abschließend in 50 µl 1 × SDS-Probenpuffer (s. 5.3.2) aufgenommen. Nach dreiminütigem Kochen bei 100 °C wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot auf kopräzipitierte Proteine untersucht.

5.3.7 Kinase-Assay

Diese Methode dient zum Nachweis von Phosphorylierungsereignissen sowie Aktivierungs- und Inhibierungsprozessen.
Die verwendete Proteinkinase PAK5 wurde in Sf9-Zellen exprimiert und mit Hilfe eines N-terminalen His_{10}-Tags aufgereinigt. Die in *E.coli* exprimierte rekombinante MARK2 T208E wurde freundlicherweise von Dr. T. Timm (MPG-ASMB, Hamburg) zur Verfügung gestellt.
Die Reaktion (25 µl, davon 1/5 Vol. Kinasen) wurde in Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM Benzamidin, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) mit je 5 µCi γ-[^{32}P]ATP (Amersham Biosciences) durchgeführt. Zur Messung der MARK2 T208E Aktivität wurden 150 µM TR-1 Peptid ($_{255}$-NVKSKIGSTENLK-$_{268}$, die erste repetitive Sequenz des Tau-Proteins) als Substrat eingesetzt. Die PAK5-Aktivität wurde mittels 2 µg Histon H4 (aus Kälberthymus, Roche) pro Reaktion ermittelt.
Die Inkubation bei 30 °C für 2-4 h wurde durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 10 %) gestoppt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugation (15 min. bei RT, 14000 rpm) sedimentiert.
Der Überstand wurde zur Messung des Phosphateinbaus in das TR1-Peptid auf Phosphozellulosefilter (Gibco, Millipore) aufgetragen. Nach mehrmaligem Waschen in 0,1 M Phosphorsäure wurden die Filter kurz luftgetrocknet und die Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (Tricarb 1900 CA, Packard) gemessen.

Die phosphorylierten Proteine wurden in 1 × SDS-Probenpuffer (s. 5.3.2) aufgenommen, für 3 min. bei 100 °C erhitzt und anschließend in einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt. Für die Auswertung der radioaktiv markierten Proteinbanden wurde das getrocknete Gel mit einer entladenen Phosphorimagerplatte für 5min. in einer Filmkassette inkubiert. Das Laserlicht des Phosphorimagers bewirkt das Abfallen der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau.

Die dabei von der Phosphorimagerplatte ausgestrahlten Lichtblitze werden vom Phosphorimager (Bio Image Analyser BAS 2000, Fuji) registriert und mit dem Programm „TINA“ (Raytest Isotopenmessgerät GmbH) datentechnisch verarbeitet.

5.4 Zwei-Hybrid-Methoden

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde zuerst von Fields und Song (1989) beschrieben. Es dient der Interaktionsuntersuchung bekannter Proteine, der Identifizierung von Domänen und Aminosäuren, die für eine Interaktion benötigt werden, sowie der Durchmusterung von Bibliotheken, um neue Bindungspartner bekannter Proteine zu isolieren.
Dieser Methode liegt die Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors zu Grunde, der die Expression dreier Reportergene (Histidin, Adenin, *lacZ*/MEL1) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aktiviert. Dies ist möglich, da Gal4 in zwei funktionelle Domänen separiert werden kann. Die N-terminale Domäne (DB) bindet spezifische DNA-Sequenzen, während die C-terminale Domäne (AD) für die Aktivierung der Expression von Genen des Galaktose-Abbaus notwendig ist. Wenn diese Domänen voneinander getrennt werden, können sie die Reportergene nicht aktivieren, obwohl die DB an die DNA binden kann.
Für die Interaktionsuntersuchungen wird ein Protein X (Köder) mit der DNA-Bindungsdomäne und ein Protein Y (Beute) mit der Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Nur im Fall einer Interaktion zwischen Köder- und Beute-Protein kommt es zur Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors und somit zur Expression der Reportergene.
Alle Hefe-Interaktionsstudien dieser Arbeit wurden mit dem MATCHMAKER Zwei-Hybrid System 3 (Clontech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

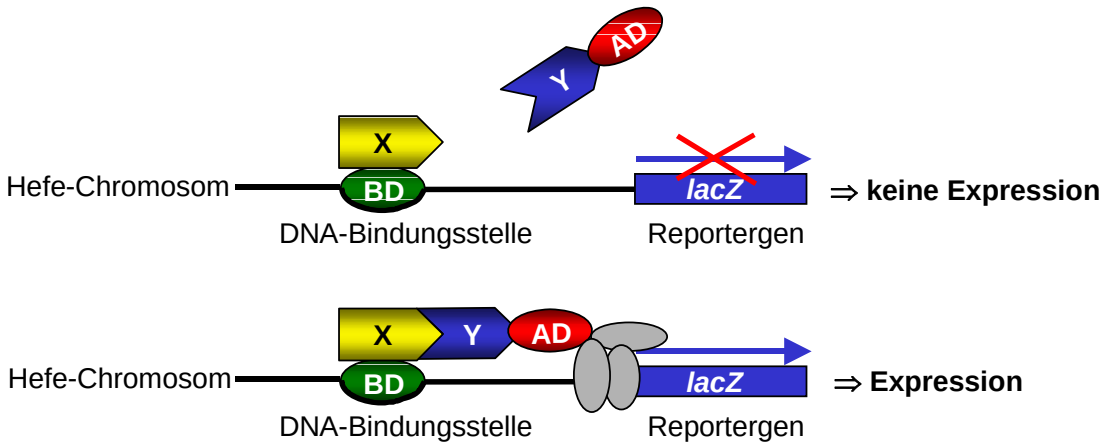


Abbildung 7: Prinzip des Zwei-Hybrid Systems
Protein X (gelb) wurde als Fusionsprotein mit der **DNA-Bindungsdomäne (BD)** eines Transkriptionsaktivators exprimiert und kann über diese Domäne an eine DNA-Bindungsstelle des Hefe-Chromosoms binden. Protein Y (blau) wurde als Fusionsprotein mit der **Aktivierungsdomäne (AD)** exprimiert. Eine Expression des Reportergens (*lacZ*) kann nur durch eine Interaktion zwischen X und Y aktiviert werden, da in diesem Fall der Gal4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert wird.

5.4.1 Amplifikation von cDNA-Bibliotheken

Für die Zwei-Hybrid-Screens wurde eine fötale menschliche cDNA-Gehirnbank (Clontech) verwendet, die hinter die Gal4-Aktivierungsdomäne des Zwei-Hybrid-Vektors pACT2 (s. 4.4.3) kloniert wurde.

Um genug cDNA-Material zur Verfügung zu haben, wurde die cDNA-Bank nach Vorschrift des „MATCHMAKER GAL4 Zwei-Hybrid System 3 & Libraries User Manual“ (Clontech) in *E.coli* amplifiziert.

5.4.2 Hefetransformation und Direkter Zwei-Hybrid-Test

Das Zwei-Hybrid System dient unter anderem zur Interaktionsuntersuchung zweier bekannter Proteine. Dazu wird das Köder-Protein hinter die Gal4-Bindungsdomäne des Plasmids pGBKT7 und das Beute-Protein hinter die Gal4-Aktivierungsdomäne des Plasmids pGADT7 bzw. pACT2 kloniert. Beide Proteine werden in den Hefestamm AH109 transformiert, der für

die Synthese der Aminosäuren Leucin und Tryptophan auxotroph ist. Da pGBKT7 ein defektes Tryptophan-Gen und pGADT7 ein defektes Leucin-Gen besitzt, kann durch entsprechende Wahl der Kulturmedien auf das Vorhandensein beider Plasmide in der Hefezelle selektiert werden.

5.4.2.1 Transformation von S.cerevisiae mit Plasmiden

Für die Hefetransformation wurde eine AH109-Übernachtkultur in 50 ml YEPD-Medium bei 30 °C im Schüttelinkubator (200 rpm) herangezogen. Jeweils 1 ml dieser Zellkultur wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß gegeben und 1 min. bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 50-100 µl abgenommen. Im verbliebenen Medium wurde das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl Carrier-DNA mit ca. 1 µg Plasmid-DNA vermischt. Bei der Carrier-DNA handelt es sich um unspezifische einzelsträngige DNA aus Lachs-Sperma (Sigma), die im Transformationsansatz die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Hefezellen unterstützt. Nach der Zugabe von 0,5 ml Plate-Mixture (45 % PEG 4000, 1 M LiAc, 1 M Tris-HCl pH 7.5, 0,5 M EDTA) und 20 µl 1 M DTT wurde der ganze Ansatz gevortext und anschließend für 6-8 h oder über Nacht bei RT inkubiert. Nach einem 10 minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurden 200 µl Zellen in Bodennähe des Reaktionsgefäßes entnommen und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C, bis nach ca. 3 Tagen Klone sichtbar wurden.

5.4.2.2 Direkter Zwei-Hybrid-Test

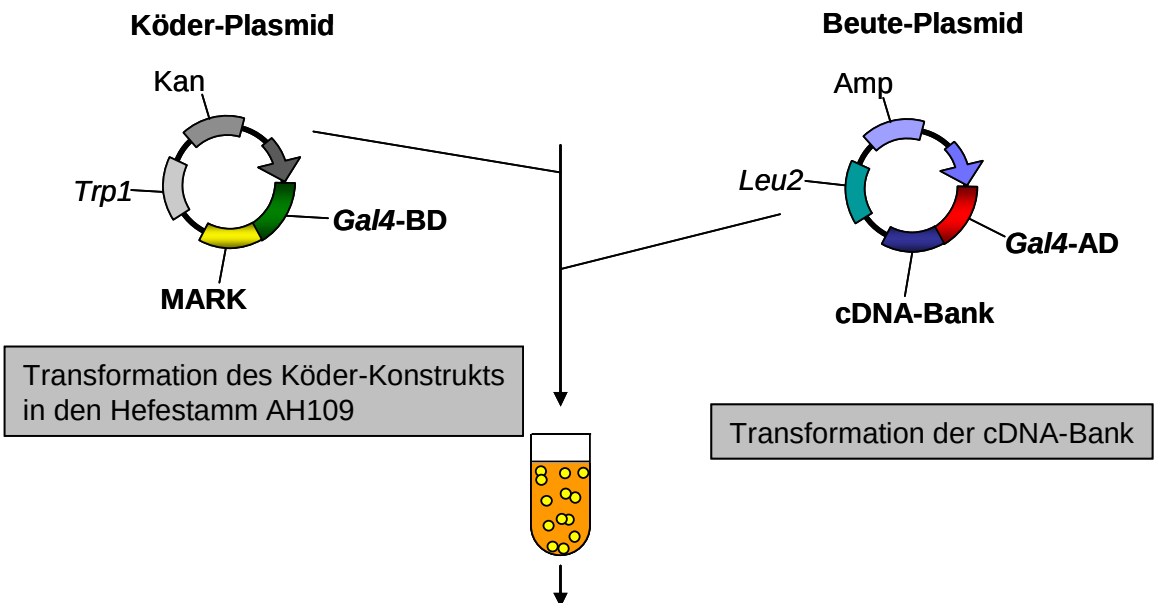
Die Plasmide zweier bekannter Proteine (Köder und Beute) wurden gemeinsam in den Hefestamm AH109 transformiert (s. 5.4.2.1). Die Transformanten wurden zunächst auf -Leu/-Trp-Selektionplatten für 3 Tage bei 30 °C herangezogen.
Mit Hilfe von sterilen Zahnstochern wurden drei Kolonien linienförmig auf -Leu/-Trp/-His- bzw. -Leu/-Trp/-His/-Adenin-Selektionplatten ausgestrichen und bei 30 °C im Brutschrank kultiviert. Nur bei stattfindender Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen kann der

Hefestamm AH109 auf den Selektionsplatten wachsen, da die Reportergene Histidin und Adenin synthetisiert werden können. Nach weiteren 2-3 Tagen konnte der Hefewachstum (Protein-Protein-Interaktion) gut vom Nichtwachstum (keine Wechselwirkung) unterschieden werden.

Um eine noch stringentere Selektion der positiven Klone zu erreichen, wurden 100 µl X-α-Gal-Lösung (Clontech, 2 mg/ml DMF), ein Substrat der Galaktosidase, auf den Selektionsplatten ausgestrichen. Das *MEL1/ lacZ*-Reportergen kodiert für die α-/β-Galaktosidase. Die α-Galaktosidase ist ein sekretorisches Protein, das bei einer Proteinwechselwirkung direkt ins Medium abgegeben wird. Durch die Umsetzung ihres Substrates X-α-Gal kann neben Wachstum auch eine Blaufärbung der Hefen auf den Indikatorplatten beobachtet werden.

5.4.3 Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek-Screen

Der Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek-Screen diente zur Suche nach neuen Bindungspartnern für ein bekanntes Protein (Köder). Das Köder-Plasmid und die Beute-Plasmide einer cDNA-Bibliothek wurden in den Hefestamm AH109 transformiert und auf Selektionsmedium kultiviert. Ein Hefewachstumm konnte beobachtet werden, wenn Köder- und Beute-Protein interagierten, da nur in diesem Fall der Transkriptionsfaktor Gal4 funktionsfähig ist und die Reportergene (Histidin, Adenin, *lacZ*/MEL1) anschalten kann (s. Abb. 8).



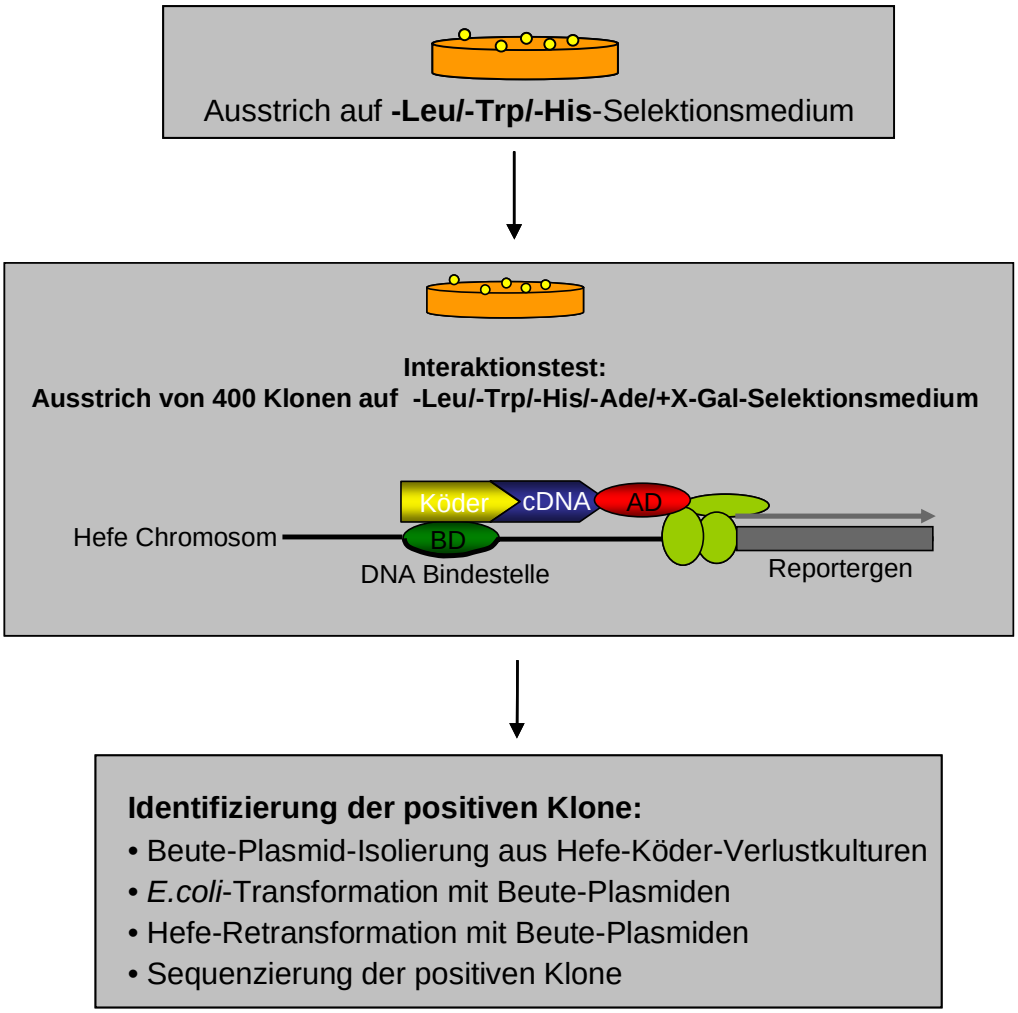


Abbildung 8: Übersicht eines Zwei-Hybrid-Screens

5.4.3.1 Transformation von S.cerevisiae für den Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek- Screen

50 ml –Trp-Selektionsmedium wurden mit 3-4 Kolonien des mit dem Köder-Plasmid vortransformierten Hefe-Stammes AH109 inokuliert und über Nacht im Schüttler bei 30 °C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden mit dieser Kultur 250 ml Selektionsmedium (-Trp) angeimpft, welches erneut über Nacht bei 30 °C inkubiert wurde. Sobald sich die Zellen auf eine OD_{600} > 1,0 vermehrt hatten, wurden 3 × 500 ml Vollmedium auf eine OD_{600} von 0,3 bis 0,5 eingestellt. Nach 4 h Inkubation bei 30 °C und 230 rpm wurden die Zellsuspensionen auf

insgesamt 4 Zentrifugenbecher verteilt und die Zellen bei 3500 rpm 10 min. bei RT sedimentiert. Die Zellpellets wurden mit 1 × TE gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in je 10 ml frisch angesetztem LiAc/TE-Mix (400 µl 100 × TE, 4 ml 10 × LiAc, 35,6 ml H_20) resuspendiert und dann 15 min. bei 30 °C stehen gelassen.

Pro Ansatz wurden 2 ml Carrier-DNA mit 500 µg cDNA-Bibliothek-Plasmid vermischt und zur Zellsuspension gegeben. Nach kurzem Schwenken wurde jeder Transformationsansatz zu 70 ml frisch angesetztem PEG/LiAc-Mix (56 ml 45 % PEG 4000, 7 ml 10 × LiAc, 750 µl 100 × TE, 6,25 ml H_20) gegeben und für 30 min. bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Jeweils 8,8 ml DMSO wurden tropfenweise unter vorsichtigem Schwenken zugegeben, bevor die Zellen für 1 h einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad ausgesetzt wurden. Nach dem Hitzeschock wurden alle 4 Ansätze für 3 min. auf Eis abgekühlt und in einem Zentrifugenbecher vereinigt und bei 3500 rpm für 5 min. bei RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 l Vollmedium aufgenommen und für 1 h bei 30 °C und 220 rpm im Schüttler kultiviert. Anschließend wurden die Hefezellen erneut pelletiert, mit 50 ml 1 × TE gewaschen, in ca. 10 ml 1 × TE aufgenommen und à 250 µl auf 40-45 Selektionsplatten (-Leu/-Trp/-His, 15 cm) ausplattiert. Kolonien, die mögliche Wechselwirkungen zwischen Köder und Beute anzeigten, erschienen nach ca. 3-8 Tagen Inkubation im 30 °C-Kulturschrank.
300-400 dieser gewachsenen Kolonien wurden anschließend auf -Leu/-Trp/-His/-Ade/+ X-α-Gal-Selektionsplatten ausgestrichen. Nach dreitägiger Kultivierung bei 30 °C wurden die sich blau färbenden Kolonien für weitere Kontrolltests verwendet (s. 5.4.3.2.1).

5.4.3.1.1 Berechnung der Transformationseffiziens

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz pro µg eingesetzter DNA wurden 5 µl und 10 µl Aliquots der unter 5.4.3.1 verwendeten transformierten Zellsuspension auf -Leu/-Trp-Platten ausgestrichen und bei 30 °C für 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Berechnung der Kotransformationseffizienz (optimal: 1×10^3-10^4 cfu/µg DNA) und die Anzahl der gescreenten Klone (optimal: 1×10^6) erfolgte nach folgender Formel:

Kotransform.effizienz: $\frac{\text{Anzahl der gewachsenen Hefekolonien} \times \text{Vol. des Gesamtansatzes (10 ml)}}{\text{Vol. der ausgestrichenen Zellsuspension (5 bzw. 10 µl)} \times \text{500 µg cDNA}}$

Anzahl gescreenter Klone: Kotransformationseffizienz × 500 µg cDNA-Bibliothek

5.4.3.2 Identifizierung der positiven Klone

Auch unter den sich blau färbenden Kolonien (s. 5.4.3.1) können sich falsch-positive Klone befinden, wenn z.B. das Beute-Protein allein an die DNA bindet und die Reportergene zur Expression anregen kann. Durch eine erneute Hefe-Retransformation können diese falsch-positiven Zellen identifiziert werden. Die Hefen werden zunächst durch die Wahl des Selektionsmediums dazu gebracht, das Köder-Plasmid zu verlieren und nur noch das Beute-Plasmid zu exprimieren. Nach der Beute-Plasmid-Isolierung aus den Hefezellen (s. 5.4.3.2.1) und der anschließenden Transformation dieser Plasmid-Isolate in *E.coli* (s. 5.4.3.2.2), wird die Plasmid-DNA im Minimaßstab isoliert und in Hefen retransformiert. Bei diesem Vorgang wird einerseits das Beute-Plasmid mit dem Köder-Plasmid (Screen-Ausgangskonstrukt) und andererseits das Beute-Plasmid mit dem Köder-Leervektor kotransformiert (s. 5.4.3.2.3). Mit Hilfe von -Leu/-Trp/-His/-Ade/+ X-α-Gal-Selektionsplatten können nun eindeutig positive von falsch positiven Klonen unterschieden werden.

5.4.3.2.1 Hefe-Köder-Verlustkulturen

Köder- und Beute-Plasmid enthaltende AH109 Hefezellen (s. 4.3.2) wurden in 5 ml -Leu-Selektionsmedium für 2 Tage bei 30 °C und 220 rpm kultiviert.
Die Hefe-Köder-Verlustkulturen wurden 1 min. bei 14000 rpm und RT sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl sterilfiltriertem STET-Puffer (8 % Saccharose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 % TritonX-100) resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Glasperlen (Sigma) für 5 min. gevortext (mechanische Zellwandaufbrechung). Nach einem kurzen Aufkochen der Zellysate (3 min. bei 100 °C) wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt und die

Zelltrümmer anschließend für 10 min. bei 4 °C und 14000 rpm pelletiert. 100 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in welchem bereits 100 µl 5 M Kaliumacetat vorgelegt worden waren. Es folgten 30 min. Inkubation auf Eis und danach eine 10 minütige Zentrifugation (14000 rpm) bei 4 °C. 50 µl des Überstandes wurden mit 100 µl „Ultra salt“ und 5 µl Glasmilch (Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit, Dianova) vermischt und für 5 min. bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugations- (30 s, 14000 rpm, RT) und Waschschritt mit 1 ml „Ultra-Wash“ wurde die DNA kurz getrocknet (5 min., RT) und danach mit 10 µl 1 × TE (55 °C, 3 min.) eluiert.

5.4.3.2.2 E.coli-Transformation mit Beute-Plasmiden aus Hefezellen

Für die Amplifikation der eluierten Beute-Plasmid-DNA (s. 5.4.3.2.1) wurde der gesamte Elutionsansatz in 50 µl kompetente DH5α-Zellen transformiert (s. 5.1.1.7). Da Bakterien bei einer Transformation erfahrungsgemäß nur ein Plasmid aufnehmen und die Zellen für die anschließende Plasmidisolation in LB+amp Flüssigmedium angeimpft wurden, sollte die im Minimaßstab (s. 5.1.2) isolierte DNA definitiv keine Restspuren des Köder-Plasmids aufweisen (s. auch 5.4.3.2.1).

5.4.3.2.3 Hefe-Retransformation mit Beute-Plasmiden aus E.coli

Zur Unterscheidung der positiven von den falsch-positiven Klonen wurde das Beute-Plasmid mit dem Köder-Plasmid (Screen-Ausgangskonstrukt) kotransformiert (s. 5.4.2.1). Als negative Kontrolle wurde das Beute-Plasmid in einem parallelen Ansatz mit dem Köder-Leervektor kotransformiert und auf -Leu/-Trp/-His/-Ade/+ X-α-Gal-Selektionsplatten ausgestrichen. Bei einem falsch positiven Klon konnte (blaues) Hefewachstum im Transformationsansatz sowie im Kontrollansatz beobachtet werden. In diesem Fall kann das Beute-Protein ohne Wechselwirkung mit dem Köder-Protein die Reportergene anschalten.

