

**Studien zur Regulation der Proteinkinase  
MARK aus *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades im Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Jian Jiao  
aus Liaoning, China

Hamburg  
2006

# Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG-----	1
<b>1 EINLEITUNG-----</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Die Serin/Threonin-Kinasen der MARK/PAR-1-Familie -----</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Regulation der MARK/PAR-1 -----</b>	<b>7</b>
1.2.1 Aktivierung der MARK -----	8
1.2.2 Inhibierung der MARK-----	10
<b>1.3 14-3-3 Proteine-----</b>	<b>13</b>
1.3.1 14-3-3 Struktur -----	16
1.3.2 Funktionen von 14-3-3 -----	17
1.3.3 Regulation von 14-3-3-----	19
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit -----</b>	<b>20</b>
<b>2 MATERIAL-----</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Geräte -----</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Chemikalien, Enzyme und Antikörper-----</b>	<b>22</b>
2.2.1 Chemikalien-----	22
2.2.2 Enzyme -----	22
2.2.3 Molekulargewichtsmarker -----	23
2.2.4 Antikörper-----	23
2.2.5 Kits-----	24
<b>2.3 Stämme, Viren und Zelllinien -----</b>	<b>24</b>

2.3.1 Bakterienstämme ( <i>Escherichia coli</i> )-----	24
2.3.2 Hefestämme ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )-----	24
2.3.3 Baculoviren -----	25
2.3.4 Eukaryotische Zelllinien -----	25
<b>2.4 Plasmide -----</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Medien -----</b>	<b>26</b>
2.5.1 Bakterienmedien -----	26
2.5.2 Zellkulturmedien -----	26
2.5.3 Hefemedien -----	26
<b>3 METHODEN-----</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden -----</b>	<b>27</b>
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-----	27
3.1.2 Gelelektrophorese von DNA -----	27
3.1.3 Elution von DNA aus Agarosegelen-----	28
3.1.4 Restriktion von DNA -----	28
3.1.5 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden -----	28
3.1.6 Ligation-----	29
3.1.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen-----	29
3.1.8 Transformation chemisch kompetenter Zellen -----	29
3.1.9 Erstellung von Punktmutation -----	30
3.1.10 Klonierung mit dem Gateway-System -----	30
3.1.11 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> -----	31
3.1.12 Konzentrationsbestimmung von DNA -----	32
3.1.13 DNA-Sequenzierung -----	32
<b>3.2 Biochemische Arbeitsmethoden -----</b>	<b>32</b>
3.2.1 Herstellung von Zellhomogenaten -----	32
3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford-----	33
3.2.3 SDS-PAGE-----	33
3.2.4 Anfärbung der Gele -----	33
3.2.5 Westernblot -----	34

3.2.6 Präparation GST-markierter Proteine-----	34
3.2.7 Aufreinigung rekombinanter His-Fusionsproteine-----	35
3.2.8 Koimmunopräzipitation -----	36
3.2.9 <i>In vitro</i> GST-Pulldown Assay -----	36
3.2.10 Kinase-Aktivitätstest -----	37
3.2.11 Grobe Fraktionierung -----	38
3.2.12 Subzelluläre Fraktionierung -----	38
3.2.12.1 Präparation der Iodixanol-Dichtegradienten -----	38
3.2.12.2 Fraktionierung durch Iodixanol-Dichtegradienten -----	39
<b>3.3 Zellbiologische Methoden -----</b>	<b>40</b>
3.3.1 Sf9-Zellkultur-----	40
3.3.1.1 Herstellung von rekombinalem Baculovirus-----	40
3.3.1.2 Infektion von Sf9 Zellkulturen -----	40
3.3.2 CHO-Zellkultur-----	40
3.3.2.1 Effectene-Transfektion -----	41
3.3.2.2 Immunofluoreszenz -----	41
<b>3.4 Hefe-Zwei-Hybrid-Methoden -----</b>	<b>42</b>
3.4.1 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmiden -----	43
3.4.2 Direkter Zwei-Hybrid-Test -----	43
<b>4 ERGEBNISSE -----</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2 und MARKK -----</b>	<b>45</b>
4.1.1 Identifizierung der MARKK als Interaktionspartner von MARK2-----	46
4.1.1.1 Interaktion von MARKK mit MARK2 in Sf9-Zellen -----	46
4.1.1.2 Interaktion von MARK2 und MARKK <i>in vitro</i> -----	48
4.1.1.2.1 Expression und Reinigung GST-markierter MARK2 -----	48
4.1.1.2.2 <i>In vitro</i> Pulldown-Assay mit GST/MARK2 -----	50
4.1.2 Bestimmung der MARKK-Bindungsstelle an MARK2-----	52
4.1.2.1 Klonierung und Expression der GST/MARK Konstrukte -----	52
4.1.2.2 Pulldown-Assay mit GST/MARK2 Konstrukten -----	54
4.1.3 MARKK stimuliert die MARK2-Aktivität in Zellen -----	55
<b>4.2 Charakterisierung des 14-3-3ζ als Interaktionspartner von MARK2 -----</b>	<b>57</b>
4.2.1 Kartierung der Interaktionsdomänen im Zwei-Hybrid-System -----	57
4.2.2 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3ζ-----	59

4.2.3 Bestimmung der 14-3-3-Bindungsstelle in MARK-----	60
4.2.4 Bestimmung der MARK2-Bindungsstelle an 14-3-3 $\zeta$ -----	62
4.2.4.1 Klonierung und Expression von GST-14-3-3 $\zeta$ -----	63
4.2.4.2 Herstellung der 14-3-3 $\zeta$ -Mutanten durch Punktmutation-----	64
4.2.4.3 Effekte der Mutationen in 14-3-3 $\zeta$ auf die Wechselwirkung mit MARK2 -----	65
4.2.5 <i>In vitro</i> Untersuchung der Aktivität von MARK2 -----	68
4.2.5.1 14-3-3 $\zeta$ inhibiert die Aktivität von MARK2 -----	68
4.2.5.2 Die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von MARK2 und 14-3-3 $\zeta$ -----	69
4.2.5.3 14-3-3 inhibiert MARK2 durch direkte Proteininteraktion-----	70
4.2.6 Koexpressionsstudien zur Untersuchung der Interaktion -----	72
4.2.6.1 Überexpression von 14-3-3 $\zeta$ führt zur Translokation der MARK2 -----	72
4.2.6.2 Kotransfektion von MARK2 und 14-3-3 $\zeta$ in CHO-Zellen -----	75
<b>4.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2, MARKK und 14-3-3<math>\zeta</math></b>	<b>78</b>
4.3.1 Identifizierung des Komplexes aus MARK2, MARKK und 14-3-3 $\zeta$ -----	78
4.3.1.1 Koimmunopräzipitation in Sf9-Zellen -----	78
4.3.1.2 Kofraktionierung in Golgi/TGN Kompartimenten -----	80
4.3.2 MARKK und 14-3-3 $\zeta$ inhibieren gegenseitig ihre Bindung an MARK2 wt -----	82
4.3.2.1 MARKK inhibiert die Bindung zwischen MARK wt und 14-3-3 -----	82
4.3.2.2 Die Bindung zwischen MARK2 wt und MARKK wird durch 14-3-3 $\zeta$ inhibiert-----	85
4.3.3 14-3-3 inhibiert die Aktivierung von MARK2 in Anwesenheit von MARKK-----	87
4.3.3.1 Aktivitätsvergleich der Fraktionen aus Iodixanol-Dichtegradienten -----	87
4.3.3.2 Koexpressionsexperiment in CHO-Zellen -----	90
<b>5 DISKUSSION -----</b>	<b>92</b>
<b>5.1 Interaktion zwischen MARK und MARKK-----</b>	<b>92</b>
<b>5.2 Interaktion zwischen MARK und 14-3-3 -----</b>	<b>95</b>
5.2.1 14-3-3-Bindungsstellen an MARK -----	96
5.2.2 MARK-Bindungsstellen an 14-3-3 -----	97
<b>5.3 Regulation der MARK durch 14-3-3-----</b>	<b>100</b>
5.3.1 Regulation der Aktivität-----	100
5.3.2 Regulation der zellulären Lokalisation -----	102
<b>5.4 Komplexbildung aus MARK2, MARKK und 14-3-3-----</b>	<b>102</b>