5.4.3.2.4 Sequenzierung der positiven Klone

Zur Identifizierung der auf dem Beute-Plasmid kodierten cDNAs wurden die positiven Klone mit Hilfe des ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) sequenziert (s. 5.1.4) und durch eine computergestützte Datenbanksuche im Internet identifiziert (Blast-Search-Funktion der NCBI-Web Seite www.ncbi.nim.nih.gov/index.html).

6. Ergebnisse

Die MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase (MARK) spielt eine wichtige Rolle bei der anormalen Phosphorylierung des neuronalen Mikrotubuli-assoziierten Tau Proteins, das im pathologischen Zustand zu den "paarigen helikalen Filamenten" (PHF) – Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit – aggregiert. Die Aktivierung der im menschlichen Gehirn exprimierten MARK2 erfolgt durch die Ste20-Kinase MARKK (MARK-Kinase).

Die Regulation der Kinaseaktivität kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte unter Verwendung des Hefe Zwei-Hybrid-Systems neue Interaktionspartner von MARK2 und MARK3 identifiziert werden. Dieser Ansatz könnte zur weiteren Aufklärung der MARK-Regulierung beitragen. Die im Screen isolierten Interaktionspartner PAK5 und 14-3-3 sollten im Anschluß durch biochemische und zellbiologische Verfahren charakterisiert werden und die *in vivo*-Relevanz ihrer Interaktion mit MARK2 überprüft werden.

Der zweite Abschnitt befasst sich mit den Regulierungsmechanismen und möglichen Interaktionspartnern von PAK5. Aktivitätsassays sollten Aufschluß über die Autoinhibierung von PAK5 geben. Weiterhin sollte in zellbiologischen Koexpressionsstudien die Interaktion zwischen PAK5 und LIMK1 untersucht und neue Bindungspartner von PAK5 mittels Zwei-Hybrid-Screens identifiziert werden.

6.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner von MARK2 und MARK3

Um nach neuen Interaktionspartnern der Isoformen MARK2 und MARK3 zu suchen, wurden auf Gal4-basierende Zwei-Hybrid-Screens (s. 5.4.3) durchgeführt. Hierbei wurden die inaktive Mutante MARK2 T208A/S212A sowie der Wildtyp MARK3 als Köder-Proteine eingesetzt. Der Einsatz der inaktiven MARK2 Kinase erschien von Vorteil, da durch die Eliminierung der Phosphorylierungsstellen in der Aktivitätsschleife eine stabilere Wechselwirkung zwischen MARK2 und Interaktionspartnern erzeugt wird (Timm et al., 2003).

6.1.1 Test der Zwei-Hybrid-Konstrukte auf korrekte Klonierung und Expression in Hefen

Für die Durchführung des Zwei-Hybrid-Screens wurde MARK3 aus dem Konstrukt pNG2:MARK3 (Quelle: MPG-ASMB) isoliert und in die *EcoRI*-/*SmaI*-Schnittstellen des Zwei-Hybrid-Vektors pGBKT7 subkloniert. Das inaktive MARK2-Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. D. Matenia/ Dr. T. Timm (MPG-ASMB) zur Verfügung gestellt. Beide Konstrukte wurden sequenziert (nicht gezeigt) und ihre Expression in Hefen getestet (s. Abb. 9).

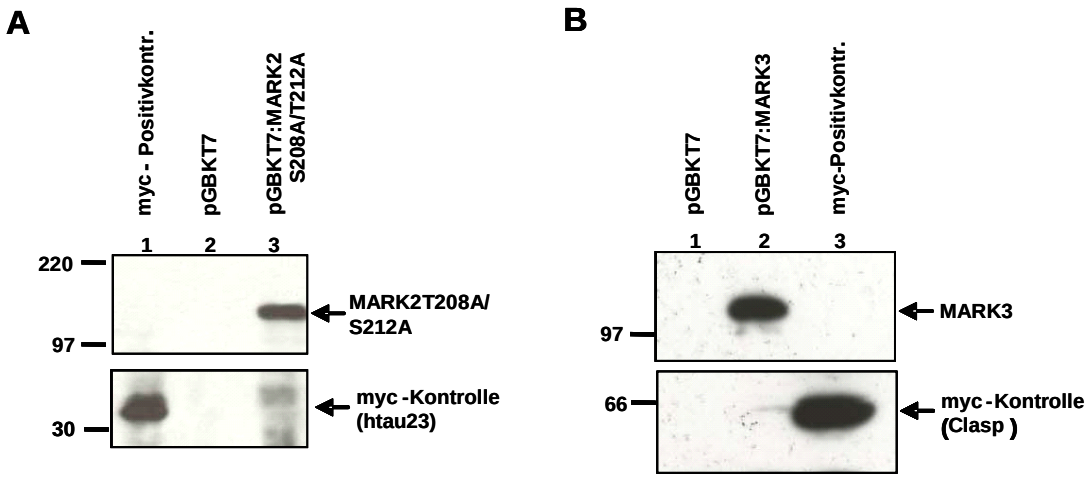


Abbildung 9: Expressionsnachweis von MARK2 T208A/S212A und MARK3 in Hefen
(A+B) AH109 Hefezellen wurden mit den angegebenen Expressionskonstrukten transformiert. Nach der Zelllyse wurden die Proteine in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Expressionsnachweis von MARK2 T208A/S212A und MARK3 erfolgte mit einem α-myc Antikörper (Spur A, 3 und B, 2). Das Molekulargewicht der beiden MARK-Isoformen beträgt ca. 85 kDa. Da beide Kinasen als Fusionsproteine mit der Gal4-DNA-Bindedomäne sowie dem myc-Tag exprimiert werden, lässt sich im Western-Blot eine Bande bei 110 kDa detektieren. Als Negativkontrolle diente in beiden Ansätzen der Leervektor pGBKT7. Als myc-Positivkontrolle wurden myc-htau23 (36 kDa, MPG-ASMB) in Abbildung A sowie myc-Clasp (65 kDa, MPG-ASMB) in Abbildung B eingesetzt.

6.1.2 Screen einer fötalen menschlichen cDNA-Gehirnbank

6.1.2.1 Gal4-Zwei-Hybrid-Screen mit MARK3

Die für den Screen verwendete fötale cDNA-Gehirnbank setzt sich aus 3×10^6 unabhängigen Klonen zusammen, die in den Hefe-Vektor pACT2 subkloniert worden waren. Nach

Transformation der cDNA-Gehirnbank in den mit MARK3 (Köder) vortransformierten Hefestamm AH109 wurden die Zellen auf -Leu/-Trp/-His-Selektionsplatten ausgestrichen. Die Transformationseffizienz betrug ca. $0{,}4 \times 10^6$ cfu („colony forming units“).
35 der Histidin-positiven Klone wuchsen nach einem weiteren Ausstrich auf -Leu/-Trp/-His/-Adenin/+X-α-Gal-Selektionsplatten. Diese zeigten sowohl den Histidin/Adenin- als auch den LacZ-positiven Phänotyp abhängig von der Präsenz des MARK3-Köders in den Hefezellen. Die positiven Klone kodierten unter anderem für die Serin/Threonin-Kinase PAK5 und verschiedenen Isoformen des Brückenproteins 14-3-3 (s. Tabelle 1)

6.1.2.2 Gal4-Zwei-Hybrid-Screen mit MARK2 T208A/S212A

1 x 10^5 Klone einer fötalen cDNA Gehirnbank wurden mit der inaktiven MARK2-Mutante durchmustert. Von 69 Histidin/LacZ-positiven Klonen zeigten 15 Klone einen sehr stark ausgeprägten Phänotyp. Die Sequenzierungsergebnisse der positiven Klone wurden in Tabelle 1 zusammengefasst:

Köder-Protein	**MARK3**	**MARK2T208A/S212A**
Bibliothek	fötale cDNA Gehirnbank	fötale cDNA Gehirnbank
gescreente Klone	0,4 x 10^6	1 x 10^5
His$^+$	400	595
Adenin$^+$	79	Selektion nicht durchgeführt
LacZ$^+$	35	69
positive Klone	1 x PAK5-Fragment (AS 502-719) 16 x 14-3-3 zeta 12 x 14-3-3 beta 1 x 14-3-3 theta unbekannte Proteine	1 x PAK5-Fragment (AS 502-719) 3 x 14-3-3 zeta 6 x 14-3-3 beta unbekannte Proteine

Tabelle 1: Zusammenfassung des MARK3- und MARK2 T208A/S212A-Zwei-Hybrid-Screens

6.1.2.3 Identifizierte Klone aus dem MARK3- und MARK2 T208A/S212A-Screen

6.1.2.3.1 Die Serin/Threonin Kinase PAK5

Die gehirnspezifische PAK5 gehört zu der p21-aktivierten Kinase (PAKs)-Familie, deren Mitglieder mit Rac/Cdc42 interagieren und als GTPase-Effektoren eine wichtige Funktion bei der Regulation des Aktinnetzwerks ausüben.
Die Regulation und die Funktion von PAK5 sind bisher nicht eindeutig geklärt. In der Literatur wird sowohl eine Aktivierung/Nicht-Aktivierung durch Cdc42 als auch eine Aktivierung durch MKK6 diskutiert (Dan et al., 2002; Ching et al., 2003; Cotteret at al., 2003; Bryan et al., 2004).
Die Expression von PAK5 in Neuroblastoma-Zellen führt zu Neuritenauswüchsen und zur Bildung von Filopodien (Dan et al., 2001). Weiterhin konnte PAK5 mit der Aktivierung der Stress-Kinase JNK (Dan et al., 2001; Pandey et al. 2002) sowie mit der Inhibierung des Apoptosefaktors BAD (Cotteret at al., 2003) in Zusammenhang gebracht werden (s. auch 3.2.2).

6.1.2.3.2 Das Brückenprotein 14-3-3

Die sieben Isoformen (β,ε,γ,η,σ,τ,ζ) der 14-3-3 Familie repräsentieren eine hoch konservierte Proteinfamilie, die in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie der Signaltransduktion (Zhang et al., 1997), der Zell-Zyklus Regulation (Yang et al., 1999), neuronaler Entwicklungsprozesse (Chang et al., 1997) sowie der Apoptose (Zha et al., 1996) eine wichtige Rolle spielen.
14-3-3 interagiert mit einer Vielzahl von verschiedenen Bindungspartnern wie z.B. Kinasen, Phosphatasen, Transmembranrezeptoren und anderen Signalmolekülen (Fu et al., 2000). Ausgehend von einer Funktion als Brückenprotein könnte 14-3-3 unter anderem für die räumliche Anordnung von Signaltransduktionskomplexen von Bedeutung sein (Aitken, 1996; Morrison, 1994) (s. auch 3.2.1.1).

In den folgenden Kapiteln 6.2-6.4 erfolgt die Bestätigung der Interaktion zwischen MARK und

den im Zwei-Hybrid-Screen identifizierten Klonen PAK5 und 14-3-3 mittels biochemischer und zellbiologischer Methoden.

6.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2, PAK5 und 14-3-3

Da in beiden Zwei-Hybrid-Screens (s. 6.1.2) identische Bindungspartner gefunden wurden, wurde sich im Folgenden auf die Interaktionsbeziehungen der im fötalen und adulten Gehirn stark exprimierten MARK2 (Drewes et al., 1997), der gehirnspezifischen PAK5 (Dan et al., 2002) und dem Brückenprotein 14-3-3 konzentriert.

6.2.1 Kartierung der Interaktionsdomänen von MARK2, PAK5 und 14-3-3 im Zwei-Hybrid-System

Um die Interaktionsdomänen von MARK2, PAK5 und 14-3-3 genauer zu charakterisieren, wurden die drei Proteine wechselseitigen Zwei-Hybrid-Tests unterzogen. Zu diesem Zweck wurden die kodierenden Sequenzen von MARK2, PAK5, 14-3-3 sowie von verschiedenen MARK2-/PAK5-Deletionsmutanten in den Beute- und Köder-Vektor des Zwei-Hybrid-Systems subkloniert (s. 4.4.4). Die inaktiven PAK5-Kinasen mit Doppelmutationen in der katalytischen Enzymtasche (K478A/K479A) und der Aktivierungsschleife (S602M/S606M) sowie die konstitutiv aktive PAK5 S573N/S602E (Dan et al., 2001; Jaffer et al., 2002) wurden mit einem PCR-basierenden Mutagenese-Kit hergestellt (s. 4.2.4). Nach Kotransformation in den Hefestamm AH109 wurde das Wachstum unter selektiven, d.h. Histidin- und Adenin-freien Bedingungen getestet.

In den direkten Zwei-Hybrid-Tests konnten die Interaktionen zwischen MARK2 und PAK5 bzw. 14-3-3 bestätigt werden sowie die dafür notwendigen Domänen definiert werden.

Abbildung 10A zeigt, dass weder das vollständige PAK5-Konstrukt noch eine andere PAK5-Mutante mit der im Screen eingesetzten inaktiven MARK2 T208A/S212A interagiert. Die einzig erfolgreiche Interaktion konnte mit der im Screen isolierten PAK5-Deletionsmutante (AS 502-719) beobachtet werden, welche den größten Teil der katalytischen Domäne umfasst.

A

	Interaktion mit MARK2 T208A/S212A
PAK5 (1-719) wt	-
PAK5 K478A/K479A inact.	-
PAK5 S602M/T606M inact	-
PAK5 S573N/S602E act.	-
PAK5 (1-447)	-
PAK5 (1-181)	-
PAK5 (410-719)	-
PAK5 (502-719)	+
PAK5 (610-719)	-

B

	Interaktion mit PAK5 (502-719):	Interaktion mit 14-3-3 β/ζ:
MARK2 (1-722) wt	-	+
MARK2 T208A/S212A inact.	+	+
MARK2 T208E act.	-	-
MARK2 (1-370)	+	+
MARK2 (1-326)	+	+
MARK2 (1-326) T208A/S212A inact.	+	+
MARK2 (1-202)	-	-
MARK2 (53-303)	+	-
MARK2 (53-303) T208A/S212A inact.	+	-
MARK2 (186-328)	+	-
MARK2 (324-722)	-	-
MARK2 (365-614)	-	-

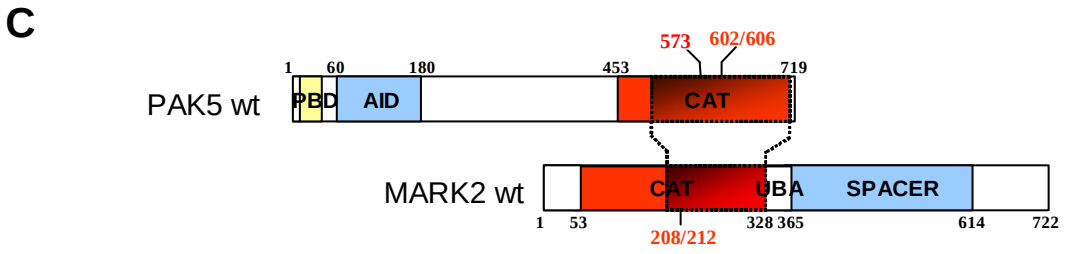


Abbildung 10: Charakterisierung der Interaktionsdomänen zwischen MARK2, PAK5 und 14-3-3 im Zwei-Hybrid-System
(A) Schematische Darstellung der Interaktion verschiedener PAK5-Konstrukte mit MARK2 T208A/S212A: In den direkten Zwei-Hybrid-Tests konnte die für eine MARK2-Interaktion notwendige PAK5-Domäne (502-719) identifiziert werden. Die gelben, blauen und roten Boxen markieren die p21-Bindedomäne (PBD), die autoinhibitorische Domäne (AID) und die Kinasedomäne (CAT). Die Zahlen unterhalb der Boxen markieren den entsprechenden Aminosäurenbereich.
(B) Schematische Darstellung der Interaktion verschiedener MARK2-Konstrukte mit PAK5 und 14-3-3: Identifizierung der für die PAK5- und 14-3-3-Interaktion notwendige MARK2-Domäne. Die roten und blauen Boxen markieren die Kinasedomäne (CAT) und die SPACER-Domäne. Die UBA-Box stellt die Ubiquitin-assoziierte Domäne dar.
(C) Interaktionsmodell von MARK2 und PAK5. Die katalytische Domäne von PAK5 interagiert mit der Kinasedomäne von MARK2.

In einem reziproken Experiment wurde die isolierte PAK5-Domäne (502-719) als Köder eingesetzt und mit verschiedenen MARK2-Konstrukten kotransformiert (s. Abb. 10B). Wie erwartet interagierte PAK5 (502-719) mit der inaktiven MARK2, jedoch nicht mit MARK2 wt oder der aktiven MARK2 T208E (freundlicherweise von Dr. T. Timm/MPG-ASMB zur Verfügung gestellt). Weiterhin konnten Wechselwirkungen zwischen PAK5 (502-719) und fast allen C-terminalen MARK2-Deletionsmutanten festgestellt werden, wobei eine Mutation in der MARK2-Aktivierungsschleife keine Auswirkung auf die Bindung zu PAK5 zeigte.
Das Interaktionsmodell in Abbildung 10C verdeutlicht, dass die katalytische Domäne von PAK5 mit der Kinasedomäne von MARK2 interagiert.

Ähnliche Resultate wurden in Zwei-Hybrid-Versuchen mit 14-3-3β/ζ und MARK2-Konstrukten erzielt. Auch in diesem Fall konnte der MARK2 N-Terminus einschließlich der katalytischen Domäne (1-326) als Interaktionsbereich für die beiden 14-3-3 Isoformen definiert werden. Im Gegensatz zur MARK2/PAK5-Interaktion wurde jedoch keine Wechselwirkung zwischen 14-3-3 und der reinen katalytischen Domäne (53-303) festgestellt.

6.2.2 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen MARK2, PAK5 und 14-3-3

Zur Bestätigung der beobachteten MARK2/PAK5-Interaktion in Hefen wurden Kopräzipitationsexperimente mit His-markierter PAK5 und HA-markierter MARK2 wt, bzw. der inaktiven MARK2 T208A/S212A durchgeführt. Die Expression der rekombinanten Fusionsproteine erfolgte in Sf9-Zellen. Die Aufreinigung sowie die Präzipitation der Proteine wurden gemäß dem unter 5.3.5 und 5.3.6 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

6.2.2.1 Interaktion von MARK2 mit PAK5 in Sf9-Zellen

Nach Behandlung der Sf9-Zellysate mit anti-HA-Antikörper wurden die immunopräzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot (s. 5.3.3) auf kopräzipitiertes His-PAK5 untersucht.

Wie aus Abbildung 11A ersichtlich, besitzt PAK5 ein aparentes Molekulargewicht von ca. 90 kDa (Spur 4, 5) und kann mit Hilfe eines monoklonalen α-His-Antikörpers in einem Immunkomplex mit MARK2 und der inaktiven Mutante MARK2 T208A/S212A nachgewiesen werden. Die Spezifität der Bindung von PAK5 an MARK2 bzw. an die inaktive Mutante wird dadurch belegt, dass in dem Kontrollansatz (PAK5 alleine, Abb. 11A, Spur 2) keine PAK5-Präzipitation detektiert werden konnte.
Abbildung 11B (Spur 3-5) dokumentiert die Expression von MARK2 wt und der inaktiven Mutante MARK2 T208A/S212A in Einzel- und Doppeltransfektionsansätzen.
Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Zwei-Hybrid-Systems konnte in Sf9-Kopräzipitationsexperimenten gezeigt werden, dass die vollständige PAK5 mit der vollständigen MARK2 interagiert, wobei die Aktivität von MARK2 keine Rolle spielte.

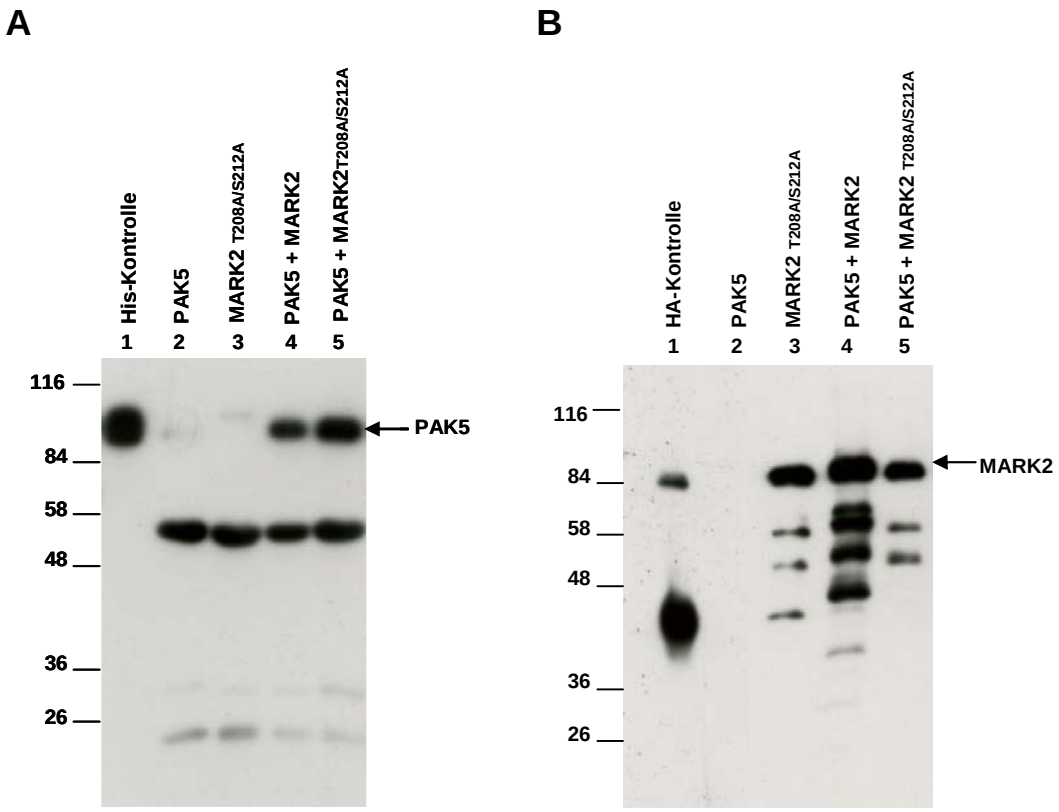


Abbildung 11: Interaktion von MARK2 und PAK5 in Sf9-Zellen
Sf9-Zellen wurden mit His-markiertem PAK5 und HA-markiertem MARK2 transfiziert. Nach 72 h wurden die Proteine aus den Lysaten mit einem HA-Antikörper (ko-)immunopräzipitiert und im Western-Blot nachgewiesen. **(A)** Wechselwirkung von PAK5 mit MARK2. Nach der HA-Koimmunopräzipitation konnte PAK5 in den Ansätzen mit MARK2 und MARK2 T208A/S212A mittels His-Antikörper nachgewiesen werden (Spur 4, 5). Die unterhalb von PAK5 verlaufenden Banden (Spur 2-5) markieren die schwere Kette des Maus-Antikörpers (50 kDa). Als Positivkontrolle diente aus Sf9-Zellen aufgereinigtes PAK5-His.
(B) Expressionsnachweis von MARK2 in Sf9-Zellen mit einem HA-Antikörper. MARK2 wird sowohl in der Einzeltransfektion (Spur 3) als auch in der Doppeltransfektion (Spur 4, 5) exprimiert. Die in Spur 3-5 sichtbaren Banden lassen auf einen MARK2-Abbau schließen. Als Positivkontrolle diente aus Sf9-Zellen aufgereinigtes MARK2-HA.

6.2.2.2 Kopräzipitation von MARK2 und endogenem 14-3-3 in Sf9-Zellen

Um die Wechselwirkung zwischen MARK2 und 14-3-3 zu untersuchen, wurde die in 6.2.2.1 verwendete Membran gestrippt und mit einem 14-3-3β-Antikörper inkubiert. Der verwendete polyklonale α-14-3-3β-Antikörper ist in der Lage, endogenes 14-3-3β und in einem geringeren Ausmaß andere 14-3-3-Isoformen immunologisch nachzuweisen (s. Abb. 12).

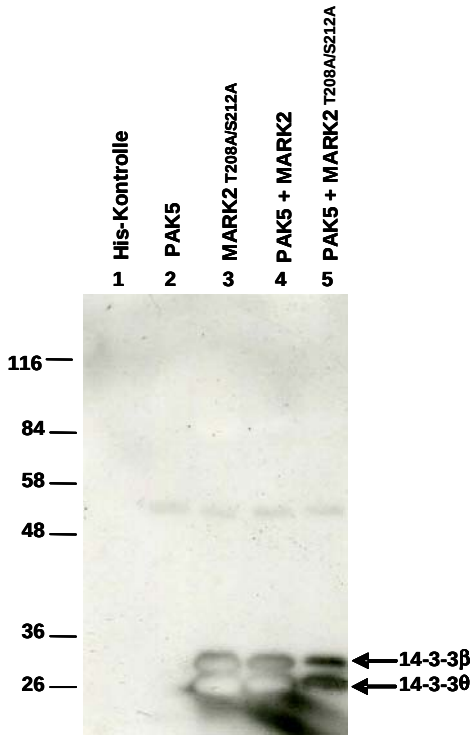


Abbildung 12: Endogenes 14-3-3 kopräzipitiert mit MARK2 in Sf9-Zellen
Für den Nachweis von endogenem 14-3-3 wurde die in Abbildung 11A eingesetzte Membran gestrippt und anschließend mit einem polyklonalen α-14-3-3β-Antikörper inkubiert. Endogenes 14-3-3 kopräzipitiert mit der inaktiven MARK2 T208A/S212A alleine sowie mit den Doppeltransfektionsansätzen MARK2 T208A/S212A/PAK5 und MARK2/PAK5. Die Spezifität der Interaktion wird durch Spur 2 (PAK5 alleine) bestätigt. Die Banden erscheinen ein wenig ausgeblichen, da aufgrund der zu hohen Proteinkonzentration das Substrat zu schnell umgesetzt worden ist (d.h. die Lichtreaktion ist schon vorbei).

Die in Abbildung 12 detektierten Banden in Höhe von ca. 30 kDa und 28 kDa lassen auf eine Interaktion der 14-3-3 beta Isoform und der etwas kleineren Isoform 14-3-3 theta mit MARK2 schließen. Es kann jedoch nicht eindeutig ausgesagt werden, ob 14-3-3 in den Doppel-transfektionsansätzen ausschließlich mit MARK2 und MARK2T208A/S212A interagiert oder auch mit dem im Komplex enthaltenem PAK5. Die beschriebenen Wechselwirkungen werden durch die im Kontrollansatz (nicht kopräzipitiertes His-PAK5, Spur 2) nicht detektierbaren 14-3-3 Banden verifiziert.

6.3 *in vitro* Untersuchung der Aktivität von MARK2 und PAK5

Die Zwei-Hybrid Versuche in Kapitel 6.2.1 verdeutlichten, dass die Wechselwirkungen zwischen MARK2 und PAK5 durch die katalytischen Domänen der beiden Kinasen vermittelt werden. Um zu untersuchen, welchen Einfluss diese Interaktion auf die Aktivität der Kinasen ausübt, wurden Aktivitätsassays mit spezifischen MARK2- und PAK5-Substraten durchgeführt.

6.3.1 Aktivitätsvergleich verschiedener PAK5-Konstrukte

Zunächst sollte die Aktivität von PAK5 wt, der aktiven PAK5 S573N/S602E und der inaktiven PAK5 S602M/S606M Mutante überprüft werden. Hierzu wurden die Kinasen aus Sf9-Zellen isoliert und anschließend äquimolare Kinasemengen mit dem PAK5-Substrat Histon H4 und radioaktivem [^{32}P]-ATP für 2 h bei 30 °C inkubiert (s. 5.3.7). Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (s. 5.3.2). Die Kinaseaktivität der eingesetzten PAK5-Konstrukte wurde anhand der Substrat- und Autophosphorylierung analysiert, wobei eine quantitative Aussage mittels der Software „TINA“ (Raytest Isotopenmessgerät GmbH) ermöglicht wurde (s. Abb. 13). Wie erwartet, wird das Substrat Histon H4 (HH4) von PAK5 (Spur 2) und in einem ca. 4,0 fach stärkerem Maß von der aktiven PAK5 S573N/S602E (Spur 3) phosphoryliert. Sowohl im Puffer-Kontrollansatz (Spur 1) als auch im Ansatz der inaktiven PAK5 S602M/S606M (Spur 4) konnte keine oder eine nur sehr schwache HH4-Phosphorylierung beobachtet werden. Die Betrachtung der Autophosphorylierung ermöglichte weitere Aussagen über die Aktivität der unterschiedlichen PAK5-Konstrukte: die aktive PAK5 S573N/S602E weist im Vergleich zu PAK5 wt eine erhöhte Autophosphorylierung auf, wohingegen die inaktive Mutante PAK5 S602M/T606M keine Autophosphorylierung zeigt.

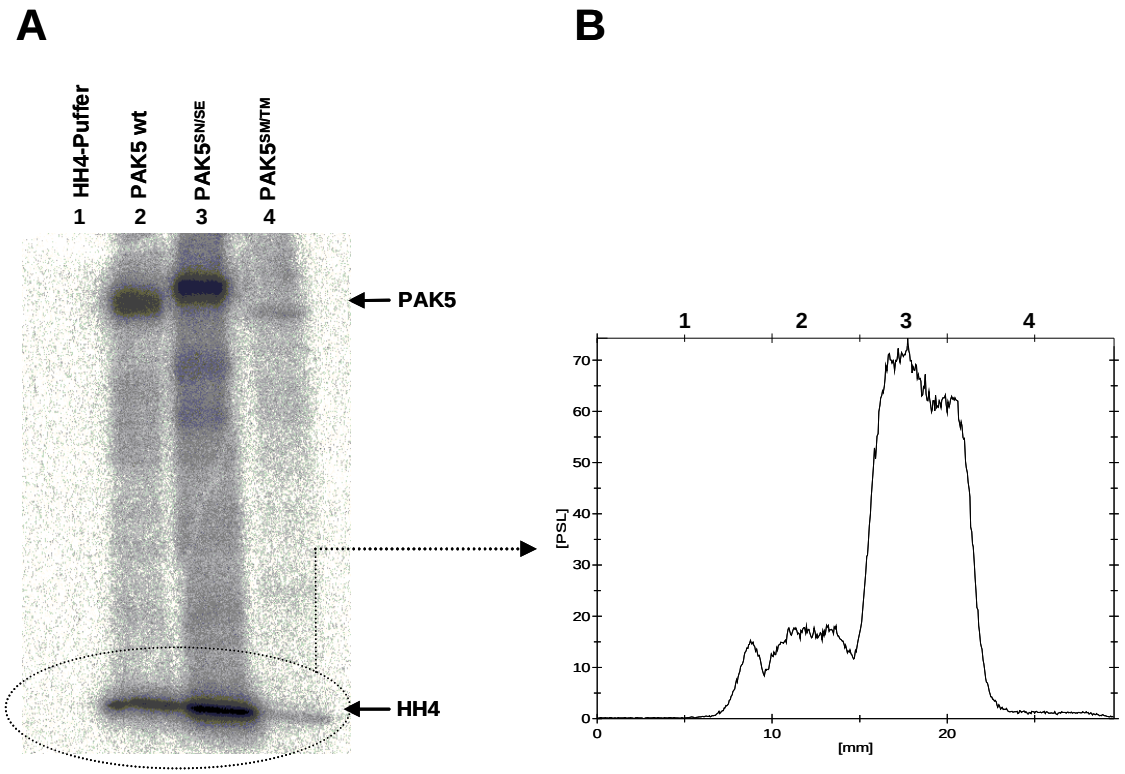


Abbildung 13: PAK5 wt, aktive PAK5 S573N/S602E und inaktive PAK5 S602M/S606M im Aktivitätsvergleich
(A) Die Kinaseaktivität der eingesetzten PAK5-Konstrukte wurde anhand der Histon H4 (unten)- und Autophosphorylierung (oben) gemessen. Wie aus dem Autoradiogramm ersichtlich, weist die aktive PAK5 S573N/S602E (Spur 3) eine stärkere Auto- und HH4-Phosphorylierung auf als PAK5 wt. Die inaktive PAK5 S602M/S606M zeigt wie erwartet eine sehr schwache Auto- und HH4-Phosphorylierung.
(B) Die Intensität der HH4-Phosphorylierung wurde mit Hilfe der Auswerte-Software „TINA“ (Raytest Isotopenmessgerät GmbH) analysiert. In der Diagrammübersicht wird die Kinaseaktivität der aktiven PAK5 S573N/S602E (Spur 3) noch einmal verdeutlicht. (PSL= Photostimulierende Lumineszenz)

6.3.2 PAK5 inhibiert die Kinaseaktivität von MARK2

Im Folgenden sollte der Einfluss von PAK5 auf die Kinaseaktivität von MARK2 untersucht werden. Die Höhe der MARK2-Aktivtät kann über die Phosphorylierung des TR-1 Peptids gemessen werden. Da das TR-1 Peptid der ersten repetitiven Sequenz des Tau-Proteins nachempfunden ist, fungiert dieses Peptid als ein sehr spezifisches Substrat von MARK2.
Die in *E.coli* exprimierte, konstitutiv aktive MARK2 T208E (Timm et al., 2003) wurde mit PAK5 wt, der aktiven und der inaktiven PAK5-Mutante in Anwesenheit des TR-1 Substrats und [^{32}P]-ATP für 4 h inkubiert.

Wie aus Abbildung 14A ersichtlich, zeigt MARK2 T208E alleine die höchste Aktivität (Spur 1). Diese Aktivität wird durch die äquimolare Proteinmenge von PAK5 um das Dreifache signifikant verringert (Spur 2). Ein ähnliches Resultat wird mit der aktiven PAK5 S573N/S602E und der inaktiven PAK5 S602M/S606M erzielt. Dies führte zu der Annahme, dass der inhibitorische Effekt von PAK5 auf MARK2 unabhängig von der PAK5-Aktivität erfolgt, aber in Abhängigkeit von der wechselseitigen Bindung der katalytischen Kinasedomänen. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde der Assay mit der nicht-katalytischen N-terminalen Domäne von PAK5 durchgeführt (AS 1-181, PAK5-AID in Spur 5), die mit MARK2 im direkten Zwei-Hybrid-Test nicht interagierte. Wie erwartet, konnte diese Deletionsmutante den inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von MARK2 nicht ausüben.

Ein weiteres Argument für die Inhibition der MARK2 durch eine PAK5-Bindung unabhängig von der PAK5-Aktivität liefert der Phosphorylierungsgrad von MARK2 T208E in Abbildung 14B: ungeachtet der unterschiedlichen PAK5-Aktivitäten (Spur 2-4) kann keine Veränderung im Autophosphorylierungsgrad von MARK2 T208E beobachtet werden. Im Falle einer inhibierenden MARK2-Phosphorylierung durch PAK5 hätten sich der Phosphorylierungsgrad von MARK2 in den Ansätzen 2 und 3 (MARK2 T208E und PAK5 wt/ aktive PAK5) im Vergleich zu Ansatz 1 (MARK2 T208E alleine) verändern müssen.

Um zu überprüfen, ob MARK2 die Aktivität von PAK5 beeinflusst, wurden Aktivitätsassays mit PAK5, MARK2 T208E und dem PAK5-Substrat HH4 durchgeführt. Das in Abbildung 14C gezeigte Autoradiogramm legt dar, dass MARK2 keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität von PAK5 ausübt: die Anwesenheit von MARK2 T208E im Ansatz (vgl. Spur 1 und 3) verursacht keine Änderung der Histonphosphorylierung, wie es im Falle einer Aktivierung oder Inhibierung von PAK5 durch MARK2 T208E erwartet worden wäre.
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PAK5 die Aktivität von MARK2 durch eine Proteininteraktion und nicht durch Phosphorylierungsprozesse inhibiert.

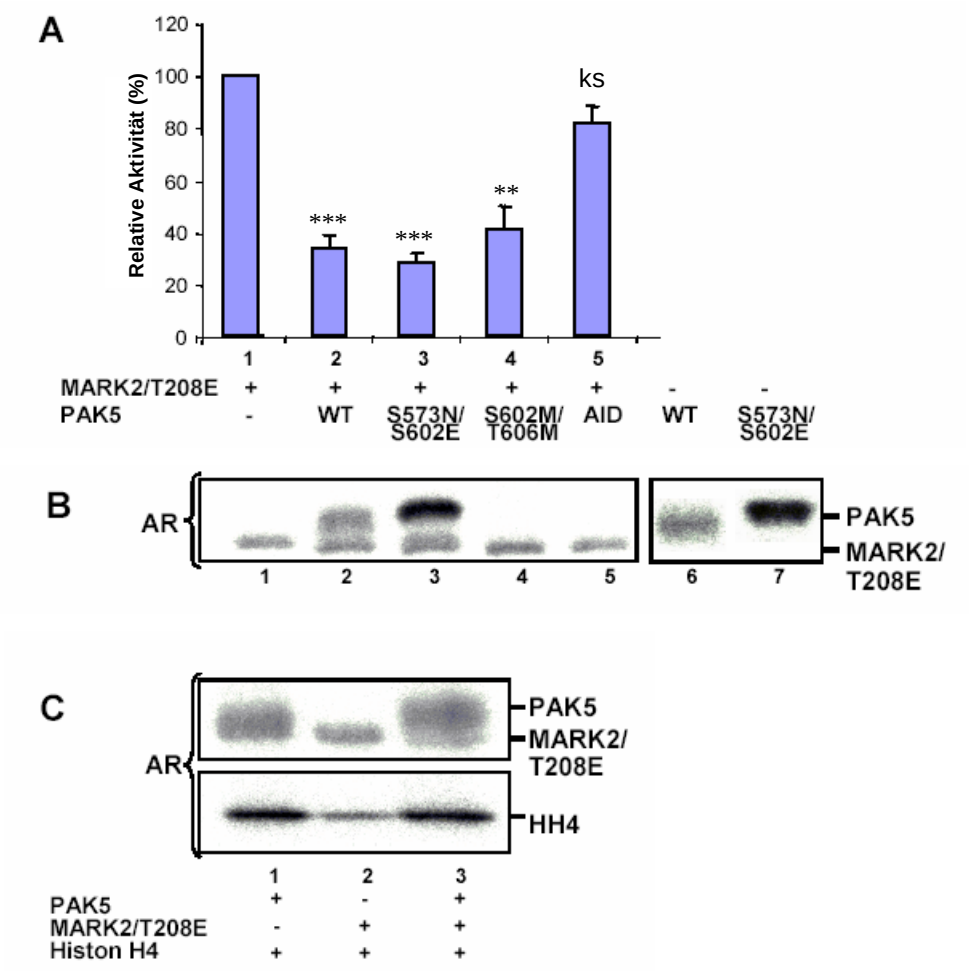


Abbildung 14: PAK5 inhibiert die Kinaseaktivität von MARK2
(A) Die Inhibition der konstitutiv aktiven MARK2 T208E durch PAK5 wurde anhand der Phosphorylierung des TR-1 Peptids durch MARK2 gemessen. Die Kinaseaktivität der aktiven MARK2 T208E wurde mit 100% relativer Aktivität gleichgesetzt (Spur 1). PAK5 wt sowie die verschiedenen PAK5-Mutanten reduzieren die Kinaseaktivität der aktiven MARK2 T208E ca. um das Dreifache (Spur 2-4). Die N-terminale Domäne von PAK5 (1-181, PAK5-AID) inhibiert die MARK2-Aktivität nur unwesentlich (Spur 5), wie es aufgrund der fehlenden Interaktion zwischen den beiden Proteinen auch erwartet wurde. Dargestellt ist der Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz der Inhibierung wurde mit dem GraphPad Prism Programm berechnet (T-Test), wobei gilt: ***, ** = $P < 0.05$, ks = keine Signifikanz.
(B) Autoradiogramm der in Abbildung A dargestellten Kombinationen von PAK5 und MARK2 in Anwesenheit des TR-1 Peptids. Jede Kinase zeigt eine gewisse Autophosphorylierung, die im Falle von MARK2 jedoch nicht von der PAK5-Aktivität beeinflusst wird (vergleiche Spur 3 und 4).
(C) Autoradiogramm von PAK5 wt und MARK2 T208E in Anwesenheit von Histon H4. PAK5 (Spur 1) zeigt eine Autophosphorylierung als auch eine starke HH4-Phosphorylierung. MARK2 T208E dagegen phosphoryliert HH4 nur sehr schwach (Spur 2). Aufgrund des unveränderten Phosphorylierungsgrades von HH4 in Spur 3 wird deutlich, dass MARK2 T208E die Kinase PAK5 nicht inhibieren kann.

6.3.2.1 Die Inhibitionskonstante (K_i) von MARK2 und PAK5

Um genauere Aussagen über die Bindung von MARK2 und PAK5 machen zu können, wurde die Kinase-Inhibitorkonstante der beiden Proteine bestimmt. Hierzu wurde die TR-1 Phosphorylierung durch MARK2 T208E (20 nM) unter dem Einfluss verschiedener PAK5 S573N/S602E Konzentrationen im Kinaseassay gemessen. Anhand der Graphik in Abbildung 15 konnte eine K_i von 1 µM bestimmt werden.

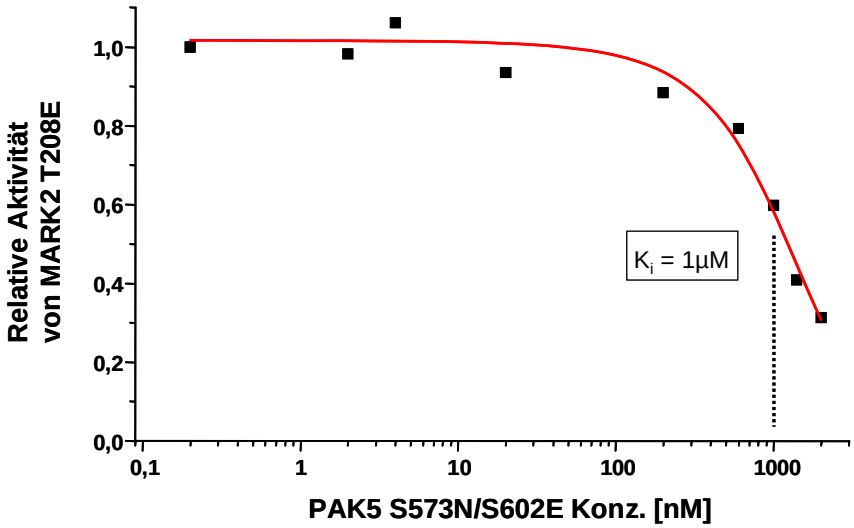


Abbildung 15: Bestimmung der Inhbitionskonstante (K_i) von MARK2 und PAK5
Die K_i der Inhibition von MARK2 durch PAK5 S573N/S602E wurde anhand der Phosphorylierung des Tau-Peptids TR-1 gemessen (s. 5.3.7). Für die Bestimmung der K_i von ca. 1 µM wurden 20 nM MARK2 T208E und unterschiedliche PAK5 S573N/S602E Konzentrationen (0.2, 2, 4, 20, 200, 600, 1000, 1400, 2000 nM) im Kinaseassay eingesetzt.

6.4 Koexpressionsstudien zur Untersuchung der Interaktion von MARK2 und PAK5

Neben dem biochemischen Nachweis einer Proteininteraktion ist es von Bedeutung, die Wechselwirkung der einzelnen Komponenten auch in einen zellulären Kontext zu bringen. Als Expressionssystem dienten CHO-Zellen aus Ovarien chinesischer Hamster.

6.4.1 Zeitreihenexperimente zur Charakterisierung der PAK5-Expression

Als einleitendes Experiment für die folgenden Koexpressions- und Zytoskelettstudien wurde die Expression von YFP (Yellow Fluorescent Protein)-markiertem PAK5 in CHO-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie über 24 h dokumentiert. Für die Berechnung der Transformationsrate wurden 12 h nach der eigentlichen Transfektion alle 2-3 h ca. 100 Zellen untersucht. Die Ergebnisse der PAK5-Expressionszeitreihe sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

	Transformationsrate	Zellgröße	PAK5-Verteilung in der Zelle
12 h	ca. 12%	große, flächige Zellen	vesikelförmig
14 h	ca. 24%	große, flächige Zellen	vesikelförmig
16 h	ca. 23%	große, flächige Zellen wenige kleine, runde Zellen	vesikelförmig
18 h	ca. 17%	kleine, runde Zellen einige große Zellen	vesikelförmig, teilweise flächiger Hintergrund
21 h	ca. 18%	kleine, runde Zellen	vesikelförmig, teilweise flächiger Hintergrund
24 h	ca. 16%	kleine, runde Zellen	vesikelförmig, teilweise flächiger Hintergrund

Tabelle 2: Zusammenfassung der Zeitreihenexperimente zur Charakterisierung der PAK5-Expression

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie nach 14, 18 und 24 h sind in Abbildung 16 dargstellt. Anhand dieser Daten kann geschlussfolgert werden, dass eine optimale PAK5-Expression 14-16 Stunden nach der Transformation der CHO-Zellen erfolgt. Die transfizierten Zellen besitzen zu diesem Zeitpunkt eine große, flächige Zellform, in denen eine vesikuläre

PAK5-Verteilung beobachtet werden kann. Eine Inkubation der Zellen über diesen Zeitraum hinaus bewirkt die Veränderung der Zellform (kleine, runde Zellen) bzw. das Absterben der Zellen.

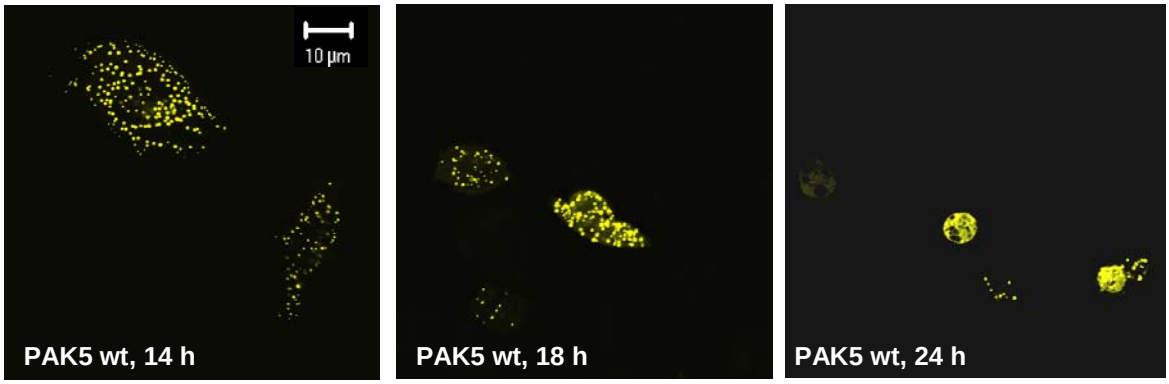


Abbildung 16: PAK5-Expression in CHO-Zellen nach 14, 18 und 24 h
CHO-Zellen wurden mit YFP-PAK5 wt transfiziert und nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten fixiert. Nach 14 h besitzen die Zellen eine große und flächige Zellform, PAK5 ist vesikulär über die ganze Zelle verteilt. Nach 18 h kann eine Zellformveränderung beobachtet werden. Die Zellen sind kleiner und runder, nur wenige Zellen erscheinen groß und flächig. Neben der vesikulären PAK5-Verteilung ist ein schwach fluoreszierender Hintergrund in einigen Zellen zu erkennen. Nach 24 h sind alle Zellen klein und abgerundet bzw. abgestorben.

6.4.2 Kolokalisation von MARK2 und PAK5 in CHO-Zellen

Neben Expressionsstudien können durch fluoreszenzmikroskopische Methoden Lokalisationsmuster koexprimierter Proteine analysiert werden. Für die Untersuchung der subzellulären Verteilung von PAK5 und MARK2 wurden CHO-Zellen mit YFP-markierten PAK5-Konstrukten oder/und CFP -MARK2 transfiziert.