LITERATURVERZEICHNIS ----- 106

ABBILDUNGSVERZEICHNIS----- 119

TABELLENVERZEICHNIS----- 120

ANHANG ----- 121

**A1 Verzeichnis der Abkürzungen----- 121**

**A2 Proteinsequenz von MARK2 ----- 123**

**A2 Proteinsequenz von 14-3-3 $\zeta$  ----- 123**

**A3 Primer-Sequenzen der ortsgerichteten Mutagenese von 14-3-3 $\zeta$ ----- 123**

## ZUSAMMENFASSUNG

MARK (MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase) wurde ursprünglich aufgrund ihrer Aktivität entdeckt, das Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP) Tau zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung findet ausschließlich innerhalb der Mikrotubuli-bindenden Domäne statt und führt zur Ablösung des Tau-Proteins von den Mikrotubuli, den Schienen des axonalen Transports und damit zu deren Destabilisierung (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1997). Das an dieser Stelle phosphorylierte Tau-Protein wurde auch in neurofibrillären Bündeln, Kennzeichen der Alzheimer-Demenz, nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der MARK untersucht.

MARK wird durch die Threonin/Serin-Kinase MARKK (MARK-Kinase) am Threonin208 in der Aktivierungsschleife phosphoryliert und somit aktiviert (Timm et al., 2003). Diese Wechselwirkung wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Zum einen wurden die Bindungsstelle und –stärke bestimmt, und zum anderen konnte bestätigt werden, dass auch in Zellen eine Koexpression der MARKK die Aktivität der MARK erhöht.

Das Protein 14-3-3 $\zeta$  wurde mittels des Zwei-Hybrid-Systems als neuer Interaktionspartner von MARK identifiziert. Eine Bestätigung dieser Wechselwirkung erfolgte biochemisch durch Koimmunopräzipitation und GST-Pulldown-Assay. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse der *in vitro* Kinaseassays, dass 14-3-3 $\zeta$  die Kinaseaktivität von MARK inhibiert, und zwar durch die direkte Proteininteraktion. Diese inhibierende Wirkung von 14-3-3 $\zeta$  auf MARK konnte auch in Zellen nachgewiesen werden. Die Mikrotubuli-destabilisierende Wirkung von MARK in Zellen wurde durch eine Koexpression von 14-3-3 $\zeta$  aufgehoben. Außerdem bewirkte 14-3-3 $\zeta$  eine Translokation der MARK von dem Zytoplasma in vesikuläre Kompartimente.

Ein Komplex aus MARK, MARKK und 14-3-3 $\zeta$  konnte durch Koimmunopräzipitation und Fraktionierung in Zellen nachgewiesen werden. MARKK und 14-3-3 $\zeta$  konnten gegenseitig ihre Wechselwirkung auf MARK beeinflussen. Überexpression von MARKK in Sf9-Zellen führte zur Abnahme der Bindung zwischen 14-3-3 $\zeta$  und MARK-Wildtyp, während die Interaktion zwischen dominant negativer MARK und 14-3-3 $\zeta$  nicht von MARKK beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu konnte die Interaktion zwischen MARK-Wildtyp und MARKK *in vitro* durch Zugabe von 14-3-3 $\zeta$  aufgehoben werden, während 14-3-3 $\zeta$  keine Wirkung auf die Interaktion zwischen MARKK und dominant negativer MARK ausübte. Überexpression von MARK und MARKK in Zellen führt zur Auflösung des Mikrotubulinnetzwerks und somit dem Zelltod. Durch eine Koexpression von 14-3-3 $\zeta$  wurde das MT-Netzwerk stabilisiert und die Zelle somit gerettet. Diese Daten weisen auf einen Mechanismus der MARK-Regulation gleichzeitig durch MARKK und 14-3-3 hin und geben neue Ansätze, die komplexen Funktionen von MARK in der Zelle zu diskutieren und weiter zu analysieren.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Serin/Threonin-Kinasen der MARK/PAR-1-Familie

Bei der Suche nach Kinasen, die eine Hyperphosphorylierung beim neuronalen Mikrotubuli-assoziierten Protein (MAP) Tau hervorrufen und es somit von den Mikrotubuli ablösen, wurde MARK (MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase) entdeckt (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1997). Die MAPs sind funktionell durch ihre Fähigkeit zur Förderung der Tubulin-Polymerisation und Stabilisierung von Mikrotubuli (MT) charakterisiert (Murphy and Borisy, 1975; Sloboda et al., 1975; Cleveland et al., 1977; Murphy et al., 1977). Die Substratstellen der MARK liegen alle in der Mikrotubuli-Bindungs-Domäne der MAPs und haben die Konsensus-Sequenz KXGS, wobei S das phosphorylierte Serin und X ein hydrophober Rest ist (Illenberger et al., 1996). MARK weist eine besonders ausgeprägte Phosphorylierungsaktivität gegenüber dem Serin262 auf (Biernat et al., 1993). Die Phosphorylierung durch MARK führt zur Ablösung der Tau-Proteine von den MT und einer damit einhergehenden Destabilisierung. Die anormale Hyperphosphorylierung und die Aggregation des Tau-Proteins zu Filamenten (PHFs: *paired helical filaments*), die sich in intrazellulären neurofibrillären Bündeln (NFTs: *neuronal fibrillary tangles*) ablagern, sind neben A $\beta$ -Plaques Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit (Hasegawa et al., 1992).

Eine Überexpression von MARK2 in CHO oder N2a Zellen führt zur Zerstörung des Mikrotubuli-Netzwerks und verursacht die Degeneration der Zellen (Drewes et al., 1997; Ebner et al., 1999). Eine Überexpression von Tau inhibiert den axonalen Transport und führt zum Absterben der Axone. Dieser Transportstillstand kann durch eine Koexpression von MARK aufgehoben werden, da MARK Tau phosphoryliert und von den MT ablöst (Mandelkow et al., 2004).

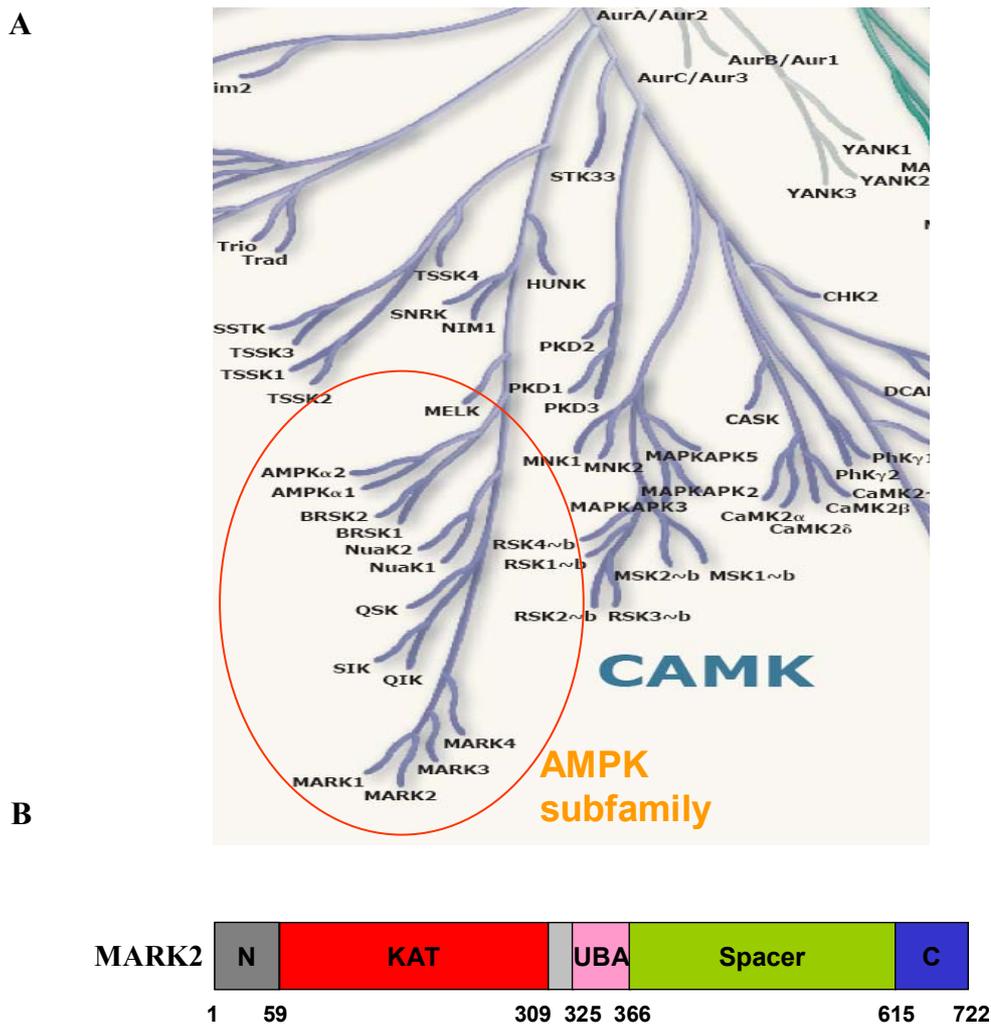
Die MARK-Familie gehört zur AMPK-Unterfamilie (*AMP-activated protein kinase*) der Gruppe der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (Hanks and Hunter, 1995;