Abbildung 17A, 1-3 zeigt die Lokalisation von PAK5 wt, der aktiven PAK5 S573N/S602E und der inaktiven PAK5 S602M/S606M Mutante in einzel-transfizierten CHO-Zellen. Alle drei Konstrukte weisen punktierte Expressionsmuster auf, was auf eine vesikuläre PAK5-Verteilung in den Zellen schließen lässt. Eine mögliche Erklärung für das in Abbildung 17A, 2 beobachtete diffuse Hintergrundsignal im Zytosol könnte ein partielles Ablösen der aktiven PAK5 von den Vesikeln sein.

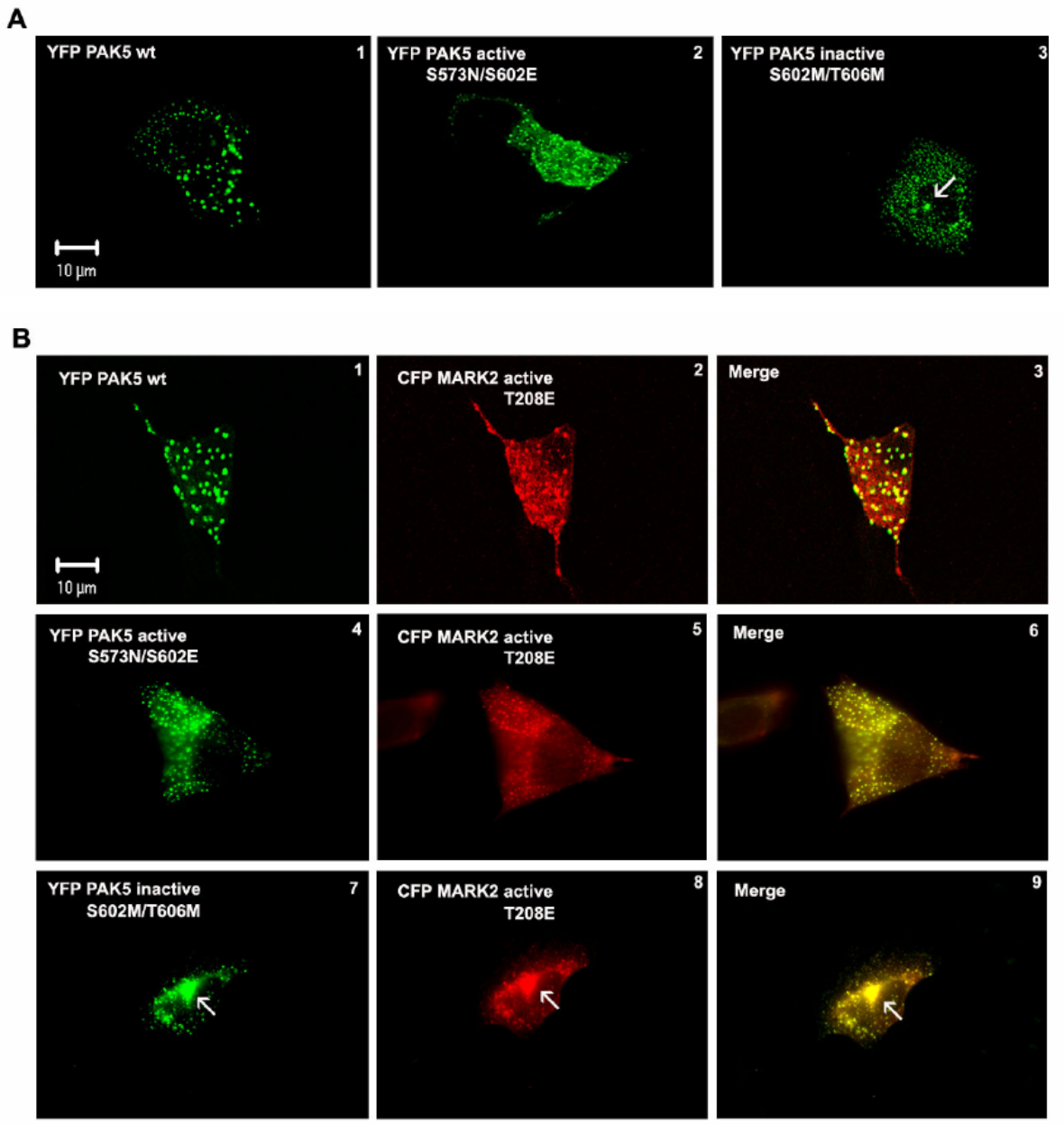


Abbildung 17: MARK2 und PAK5 kolokalisieren in CHO-Zellen
(A, 1-3**)** Verteilung von PAK5 und PAK5-Mutanten in CHO-Zellen. CHO-Zellen wurden mit PAK5 wt, aktiver PAK5 S573N/S602E und inaktiver PAK5 S602M/T606M transfiziert, nach 16 h fixiert und die zelluläre Verteilung mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. PAK5 wt und inaktive PAK5 S602M/T606M weisen eine Vesikel-ähnliche Verteilung auf, wohingegen die aktive PAK5 S573N/S602E vesikulär und zytosolisch in der Zelle vorliegt.
(B) Kolokalisation verschiedener PAK5-Konstrukte und aktiver MARK2 T208E.
(B, 1-3) Neben einer diffusen Hintergrundverteilung von MARK2 T208E kann die Kolokalisation von PAK5 wt und MARK2 T208E in vesikulären Strukturen beobachtet werden.
(B, 4-6) Nach der Kotransfektion von PAK5 S573N/S602E und MARK2 T208E kolokalisieren beide Proteine in Vesikeln und diffus verteilt im Zytosol.
(B, 7-9) PAK5 S602M/T606M und MARK2 T208E zeigen eine Kolokalisation in Vesikeln sowie eine Akkumulierung in der Nähe des Centrosoms (durch Pfeile gekennzeichnet, siehe auch Pfeil A, 3).

Zur genauen Analyse der Lokalisationsmuster von MARK2 T208E und PAK5 wurden CHO-Zellen kotransfiziert. Abbildung 17B stellt dar, dass die aktive MARK2 T208E mit PAK5 wt, aktiver PAK5 S573N/S602E und inaktiver PAK5 S602M/S606M kolokalisiert. Ein weiteres Indiz für die Kolokalisation liefert die Beobachtung, dass die Verteilung von MARK2 durch die Aktivität von PAK5 beeinflusst wird: PAK5 wt kolokalisiert mit größeren vesikel-ähnlichen Strukturen als PAK5 S573N/S602E und zeigt im Vergleich zu dieser Mutante keine diffuse Hintergrundverteilung. PAK5 S602M//T606M ist ebenfalls vesikelförmig verteilt, aber auch am Centrosom konzentriert. In allen drei Fällen folgt das Expressionsmuster von MARK2 dem der PAK5-Konstrukte.

In Drewes et al. (1997) wurde ebenfalls eine punktierte MARK2-Expression sowie eine schwache zytosolische Hintergrundverteilung von MARK2 beschrieben.

6.4.3 PAK5 inhibiert MARK2 und reguliert die Stabilität des Mikrotubuli- und Aktinnetzwerks

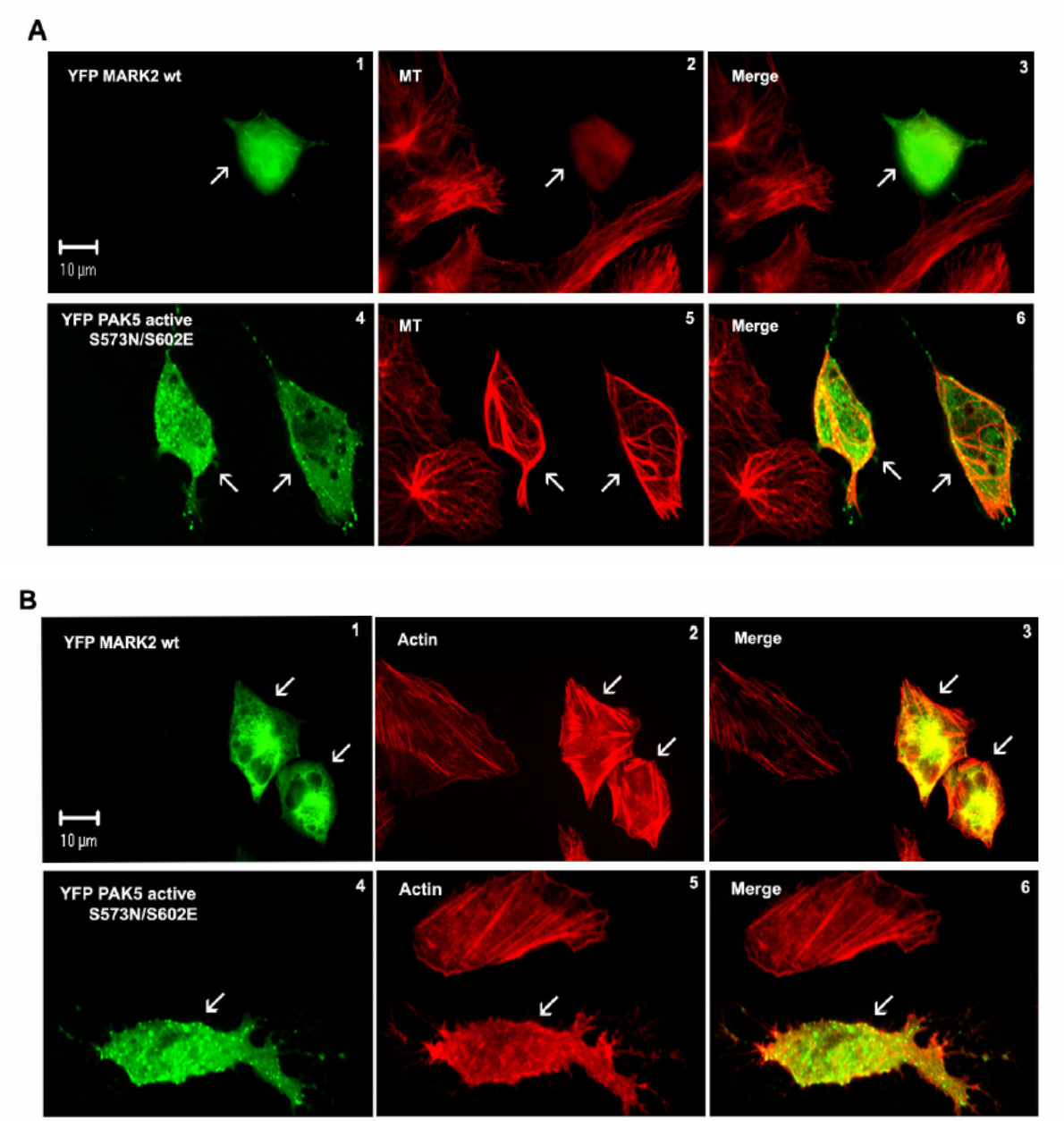
Als nächstes sollte der funktionale Charakter der PAK5/MARK2-Interaktion in CHO-Zellen untersucht werden.

MARK2 phosphoryliert das neuronale Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau und bewirkt dadurch seine Ablösung von den Mikrotubuli. Die Überexpression von MARK2 in Hamsterovarien-Zellen führt daher zur Destabilisierung des Mikrotubulinetzwerks und zur Degeneration der Zellen (Drewes et al., 1997; Ebneth et al., 1998; Illenberger et al., 1998).

Die Mitglieder der PAK-Familie üben einen destabilisierenden Einfluss auf das Aktinnetzwerk aus (Manser, 2002; Bokoch, 2003). Aufgrund dieser Fakten und den in Abbildung 17 dargestellten Ergebnissen sollte überprüft werden, ob durch die Interaktion der beiden Kinasen das Zytoskelett beeinflusst wird. Zuerst wurden mögliche Veränderungen am Mikrotubulinetzwerk untersucht.

Übereinstimmend mit den in Drewes et al. (1997) beschriebenen Ergebnissen kann in Abbildung 18A, 2 das Auflösen der Mikrotubuli und das Absterben von YFP-MARK2 transfizierten CHO-Zellen beobachtet werden. Im Vergleich dazu stabilisiert die Überexpression der aktiven PAK5 das Mikrotubulinetzwerk in CHO-Zellen (s. Abb. 18A, 5).

Gegensätzliche Effekte wurden am Aktinnetzwerk beobachtet: MARK2 wt bewirkt die Stabilisierung der Aktin-Stressfasern (s. Abb. 18B, 2), während die aktive PAK5 die Stressfasern auflöst und die Bildung von Filopodien verursacht (s. Abb. 18B, 5).
Zellen, die mit der inaktiven PAK5 S602M/T606M transfiziert wurden, wiesen keine signifikanten Veränderungen am Aktin- und Mikrotubulinetzwerk auf (s. Abb. 18C, 2 und 5).



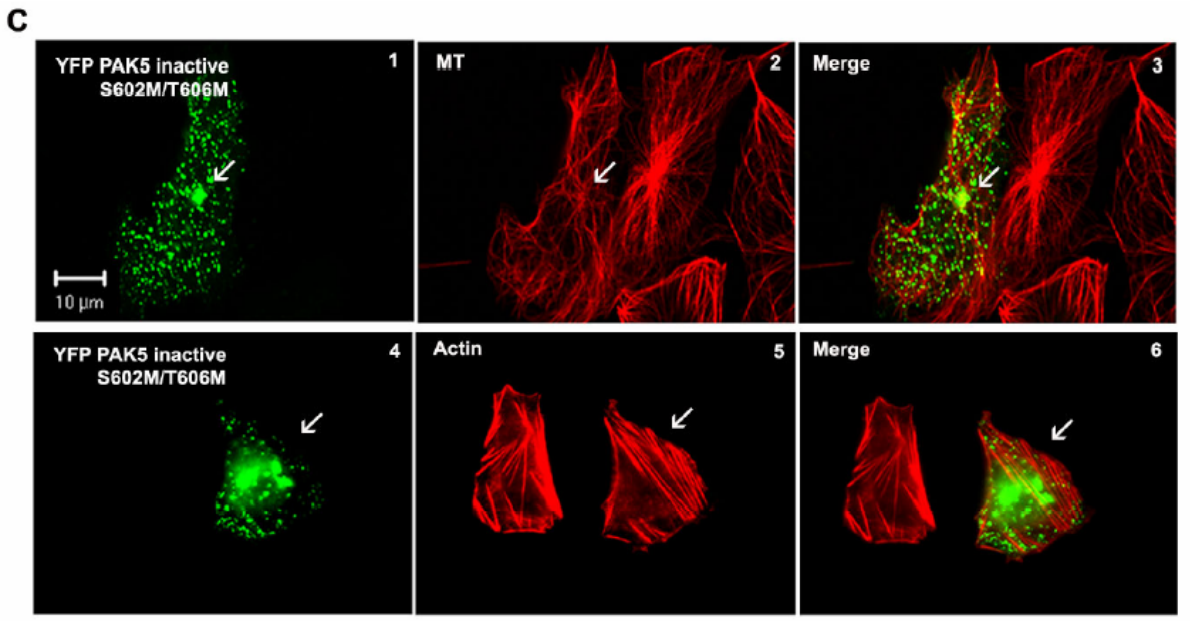


Abbildung 18: Effekte verschiedener PAK5-Mutanten und MARK2 auf die Stabilität des Mikrotubuli- und Aktinnetzwerks
CHO-Zellen wurden mit PAK5-Mutanten und MARK2 wt transfiziert und nach 16 h Inkubation fixiert. Die Mikrotubuli wurden mit YL1/2- und TRITC-gekoppeltem Sekundär-Antikörper (rot) angefärbt. Für die Aktinfärbung wurde Rhodamin-konjugiertes Phalloidin verwendet. Transfizierte Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.
(A) MARK2- und PAK5-Effekte auf das Mikrotubulinetzwerk. In MARK2-transfizierten Zellen löst sich das Mikrotubulinetzwerk auf (1-3), während PAK5 S573N/S602E die Mikrotubuli stabilisiert (4-6).
(B) MARK2- und PAK5-Effekte auf das Aktinnetzwerk. MARK2 bewirkt die Stabilisierung der Aktin Stressfasern, aktive PAK5 S573N/S602E bewirkt ihre Auflösung.
(C) Die mit inaktiver PAK5 S602M/T606M-transfizierten Zellen weisen keine Stabilitätsveränderungen am Mikrotubuli- oder Aktinnetzwerk auf.

Um zu analysieren, ob nach einer Doppeltransfektion ein inhibitorischer Effekt von PAK5 auf MARK2 (vgl. 6.3.2) ausgeübt werden kann, wurde die aktive MARK2 T208E mit der aktiven bzw. inaktiven PAK5-Mutante koexprimiert (s. Abb. 19). In beiden Ansätzen wurde wie erwartet die Destabilisierung der Mikrotubuli durch MARK2 T208E von PAK5 unterbunden. Die PAK5-Aktivität spielte hierbei keine Rolle. Die Auflösung der Aktinfasern konnte nur im Falle der PAK5 S573N/S602E wahrgenommen werden.

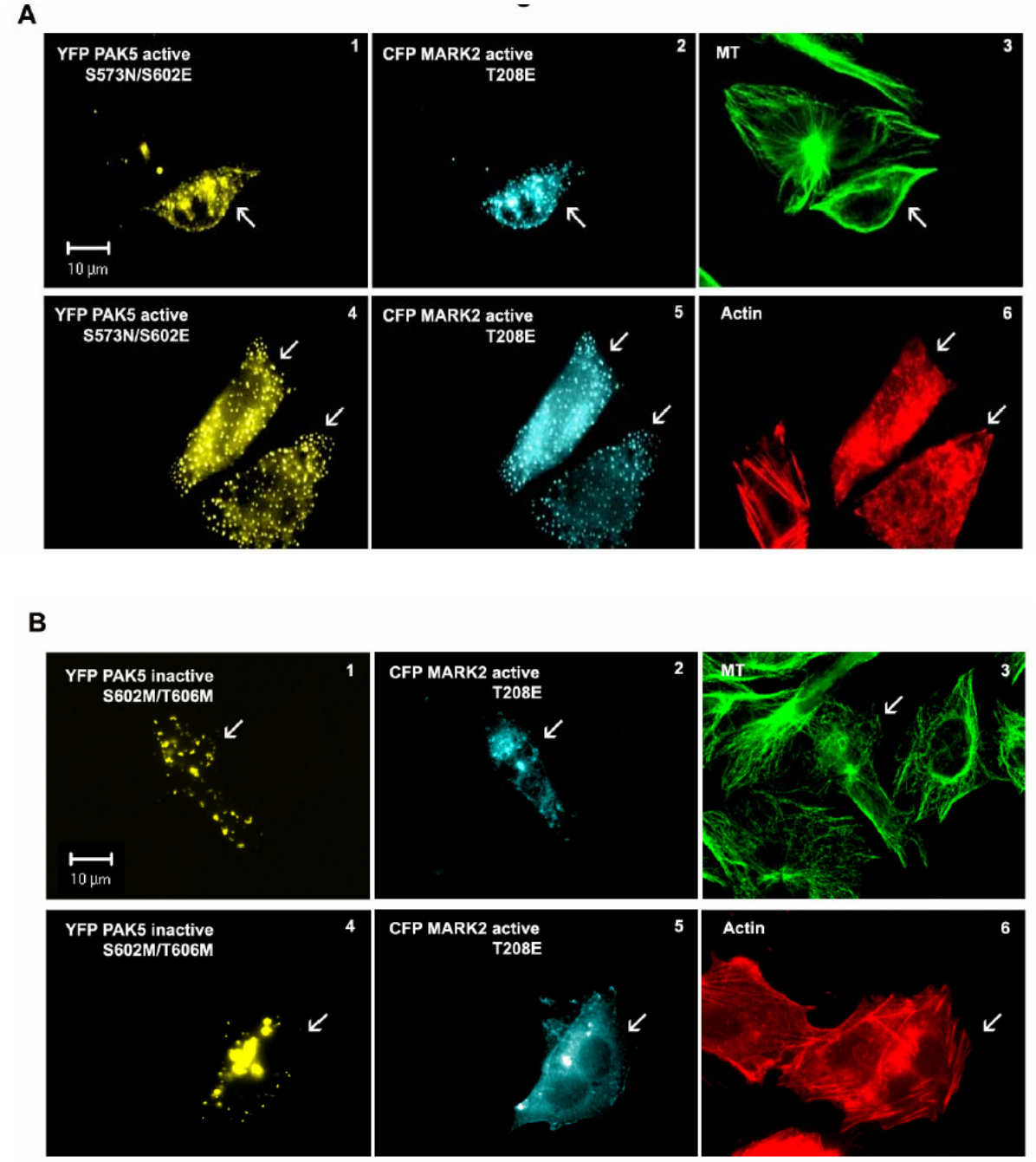


Abbildung 19: PAK5 inhibiert den MARK2-Effekt auf das Mikrotubulinetzwerk und macht Aktin dynamisch (Transfizierte Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet).
(A) CHO-Zellen, in denen PAK5 S573N/S602E und aktive MARK2 T208E koexprimiert wurden, zeigen ein stabiles Mikrotubulinetzwerk und ein dynamisches/nicht stabiles Aktinnetzwerk, verdeutlicht durch die Auflösung der Stressfasern.
(B) Die mit inaktiver PAK5 S602M/T606M und aktiver MARK2 T208E transfizierten CHO-Zellen weisen neben einem stabilen Mikrotubulinetzwerk (vergleiche hierzu MARK2-Einzeltransfektion Abbildung 18A, 2) auch ein stabiles Aktinnetzwerk auf. Der stabilisierende Mikrotubuli-Effekt wird durch die Inhibierung von MARK2 durch die inaktive PAK5 verursacht. Da für die Aktinauflösung die Aktivität von PAK5 notwendig ist, besitzen die Zellen nach der Kotransfektion von inaktiver PAK5 und MARK2 ein stabiles Aktinnetzwerk.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die aktive PAK5 zwei unterschiedliche Funktionen auf das Zytoskelett ausübt: zum einen stabilisiert sie das Mikrotubulinetzwerk durch Bindung und Inhibierung von MARK2, zum anderen destabilisiert sie das Aktinnetzwerk, indem sie die Stressfasern auflöst und die Bildung von Filopodien bewirkt. Die inaktive PAK5 kann nur den ersten Effekt ausüben, da für den zweiten Effekt die PAK5-Aktivität erforderlich ist (s. Abb. 20).

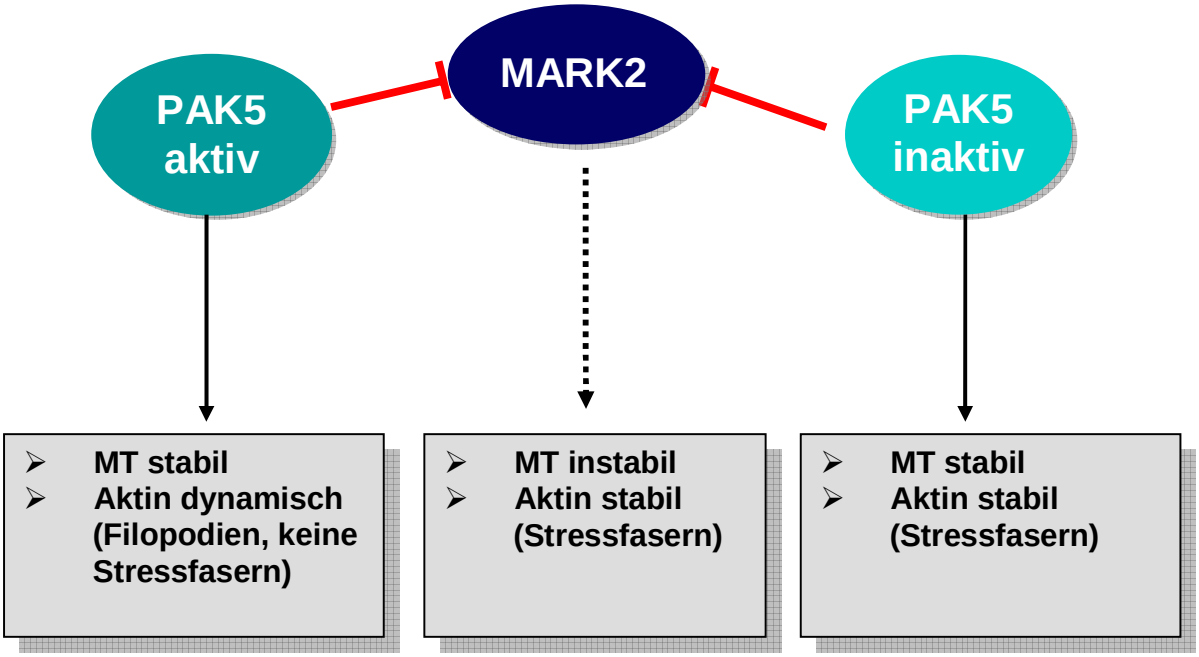


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Effekte von PAK5 und MARK2 auf das Mikrotubulus- und Aktinnetzwerk
Die aktive PAK5 kann zwei unabhängige Funktionen auf das Zytoskelett ausüben: zum einen stabilisiert sie das Mikrotubulinetzwerk durch Bindung und Inhibierung von MARK2, zum anderen destabilisiert sie das Aktinnetzwerk, indem sie Stressfasern auflöst und die Bildung von Filopodien bewirkt. Die inaktive PAK5 kann nur den ersten Effekt ausüben, da sie für den zweiten Effekt die PAK5-Aktivität benötigt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten neue Regulierungspartner und Regulierungsmechanismen der im Zwei-Hybrid-Screen identifizierten Kinase PAK5 charakterisiert werden.

6.5 *in vitro* Untersuchungen der PAK5-Autoinhibierung

Die Mitglieder der PAK-Familie lassen sich aufgrund der Sequenzähnlichkeiten ihrer Kinasedomäne und dem Vorhandensein einer autoinhibitorischen Domäne (AID) in zwei Gruppen unterteilen. Die hochkonservierte AID, die nur in Gruppe I (PAK1-3) vorzufinden ist, wird durch die N-terminale PBD-Domäne (p21-Bindedomäne) reguliert.

Ching et al. (2003) beschrieben zum ersten Mal ein autoinhibitorisches PAK5 KI-Motiv (Kinase-Inhibitory-Fragment, AS 120-133), das dem konservierten inhibitorischen Fragment der PAK I-Gruppe nicht entspricht (s. Abb. 21). Die *in vitro* Ergebnisse dieser Veröffentlichung wurden mit PAK5 wt und C-terminalen PAK5-Deletionsmutanten im Kinaseassay erzielt. Im Folgenden sollten Zwei-Hybrid Interaktionsexperimente und weitere Aktivitätsassays die in Ching et al. (2003) veröffentlichten Aussagen bestätigen.

```
PAK5   N120-AEENGFITFSQYSS-C133
PAK1   N137-SNSQKYMSFTDKSA-C150
            ::.: :::*:: *:
```

Abbildung 21: Sequenzvergleich des KI-Motivs von PAK1 und PAK5 nach Ching et al. (2003)
Identische (rot, *) und konservierte (stark: grün : / schwach: blau .) Aminosäuren sind durch Farbe und Zeichen unterhalb der Sequenz gekennzeichnet.

6.5.1 Untersuchung der intra- und intermolekularen PAK5-Wechselwirkungen im Zwei-Hybrid-System

Um die intra- bzw. intermolekularen Wechselwirkungen von PAK5 im direkten Zwei-Hybrid-Test genauer zu charakterisieren, wurden PAK5 wt sowie verschiedene PAK5-Aktivitäts- und Deletionsmutanten gemeinsam mit PAK5-AID in dem Hefenstamm AH109 koexprimiert. PAK5-AID (Auto-Inhibitory-Domain) ist eine N-termimale Deletionsmutante, die sich über den Aminosäurenbereich 1 bis 181 erstreckt und das autoinhibitorische KI-Fragment (120-133) beinhaltet. Die Herstellung aller Beute- bzw. Köder-Konstrukte erfolgte wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben. Das Wachstum der transformierten Hefen wurde unter Histidin- und Adenin-freien Bedingungen geprüft.

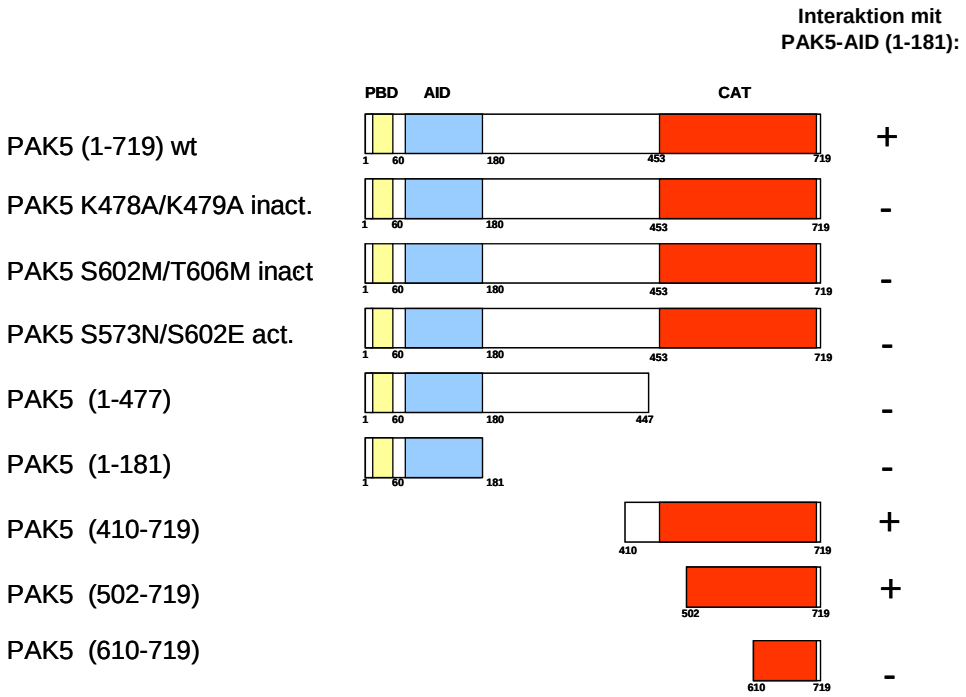


Abbildung 22: Schematische Interaktionsübersicht von PAK5-Konstrukten und PAK5-AID (AS 1-181)
Alle PAK5-Konstrukte, die die katalytische Domäne mit einem nicht mutierten Aktivierungsschleife (AS 586-613) besitzen, interagieren mit PAK5-AID (1-181).

Wie Abbildung 22 zeigt, konnte eine Interaktion von PAK5-AID mit PAK5 wt und zwei C-terminalen PAK5-Deletionsmutanten, die in beiden Fällen die fast vollständige katalytische Domäne besitzen, festgestellt werden. Im Vergleich dazu konnte zwischen PAK5-AID und PAK5-Mutanten, deren katalytische Domäne mutiert oder deletiert worden war, keine Interaktion beobachtet werden.

Da in Ching et al. (2003) die Inhibierung der PAK5-Kinase-Aktivität durch das N-terminale inhibitorische AID-Fragment (N180) beschrieben wird, lassen sich die erzielten Zwei-Hybrid Ergebnisse in den Kontext dieser Veröffentlichung gut eingliedern.

6.5.2 Überprüfung der PAK5-Autoinhibierung im Aktivitätsassay

Zur Identifizierung eines autoinhibitorischen PAK5-Fragments führten Ching et al. (2003) radioaktive Kinaseassays durch, in denen GST-PAK5 mit verschiedenen C-terminalen PAK5-Deletionsmutanten und dem PAK5-Substrat MBP (Myelin Basic Protein) inkubiert wurden. Hierbei konnte ein AID-Fragment (beinhaltet KI-Motiv, AS 120-133) bestimmt werden, welches die PAK5-Autophosphorylierung und die PAK5-Aktivität zu ca. 60 % reduzierte.
Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten die Ergebnisse von Ching et al. (2003) in einem leicht veränderten Experimentansatz verifiziert werden. Anstelle von GST-markiertem PAK5 aus *E.coli* wurden die im Kinaseassay verwendeten PAK5-Konstrukte in Sf9-Zellen exprimiert und über einen His-Tag aufgereinigt. Als Substrat wurde statt MBP das Histon H4 eingesetzt.

Abbildung 23 zeigt das Autoradiogramm der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine des Kinaseassays. Wie zu erwarten, sind die Autophosphorylierungen von PAK5 wt, PAK5 S573N/S602E und der N-terminalen PAK5-Deletionsmutante PAK5-CAT (AS 410-719) im Gegensatz zu der von PAK5-AID deutlich sichtbar. In allen Ansätzen mit Ausnahme des Puffer-Kontrollansatzes (Spur 1) sowie des PAK5-AID Ansatzes (Spur 5) kann eine Histonphosphorylierung wahrgenommen werden. Vergleicht man die Ansätze 2-4 (PAK5 ohne PAK5-AID) mit den Ansätzen 6-8 (PAK5 mit PAK5-AID), ist keine signifikante Veränderung bzw. Inhibierung der HH4-Substratphosphorylierung durch PAK5-AID zu erkennen.
Die in Ching et al. (2003) veröffentlichten Aussagen bezüglich der inhibitorischen Eigenschaften des AID-Fragments konnten daher in einem abgewandelten Experimentansatz nicht bestätigt werden (vgl. 7.3).

Bei weiterer Betrachtung der Abbildung 23 (Spur 7, 8) fällt jedoch ein neuer und unerwarteter Aspekt ins Auge: PAK5-AID wird sowohl durch PAK5 S573N/S602E als auch durch PAK5-CAT (AS 410-719) stark phosphoryliert. Zum besseren Verständnis der PAK5-Regulierung ist daher die Identifizierung der phosphorylierten Aminosäurereste mittels einer Phosphoaminosäureanalyse (z.B. Boyle et al., 1991) von Interesse (s. auch 7.3.).

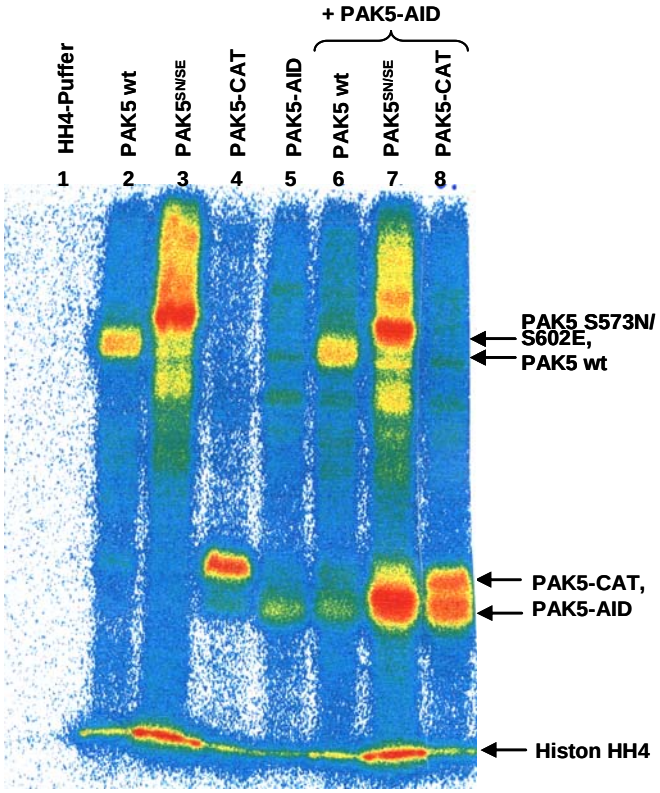


Abbildung 23: Die Kinaseaktivität von PAK5 wird durch PAK5-AID (AS 1-181) nicht inhibiert
Nach Inkubation (4 h) verschiedener PAK5-Konstrukte mit PAK5-AID in Anwesenheit von HH4 und radioaktivem ATP wurden die Proteine im 10 % SDS-Gel aufgetrennt und die zu beobachtenden Phosphorylierungen im Autoradiogramm ausgewertet.
Vergleicht man die Spuren 2-4 (PAK5 ohne PAK5-AID im Ansatz) mit den Spuren 6-8 (PAK5 mit PAK5-AID im Ansatz), stellt man keine signifikante Inhibierung der HH4-Substratphosphorylierung bzw. Veränderung der Autophosphorylierung von PAK5 durch PAK5-AID fest.
PAK5-AID wird sowohl von PAK5-CAT als auch von der aktiven PAK5 S573N/S602E phosphoryliert (vergleiche Spur 5 mit 7 und 8).

6.6 LIMK1: ein potentieller Interaktionspartner von PAK5?

LIM Kinasen (LIMK) bewirken durch die Phosphorylierung eines Serinrests (Ser3) die Inaktivierung des Aktin-depolymerisierenden Faktors Cofilin (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998). Da einerseits die beiden gehirnspezifischen Kinasen LIMK1 und PAK5 einen Einfluss auf das Aktinnetzwerk ausüben, andererseits LIMK1 von PAK4 phosphoryliert und aktiviert wird (Dan et al., 2001) stellte sich die Frage, ob LIMK1 als ein potentieller Interaktionspartner von PAK5 fungieren könnte.

6.6.1 Interaktionsuntersuchungen zwischen PAK5 und LIMK1 im Zwei-Hybrid-System

Zum Nachweis potentieller Wechselwirkungen zwischen PAK5 und LIMK1 im direkten Zwei-Hybrid-Test, wurden LIMK1 in den Beute- und Köder-Vektor des Zwei-Hybrid-Systems subkloniert (s. 4.4.4). Die verwendete GFP-LIMK1 Matrize wurde freundlicherweise von J. Condeelis (Albert-Einstein College of Medicin, Bronx/NY) zur Verfügung gestellt. Anschließend wurden verschiedene PAK5-Konstrukte und LIMK1 in Hefen kotransformiert und unter selektiven Bedingungen angezogen.

Eine spezifische Interaktion konnte nur zwischen LIMK1 und der im MARK2/MARK3-Screen isolierten katalytischen PAK5-Domäne (AS 502-719) nachgewiesen werden (s. Abb. 24). Alle übrigen Proteinkombinationen zeigten keine Wechselwirkungen (s. 7.4).

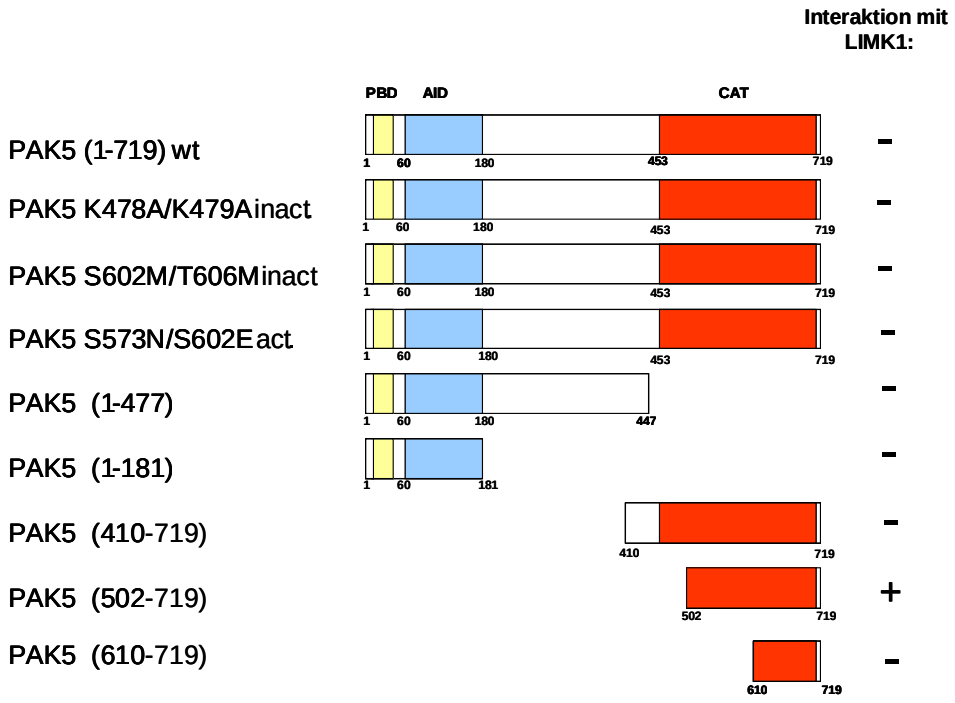


Abbildung 24: Schematische Interaktionsübersicht von PAK5-Konstrukten und LIMK1
Eine Wechselwirkung kann nur zwischen LIMK1 und PAK5 (AS 502-719) beobachtet werden.

6.6.2 *in vivo* Koexpressionsstudien zur Untersuchung der Interaktion von PAK5 und LIMK1

Im Gegensatz zu LIMK1 (Aktin-Stabilisator) macht PAK5 das Aktinnetzwerk dynamisch. Zur Klärung der Frage, ob beide Proteine *in vivo* kolokalisieren und/oder sich gegenseitig in ihren Zytoskelettfunktionen beeinflussen, sollten fluoreszierende PAK5- und LIMK1-Konstrukte in Hamsterovarien-Zellen koexprimiert werden. Nach der Immunodetektion des Zytoskeletts mit einem spezifischen Mikrotubuli (α-YL1/2)- und Aktin-Antikörper (α-β-actin) erfolgte die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie (s. Abb. 25).

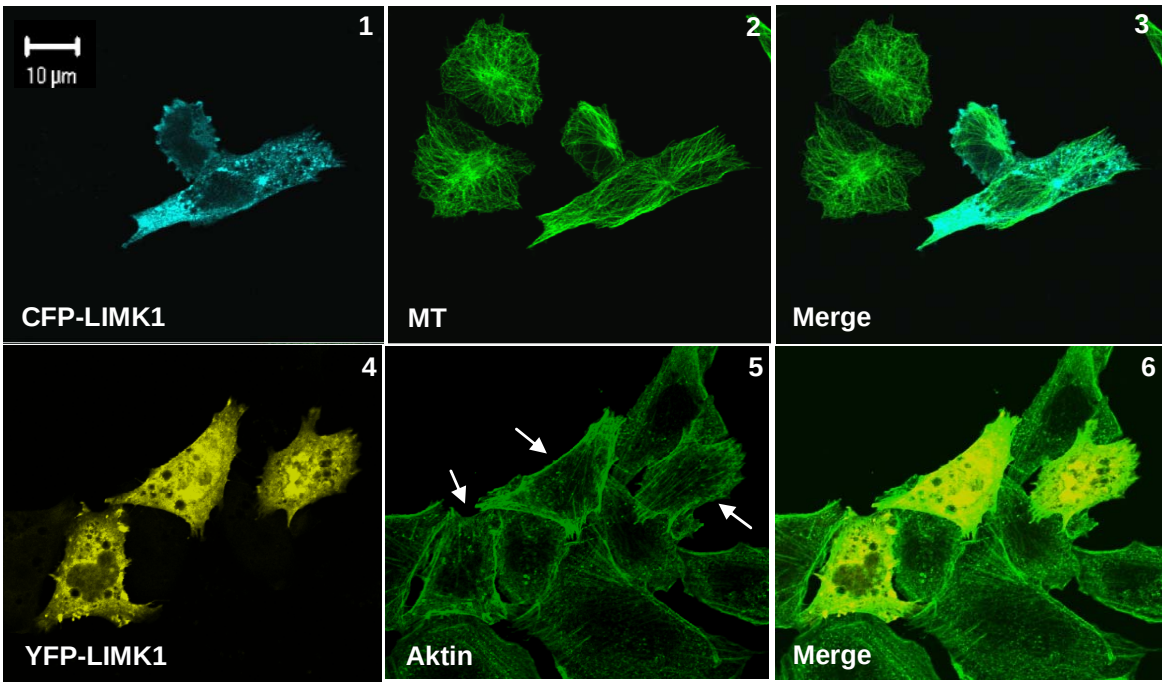


Abbildung 25: Zytoplasmatische Verteilung sowie Effekte von LIMK1 auf das Zytoskelett in CHO-Zellen
CHO-Zellen wurden mit LIMK1 transfiziert und nach 17 h Inkubation fixiert. Für die Mikrotubulifärbung wurde YL1/2 und ein Cy5-konjugierter α-Ratte-Antikörper verwendet. Das Aktinnetzwerk wurde mit Hilfe des β-Aktin-Anikörpers und Cy5-konjugiertem α-Maus-Antikörper sichtbar gemacht.
(1, 4) LIMK1 weist eine zytoplasmatische Verteilung auf. Eine vesikuläre Lokalisation ist nur in sehr geringem Ausmaß in den Randgebieten der Zelle zu erkennen.
(2, 3) LIMK1 übt keinen auffälligen Effekt auf die Mikrotubuli aus.
(5, 6) LIMK1-transfizierte Zellen besitzen ein stabiles Aktinnetzwerk. Besonders in den Randgebieten der Zellen fallen die verstärkten Stressfasern auf (siehe Pfeil).

Wie in Kapitel 6.4.2 beschrieben, weisen PAK5 wt-transfizierte Zellen eine vesikuläre PAK5-Verteilung auf (s. Abb. 17A, 1), wohingegen PAK5 S573N/S602E zytoplasmatisch und weniger vesikulär exprimiert wird (s. Abb. 17A, 2). Die LIMK1-Zellokalisation ähnelt der von PAK5 S573N/S602E. Auch hier ist eine flächige und zytoplasmatische Proteinverteilung zu beobachten, die nur in sehr geringem Ausmaß vesikuläre Formen annimmt.
Bei Betrachtung der Abbildung 17 und 25 werden jedoch die unterschiedlichen Effekte der beiden Proteine auf das Zytoskelett deutlich: PAK5 S573N/S602E-transfizierte Zellen besitzen stabile Mikrotubuli (s. Abb. 17A, 5) und dynamisches Aktin (s. Abb. 17B, 5). Im Vergleich dazu erscheint das Mikrotubulinetzwerk in LIMK1-transfizierten Zellen weitgehend unverändert, während das Aktinnetzwerk auffällig verstärkte Stressfasern aufweist (s. Abb. 25, 2 und 5).

Im Folgenden sollte die Auswirkung der Koexpression beider Proteine auf das Zytoskelett analysiert werden. Wie aus Abbildung 26 ersichtlich, kann eine signifikante Kolokalisation von PAK5 wt und LIMK1 nicht festgestellt werden. Das Mikrotubulinetzwerk dieser Zellen zeigt keine auffälligen Veränderungen. Bei Betrachtung des Aktinnetzwerks wird jedoch deutlich, dass PAK5 den stabilisierenden Einfluss von LIMK1 auf das Aktinnetzwerk nicht unterbinden kann.

Im Falle einer Koexpression von LIMK1 und aktiver PAK5 S573N/S602E kann eine zytoplasmatische Kolokalisation in den CHO-Zellen wahrgenommen werden. Weiterhin kann die Auflösung der verstärkten Stressfasern, die Ausbildung von Filopodien sowie der stabilisierende PAK5-Effekt auf die Mikrotubuli beobachtet werden (s. Abb. 27).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kinase LIMK1 in ihrer Aktin-stabilisierenden Funktion von der aktiven PAK5 S573N/S602E, jedoch nicht von PAK5 wt gehemmt wird. Die stabilen Stressfasern werden durch PAK5 S573N/S602E aufgelöst und das Aktin somit dynamisch (Filopodienbildung) gemacht. Weitere Analysen wie z.B. Koimmunopräzipitations- und Aktivitätsassays sind notwendig, um das Wechselspiel dieser beiden Proteine sowie die Beteiligung anderer Proteine an diesem Prozess genauer zu charakterisieren.