Manning, 2002) (Abb. 1A) und weist eine starke Homologie zu PAR-1 (*partitioning-defective kinase family*) in *C. elegans* und *D. melanogaster*, KIN1 und KIN2 in *S. cerevisiae* und kin1 in *S. pombe* (Levin et al., 1990; Levin und Bishop, 1990) auf (Tabelle 1).

Organismen	Gene
<i>S. pombe</i>	kin1
<i>S. cerevisiae</i>	KIN1 KIN2
<i>C. elegans</i>	PAR-1
<i>Drosophila</i>	PAR-1 P78
Säugetiere	MARK1 MARK2 MARK3/C-TAK1/p78 MARK4/MARKL1 PEg3/MELK/MPK38

**Tabelle 1: Proteine der KIN1/PAR-1/MARK-Familie**

Die MARK/PAR-1-Familie besteht aus vier Isoformen (MARK1-4), die zwischen 722 und 793 Aminosäuren (AS) lang sind (Abb. 1A und B). Hinter der kurzen aminoterminalen Kopfsequenz, die wenige Übereinstimmungen aufweist, findet man die katalytische Domäne (KAT) mit ausgeprägter Homologie. Die darauf folgende Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA; Hofmann und Bucher, 1996) könnte eine Rolle bei der Ubiquitin-vermittelten Interaktion mit anderen Proteinen spielen. Der sehr basische „Spacer“ ist der Teil mit der größten Variabilität zwischen den Kinasen. Studien in *Drosophila* zeigten, dass die „Spacer“-Domäne für die Lokalisation der PAR-1 an der Plasmamembran und für die Polaritätsentwicklung entscheidend ist (Vaccari et al., 2005). Der carboxyterminale Schwanz enthält die für diese Kinase-Familie typische Kinase-assoziierte Domäne 1 (KA1; Hofmann und Bucher, 1996).



**Abbildung 1: MARK-Familie und Domänenstruktur der MARK2**

**(A)** Teil des phylogenetischen Baums der eukaryotischen Proteinkinasen (Manning et al., 2002). Das rote Oval markiert Kinasen der AMPK-Unterfamilie, die zur Gruppe der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinasen (CAMK) gehört.

**(B)** Domänenstruktur der MARK2. Hinter der kurzen aminoterminalen Kopfsequenz findet man die katalytische Domäne (KAT) mit ausgeprägter Homologie zu anderen Mitgliedern der MARK/PAR-1-Familie. Daraufhin folgt die Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA, Hofmann und Bucher, 1996). Die sehr basische „Spacer“-Domäne ist der Teil mit der größten Variabilität zwischen den Kinasen dieser Familie. Der carboxyterminale Schwanz enthält die für diese Kinase-Familie typische Kinase-assoziierte Domäne 1 (KA1; Hofmann und Bucher, 1996).

Das Protein PAR-1 wurde aufgrund seiner Funktion in der Polaritätsentwicklung von *C. elegans* entdeckt (Guo und Kemphues, 1995; Pellettieri and Seydoux, 2002). In Hefen sind KINs an der asymmetrischen Teilung beteiligt (Nelson und Grindstaff, 1997). In polarisierten Säugetierzellen, wie Epithelzellen oder Neuronen, ist MARK/PAR-1 für die Errichtung und Erhaltung der asymmetrischen Organisation der Zellen, das Wachstum von Neuriten und die Reorganisation des Mikrotubulinnetzwerks von Bedeutung (Böhm et

al., 1997; Cox et al., 2001; Biernat et al., 2002; Cohen et al., 2004). Diese Funktionen lassen sich zum Teil auf die Effekte der MARK/PAR-1 auf die dynamische Instabilität der Mikrotubuli zurückführen, die eine zentrale Rolle bei der Polaritätsentwicklung spielen (Wallenfang und Seydoux, 2000).

Neben der Rolle in der Polaritätsentwicklung ist MARK/PAR-1 auch in andere Prozesse involviert.

MARK3/C-TAK1 (*cdc-twentyfive-associated kinase 1*) vermittelt durch Phosphorylierung von Cdc25 dessen Bindung an 14-3-3 und verhindert so die Lokalisation von Cdc25 im Kern, wo die Phosphatase sonst für eine Aktivierung der Cdc2 und ein Voranschreiten des Zellzyklusses von G2 in die S-Phase sorgt (Ogg et al., 1994; Peng et al., 1998).

Über eine Beteiligung von PAR-1 an dem Wnt-Signaltransduktionsweg berichteten T. Sun und Mitarbeiter (Sun et al., 2001): PAR-1 fungiert in *Drosophila* als positiver Regulator dieses Weges, indem sie das Protein Dishevelled, eine stimulierende Komponente dieses Signaltransduktionsweges, phosphoryliert. Neben seiner Funktion im Wnt-Signaltransduktionsweg ist Dishevelled auch in die Polaritätsentwicklung involviert. O. Ossipova und Mitarbeiter konnten in *Xenopus* zwei Klassen von PAR-1 identifizieren, die jeweils eine dieser beiden Funktionen regulieren. PAR-1BY reguliert die Polaritätsentwicklung, während PAR-1A und PAR-1BX für den Wnt-Signaltransduktionsweg von Bedeutung sind (Ossipova et al., 2005).

MARK4, auch als MARKL1 (*MARK-like Kinase 1*) bekannt, spielt eine Rolle bei der Kernlokalisation von  $\beta$ -Catenin, einem Aktivator des Transkriptionsfaktors Tcf/LEF (Kato et al., 2001).

KIN1 und KIN2, Homologe von PAR-1 in der Hefe *S. cerevisiae*, wurden neuerlich in Verbindung mit Exozytose gebracht (Elbert et al., 2005). Sie interagieren mit Komponenten dieses Prozesses und induzieren die Phosphorylierung von Proteinen wie z.B. von t-SNARE Sec9 und dem t-SNARE-bindenden Protein Sro7, was zu ihrer Freisetzung aus der Plasmamembran führt.

*Drosophila* gilt aufgrund ihres einzigen PAR-1-Gens als ein ideales Tiermodell für die Untersuchung der *in vivo*-Funktion von PAR-1. Studien in *Drosophila*, die Tau überexprimieren, zeigten, dass das Ausschalten des *PAR-1*-Gens den neuronalen Tod auf ein Drittel reduziert (Nishimura et al., 2004). Ein ähnlicher Effekt konnte auch durch Punktmutationen der Serinstellen, die sich in der MT-Bindungsdomäne befinden und von PAR-1 phosphoryliert werden, erzielt werden (Nishimura, et al., 2004). Interessanterweise eliminierten diese Mutationen nicht nur die Phosphorylierung durch PAR-1, sondern auch die Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  und Cdk5. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass PAR-1 als eine Art Initiator der Tau-Phosphorylierung fungiert.