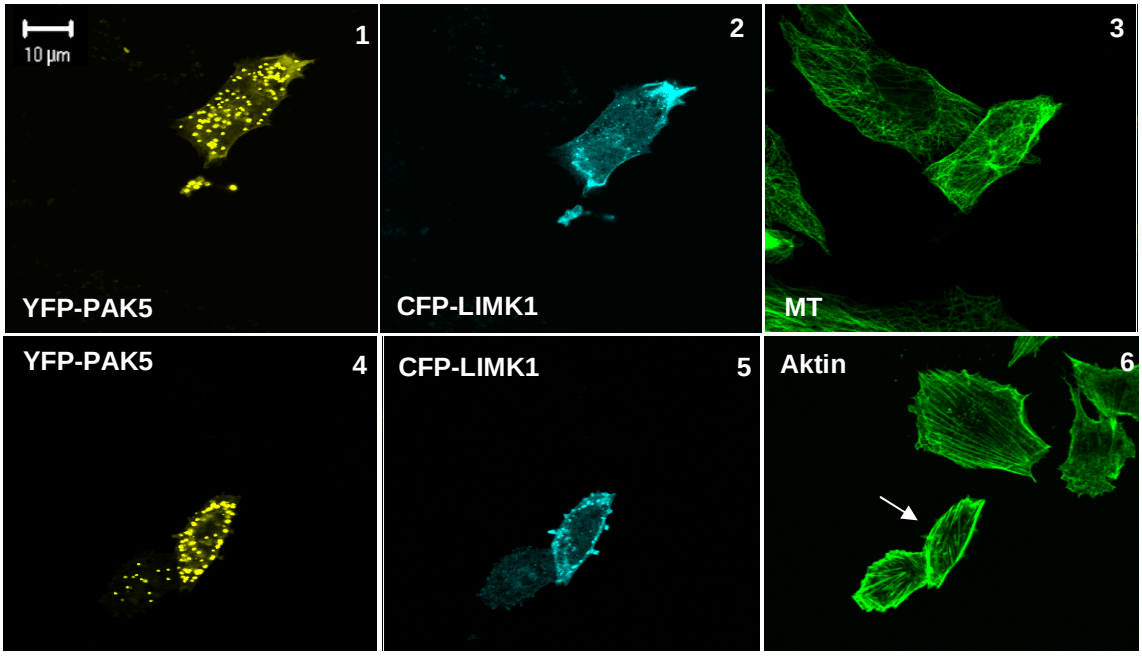


Abbildung 26: Effekte von PAK5 wt und LIMK1 auf das Mikrotubuli- und Aktinnetzwerk
Fixierung und Färbungen wurden wie in Abbildung 25 beschrieben durchgeführt. PAK5 und LIMK1 weisen keine signifikante Kolokalisation auf. Das Mikrotubulinetzwerk zeigt keine Auffälligkeiten, während das Aktinnetzwerk der kotransfizierten Zellen durch die Ausbildung der verstärkten Stressfasern (in der Zellperipherie, Pfeil) sehr stabil erscheint. PAK5 ist daher nicht in der Lage, den Aktin-stabilisierenden Effekt von LIMK1 zu unterbinden.

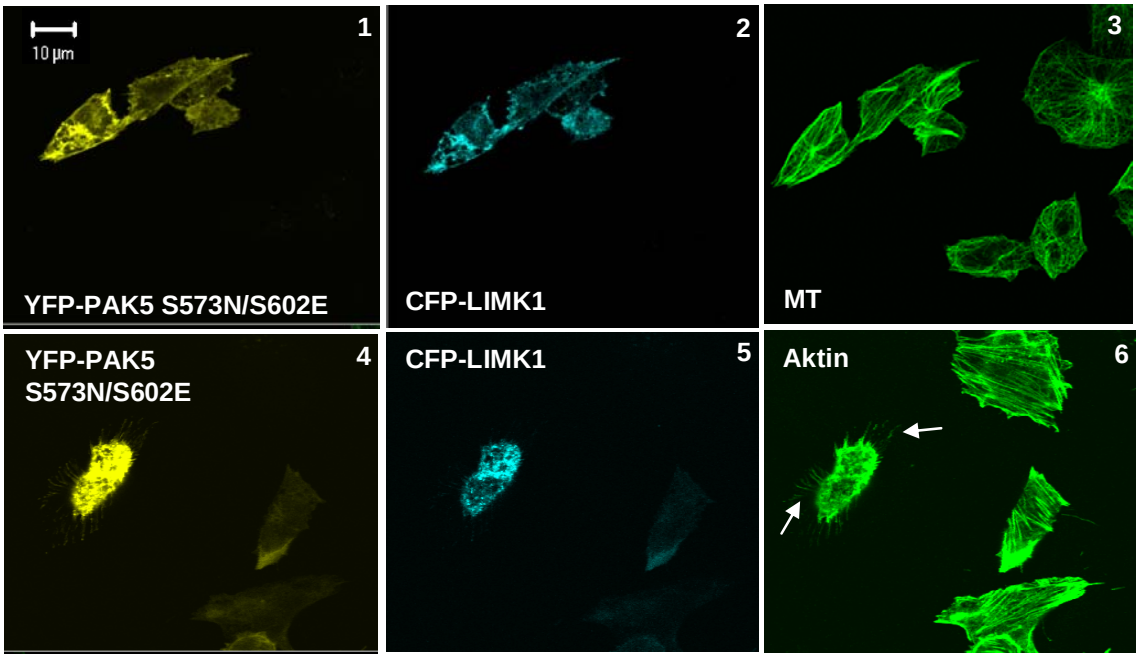


Abbildung 27: Effekte der aktiven PAK5 und LIMK1 auf das Mikrotubuli- und Aktinnetzwerk
In PAK5 S573N/S602E- und LIMK1-kotransfizierten Zellen ist sowohl der für PAK5 typische Mikrotubuli-stabilisierende als auch der Aktin-destabilisierende Effekt deutlich zu erkennen. Anstelle der in Abbildung 25-5 oder Abbildung 26-6 beobachteten Stressfasern besitzen die kotransfizierten Zellen Filopodien (durch Pfeile markiert). Die Aktin-stabilisierende Funktion von LIMK1 wird folglich von der aktiven PAK5 inhibiert.

7. Diskussion

Im Verlauf der Alzheimerschen Krankheit aggregiert das Mikrotubuli-assoziierte Tau Protein zu den neurofibrillären Bündeln. Diese intrazellulären Ablagerungen im Gehirn kennzeichnen neben den extrazellulären Amyloidplaques die Alzheimer Demenz (Delacourte und Buee, 2000).

Die stabilisierende Bindung des Tau Proteins an die Mikrotubuli wird durch Phosphorylierungen reguliert. Dabei spielt die Phosphorylierung der KXGS-Motive (besonders Serin 262) innerhalb der MT-bindenden Domäne durch die Kinase MARK (MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase) eine besondere Rolle. Im Falle einer Phosphorylierung des Tau Proteins durch MARK löst sich Tau von den MT ab und stabilisiert diese nicht mehr.

Die Aktivierung von MARK erfolgt durch die Ste-20 Kinase MARKK (MARK-aktivierende Kinase) (Timm et al., 2003). Da es sich bei MARK um eine Multi-Domänen Kinase handelt, sind Wechselwirkungen mit anderen regulierenden Proteinen möglich. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, neue Regulierungspartner der Kinase MARK zu identifizieren. Die Kinase PAK5 wurde im Laufe dieser Arbeit als neuer Interaktionspartner gefunden und näher charakterisiert.

7.1 Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner von MARK

Für die Identifizierung neuer Interaktionspartner von MARK wurde in Zwei-Hybrid-Experimenten eine humane fötale cDNA-Gehirnbank untersucht. Neben unbekannten Proteinen wurde das Brückenprotein 14-3-3 und die Serin/Threonin Kinase PAK5 isoliert (vgl. Tabelle 1; 6.1.2.2).

PAK5 ist ein Mitglied der p21-aktivierten Kinase-Familie, die bei der Regulation des Aktinnetzwerks eine Rolle spielt (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Bokoch, 2003). Da MARK die Mikrotubuli-Dynamik beeinflusst, konnte die Interaktion zweier Kinasen nachgewiesen werden, die komplementäre Effekte auf das Zytoskelett ausüben.

Das Adapterprotein 14-3-3 interagiert mit Kinasen, Phosphatasen und anderen Signalmolekülen (Fu et al., 2000) und ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt (Signaltransduktion, neuronale Entwicklungsprozesse, Apoptose (Zha et al., 1996; Zhang et al.,

1997; Chang et al., 1997)). Benton et al. (2002) identifizierte die MARK-homologe Kinase PAR-1 aus *D. melanogaster* als neuen Bindungspartner von 14-3-3. Als Kofaktor von PAR-1 ist 14-3-3 für die Ausbildung der Zellachse unabdingbar.

Für die Charakterisierung der Interaktionsdomänen von MARK und PAK5 wurden verschiedene Deletionsmutanten hergestellt. Die Ergebnisse der Zwei-Hybrid-Assays zeigen, dass MARK und PAK5 über die Kinasedomänen wechselwirken (N-terminale Kinasedomäne bei MARK, C-terminale Kinasedomänen bei PAK5). Die detaillierte Analyse ergab, dass die katalytischen Domänen vorzugsweise aneinander binden, wenn die nicht katalytischen Bereiche deletiert sind. Es ist daher anzunehmen, dass eine sterische Hemmung oder die Konformation des gesamten Kinasemoleküls die Interaktion der beiden Kinasen abschwächt (s. Abb. 10; 6.2.1).
Im Vergleich dazu konnte in Koimmunopräzipitationsexperimenten in Sf9-Zellen die Interaktion der beiden vollständigen Kinasen MARK und PAK5 nachgewiesen werden (s. Abb. 11; 6.2.2.1). Auffällig war die stärkere Wechselwirkung zwischen PAK5 und der inaktiven Mutante MARK2 T208A/S212A. Dies lässt sich durch eine Beteiligung der Aktivierungsschleifen-Konformation an der Bindung erklären. Wie in Timm et al. (2003) gezeigt, bewirkt die Eliminierung der Phosphorylierungsstellen eine stabilere Wechselwirkung zwischen MARK2 und seinen Interaktionspartnern.

In Zwei-Hybrid-Versuchen mit 14-3-3 und MARK wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. 14-3-3 bindet an den N-Terminus von MARK. Da jedoch eine Bindung zwischen 14-3-3 und der rein katalytischen Domäne von MARK nicht belegt werden konnte (s. Abb. 10; 6.2.1), scheint es, dass 14-3-3 N-terminal von PAK5 an MARK bindet.
Mit einem spezifischen Antikörper gegen 14-3-3 konnte die Interaktion zwischen endogenem 14-3-3 beta/theta und MARK in Sf9-Zellen nachgewiesen werden. In der Literatur wird für 14-3-3 eine Brückenfunktion postuliert. Aitken (1996) beschreibt z.B. eine mögliche Rolle von 14-3-3 in der Koordination verschiedener Signalwege durch die Bindung an mehrere Proteine. Es wäre daher denkbar, dass 14-3-3 mit den beiden Kinasen MARK und PAK5 interagiert und sie auf diese Weise in räumliche Nähe bringt.

7.2 Die Rolle von MARK und PAK5 in der Regulation des Zytoskeletts

Im Falle des $MARK_{kat}$-$PAK5_{kat}$ Komplexes ist es überraschend, dass die Interaktion für die Kinaseaktivität der beiden Proteine verschiedene Konsequenzen mit sich bringt: MARK wird durch PAK5 inhibiert, umgekehrt wird jedoch die Aktivität von PAK5 nicht beeinflusst. Interessanterweise erfolgt die Inhibierung von MARK2 durch PAK5 wt, der aktiven sowie der inaktiven PAK5-Mutante. Im Gegensatz dazu bewirkt die C-terminale Deletionsmutante PAK5-AID (AS 1-181), die im Zwei-Hybrid-Test mit MARK nicht interagiert, eine vernachlässigbare Reduzierung der MARK-Kinaseaktivität. Es scheint daher plausibel, dass die Inhibierung von MARK über die Bindung an PAK5 und nicht durch Trans- oder Autophosphorylierung verursacht wird (s. Abb. 14; 6.3.2).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Bindungs- und Aktivitätsassays kolokalisieren überexprimierte MARK und PAK5 in CHO-Zellen. Die Lokalisation der beiden Kinasen ist vesikelförmig und wurde für MARK schon in früheren Veröffentlichungen erwähnt (Drewes et al., 1997).

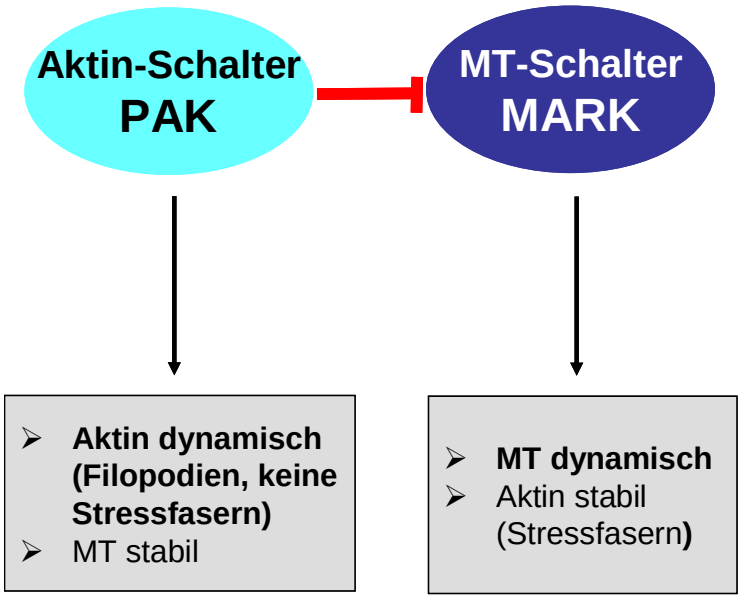
Nach einer Einzeltransfektion von MARK2 und PAK5 in CHO-Zellen können die Effekte auf das Zytoskelett wie folgt beschrieben werden: MARK2 destabilisiert die MT, während das Aktinnetzwerk stabil erscheint (verstärkte Stressfasern in Abb. 18B, 2 gut sichtbar). Die Degeneration der Zellen erfolgt nach einer längeren Inkubationszeit der transfizierten Zellen oder nach Expression einer höheren Proteinkonzentration von MARK2 (Drewes et al., 1997).
Im Gegensatz dazu löst PAK5 die Aktin-Stressfasern auf und bewirkt die Bildung von Filopodien, während die MT stabile Bündel formen. Die MT- und Aktineffekte sind von der Aktivität der Kinasen abhängig und können daher nach einer Transfektion der inaktiven Kinase nicht beobachtet werden (s. Abb. 18C; 6.4.3).

Im Falle einer Koexpression von MARK und PAK5 in CHO-Zellen ist MARK nicht mehr in der Lage, die MT zu destabilisieren, während PAK5 nach wie vor Aktin-Stressfasern auflöst und Filopodien bildet. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der *in vitro* Aktivitätsassays kann der MT-stabilisierende bzw. MARK-inhibierende Effekt auch bei der inaktiven Mutante

PAK5 S602M/S606M beobachtet werden. Dies illustriert, dass auch auf zellulärer Ebene MARK2 durch die Bindung von PAK5 und nicht durch Phosphorylierung inhibiert wird (s. Abb. 19; 6.4.3).

Die aufgeführten Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass das Wechselspiel zwischen Aktin-Stressfasern und Mikrotubuli durch die „Schalter“ MARK und PAK5 kontrolliert werden kann. Dabei kann der Aktin-Schalter PAK5 den MT-Schalter MARK inhibieren, dies funktioniert jedoch nicht umgekehrt.

Unter Berücksichtigung des MARK/MT-Signalweges ist dieses Ergebnis aufgrund der Regulierungsasymetrie bemerkenswert: MARK wird durch die Kinase MARKK aktiviert, deren Überexpression in CHO-Zellen die MT destabilisiert (Timm et al., 2003). Im Gegenzug wird MARK durch eine Kinase der PAK-Familie inhibiert, die in konkurrierenden Signalwegen der Aktinregulation involviert ist. Eine Übersicht dieses MARK/PAK-Wechselspiels ist in Abbildung 28 dargestellt (vgl. Abb. 20; 6.4.3).



Abbidung 28: Schematische Darstellung der „Schalter“-Effekte von PAK5 und MARK2
Durch die beiden „Schalter“ MARK2 und PAK5 wird das Zytoskelett kontrolliert. MARK fungiert als MT-Schalter, indem es die MT dynamisch macht. PAK5 agiert als Aktin-Schalter, indem es Stressfasern auflöst und Filopodien bildet. Der rote Pfeil kennzeichnet die Inhibierung des MT-Regulators MARK durch den Aktinregulator PAK.

Vom strukturellen Standpunkt gesehen stellt sich nun die Frage, wie PAK5 als Inhibitor von MARK fungiert. Da es sich bei bekannten Kinase-Regulatoren wie z.B. Cyclinen oder p35 gewöhnlich nicht um Kinasen handelt (Huse und Kuriyan, 2002), sind die Ergebnisse dieser Arbeit eher unerwartet. Einige Kinasen besitzen inhibitorische Sequenzen, die sich nach einer Phosphorylierung zum Pseudosubstrat umwandeln und die eigene Aktivierungsschleife blockieren. Beispielsweise besitzt GSK3 nach der Phosphorylierung des Serin 9 durch die Protein Kinase B (PKB) eine inhibierte Konformation (Dajani et. al., 2001).
Andere Kinasen wie PAK1 liegen als Dimer vor und inhibieren mit einer autoinhibitorischen Sequenz die aktive Seite des Partnermoleküls (Parrini et al., 2002).
Eine weitere Inhibierungsmethode ist für PAR-1b (homolog zu MARK2) beschrieben worden. Die Phosphorylierung des Serins 595 durch aPKCζ schafft eine 14-3-3-Bindestelle, wodurch PAR-1b inhibiert wird (Hurov et al., 2004).
Im Gegensatz zu den beschriebenen Kontrollsequenzen, die alle außerhalb der katalytischen Domäne liegen, bindet und inhibiert die Kinasedomäne von PAK5 die katalytische Domäne von MARK. Dieser Vorgang erinnert eher an die Proteinregulierung durch Trans- und Autophosphorylierung, bei der die Aktivierungsschleife der einen Kinase vorübergehend in die katalytische Tasche der anderen Kinase hineinragt und phosphoryliert wird. Für die vollständige Aufklärung des MARK/PAK-Wechselspiels müssen weitere experimentelle Arbeiten durchgeführt werden. Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass die Inhibierung von MARK2 durch Proteinbindung und nicht durch Phosphorylierung erfolgt.

In der Literatur existieren einige Beispiele, in denen Verbindungen zwischen Mitgliedern der MARK- und PAK-Familie beschrieben werden:
Für die Zellmigration ist die Polarisierung und die Dynamik des Aktin- und Mikrotubulinetzwerks notwenig. Das Aktinnetzwerk ist für initiale Prozesse an der Bewegungsfront („leading edge“) wie die Ausbildung und Verlängerung von Filopodien verantwortlich (Wittmann und Waterman-Storer, 2001; Pollard und Borisy, 2003; Wittmann et al., 2003). Eine zentrale Schlüsselrolle kommt hierbei der GTPase Cdc42 zu. Zum einen bewirkt Cdc42 durch Bindung an PAK1 und PAK4 die Filopodienbildung, zum anderen fördert Cdc42 die Rekrutierung der Proteine der PAR-Familie an die Zellmembran, wo sie die Polarität der Zelle beeinflussen (Etienne-Manneville und Hall, 2003; Macara, 2004). Hierbei spielt PAR-1 alias MARK eine

Rolle, da es die Beförderung von PAR-3, PAR-6 und der atypischen PKC reguliert. Auch die Beteiligung von Par-5/14-3-3, einem weiteren Zwei-Hybrid-Partner der MARK (s. 6.1.2), wurde in diesem Zusammenhang beschrieben.
Ein weiteres Beispiel stellt PAK1 dar, das durch die Phosphorylierung des Proteins Stathmin/Op18 einen direkten Einfluss auf die Dynamik der MT ausübt (Daub et al., 2001; Wittmann et al., 2004). Stathmin ist nach der Phosphorylierung des Serins 16 nicht mehr in der Lage, seine MT-destabilisierende Funktion auszuüben. PAK1 agiert in diesem Fall als Antagonist zu MARK, das die MT dynamisch macht.

Kinasen sind häufig in verschiedene Signalwege involviert. Es ist erwähnenswert, dass die Kinasen, deren Interaktion und Zytoskelett-Effekte in dieser Arbeit untersucht worden sind, an der zellulären Stress-Bewältigung („stress response“) beteiligt sind. Die MT-destabiliserende Kinase MARKK (MARK-akivierende Kinase) ist durch die Phosphorylierung von MEK3 und MEK6 in der p38-Stress-Kaskade involviert. PAK5 spielt neben der Aktinregulation eine Rolle im JNK-Stress-Signalweg (Dan et al., 2002; Pandey et al., 2002). Hinzu kommt, dass die Aktivierung von MARK sowie die Phosphorylierung des Substrats Tau nach Stresseinwirkung auf die Zelle erhöht sind (Schneider et al., 2004). Dies wiederum könnte die Tau-Hyperphosphorylierung in den frühen Stadien der Alzheimerschen Krankheit erklären. Angesichts dieser Tatsachen wäre es von Interesse, eine Beteiligung der MARK/PAK5-Wechselwirkung an der neuronalen Degeneration in den Blickpunkt weiterer Untersuchungen zu stellen.

7.3 Untersuchung der Autoregulation von PAK5

P21-aktivierte Kinasen (PAKs) sind Mitglieder der Rac/Cdc42-asoziierten Ser/Thr-Kinasen Familie, von denen einige als GTPase-Effektoren eine wichtige Funktion bei der Regulation des Aktinnetzwerks ausüben (Bokoch, 2003; Cotteret et al., 2003).
Aufgrund ihrer Sequenzhomologie lassen sie sich in zwei Gruppen unterteilen, die auf unterschiedliche Weise reguliert werden:

Die Gruppe I (PAK1-3) wird durch die Bindung von Cdc42/Rac an die PBD (p21-Bindedomäne) aktiviert. Im Falle des PAK1-Dimers dissoziieren die beiden PAK1-Moleküle auseinander, das Kinase-Inhibitor-Motiv (KI-Motiv) der autoinhibitorischen Domäne (AID) kann die Aktivierungsschleife der Kinase nicht weiter blockieren und ermöglicht die anschließende Aktivierung der Kinase (Lei et al., 2000; Parrini et al., 2002).
Die Gruppe II (PAK4-6) weist keinen einheitlichen Regulierungsmechanismus auf. Die Bindung von Cdc42 an die konstitutiv aktive PAK4 bewirkt die Bildung von Filopodien, jedoch keine Steigerung der Kinaseaktivität (Abo et al., 1998). PAK6 interagiert mit Cdc42, wird aber durch die Stress-Kinasen MKK6 und p38 aktiviert (Kaur et al., 2005).
Die Regulierung der gehirnspezifischen PAK5 wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Im Vergleich zu Pandey et al. (2002) und Cotteret et al. (2003), die eine PAK5-Aktivierung durch Cdc42 nicht nachweisen konnten, wird in Ching et al. (2003) eine Aktivierung durch Cdc42 und das Vorhandensein einer autoinhibitorischen Domäne (AID) mit dem KI-Motiv beschrieben. Der AS-Sequenzvergleich zwischen dem KI-Motiv von PAK1 (AS 137-149) und dem von PAK5 (AS 120-133) ergab eine Identität von 14 % sowie eine Ähnlichkeit von 71 %.
Aufgrund der gegensätzlichen Aussagen wurde die Rolle des AID-Fragments in Zwei-Hybrid- und Aktivitätsassays geprüft.

Um Aufschluß über die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen von PAK5 zu erhalten, wurden in Zwei-Hybrid-Versuchen die Bindungseigenschaften verschiedener PAK5-Mutanten mit PAK5-AID (AS 1-181) getestet.
Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, inhibiert im PAK1-Dimer die autoinhibitorische Domäne die Kinasedomäne (Lei et al., 2000; Parrini et al., 2002, Lei et al., 2005). Da Ching et al. (2003) einen vergleichbaren Autoinhibierungsmechanismus für PAK5 beschreiben, wurde vermutet, dass in den Zwei-Hybrid-Versuchen eine Wechselwirkung zwischen PAK5-AID und der PAK5-Kinasedomäne stattfinden könnte.
Erwartungsgemäß zeigte sich, dass alle PAK5-Mutanten, die im Besitz der katalytischen Domäne einschließlich der Aktivierungsschleife sind, mit PAK5-AID interagieren. Eine Deletion oder Mutation in der PAK5-Aktivierungsschleife blockiert die Wechselwirkungen mit PAK5-AID. Im Kontext der postulierten PAK1- und PAK5-Autoinhibierung (Lei et al., 2000; Parrini et al., 2002; Ching et al., 2003) lässt sich diese Beobachtung durch die

Konformationsänderung der Aktivierungsschleife erklären, die daraufhin nicht mehr von der autoinbitorischen Domäne abgeschirmt werden kann.

Zur weiteren Verifizierung der PAK5-Autoinhibierungsthese wurden radioaktive Aktivitätsassays durchgeführt. Anhand der Substratphosphorylierung (Histon H4) wurden Veränderungen der PAK5-Aktivität in An- oder Abwesenheit von PAK5-AID gemessen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ching et al. (2003) konnte keine signifikante Hemmung der PAK5-Aktivtät durch die autoinhibitorische Domäne festgestellt werden. Dies könnte durch den abgewandelten Experimentansatz zu erklären sein. Für die *in vitro* Versuche wurde neben veränderten Pufferbedingungen sowohl ein anderes Substrat (HH4 statt MBP) als auch rekombinantes Protein aus Sf9-Zellen und nicht aus *E.coli* eingesetzt. Theoretisch gesehen sollten diese Veränderungen jedoch nicht zu der völligen Aufhebung der Inhibierung führen. Eine definitive Aussage über die Regulation von PAK5 kann daher mit den erhaltenen Daten nicht getroffen werden. Hierzu sind weitere experimentelle Arbeiten nötig.

Interessanterweise ließ sich darüber hinaus die Phosphorylierung der autoinhibitorischen Domäne (AID) durch die aktive PAK5 S573N/S602E und die PAK5-Kinasedomäne im Aktivitätsassay feststellen. Auch hier kann man ein Vergleich zur PAK1-Regulation ziehen. Im aktiven Zustand verhindert PAK1 durch die Autophosphorylierung bestimmter Aminosäurereste des N-terminalen Bereichs (S144, S149) die Rückbildung der inhibitorischen Konformation (Lei et al., 2005). Auf die gleiche Weise könnte durch die Phosphorylierung der PAK5-AID eine mögliche Autoinhibition von PAK5 blockiert werden.
Mit Hilfe einer Phosphoaminosäureanalyse könnten die spezifischen Aminosäurereste identifiziert werden und die Aufklärung der PAK5-Regulation weiter vorangetrieben werden.

7.4 LIMK1: ein möglicher Interaktionspartner von PAK5?

LIMK1 ist eine zytoplasmatische Proteinkinase, die überwiegend im Gehirn exprimiert wird (Frangiskakis, 1996). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Regulierung der Aktindynamik. Nach Überexpression der LIMK1 bilden Zellen die sogenannten „Aktincluster“, die durch die Akkumulation von filamentösem Aktin entstehen (Dan et al., 2001). Desweiteren konnte eine Beteiligung der LIMK1 an der Regulierung der Wachstumskegelbewegung in kultivierten Neuronen festgestellt werden (Endo et al., 2003).
Die Aktivierung der LIMK1 erfolgt durch die Phosphorylierung von PAK4 und in einem schwächeren Ausmaß auch von PAK1 (Dan et al., 2001; Edwards et al., 1999). In beiden Fällen wird LIMK1 an spezifischen Stellen phosphoryliert und kann daraufhin den Aktin-destabilisierenden Faktor Cofilin inhibieren (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gehirnspezifische Kinase PAK5 im Vergleich zu LIMK1 eine antagonistische Rolle bei der Regulation der Aktindynamik spielt: Die Expression der aktiven PAK5 löst stabile Stressfasern auf und bewirkt die Bildung von Filopodien. In der Literatur sind bisher noch keine Zusammenhänge zwischen den beiden gehirnexprimierten und Aktin-regulierenden Kinasen beschrieben worden.
Aufgrund der PAK5-Sequenzhomologie zu PAK4 (Dan et al., 2002) und der Beeinflussung der Aktindynamik durch PAK5 wurden in Zwei-Hybrid- und Zellkulturexperimenten die mögliche Interaktion sowie die funktionelle Beziehung zwischen PAK5 und LIMK1 überprüft.

Wie zuvor im Zwei-Hybrid-Test mit MARK und PAK5 beobachtet, konnte nur eine Wechselwirkung zwischen LIMK1 und der im MARK2-Screen isolierten katalytischen PAK5-Domäne (AS 502-719) nachgewiesen werden. Weder vollständiges PAK5 noch N- bzw. C-terminale PAK5-Deletionsmutanten interagierten mit LIMK1 im Zwei-Hybrid-Test. Auch in diesem Fall kann davon ausgegangen werden, dass die Konformation des gesamten Kinasemoleküls zu einer Abschwächung der Interaktion führt.

Für Kolokalisations- und Zytoskelettstudien wurde LIMK1 einzeln und gemeinsam mit verschiedenen PAK5-Konstrukten in CHO-Zellen exprimiert.
Die Proteinverteilung von LIMK1 ist zytoplasmatisch und nur in geringem Ausmaß vesikulär. Eine partielle Kolokalisation konnte daher mit der flächig lokalisierten PAK5 S573N/602E, jedoch nicht mit der stark vesikulär exprimierten PAK5 wt nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung des Zytoskeletts kam der antagonistische LIMK1-Effekt deutlich zum Vorschein: Im Unterschied zu PAK5 besitzen LIMK1-transfizierte CHO-Zellen ein stabiles Aktinnetzwerk mit auffällig verstärkten Stressfasern und ein weitgehend unverändertes MT-Netzwerk. Widersprüchlich zu der Veröffentlichung von Dan et al. (2001) konnten jedoch keine „Aktincluster“ beobachtet werden. Dies läßt sich zum einen durch die Muskelzellinie C2C12 erklären, die anstelle der Hamsterovarien-Zellinie (CHO) verwendet wurde. Zum anderen könnten die verschiedenen Transfektionsmethoden und eingesetzten DNA-Konzentrationen ursächlich sein. So wurden in dieser Arbeit Zellen mit je 0,2 µg DNA mittels „Effectene-Kit“ (s. 5.2.3.1) transfiziert. Im Gegensatz dazu verwendeten Dan et al. (2001) die Calcium-Phosphat-Transfektionsmethode (s. 5.2.2.1), bei der je Ansatz 16 µg DNA eingesetzt wurden.

Um eine funktionelle Beziehung zwischen LIMK1 und PAK5 charakterisieren zu können, wurden Koexpressionsstudien in CHO-Zellen durchgeführt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aktin-destabilisierende PAK5 den Aktin-stabilisierenden Effekt von LIMK1 (Dan et al., 2001) aufhebt, jedoch umgekehrt der MT-stabilisierende PAK5-Effekt durch LIMK1 nicht inhibiert wird. Folglich bilden LIMK1/PAK5-doppeltransfizierte Zellen dynamische Filopodien anstelle von stabilen Stressfasern und besitzen darüber hinaus ein stabiles MT-Netzwerk. Übereinstimmend mit den Kolokalisationsexperimenten wurden die beschriebenen Effekte nur in Doppeltransfektionsansätzen mit LIMK1 und aktiver PAK5 S573N/S602E, jedoch nicht mit PAK5 wt beobachtet.

Wie in der Einleitung erwähnt (s. 3.2.2), besitzen PAK5 und PAK4 in der Kinasedomäne eine Sequenzhomologie von 84 % bzw. 80 % in der PBD (p21-Bindedomäne). Aufgrund dieser großen AS-Übereinstimmung könnte man eher redundante als konträre Funktionseigenschaften

für PAK4 und PAK5 erwarten. Dies scheint jedoch weder auf MT- noch auf Aktinebene der Fall zu sein: aktive PAK5 stabilisiert die Mikrotubuli (s. 6.4.3), wohingegen *Xenopus* PAK5 (homolog zu humaner PAK4, s. Anhang A.1.2) diese Funktion nur in seiner inaktiven Form ausüben kann (Cau et al., 2001). Desweiteren beschreiben Dan et al. (2001) die Aktivierung des Aktinstabilisators LIMK1 durch PAK4. Die Überexpressionsstudien dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass PAK4 und PAK5 auf gegensätzliche Weise das Aktinnetzwerk durch die Regulation von LIMK1 beeinflussen.

Eine endgültige Bestätigung dieser These steht noch aus. Es müssen weitere Experimente wie z.B. Koimmunopräzipitations- und Aktivitätsassays durchgeführt werden, um eine potentielle biologische Relevanz der PAK5/LIMK1-Wechselwirkung verifizieren zu können. Darüber hinaus muss die Beteiligung „dritter“ Proteine an dieser Interaktion berücksichtigt werden. Erst kürzlich wurde durch Soosairajah et al. (2005) das Zusammenspiel zwischen PAK4, LIMK1, dem Aktin-destabilisierenden Faktor Cofilin, der Phosphatase Slingshot sowie 14-3-3 beschrieben. Hierbei aktiviert PAK4 die LIMK1 und inhibiert Slingshot. Slingshot wiederum agiert unter Mithilfe von 14-3-3 als Inhibitor von LIMK1 und als Aktivator von Cofilin. Nur unter Berücksichtigung aller Partner eines Signalkomplexes können die vollständigen Funktionen der am Komplex beteiligten Proteine sowie die ineinander greifenden Regulierungsmechanismen verstanden werden.

8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AID	Autoinhibitorische Domäne
AK	Antikörper
Amp.	Ampicilin
Amp^R	Ampicilin Resistenz
aPKC	atypische Proteinkinase C
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Arp2/3	„Actin-related protein 2/3”
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BAD	“Bcl-2/Bcl-XL-Antagonist, causing cell Death”
BCA	Bicinchonine acid solution
BSA	Rinderserumalbumin (B*ovin Serum Albumin*)
ca.	circa
CapZ	„Capping protein Z“
CDK2/5	Cyclin-abhängige Kinase 2/5
cDNA	copy-Desoxyribonucleinsäure
CFP	Cyan Fluorescent Protein
cfu	colony forming units
Chaps	Cholamidopropyldimethylaminopropansulfonat
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
Conc.	Konzentration
CRIB	cdc/Rac-Interaktions-Binde Motiv
DB	DNA-Bindedomäne
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethyl-Formamide
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithio-DL-threitol
ECL	Enhanced Chemoluminiscence
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum (F*etal Calf Serum*)
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	GTP/GDP-bindendes Protein
GSK3β	Glykogen Synthase Kinase 3, β-Form
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)

HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N´-2- ethansulfonsäure
HH4	Histon H4
His	Histidin
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
JNK	cJun N-terminale Kinase
Kan	Kanamycin
Kan^R	Kanamycin Resistenz
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KI	Kinaseinhibitor
Ki	Kinaseinhibitorkonstante
Kin 1/2	Kinase Gen Produkt 1/2
LacZ	β-Galactosidase
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
LIM	Lin-11, Isl-1, Me-3
LIMK1	LIM Motiv-beinhaltende Proteinkinase
MPG-ASMB	Max Planck Gesellschaft - Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie
MAP(s)	Mikrotubuli-assoziiertes Protein(e)
MARK	MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase
MARKK	MAP/ Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase Kinase
MBP	„Myelin Basic Protein“
min.	Minute(n)
MKK 3/6	MAP Kinase Kinase 3/6
MT	Mikrotubuli
NCBI	Nationales Center für biotechnologische Information
NFT	Neurofibrilläre Bündel (*neurofibrillary tangels*)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase
Par-1	Partitioning defective-1
PBD	p21-Bindedomäne
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	*para*-Formaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzetration
PHF	paarige helikale Filamente (*Paired Helical Filaments*)
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumdodecylsulfat
S, Ser	Serin
Ste20	Steril 20
T, Thr	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer

TBS	Tris gepufferte Salzlösung (*Tris Buffer Saline*)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylen-diamin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheiten, "units"
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
v/v bzw. w/v	Volumen pro Volumen bzw. Gewicht pro Volumen
V	Volt
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
Y, Tyr	Tyrosin
YFP	Yellow Fluorescent Protein

9. Literatur

Abo A, Qu J, Cammarano MS, Dan C, Fritsch A, Baud V, Belisle B, Minden A (1998). PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. EMBO J. **17**(22): 6527-40.

Aitken A (1996). 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. Trends Cell Biol. **6**(9): 341-7.

Aitken A, Collinge DB, van Heusden BP, Isobe T, Roseboom PH, Rosenfeld G, Soll J (1992). 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. Trends Biochem Sci. **17**(12): 498-501. Review.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (2001). Das Cytoskelett. In: Lehrbuch der molekularen Zellbiologie 2. Auflage, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany. 734-812.

Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. Nature **393**(6687): 805-9.

Arrini MC, Lei M, Harrison SC, Mayer BJ (2002). PAK1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. Mol Cell **9:** 73-83.

Bagrodia S, Cerione RA (1999). Pak to the future. Trends Cell Biol. **9**(9):350-5. Review.

Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E (1993). Abnormal phosphorylation of tau protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. FEBS Letters 336, 417-424.

Biernat J und Mandelkow EM (1999). The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. Mol Biol Cell **10**(3):727-40.

Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhofer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM (2002). Protein kinase MARK/par-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. Mol Biol Cell **13:** 4013-4028.

Boyle WJ, van der Geer P, Hunter T (1991). Phosphopeptide mapping and phoshoamino-acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer celulose plates. Methods Enzymol. **201**:110-149.

Bryan B, Kumar V, Stafford LJ, Cai Y, Wu G, Liu M (2004). GEFT, a Rho family guanine nucleotide exchange factor, regulates neurite outgrowth and dendritic spine formation. J Biol Chem. **279**(44):45824-32.

Buchwald G, Hostinova E, Rudolph MG, Kraemer A, Sickmann A, Meyer HE, Scheffzek K, Wittinghofer A (2001). Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation. Mol Cell Biol. **21**: 5179-5189.

Cau J, Faure S, Comps M, Delsert C, Morin N (2001). A novel p21-activated kinase binds the actin and microtubule networks and induces microtubule stabilization. J Cell Biol. **155**(6):1029-42.

Chang HC, Rubin GM (1997). 14-3-3 epsilon positively regulates Ras-mediated signaling in Drosophila. Genes Dev. **11**(9): 1132-9.

Chen H, Bernstein BW, Bamburg JR (2000). Regulating actin-filamnet dynamics in vivo. Trens Biochem Sci. **25**: 19-23.

Ching YP, Leong VY, Wong CM, Kung HF (2003). Identification of an autoinhibitory domain of p21-activated protein kinase 5. J Biol Chem. **278**(36): 33621-4.

Chong C, Tan L, Lim L, Manser E (2001). The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. J Biol Chem. **276:** 17347-17353.

Cooper JA und Schafer DA (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. Curr. Opin. Cell Biol. **12**: 97-103.

Correas I, Diaz-Nido J, Avila J (1992). Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. J Biol Chem. **267**(22): 15721-8.

Cotteret S, Jaffer ZM, Beeser A, Chernoff J (2003). p21-Activated kinase 5 (Pak5) localizes to mitochondria and inhibits apoptosis by phosphorylating BAD. Mol Cell Biol. **23**: 5526-5539.

Cunningham CC, Leclerc N, Flanagan LA, Lu M, Janmey PA, Kosik KS (1997). Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line. J Cell Biol. **136**(4): 845-57.

Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. Cell **105**(6): 721-32.

Dan C, Kelly A, Bernard O, Minden A (2001). Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. J Biol Chem. **276**(34): 32115-21.

Dan C, Nath N, Liberto M, Minden A (2002). PAK5, a new brain-specific kinase, promotes neurite outgrowth in N1E-115 cells. Mol Cell Biol. **22**(2): 567-77.

Daniels RH, Bokoch GM (1999). p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? Trends Biochem Sci. **24**(9):350-5. Review.

Delacourte A und Buee L (2000). Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. Curr. Opin. Neurolog. **13**: 371-376.

Drewes G, Ebneth A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. Cell **89**(2): 297-308.

Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. EMBO J. **11**(6):2131-8.

Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995). Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. J Biol Chem. **270**(13):7679-88.

Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B,Mandelkow EM, Mandelkow E (1998). Overexpression of tau protein alters kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: Implications for Alzheimer's disease. J. Cell Biol. **143:** 777-794.

Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. Nat Cell Biol. **1**(5): 253-9.

Endo M, Ohashi K, Sasaki Y, Goshima Y, Niwa R, Uemura T, Mizuno K (2003). Control of growth cone motility and morphology by LIM-Kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of Cofilin. J Neurosci. **23**: 2527-2537.

Etienne-Manneville S und Hall A (2002). Rho GTPases in cell biology. Nature **420**: 629-635.

Frangiskakis JM (1996). LIM-Kinase 1 hemizygosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. Cell **86**: 59-69.

Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol. **40**: 617-47. Review.

Guo S, Kemphues KJ (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell **81**(4): 611-20.

Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994). Domains of tau protein and interaction with microtubules. Biochemistry **33**: 9511-9522.

Hanks SK und Hunter T (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J. **9**(8): 576-96. Review.

Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1992). Protein sequence and mass spectrometic analysis of Tau in the Alzheimer`s disease brain. J Biol Chem. **267**: 17047-17054.

Himmler A (1989). Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. Mol Cell Biol. **9**(4): 1389-96.

Hofman K, Bucher P (1996). The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. Trends Biochem Sci. **21**(5): 172-3.

Hurov JB, Stappenbeck TS, Zmasek CM, White LS, Ranganath SH, Russell JH, Chan AC, Murphy KM, Piwnica-Worms H (2001). Immune system dysfunction and autoimmune disease in mice lacking Emk (Par-1) protein kinase. Mol Cell Biol. **21**(9): 3206-19.

Hurov JB, Watkins JL, Piwnica-Worms H (2004). Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. Curr Biol. **14**(8): 736-41.

Huse M und Kuriyan J (2002). The conformational plasticity of protein kinases. Cell **109**(3): 275-82. Review.

Illenberger S, Zheng-Fischhofer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Godemann R, Mandelkow EM, Mandelkow E (1998). The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. Mol Biol Cell. **9**(6):1495-512.

Jaffer ZM, Chernoff J (2002). p21-activated kinases: three more join the Pak. Int J Biochem Cell Biol. **34:** 713-717.

Kaur R, Liu X, Gjoerup O, Zhang A, Yuan X, Balk SP, Schneider MC, Lu ML (2005). Activation of p21-activated kinase 6 by MAP kinase kinase 6 and p38 MAP kinase. J Biol Chem. **280**(5): 3323-30.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**(5259): 680-5.

Lei M, Lu W, Meng W, Parrini MC, Eck MJ, Mayer BJ, Harrison SC (2000). Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. Cell **102**: 387-397.

Lei M, Robinson MA, Harrison SC (2005). The Active Conformation of the PAK1 Kinase Domain. Structure(Camb). **13**(5):769-78.

Levin DE, Bishop JM (1990). A putative protein kinase gene (kin1+) is important for growth polarity in Schizosaccharomyces pombe. Proc Natl Acad Sci U S A. **87**(21):8272-6.

Levin DE, Hammond CI, Ralston RO, Bishop JM (1987). Two yeast genes that encode unusual protein kinases. Proc Natl Acad Sci U S A. **84**(17): 6035-9.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J (1996). Mikrofilamente: Zellbewegung und Zellgestalt. In: Molekulare Zellbiologie. Hrsg. d. Übersetzung: de Gruyter, W., 2. Auflage, Berlin, New York. 1019-1076.

Lum H, Malik AB (1994). Regulation of vascular endothelial barrier function. Am J Physiol. **267**: 223-241.

Macara IG (2004). Par proteins: Partners in polarization. Curr Biol. **14:** 160-162.

Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E (1992). Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. FEBS Lett. **314**(3): 315-21.

Mandelkow E und Mandelkow EM (1995). Microtubules and Microtubule-associated Proteins. Curr Opin Cell Biol. **7**: 72-81.

Mandelkow EM, Mandelkow E, Milligan RA (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. J Cell Biol. **114**(5):977-91.

Matus A (1988). Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. Annu Rev Neurosci. **11**: 29-44. Review.

Melzig J, Rein KH, Schafer U, Pfister H, Jackle H, Heisenberg M, Raabe T (1998). A protein related to p21-activated kinase (PAK) that is involved in neurogenesis in the Drosophila adult central nervous system. Curr Biol. **8**(22): 1223-6.

Mitchison T, Kirschner M (1984). Dynamic instability of microtubule growth. Nature **312**: 237-242.

Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995). Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. J Biol Chem. 270(2): 823-9.

Mühle HW (2004). Das Zytoskelett der Endothelzelle: Bedeutung des Mikrotubulus- und Mikrofilamentsystems für die Regulation der Endothelpermeabilität. Dissertationsschrift.

Muller J, Ory S, Copeland T, Piwnica-Worms H, Morrison DK (2001). C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. Mol Cell. **8**(5): 983-93.

Mullins RD, Heusser JA, Pollard TD (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high-affinity pointed end capping, and formation of of branching networks of filaments. Proc Natl Acad Sci. USA **95**: 6181-6186.

Oakley BR und Akkari YN (1999). γ-Tubulin at Ten: Progress and Prospects.

Oakley CE, Oakley BR (1989). Identification of γ-tubuline, a new member of the tubuline superfamily encoded by mipA gene of Aspergillus nidulans. Nature **338**: 662-664.

Okano I, Hiraoka J, Otera H, Nunoue K, Ohashi K, Iwashita S, Hirai M, Mizuno K (1995). Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs. J Biol Chem. **270**(52): 31321-30.

Palazzo AF und Gundersen GG (2002). Microtubule-Actin Cross-Talk at Focal Adhesions. Science`s STKE (139): 31.

Pandey A, Dan I, Kristiansen TZ, Watanabe NM, Voldby J, Kajikawa E, Khosravi-Far R, Blagoev B, Mann M. (2002). Cloning and characterization of PAK5, a novel member of mammalian p21-activated kinase-II subfamily that is predominantly expressed in brain. Oncogene **21**(24):3939-48.

Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH (1993). Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. J Biol Chem. **268**(31): 23512-8.

Pellettieri J, Seydoux G (2002). Anterior-posterior polarity in C. elegans and Drosophila--PARallels and differences. Science **298**: 1946-1950.

Pierre M, Nunez J (1983). Multisite phosphorylation of tau proteins from rat brain. Biochem Biophys Res Commun. **115**(1): 212-9.

Pollard TD und Borisy GG (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell **112**: 453-465.

Pollard TD und Cooper JA (1984). Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation.Biochemistry **23**: 6631-6641.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez-Garcia I und Rabbitts TH (1994). The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. Trends Genet. **10:** 315–321.

Schneider A, Laage R, von Ahsen O, Fischer A, Rossner M, Scheek S, Grunewald S, Kuner R, Weber D, Kruger C, Klaussner B, Gotz B, Hiemisch H, Newrzella D, Martin-Villalba A, Bach A, Schwaninger M (2004). Identification of regulated genes during permanent focal cerebral ischaemia: characterization of the protein kinase 9b5/MARKL1/MARK4. J Neurochem. **88**: 1114-1126.

Shulman JM, Benton R, St Johnston D (2000). The Drosophila homolog of C. elegans PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. Cell **101**(4): 377-88.

Singh LP, Denslow ND, Wahba AJ (1995). Modulation of rabbit reticulocyte guanine nucleotide exchange factor activity by casein kinases 1 and 2 and glycogen synthase kinase 3. Biochemistry **35**(10): 3206-12.

Small JV, Stradal T, Vignal E, Rotter K (2002). The lamellipodium: where motility begins. Trends in Cell Biology **12(**3).

Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, Sarmiere P, Moussi N, Sarcevic B, Sampath R, Bamburg JR, Bernard O (2005). Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. EMBO J. **24**(3): 473-86.

Stanyon CA, Bernard O (1999). LIM-kinase1. Int J Biochem Cell Biol. **31**(3-4): 389-94.

Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Soling HD, Drechsel D, Kirschner MW, et al. (1990). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca2(+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. EMBO J. **9** (11): 3539-44.

Straub FB (1942). Actin. Stud. Szeged. **2**: 3-15.

Stryer L (1996). Biochemie, 4. Auflage; Spektrum, Akad. Verlag. 411-435.

Timm T, Li XY, Biernat J, Jiao J, Mandelkow E, Vandekerckhove J, Mandelkow EM (2003). MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/ PAR-1. EMBO J. **22**(19): 5090-101.