Transgene Mäuse, in denen das MARK2-Gen ausgeschaltet ist, zeigten Störungen im Immunsystem, jedoch keine in der Polaritätsentwicklung (Hurov et al., 2001). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Aufgaben der MARK2 von anderen MARK/PAR-1-Isoformen übernommen werden können.

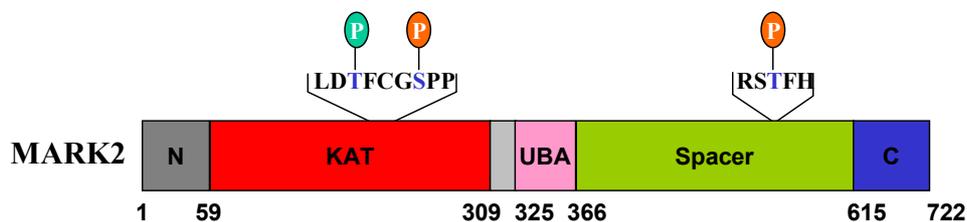
### 1.2 Regulation der MARK/PAR-1

Aufgrund der bedeutenden Rolle der MARK/PAR-1 ist eine strikte Regulation unentbehrlich. Im Gegensatz zu den vielfältigen Funktionen von MARK/PAR-1, ist über die Regulation wenig bekannt.

Jenkins und Mitarbeiter zeigten 2000, dass in menschlichen Neuroblastomazellen durch oxidativen Stress, hier durch Phenylarsenoxid, eine MARK-Aktivität induziert werden kann. Dies sollte allerdings nicht für alle oxidativen Prozesse gelten, da dieser Effekt durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufgehoben wird (Jenkins und Johnson, 2000). Tatsächlich führt oxidativer Stress für gewöhnlich zur Dephosphorylierung des Tau-Proteins (Ko et al., 1997). In PC12-Zellen steigert sich die Expression der MARK1 mit der Dauer der NGF-Behandlung, die mit der Zeit (nach 24 Stunden) wieder auf den normalen Spiegel sinkt (Brown et al., 1999). Eine stimulierende Wirkung wurde auch bei TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) festgestellt (Beaulieu et al., 1999).

### 1.2.1 Aktivierung der MARK

MARKs aus dem Gehirn sind an zwei Stellen phosphoryliert, T215/S219 in MARK1 und T208/S212 in MARK2. Dephosphorylierung des Proteins mit Serin/Threonin-spezifischen Phosphatasen führt zum Verlust der Kinaseaktivität, welche durch Inkubation mit ATP nicht wieder hergestellt werden konnte (Drewes et al., 1997). Durch Austausch des Threonins und des Serins gegen Alanin wurde ein Verlust der katalytischen Aktivität festgestellt. Dies führte zu der Vermutung, dass MARK über diese beiden Stellen reguliert wird (Drewes et al., 1997).



**Abbildung 2: Domänenstruktur der MARK2.**

Ein Ausschnitt aus der Sequenz der Aktivierungsschleife ist angezeigt. Die Aminosäuren, deren Phosphorylierung wichtig für die Aktivitätsregulation ist, sind hier mit Phosphat (Thr208; Ser212 und Thr539) dargestellt (Timm et al., 2003; Hurov et al., 2004).

Eine MARK aktivierende Kinase wurde von Dr. T. Timm aus unserer Gruppe aus Schweinegehirn isoliert und MARKK (MARK-Kinase) genannt (Timm et al., 2003). Die Aufreinigung erfolgte durch mehrere Chromatographieschritte, u.a. durch Affinitätschromatographie, in der ein verkürztes Konstrukt (AS1-370) der dominant negativen MARK2 (T208A/S212A) als Ligand eingesetzt wurde. MARKK phosphoryliert MARKs über eine einzelne Stelle in der Aktivierungsschleife, das Threonin208 (MARK2), und erhöht die Aktivität von MARK 15-fach, was die Phosphorylierung des Tau-Proteins angeht. Möglicherweise wird die Aktivierungsschleife von MARK durch Phosphorylierung an Thr208 in einer offenen Konformation fixiert.

Die Sequenzanalyse ergab, dass MARKK eine hohe Homologie mit TAO1 aus Ratte (*thousand-and-one aminoacids*; Hutchison et al., 1998) aufweist. Sie ist eine Serin/Threonin-Kinase und gehört zur Gruppe der Ste20-Kinasen (*steril20 protein kinases*), die in zwei Familien unterteilt werden kann: die p21-aktivierten Proteinkinasen

(PAKs) und die „germinal center kinases“ (GCKs). MARKK/TAO-1 gehört - zusammen mit der JIK ("JNK/SAPK inhibitory kinase"; Tassi et al., 1999), der DPK/KDS ("Dendritic cell derived protein kinase"; Zhang et al., 2000; "Kinase domain with homology to Ste20p"; Carter et al., 2000) und der PSK ("Prostate-derived Ste20-like kinase", dem humanen Homolog der Ratten-TAO-2; Moore et al., 2001; Chen et al., 1999) - zur Gruppe VIII der GCK-Kinasen. Weiterhin sind deren Homologe aus *Drosophila* (CG14217), *C.elegans* (Sulu/kin-18; Bermann et al., 2001) und Hühnern (KFC – "kinase from chicken"; Yustein et al., 2000) dieser Gruppe zugeordnet.

Die identischen Kinasen DPK und KDS - Aktivatoren der ERK- und JNK/SAPK-Signaltransduktionswege - unterscheiden sich von der JIK, einem direkten Inhibitor der JNK/SAPK, nur in einem Block von 22 Aminosäuren in der Substratbindungsdomäne.



**Abbildung 3: Domänenstruktur der MARKK**

Die katalytische Domäne (KAT), sowie der Aminoterminus (N) und die sogenannte "Spacer"-Domäne sind hoch konserviert in der GCK VIII-Unterfamilie. Weniger Homologien finden sich in der Substrat-Bindungs-Domäne (SBD). Nur noch geringe Ähnlichkeit haben die Carboxytermini (C) der Kinasen dieser Familie.

In der Abbildung 3 ist die Domänenstruktur der MARKK dargestellt. An eine kurze aminoterminalen Kopfsequenz (N) mit hoher Homologie zu PSK und JIK schließt sich eine stark konservierte katalytische Serin/Threonin-Kinase Domäne an. Die darauf folgende Substrat-Bindungs-Domäne (SBD) mit partiell hoher und niedriger Homologie variiert in der Länge unter den Homologen der MARKK. Daran schließt sich der sogenannte „Spacer“ an, der in allen Kinasen der GCK VIII Gruppe stark konserviert ist, gefolgt von einem carboxyterminalen Schwanz mit geringen Gemeinsamkeiten. Der „Spacer“ und der Schwanz besitzen aufgrund amphipatischer Eigenschaften eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Dimeren (Segrest et al., 1990; Lupas et al., 1991).

Mit 1001 Aminosäuren ist die MARK-Kinase ungewöhnlich groß. Ihre Kinasedomäne ist wie gewöhnlich nur 250 Aminosäuren lang, die anderen Domänen übernehmen vermutlich regulatorische Funktionen. MARKK/TAO1 und PSK/TAO2 sind *in vitro* als Aktivatoren der MKK3 und MKK6 des Stress-aktivierten Signaltransduktionsweges

bekannt. Diese wiederum aktivieren die p38-MAPK (Hutchinson et al., 1998; Chen et al., 1999). Für TAO2 konnte eine Funktion als Effektor der MKK/p38- und MKK6/JNK-Stress-aktivierten Signalwege auch *in vivo* verifiziert werden (Chen und Cobb, 2001). Bei PSK, dem humanen Homolog von TAO2 wurde eine regulatorische Funktion beim Aktin- und Mikrotubulinetzwerk nachgewiesen (Moore et al., 2000; Mitsopoulos et al., 2003). Überexpression der PSK in Zellen führt zur Abnahme der Stressfiber und Reorganization von Aktin (Moore et al., 2000). Außerdem kann PSK  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin phosphorylieren und stabilisieren (Mitsopoulos et al., 2003). Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser beiden Effekte sind noch unklar.

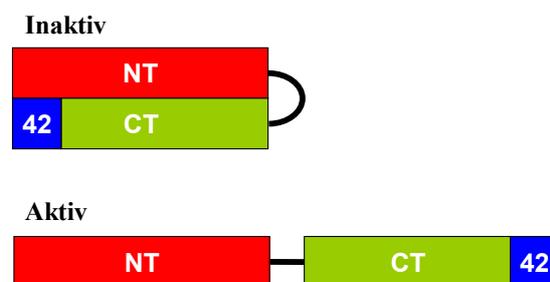
Die andere Kinase LKB1 konnte ebenso mit der Aktivierung von MARK/PAR-1 in Verbindung gebracht werden. J. Lizcano und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Serin/Threonin-Kinase LKB1 elf der gesamten zwölf Mitglieder der AMPK (*AMP-activated protein kinase*)-Untergruppe, zu der auch MARK/PAR-1 gehört, phosphorylieren kann. LKB1 phosphoryliert den Threoninrest in der Aktivierungsschleife der MARK/PAR-1 und stimuliert somit ihre Aktivität bis zu 200-fach (Lizcano et al., 2004). LKB1 wurde ursprünglich als Tumor-Suppressor bekannt. Mutationen im LKB1-Gen führen oft zum Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS) und anderen Tumorbildungen in Epithelgeweben (Hemminki et al., 1998; Yoo et al., 2002). Weitere Funktionen der LKB1 in Chromatin-Reorganisation (Marignani et al., 2001), Zellzyklus (Tiainen et al., 1999), Energie-Metabolismus (Woods et al., 2003) und Wnt-Signaltransduktionsweg (Spicer et al., 2003) wurden berichtet. LKB1 ist auch in die Polaritätsentwicklung von *Drosophila* involviert. Sie ist hier als PAR-4 bekannt und ein Substrat der MARK/PAR-1 (Martin and St Johnston, 2003).

### 1.2.2 Inhibierung der MARK

Phosphorylierung der Aktivierungsschleife von MARK durch MARKK und LKB1 ist nicht der einzige Regulierungsmechanismus. Ein weiterer Zusammenhang konnte zwischen MARK und aPKC (*atypical protein Kinase C*) hergestellt werden (Brajnovic et al., 2004), die u.a. eine Rolle bei der Polaritätsentwicklung spielt (Etienne-Manneville und Hall, 2003). aPKC phosphoryliert MARK/PAR-1 an einem konservierten Threonin (T595 in humaner MARK2/PAR-1b) in der „*Spacer*“-Domäne und erzeugt dadurch eine

Bindungsstelle für 14-3-3. Diese Modifikation inhibiert die Aktivität von MARK und bewirkt gleichzeitig eine Translokation der MARK von der Plasmamembran zum Zytosol (Hurov et al., 2004; Kusakabe und Nishida, 2004; Suzuki et al., 2004).

Elbert und Mitarbeiter zeigten 2005, dass eine Deletion der letzten 42 C-terminalen Aminosäuren von KIN1 und KIN2, MARK-Homologe in der Hefe, zu einer Erhöhung ihrer stimulierenden Effekte in der Exozytose führte. Außerdem fanden sie, dass die katalytische und die regulatorische Domäne miteinander wechselwirken, wobei die 42 hochkonservierten C-terminalen Aminosäuren der KA1-Domäne benötigt wurden. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Schwanz-Domäne eine inhibitorische Rolle spielt. Das heißt, KIN/PAR-1 könnte einer Autoregulation unterliegen (Abb. 4).



**Abbildung 4: Modell der Autoinhibierung von PAR-1/KIN1-2 (Elbert et al., 2005)**

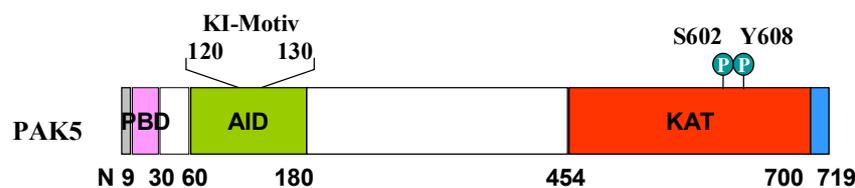
Die C-terminale regulatorische Domäne von KIN1/2 kann direkt an ihre N-terminale katalytische Domäne binden, wobei die letzten 42 Aminosäuren benötigt werden. Bei dieser „geschlossenen“ Konformation wird die ATP- oder Substrat-Bindungsstelle blockiert und die Kinase bleibt inaktiv. Durch eine Stimulation oder Phosphorylierung wird die Kinase „geöffnet“ und aktiviert.

Kürzlich wurde ein anderes MARK-inhibierendes Protein identifiziert, die p21-aktivierte Kinase 5 (PAK5) (Matenia et al., 2005). PAK5 gehört zur Gruppe der Rac/Cdc42-assoziierten Serin/Threonin Kinasen der Ste20-Kinase Familie. Bis heute wurden sechs menschliche PAKs (PAK1-6) identifiziert, die aufgrund ihrer Domänenstruktur in zwei Gruppen unterteilt werden, PAK1-3 in Gruppe I und PAK4-6 in Gruppe II. Innerhalb der Gruppe weisen die Kinasen hohe Homologie miteinander auf.

Die Domänenstruktur der PAKs ist in der Abbildung 4 am Beispiel von PAK5 dargestellt. Die p21-Bindungsdomäne (PBD) ist am N-terminalen Ende lokalisiert und ist innerhalb der Familie hoch-konserviert. Diese Domäne beinhaltet auch das CRIB-Motiv

(*Cdc42/Rac interactive binding motive*), welches für die Regulation der Kinaseaktivität der Gruppe I (PAK1-3) notwendig ist (Bagrodia und Cerione, 1999; Daniels et al., 2001; Jaffer et al., 2002). Direkt im Anschluss an die PBD folgt in Gruppe I die Autoinhibierungsdomäne (AID), die durch eine inter- und intramolekulare Interaktion mit der Kinase-Domäne die Kinase inhibiert. Die PBD und AID bilden die regulatorische Domäne der PAKs. Während bei PAK4 und PAK6 keine AID-Domäne identifiziert wurde, wurde bei PAK5 über eine AID mit dem Kinase-Inhibitor-Motiv (KI-Motiv) berichtet (Ching et al., 2003).

Die C-terminalen Kinase-Domänen der Gruppe I weisen eine Homologie von über 90% auf, während die Homologie zu Gruppe II nur 50% beträgt. Zwischen dem katalytischen und dem regulatorischen Bereich befindet sich eine prolinreiche Domäne, die eine Wechselwirkung mit SH3-Motiven anderer Moleküle wie z.B. PIX oder Nck ermöglicht (Daniels et al., 1999).



**Abbildung 5: Domänenstruktur von PAK5**

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.

D. Matenia und Mitarbeiter in unserem Labor identifizierten mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Systems PAK5 als neuen Interaktionspartner von MARK2 (Matenia et al., 2005). Diese Interaktion wird durch ihre katalytischen Domänen vermittelt und übt unterschiedliche Wirkungen auf beide Kinasen aus. Während die Aktivität von PAK5 dadurch unverändert bleibt, wird MARK2 durch die Wechselwirkung inhibiert. Obwohl es sich hier um zwei Kinasen handelt, wurde keine Phosphorylierung festgestellt. Eine direkte Proteininteraktion beider Kinasen sollte der Mechanismus der Inhibierung sein. Diese Hypothese wurde dadurch unterstützt, dass sowohl die aktive als auch die inaktive PAK5 Mutante MARK2 inhibierten. Weiterhin konnte in Zellen gezeigt werden, dass die MT-

destabilisierende Wirkung von MARK durch eine Koexpression von PAK5 aufgehoben wurde.