Tomancak P, Piano F, Riechmann V, Gunsalus KC, Kemphues KJ, Ephrussi A (2000). A Drosophila melanogaster homologue of Caenorhabditis elegans par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. Nat Cell Biol. **2**(7): 458-60.

Volkmann N, Amann KJ, Stoilova-McPhie S, Egile C, Winter DC, Hazelwood L, Heusser JE, Li R, Pollard TD (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. Science **293**: 2456-2459.

Wadman I, Li J, Bash RO, Forster A, Osada H, Rabbitts TH, Baer R (1994). Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. EMBO J. **13:** 4831–4839.

Wegner A (1982). Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. J Mol Biol. **161**(4): 607-15.

Wittmann T, Bokoch GM, Waterman-Storer CM (2003). Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. J Biol Chem. **161**(5): 845-851.

Wittmann T, Bokoch GM, Waterman-Storer CM (2004). Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1. J Biol Chem. **279**(7): 6196-6203.

Wittmann T, Waterman-Storer CM (2001). Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? J Cell Sci. **114**: 3795-3803.

Wong AJ, Pollard TD (1983). Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. Science **219**: 867-869.

Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. Nature **393**(6687): 809-12.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). Cell **87**(4): 619-28.

Zhang SH, Kobayashi R, Graves PR, Piwnica-Worms H, Tonks NK (1997). Serine phosphorylation-dependent association of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1 with 14-3-3beta protein. J Biol Chem. **272**(42): 27281-7.

Anhang

A.1 PAK-Proteinsequenzvergleich

A.1.1 Proteinsequenzvergleich von PAK1-3 (Gruppe I)

```
PAK1      MSNNGLDIQDKPPAPPMRNTSTMIGAGSKDAGTLNHGSKPLPPNPEEKKKKDRFYRSILP
PAK3      MS-DGLDNEEKPPAPPLR-----MNSNNRDSSALNHSSKPLPMAPEEKNKKAR-LRSIFP
PAK2      MS-DNGELEDKPPAPPVRMSSTIFSTGGKDPLSANHSLKPLPSVPEEKKPRHK-IISIFS
          ** :. : ::******:*     :.:..:*. : **. ****  ****: : :   **:.

                    70   75    81    87 90                      113
                     |    |     |     |  |                        |
PAK1      G--DKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFDAVTGEFTGMPEQWARLLQTSNITKSEQK
PAK3      GGGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFDAVTGEFTGIPEQWARLLQTSNITKLEQK
PAK2      G-TEKGSKKKEKERPEISPPSDFEHTIHVGFDAVTGEFTGMPEQWARLLQTSNITKLEQK
          *  :* .*********** *********************:*************** ***

                           137            150
                             |              |
PAK1      KNPQAVLDVLEFYNSKKTSNSQKYMSFT--DKSAEDYNSSNALNVKAVSETPAVPPVSED
PAK3      KNPQAVLDVLKFYDSKETVNNQKYMSFTSGDKSAHGYIAAHPSSTKTASEPPLAPPVSEE
PAK2      KNPQAVLDVLKFYDSN--TVKQKYLSFT--PPEKDGFPSGTPALNAKGTEAPAV--VTEE
          **********:**:*:    .***:***    . ..: :. .      :*.* .  *:*:

                                     249
                                       |
PAK1      EDDDD----DDATPPPVIAPRPEHTKSVYTRSVIEPLPVTPTRDVATSPISPTENNTTPP
PAK3      EDEEEEEEEDENEPPPVIAPRPEHTKSIYTRSVVESIASPAVPNKEVTPPSAENANSS--
PAK2      EDDDE-----ETAPP-VIAPRPDHTKSIYTRSVID-----PVP----APVGDSHVDGA--
          **:::     :  ** ******:****:*****::     ..     :* .  . : :


PAK1      DALTRNTEKQKKKPKMSDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQGASGTVYTAMDVAT
PAK3      -TLYRNTDRQRKKSKMTDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQGASGTVYTALDIAT
PAK2      ---AKSLDKQKKKTKMTDEEIMEKLRTIVSIGDPKKKYTRYEKIGQGASGTVFTATDVAL
              :. ::*:**.**:****:****:***:*********:***********:** *:*


PAK1      GQEVAIKQMNLQQQPKKELIINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGDELWVVMEYLAGGSL
PAK3      GQEVAIKQMNLQQQPKKELIINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGDELWVVMEYLAGGSL
PAK2      GQEVAIKQINLQKQPKKELIINEILVMKELKNPNIVNFLDSYLVGDELFVVMEYLAGGSL
          ********:***:**************:* *******:**********:***********


PAK1      TDVVTETCMDEGQIAAVCRECLQALEFLHSNQVIHRDIKSDNILLGMDGSVKLTDFGFCA
PAK3      TDVVTETCMDEGQIAAVCRECLQALDFLHSNQVIHRDIKSDNILLGMDGSVKLTDFGFCA
PAK2      TDVVTETCMDEAQIAAVCRECLQALEFLHANQVIHRDIKSDNVLLGMEGSVKLTDFGFCA
          ***********.*************:***:************:****:************
```

```
                  423  428
                    |    |
PAK1      QITPEQSKRSTMVGTPYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEMIEGEPPYLNENPLRA
PAK3      QITPEQSKRSTMVGTPYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEMVEGEPPYLNENPLRA
PAK2      QITPEQSKRSTMVGTPYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEMVEGEPPYLNENPLRA
          ********************************************:**************

PAK1      LYLIATNGTPELQNPEKLSAIFRDFLNRCLEMDVEKRGSAKELLQHQFLKIAKPLSSLTP
PAK3      LYLIATNGTPELQNPERLSAVFRDFLNRCLEMDVDRRGSAKELLQHPFLKLAKPLSSLTP
PAK2      LYLIATNGTPELQNPEKLSPIFRDFLNRCLEMDVEKRGSAKELLQHPFLKLAKPLSSLTP
          ****************:**.:*************::********** ***:*********

                     545
                       |
PAK1      LIAAAKEATKNNH-
PAK3      LIIAAKEAIKNSSR
PAK2      LIMAAKEAMKSNR-
          ** ***** *..
```

Abbildung 29: Proteinsequenzvergleich von humaner PAK1-3
Identische (rot, *) und konservierte (stark: grün, : / schwach: blau, .) Aminosäuren sind durch Farbe und Zeichen unterhalb der Sequenz gekennzeichnet.
Domänenbereiche und spezifische AS der PAK1-Sequenz sind durch Zahlen und Farbbalken markiert: das autoregulatorische Fragment (AS 70-150) besteht aus der PBD-Domäne (blau, AS70-113) mit CRIB-Motiv (hellgrau, AS 75-90), dem inhibitorischen Fragment (AS 87-136) mit Dimerisierungssegmet (AS 81-87) und dem KI-Motiv (grün, AS 137-150). Die katalytische Domäne (gelb) erstreckt sich über den AS-Bereich 249-545. Innerhalb dieser Region liegt die Aktivierungsschleife (dunkelgrau, AS 407-434) mit der Autophosphorylierungsseite T423 und dem MKK6-Motiv TPY (pink, 327-429).
Für den Vergleich wurden folgende NCBI-Genbanknummern verwendet: PAK1: NM_002576, PAK2: NM_002577, PAK3: NM_002578.

A.1.2 Proteinsequenzvergleich von PAK4-6 (Gruppe II)

```
                    10                                  43
                     |                                   |
XPAK5     MFAKKKK-RVEISAPSNFEHRVHTGFDQQEQKFTGLPRQWQSLIEESAKRPKPLVDPSYI
PAK4      MFGKRKK-RVEISAPSNFEHRVHTGFDQHEQKFTGLPRQWQSLIEESARRPKPLVDPACI
PAK5      MFGKKKK-KIEISGPSNFEHRVHTGFDPQEQKFTGLPQQWHSLLADTANRPKPMVDPSCI
PAK6      MFRKKKKKRPEISAPQNFQHRVHTSFDPKEGKFVGLPPQWQN-ILDTLRRPKPVVDPSRI
          ** *:** : ***.*.**:*****.** :* **.*** **:. : :: .****:***: *

          60
           |
XPAK5     TTIKHVPQKTIVRGNKMSLDGSLAWLLDEFDDMSVCRSNSLRRESPPC---QPREGRFHQ
PAK4      TSIQPGAPKTIVRGSKGAKDGALTLLLDEFENMSVTRSNSLRRDSP------PPPARARQ
PAK5      TPIQLAPMKTIVRGNKPCKETSINGLLEDFDNISVTRSNSLRKESPP----TPDQGASSH
PAK6      TRVQLQPMKTVVRGSAMPVDGYISGLLNDIQKLSVISSNTLRGRSPTSRRRAQSLGLLGD
          * ::  . **:***.    :  :  **:::::.:**  **:**  **         .   .
```

```
             120          133
               |            |
XPAK5      ENGMSEVR-------------------------------------VRQQREDGQRGSE
PAK4       ENGMPE-------------------------------------------------------
PAK5       GPGHAEENGFITFSQYSSESDTTADYTTEKYREKSLYGDDLDPYYRGSHAAKQNGHVMKM
PAK6       EHWATDPDMYLQ---------------------------------SPQSERTDPHGLYL
               .:

              181
               |
XPAK5      RNRSEHHRRERQREEHRAVPQQPRGQEPSNKHRPPPPDYPKDIPEKRGPRS---------
PAK4       -------------------------EPATTARGGP--------GKAGSR----------
PAK5       KHGEAYYSEVKPLKSDFARFSADYHSHLDSLSKPSEYSDLKWEYQRASSSSPLDYSFQFT
PAK6       SCNGGTPAGHKQMPWPEPQSPRVLPNGLAAKAQSLGPAEFQGASQRCLQLG------ACL
                                                 :            :


XPAK5      HEKSDGRREYPGNDRGHSDPVERVVKRDKGEEKRPKSAYT--------SGEGSPQSPRD-
PAK4       -GRFAGHSEAGG---GSGD------RRRAGPEKRPKSSRE--------GSGGPQESSRD-
PAK5       PSRTAGTSGCSKESLAYSESEWG--PSLDDYDRRPKSSYL--------NQTSPQPTMR--
PAK6       QSSPPGASPPTGTNRHGMK-A----AKHGSEEARPQSCLVGSATGRPGGEGSPSPKTRES
                *            .          . : **:*.          .  ..  . *


XPAK5      --KRPLSGPNIRTPGSSSTDGVVKQTET--GRPFNTYPRAETD-PNRGAAHQVSD---SR
PAK4       --KRPLSGPDVGTPQPAGLASGAKLAA---GRPFNTYPRADTDHPSRGAQGEPHD---VA
PAK5       --QRSRSGSGLQEPMMPFGASAFKTHPQ--GHSYNSYTYPRLSEPTMCIPKVDYDRAQMV
PAK6       SLKRRLFRSMFLSTAATAPPSSSKPGPPPQSKPNSSFRPPQKDNPPSLVAKAQSLP----
             :*    . .  .  .   .  *      .:. .::  .  . *


XPAK5      STVPLDSKSSVSKGSSRPQQGQVKPKPPE-------KPHPTQLAPHSSDPQLSRPVQT--
PAK4       PNGPSAGGLAIPQSSSSSSRPPTRARG---------APSPGVLGPHASEPQLAPPACTP-
PAK5       LSPPLSGSDTYPRGPAKLPQSQSKSGYSSSSHQYPSGYHKATLYHHPSLQSSSQYISTAS
PAK6       SDQPVGTFSPLTTSDTSSPQKSLRTAPAT-------GQLPGRSSPAGSPRTWHAQISTSN
              *     . . . :   :   :.                      *         *

                                                                454
                                                                  |
XPAK5      ------------QHPAQPRSPQREPQRVSHEQFRAALQMVVDPGDPRTYLDNFIKIGEGS
PAK4       -------AAPAVPGPPGPRSPQREPQRVSHEQFRAALQLVVDPGDPRSYLDNFIKIGEGS
PAK5       YLSSLSLSSSTYPPPSWGSSSDQQPSRVSHEQFRAALQLVVSPGDPREYLANFIKIGEGS
PAK6       ------LYLPQDPTVAKGALAGEDTGVVTHEQFKAALRMVVDQGDPRLLLDSYVKIGEGS
                          .    . .:.  *:****:***::**. ****  * .::******


XPAK5      TGIVCIATIKSSGKLVAVKKMDLRKQQRRELLFNEVVIMRDYQHENVVEMYNSYLVGDEL
PAK4       TGIVCIATVRSSGKLVAVKKMDLRKQQRRELLFNEVVIMRDYQHENVVEMYNSYLVGDEL
PAK5       TGIVCIATEKHTGKQVAVKKMDLRKQQRRELLFNEVVIMRDYHHDNVVDMYSSYLVGDEL
PAK6       TGIVCLAREKHSGRQVAVKMMDLRKQQRRELLFNEVVIMRDYQHFNVVEMYKSYLVGEEL
           *****:*  : :*: **** **********************:* ***:**.*****:**
```

```
XPAK5     WVIMEFLEGGALTDIVTHTRMNEEQIATVCVSVLKALSVLHAQGVIHRDIKSDSILLTHD
PAK4      WVVMEFLEGGALTDIVTHTRMNEEQIAAVCLAVLQALSVLHAQGVIHRDIKSDSILLTHD
PAK5      WVVMEFLEGGALTDIVTHTRMNEEQIATVCLSVLRALSYLHNQGVIHRDIKSDSILLTSD
PAK6      WVLMEFLQGGALTDIVSQVRLNEEQIATVCEAVLQALAYLHAQGVIHRDIKSDSILLTLD
          **:****:********:::.*:******:** :**:**: ** **************** *

                                602   608
                                  |     |
XPAK5     GRVKLSDFGFCAQVNKEVPRRKSLVGTPYWMAPELISRLPYGPEVDVWSLGIMVIEMVDG
PAK4      GRVKLSDFGFCAQVSKEVPRRKSLVGTPYWMAPELISRLPYGPEVDIWSLGIMVIEMVDG
PAK5      GRIKLSDFGFCAQVSKEVPKRKSLVGTPYWMAPEVISRLPYGTEVDIWSLGIMVIEMIDG
PAK6      GRVKLSDFGFCAQISKDVPKRKSLVGTPYWMAPEVISRSLYATEVDIWSLGIMVIEMVDG
          **:**********:.*:**:**************:***  *.:***:**********:**

XPAK5     EPPYFNEPPLKAMKMIRDNLPPKLKNAQKVSPLLKGFLDRLLVRDPSQRASANELLKHPF
PAK4      EPPYFNEPPLKAMKMIRDNLPPRLKNLHKVSPSLKGFLDRLLVRDPAQRATAAELLKHPF
PAK5      EPPYFNEPPLQAMRRIRDSLPPRVKDLHKVSSVLRGFLDLMLVREPSQRATAQELLGHPF
PAK6      EPPYFSDSPVQAMKRLRDSPPPKLKNSHKVSPVLRDFLERMLVRDPQERATAQELLDHPF
          *****.:.*::**: :**. **::*: :***. *:.**: :***:* :**:* *** ***

XPAK5     LGKAGPPSCIVPLMRQNRMR----
PAK4      LAKAGPPASIVPLMRQNRTR----
PAK5      LKLAGPPSCIVPLMRQYRHH----
PAK6      LLQTGLPECLVPLIQLYRKQTSTC
          *  :* * .:***::  * :
```

Abbildung 30: Proteinsequenzvergleich von humaner PAK4-6 sowie *Xenopus* PAK5
Identische (rot, *) und konservierte (stark: grün, : / schwach: blau, .) Aminosäuren sind durch Farbe und Zeichen unterhalb der Sequenz gekennzeichnet.
Domänenbereiche und spezifische AS der PAK5-Sequenz sind durch Zahlen und Farbbalken markiert: PBD (blau, AS 10-43), autoinhibitorisches Fragment (grau, AS 60-181) mit KI-Motiv (grün, AS 120-133), katalytische Domäne (gelb, 454-700) mit der Aktivierungsschleife (dunkelgrau, AS 586-611), der Autophosphorylierungsseite S602 (pink) und dem MKK6-Motiv TPY (pink, AS 606-608).
Für den Vergleich wurden folgende NCBI-Genbanknummern verwendet: *Xenopus* PAK5: AJ277826, PAK4: NM_005884, PAK5: AB040812, PAK6: NM_020168.

A.1.3 Proteinsequenzvergleich zwischen PAK1 (Gruppe I) und PAK5 (GruppeII)

```
                   10        20        30        40        50        60
                    |         |         |         |         |         |
PAK1      -------------------MSNNGLDIQDK-----------------PPAPPMRNTSTMI
PAK5      MFGKKKKKIEISGPSNFEHRVHTGFDPQEQKFTGLPQQWHSLLADTANRPKPMVDPSCIT
                                :.*:* *::                  . ** :.* :

                   70        80        90       100       110       120
                    |         |         |         |         |         |
PAK1      GAGSKDAGTLNHGSKP---------------------------LPPNPEEKKKKD-----
PAK5      PIQLAPMKTIVRGNKPCKETSINGLLEDFDNISVTRSNSLRKESPPTPDQGASSHGPGHA
                   *: :*.**                            **.*::  ...
```

```
                 130       140       150       160       170       180
                   |         |         |         |         |         |
PAK1       ------RFYRSILPGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVG-----------------
PAK5       EENGFITFSQYSSESDTTADYTTEKYREKSLYGDDLDPYYRGSHAAKQNGHVMKMKHGEA
                 * :    .*.* . . ::  * ** .*  .. : *

                 190       200       210       220       230       240
                   |         |         |         |         |         |
PAK1       -----------FDAVTGEFTGMPEQWARLLQTSNITKSEQKKNPQAVLDVLEFYNSKKTS
PAK5       YYSEVKPLKSDFARFSADYHSHLDSLSKPSEYSDLKWEYQRASSSSPLDYSFQFTPSRTA
                      *  .:.:: .  :. ::  : *::. . *: ...: **    :...:*:

                 250       260       270       280       290       300
                   |         |         |         |         |         |
PAK1       ----NSQKYMSFTDK----SAEDYNS-SNALNVKAVSETPAVPPVSEDEDDDDDDATPPP
PAK5       GTSGCSKESLAYSESEWGPSLDDYDRRPKSSYLNQTSPQPTMRQRSRSGSGLQEPMMPFG
                *:: ::::::.    * :**:  .::  :: .*  *::   *.. .. ::   *

                 310       320       330       340       350       360
                   |         |         |         |         |         |
PAK1       VIAPRPE---HTKSVYTRS-------VIEPLPVTPTRDVATSPISPTENNTTPPDALTRN
PAK5       ASAFKTHPQGHSYNSYTYPRLSEPTMCIPKVDYDRAQMVLSPPLSGSDTYPRGPAKLPQS
           . * :..   *: . ** .        *  :    :: * :.*:* ::. .  *  *.:.

                 370       380       390       400       410       420
                   |         |         |         |         |         |
PAK1       TEK-------------------------------------------------------
PAK5       QSKSGYSSSSHQYPSGYHKATLYHHPSLQSSSQYISTASYLSSLSLSSSTYPPPSWGSSS
            .*

                 430       440       450       460       470       480
                   |         |         |         |         |         |
PAK1       QKKKPKMSDEEILEKLRSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQGASGTVYTAMDVATGQEVAIKQM
PAK5       DQQPSRVSHEQFRAALQLVVSPGDPREYLANFIKIGEGSTGIVCIATEKHTGKQVAVKKM
           ::: .::*.*::   *: :** ***::  :.* ***:*::* *  * :  **::**:*:*

                 490       500       510       520       530       540
                   |         |         |         |         |         |
PAK1       NLQQQPKKELIINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGDELWVVMEYLAGGSLTDVVTETCM
PAK5       DLRKQQRRELLFNEVVIMRDYHHDNVVDMYSSYLVGDELWVVMEFLEGGALTDIVTHTRM
           :*::* ::**::**:::**: :: *:*:  .*************:* **:***:**.* *

                 550       560       570       580       590       600
                   |         |         |         |         |         |
PAK1       DEGQIAAVCRECLQALEFLHSNQVIHRDIKSDNILLGMDGSVKLTDFGFCAQITPEQSKR
PAK5       NEEQIATVCLSVLRALSYLHNQGVIHRDIKSDSILLTSDGRIKLSDFGFCAQVSKEVPKR
           :* ***:** . *:**.:**.: *********.***  ** :**:*******:: * .**

                 610       620       630       640       650       660
                   |         |         |         |         |         |
PAK1       STMVGTPYWMAPEVVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEMIEGEPPYLNENPLRALYLIATNGT
PAK5       KSLVGTPYWMAPEVISRLPYGTEVDIWSLGIMVIEMIDGEPPYFNEPPLQAMRRIRDSLP
           .::***********::* .**.:*********.****:*****:** **:*:  *  . .
```

```
                    670       680       690       700       710       720
                      |         |         |         |         |         |
PAK1        PELQNPEKLSAIFRDFLNRCLEMDVEKRGSAKELLQHQFLKIAKPLSSLTPLIAAAKEAT
PAK5        PRVKDLHKVSSVLRGFLDLMLVREPSQRATAQELLGHPFLKLAGPPSCIVPLMRQYRHH-
            *.::: .*:*:::*.**:  *  : .:*.:*:*** * ***:* * *.:.**:   :.


PAK1        KNNH
PAK5        ----
```

Abbildung 31: Proteinsequenzvergleich zwischen humaner PAK1 (GruppeI) und PAK5 (GruppeII)
Identische (rot, *) und konservierte (stark: grün, : / schwach: blau, .) Aminosäuren sind durch Farbe und Zeichen unterhalb der Sequenz gekennzeichnet.
Farbbalken markieren die p21-Bindedomäne (PBD, blau), das KI-Motiv (grün) und die katalytische Domäne (gelb) mit der Aktivierungsschleife (dunkelgrau). Die Autophosphorylierungsstellen (PAK1: T423, PAK5: S602) sowie das konservierte MKK6-Substratmotiv (TxY) sind pink gekennzeichnet.
Für den Vergleich wurden folgende NCBI-Genbanknummern verwendet: PAK1: NM_002576, PAK5: AB040812.

A.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

	Bettina Grießhaber (geb. 1974)
	deutsch
	ledig

Schulausbildung:

1981-1985	Friedrich-Ebert-Grundschule, Heidelberg
1985-1994	humanist. Kurfürst-Friedrich-Gymnasium, Heidelberg
	Abschluß: Abitur

Auslandsaufenthalt:

1995	6 Monate USA (San Francisco)

Hochschulausbildung und Dissertation:

1995-2000	Biologie-Studium an der Universität Hamburg
	Studienfächer im Hauptstudium: Molekularbiologie/Genetik, Biochemie und Mikrobiologie
2000	Diplomarbeit an der Universität Hamburg, zum Thema: „Expression des Gens für die Cytochromoxidase Untereinheit 2 der Sojabohne in der Hefe“
	Betreuerin: Frau Prof. Dr. Elke Pratje
2001-2005	Promotionsstudium an der Max-Planck-Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie in Hamburg
	Betreuer: Prof. Dr. Eckhard Mandelkow
	Thema: PAK5, ein Inhibitor der Kinase MARK2, reguliert die Stabilität des Mikrotubuli- und Aktinnetzwerks

A.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Eva-Maria Mandelkow und Herrn Prof. Dr. Eckhard Mandelkow für die Vergabe der interessanten Themenstellung, die hilfreichen Anregungen und Diskussionen sowie die hervorragende Betreuung.

Bei Frau Prof. Dr. Elke Pratje bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Dorthe Matenia, die mich in die Thematik einführte und ein ständiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit zeigte. Darüber hinaus danke ich ihr für ihre fachliche Kompetenz, ihre Kooperation und große Hilfsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei Cindy Johne, Anja Thiesen, Dr. Thomas Timm und Dr. Jacek Biernat für ihre wichtigen Ratschläge und die gute Zusammenarbeit.

Ferner danke ich allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen für ihre Hilfsbereitschaft, das ausgezeichnete Arbeitsklima und darüber hinaus die netten Stunden in privater Runde.

Mein herzlicher Dank gilt meinem guten Freund Marco Littek für seine unermüdliche Unterstützung jeglicher Art.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da waren.