PAKs sind in viele andere zelluläre Prozesse involviert. Als GTPase-Effektoren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts. So aktivieren z.B. PAK1 und PAK4 die LIM-Kinase, die wiederum den Aktin-depolymerisierenden Faktor (ADF)/Cofilin phosphoryliert und inaktiviert (Frost et al., 1998; Dan et al., 2001). Ein Zusammenhang mit Apoptose wurde bei beiden PAK-Gruppen gefunden, ein stimulierender (PAK2) oder inhibierender (PAK1 und PAK4) (Rudel et al., 1997; Schurmann et al., 2000; Tang et al., 2000; Gnesutta et al., 2001; Jakobi et al., 2001).

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*) an der Differenzierung und Entwicklung von Nervenzellen in einer spezifischen Gehirnregion von *Drosophila* beteiligt ist (Melzig et al., 1998). Ähnliche Resultate wurden nach einer Überexpression von PAK5 in Neuroblastoma-Zellen und hippocampalen Neuronen beobachtet. Die transfizierten Zellen bildeten Neuritenauswüchse, 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 et al. (2003) beschrieben. PAK5 kolokalisiert mit Mitochondrien und inhibiert dort die Apoptose-Kaskade durch die Phosphorylierung des Apoptosefaktors BAD.

### 1.3 14-3-3 Proteine

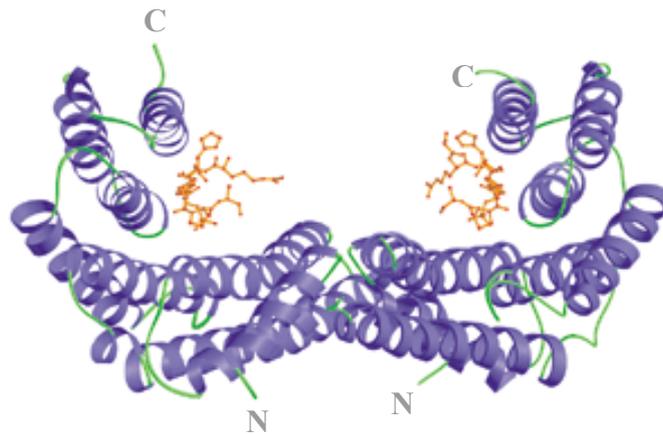
14-3-3 Proteine wurden in 1976 von Moore und Perez während einer intensiven Studie mit Kälberhirnproteinen entdeckt. Sie bekamen ihren ungewöhnlichen Namen in Anlehnung an ihre jeweiligen HPLC-Elutionspositionen und Positionen im SDS-Gel (Ichimura et al., 1988). Sie sind ungefähr 30 kD groß und bilden unter physiologischen Bedingungen Homo- und Heterodimere. 14-3-3 Proteine wurden ursprünglich als stark exprimierte Proteine im Nervensystem identifiziert (Moore and Perez, 1967), wo sie 1%

der gesamten zytosolischen Proteine ausmachen. Allerdings beschränkt sich ihre Expression nicht auf neuronales Gewebe, sondern erfolgt ubiquitär in allen Gewebetypen (Aitken, 1996; Fu et al., 2000). In Säugetieren wurden sieben Isoformen identifiziert ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$ ,  $\zeta$ ). 14-3-3 Proteine sind hoch-konserviert zwischen Spezies. Die humane 14-3-3 $\epsilon$  Isoform besitzt z.B. bis zu 70% Homologie zu ihrem Homolog BMH1 aus *S. cerevisiae* (Abbildung 6).



### 1.3.1 14-3-3 Struktur

Jeder 14-3-3 Monomer besteht aus neun antiparallel angeordneten  $\alpha$ -Helices. Bei einem Dimer (Abbildung 7) bilden zwei L-förmige Monomere eine U-förmige Struktur, wobei jeweils vier der neun Helices eine amphipatische Bindungstasche für die Interaktion mit Partnerproteinen formen. Die Aminosäuren im Bereich der Interaktionsdomäne sind zwischen den einzelnen Isoformen hoch-konserviert. Dagegen stellen die äußeren N-terminalen Regionen des Proteins die variablen Bereiche innerhalb dieser Proteinfamilie dar. Es wurde allerdings auch berichtet, dass auch die C-terminale Region als Interaktionsfläche fungieren kann. Raf-1 und Bcr z.B. können mit dem Bereich AS171-213 interagieren (Ichimura et al., 1995; Ichimura et al., 1997; Gu et al., 1998). Zwar könnten einige der hydrophoben und polaren Aminosäurereste in dieser Region zur Bindung der Liganden beitragen, die genauen Eigenschaften der Interaktion mit diesem Bereich sind jedoch noch ungeklärt. Der N-Terminus von 14-3-3 bildet die Interaktionsschnittstelle zur Dimerisierung der Monomere. Die Aminosäurereste, die in die Dimerisierung von 14-3-3 involviert sind, sind in den Bereichen AS5-21 und AS58-89 lokalisiert (Aitken, 1996; Fu et al., 2000; Aitken, 2002). Die Dimerisierung spielt zum Teil eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung von 14-3-3 und ihren Partnern (Shen et al., 2003). Als Homo- oder Heterodimere sind 14-3-3 Proteine in der Lage, gleichzeitig mit zwei Liganden zu interagieren, wodurch z.B. die Interaktion zwischen einer Kinase und dem zugehörigen Substrat vermittelt werden könnte (Yaffe, 2002). Sie fungieren als Adaptoren und sind bei der räumlichen Anordnung von Signaltransduktionskomplexen (Aitken, 1996; Morrison, 1994) und der subzellulären Lokalisation von assoziierten Proteinen (Rittinger et al., 1999) von Bedeutung.



**Abbildung 7: Humanes 14-3-3 $\zeta$ -Dimer mit gebundenem -Peptide (Rittinger et al., 1999)**

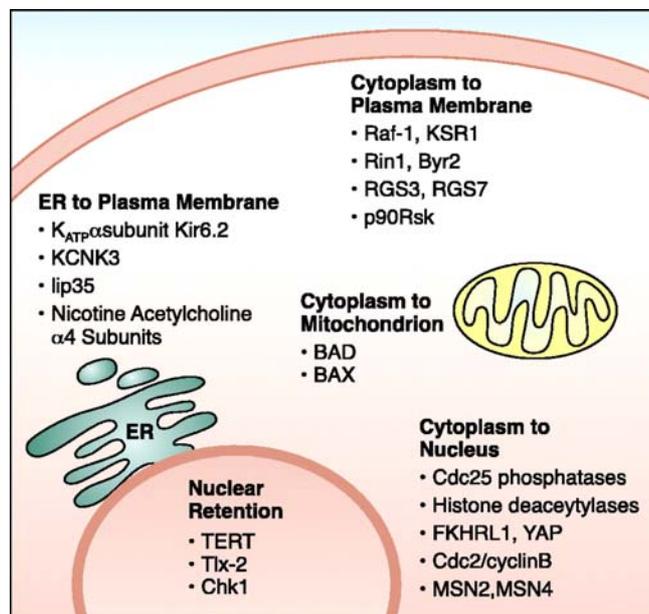
Jedes 14-3-3 Monomer besteht aus neun antiparallel angeordneten  $\alpha$ -Helices. Bei einem Dimer bilden zwei L-förmige Monomere eine U-förmige Struktur, wobei jeweils vier der neun Helices eine amphipatische Bindungstasche zur Interaktion mit Partnern formen. Die Aminosäuren im Bereich der Interaktionsdomäne sind zwischen den einzelnen Isoformen hoch-konserviert. Orange dargestellt sind die mit dieser Furche interagierenden Peptide mit Phosphoserinrest.

### 1.3.2 Funktionen von 14-3-3

Für die Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit ihren Liganden werden in vielen Fällen spezifische Phosphoserinmotive benötigt (Muslin et al., 1996). In Übereinstimmung besitzen die meisten Bindungspartner von 14-3-3 Proteinen phosphorylierte Erkennungsmotive der Konsensussequenz RSXpSXP, RXRXXpSXP oder RXXpS, wobei pS einen Phosphoserinrest bezeichnet, an den 14-3-3 bevorzugt bindet (Muslin *et al.*, 1996; Aitken, 1996; Yaffe *et al.*, 1997; Fu et al., 2000). Diese Phosphomotive können auch durch MARK/PAR-1 erzeugt werden. MARK3/C-TAK1 ist z.B. in der Lage, die Tyrosinphosphatase PTPH1, CDC25 und den Suppressor von Ras/MAPK KSR an einen Serinrest zu phosphorylieren und somit die Bindungsstelle für 14-3-3 zu schaffen (Müller et al., 2003; Peng et al., 1998; Müller et al., 2001; Zhang et al., 1997). PAR-1 aus *Drosophila* phosphoryliert das Ser743 von Raf oder den äquivalenten Serinrest der Homologen, so dass eine Bindung an 14-3-3 möglich ist (Benton et al., 2002). Mittlerweile ist bekannt, dass 14-3-3 auch mit unphosphorylierten Stellen interagiert. Raf1 besitzt z.B. eine weitere 14-3-3-Bindungsstelle in der cysteinreichen Domäne (CRD), die keine Phosphorylierung benötigt (Winkler et al., 1998; McPherson et al., 1999).

Mehr als 100 Interaktionspartner von 14-3-3 Proteinen wurden bereits identifiziert. Neben einer Beteiligung an der Kontrolle des Zellzyklusses (Peng et al., 1997) besitzen 14-3-3 Proteine auch regulatorische Funktionen bei apoptotischen Prozessen (Zha et al., 1996), der Synthese von Neurotransmittern (Ichimura et al., 1987), neuronalen Entwicklungsprozessen (Chang et al., 1997; Skoulakis and Davis, 1998) und der gesteuerten Sekretion (Morgan and Burgoyne, 1992; Broadie et al., 1997). Zusätzlich sind viele Interaktionen zwischen 14-3-3 Proteinen und Komponenten der Signaltransduktionskaskaden bekannt. Darunter finden sich u. a. Raf-1 Kinase (Fantl et al., 1994), Bcr-Abl (Reuther et al., 1994), Protein Kinase C (Meller et al., 1996) und Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3-Kinase; Bonnefoy-Berard et al., 1995). 14-3-3 Proteine wie auch MARK/Par1 spielen eine entscheidende Rolle bei der Polaritätsentwicklung in *Drosophila*, wo sie als PAR5 bekannt wurden (Morton et al., 2002). Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen im Gehirn sind 14-3-3 Proteine in viele neuronale Krankheiten involviert wie z.B. Creutzfeldt-Jacob- (Hsich et al., 1996; Baxter et al., 2002), Parkinson- (Kawamoto et al., 2002; Ubl et al., 2002) und Alzheimer-Krankheit (Layfield et al., 1996).

Ein wichtiger Mechanismus, durch welchen 14-3-3 Proteine ihre Interaktionspartner beeinflussen, ist die Regulierung ihrer intrazellulären Lokalisation (Abbildung 8). 14-3-3 Proteine befördern z.B. die zytoplasmatische Lokalisation von Bad und Cdc25 und die nukleäre Lokalisation der Untereinheit der Telomerase (TERT: *telomerase reverse transcriptase*). Diese Effekte werden meistens dadurch erzielt, dass 14-3-3 Proteine die Lokalisationssequenzen der Interaktionspartner, wie z.B. NLS (*nuclear localization sequenz*) und NES (*nuclear export sequenz*), direkt bedecken oder eine Konformationsänderung hervorrufen, so dass sie nicht mehr von Import-/Exportproteinen erkannt werden können.



**Abbildung 8: 14-3-3 als Regulator der Proteinlokalisierung (Dougherty et al., 2004)**  
 Dargestellt sind Proteine, deren Lokalisation durch 14-3-3 reguliert wird.

Es wurde berichtet, dass 14-3-3 Proteine bei der Proteinsortierung vom ER zur Plasmamembran eine wichtige Rolle spielen (O’Kelly et al., 2002; Yuan et al., 2003). Der Transport der Proteinkomplexe vom ER zur Membran wird streng reguliert, so dass keine Proteine zur Membran geleitet werden, die noch nicht ausgereift sind. Das Protein COPI (*coat protein I*) spielt eine entscheidende Rolle in diesem Prozess (Kreis et al., 1995, Review). Durch Bindung von COPI an bestimmte Sequenzen der Zielproteine werden die Proteinkomplexe im ER festgehalten oder in das ER zurücktransportiert (Ellgaard und Helenius, 2003; Ma und Jan, 2003). Diese Bindung kann durch eine Interaktion zwischen 14-3-3 und den Proteinkomplexen inhibiert werden, was eine Freisetzung der Proteinkomplexe von COPI bewirkt und einen Transport der Komplexe zur Plasmamembran ermöglicht (O’Kelly et al., 2002; Yuan et al., 2003).

### 1.3.3 Regulation von 14-3-3

14-3-3 Proteine können durch Phosphorylierung reguliert werden. Drei Phosphorylierungsstellen wurden bei 14-3-3ζ identifiziert, Ser58 (Aitken et al., 1995),

Ser184 (Megish et al., 1998) und Thr232 (Dubois et al., 1997). Ser184 liegt nah am oberen Bereich der Interaktionstasche, mitten in einer Konsensus-Sequenz, die von den Prolin-gerichteten Kinasen erkannt werden kann. Diese Lokalisierung ergibt die Möglichkeit, dass die Phosphorylierung dieser Stelle eine Rolle bei der Liganden-Bindung spielt. Allerdings können Kinasen, die Serin184 phosphorylieren, bis heute nicht detektiert werden. Thr232, das durch CKI phosphoryliert wird (Dubois et al., 1997), befindet sich in dem C-terminalen Loop. Diese Region ist auch in die Regulation der Liganden-Bindung involviert (Liu et al., 1995). Ser58 ist ein entscheidender Aminosäurerest für die Dimerisierung von 14-3-3 und kann durch SDK1 phosphoryliert werden (Megidish et al., 1998). Eine Phosphorylierung an dieser Stelle übt einen inhibitorischen Einfluss auf die Dimerisierung von 14-3-3 aus (Woodcock et al., 2003).

R. Benton und Mitarbeiter 2002 (Benton et al., 2002) identifizierten PAR-1 in *Drosophila* als neuen Interaktionspartner von 14-3-3 $\epsilon$ , das auch als PAR-5 in der Polaritätsentwicklung bekannt wurde. Sie zeigten, dass 14-3-3 als Vermittler der PAR-1-Funktion in der asymmetrischen Achsenbildung von *Drosophila* dient. Parallel zu dieser Publikation wurden 14-3-3 $\beta$  und - $\zeta$  auch in unserer Arbeitsgruppe als Interaktionspartner von MARK2 identifiziert (Matenia et al., 2005).

### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Regulation der Proteinkinase MARK untersucht werden.

Ausgangspunkt war der Befund, dass MARK durch eine andere Kinase (MARKK) phosphoryliert und damit aktiviert werden kann (Timm et al., 2003). Deshalb sollte die Interaktion zwischen den beiden Kinasen und die funktionelle Relevanz näher untersucht werden.

Ein zweiter Ansatzpunkt war die Suche nach den neuen Interaktionspartnern von MARK mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens. Dies führte zu dem 14-3-3 Protein, das ubiquitär exprimiert und in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert ist. Die Wechselwirkung

zwischen 14-3-3 und MARK und ihre funktionelle Wirkung sollten charakterisiert und auf zellulärer Ebene überprüft werden.

Schließlich sollte untersucht werden, ob MARK, MARKK und 14-3-3 in Zellen als Komplex vorliegen und welchen Effekt dies auf die Regulation von MARK hat.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blottingkammer	Semi-Dry	VWR
DNA-Sequenzierungsgerät	ABI Prisma 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer
Szintillationszähler	Tricarb 1900 CA	Packard Canberra Ltd
French Press	Pressure Cell 20 kpsi	SLM Aminco
Luminescent Image Analyzer	LAS3000	Fuji
PCR-Gerät	Mastercycle personal	Eppendorf
Photometer	Ultrospec 300 Pro	Amersham Pharmacia Biotech
Inkubator	Innova <sup>TM</sup> 4300	New Brunswick Scientific
Zentrifuge	J2-21M/E	Beckman
Zentrifuge	Minifuge A	Hereaus
Kühlzentrifuge	5402	Eppendorf
Gelelektrophorese-System	SE200	Hoefer/Amersham Pharmacia Biotech
Ultrazentrifuge	TL-100	Beckman
Ultrazentrifuge	Optima <sup>TM</sup> LE-80K	Beckman Coulter
Homogenisator	DIAX 900	Heidolph
Phospho-Imager	BAS3000	Fuji
Fluoreszenzmikroskop	LSM 510 Meta	Zeiss

### 2.2 Chemikalien, Enzyme und Antikörper

#### 2.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Amersham, Sigma, Fluka, Roth, Roche, Calbiochem, Gibco-BRL oder Merck bezogen.

#### 2.2.2 Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
<i>PfuUltra</i> <sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene
Alkalische Phosphatase	Roche

### 2.2.3 Molekulargewichtsmarker

#### Proteinmarker:

- *Protein Molecular Weight Marker (SM0431, MBI Fermentas)*

Markerproteine:	β-Galaktosidase	116 kD
	BSA	66,2 kD
	Ovalbumin	45,0 kD
	Lactatdehydrogenase	35,0 kD
	Restriktionsendonuklease Bsp981	25 kD
	β-Laktoglobulin	18 kD
	Lysozyme	14 kD

- *Protein Marker für Westernblot (MagicMark™, Invitrogen)*

#### DNA-Marker:

*Smart-Ladder (Fermentas)*

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

### 2.2.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller	
<b>Primäre Antikörper</b>	Anti-HA-Antikörper	Cell Signaling
	Anti-HA-Antikörper-Agarose Konjugate	Santa Cruz
	Anti-14-3-3-Antikörper	Santa Cruz
	Anti-MARKK/TAO1-Antikörper	BD Science
	Anti-α-Myc-Tag (9E10)	Santa Cruz
	Anti-His-Antikörper	Novagen
	Anti-MARK-Antikörper	MPA
	Anti-Tublin-Antikörper (YL1/2)	Serotec
<b>Sekundäre Antikörper</b>	Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	DAKO
	Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	DAKO
	α-Maus/α-Ratte-Antikörper/Cy5	Molecular Probes
	α-Maus/α-Ratte-Antikörper/TRITC	Molecular Probes

### 2.2.5 Kits

Kit	Hersteller
BaculoGold™ Transfection Kit	PharMingen
ECL Western Blotting Detection	Amersham
Plasmid Maxi Kit	Macherey-Nagel
Plasmid Mini Kit	Invitex
Gel Extraction Kit (Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit)	Dianova
Quick-Change™ Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Gateway Cloning Kit	Invitrogen
Gateway Expression Kit	Invitrogen
Effecten Transfection Reagenz	Qiagen

## 2.3 Stämme, Viren und Zelllinien

### 2.3.1 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

Bezeichnung	Genotyp	Quelle
DH5α	F <sup>-</sup> φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) <i>phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Gibco BRL
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )].	Stratagene
BL21	F - <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal</i>	Stratagene

### 2.3.2 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Bezeichnung	Genotyp	Quelle
AH109	<i>MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his 3-200 gal4Δ gal80Δ</i> <i>LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3 GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2</i> <i>URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech

### 2.3.3 Baculoviren

Es wurden Baculoviren hergestellt, die für folgende Proteine kodieren:

<b>MARKK</b>	His/MARKK wt	
<b>14-3-3</b>	His/14-3-3 ζ	
<b>MARK2</b>	HA/MARK2 wt	HA/MARK2-dn (T208A/S212A)

### 2.3.4 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Organismus	Spezifikation
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Insekteneierstockzellen
PC12	<i>Rattus norvegicus</i>	Pheochromocytoma-Zellen
CHO	Hamster	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster

## 2.4 Plasmide

Bezeichnung	Charakterisierung	Quelle
pDEST 15	7,0 kb, pBR322 ori, Amp <sup>r</sup> , attR1, Cm <sup>r</sup> , ccdB, attR2	Invitrogen
pDONR201	4,5 kb, pUC ori, Kmr, attL1, Cm <sup>r</sup> , ccdB, attL2	Invitrogen
pGBKT7	7,3 kb, Kan <sup>R</sup> , Tryptophan Selektionsmarker, Gal4-DNA- Bindedomäne vor Polylinker	Clontech
pGADT7	7,3 kb, Amp <sup>R</sup> , Leucin Selektionsmarker, Gal4-Aktivierungsdomäne vor Polylinker	Clontech
pEU	5.475 kb, Amp <sup>R</sup>	MPA
pVL1392*	9,6 kb, Amp <sup>R</sup> , veränderte MCS, His-Tag am N-Term	MPA
pYFP-C1	4,7 kb, Kan <sup>R</sup>	Clontech
pCFP-C1	4,7 kb, Kan <sup>R</sup>	Clontech

## 2.5 Medien

### 2.5.1 Bakterienmedien

LB-Medium	LB Broth	25 g/l
LB-Agar	LB Broth	25 g/l
	Bacto-Agar	25 g/l
SOC-Medium	Bacto Trypton	20 g/l
	Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Glucose	2%

### 2.5.2 Zellkulturmedien

Sf9-Medium	Grace's Insekten Medium	Gibco
	FCS	100 ml/l
	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml)	10 ml/l
CHO-Medium	HAM-Medium	Gibco
	FCS	100 ml/l
	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml)	10 ml
	L-Glutamin	10 ml/l

### 2.5.3 Hefemedien

<b>Aminosäure-Dropout-Lösung (100 x)</b> Die in der jeweiligen Drop-out-Lösung nicht benötigten Aminosäuren wurden weggelassen	Arginin	2 g/l
	Histidin	1 g/l
	Isoleucin	6 g/l
	Leucin	6 g/l
	Lysin	4 g/l
	Methionin	1 g/l
	Phenylalanin	6 g/l
	Threonin	5 g/l
	Tryptophan	4 g/l
<b>Selektionsmedium (SM)</b>	Difco-Hefe-Stickstoffbasis oh. AS	8 g/l
	Tyrosin	55 mg/l
	Uracil	55 mg/l
	Adenin	55 mg/l
	100 x AS-Dropout-Lösung	1:100
	Glucose	2%
<b>Vollmedium (YEPD)</b>	Hefe-Extrakt	11 g/l
	Bacto-Pepton	22 g/l
	Adenin	55 mg/l
	Glucose	2%

## 3 METHODEN

### 3.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

#### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion ermöglicht die selektive Anreicherung von Genabschnitten definierter Sequenz und Länge in einem sich vielfach wiederholenden Prozess (Mullis et al., 1986). Das Prinzip der PCR basiert auf der Trennung des DNA-Doppelstranges in zwei Einzelstränge (ssDNA) durch Hitze (Denaturierung), der darauf folgenden Anlagerung der Primer, an die freien 5'-Enden der beiden ssDNA (Annealing) und der anschließenden Aktivität einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, die in Gegenwart freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP) die Primer verlängert (Elongation) und den zu den ssDNA komplementären Strang synthetisiert. Der letzte Schritt, die Elongation, erfolgt bei einer Temperatur zwischen 68°C und 72°C. Mit jedem Durchlaufen eines Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle exponentiell amplifiziert.

Die Reaktion erfolgte im PfuUltra-Reaktionspuffer mit 200 µM dNTPs (Stratagene), 200 nM Primer, 50-150 ng Plasmid-DNA und 1 U pfuUltra-DNA-Polymerase (Stratagene).

PCR-Reaktionsbedingungen:

Denaturierung	92°C	30 s	} 35 x Wiederholungen
Primerannealing	Primer T <sub>m</sub> -5°C	30 s	
Elongation	72°C	1 Minute pro kb DNA	

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

#### 3.1.2 Gelelektrophorese von DNA

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in 1%-igen Agarose-Gelen, wobei 1x TAE (40 mM Tris-Acetat pH 8,0, 2 mM EDTA) als Laufpuffer diente. Um die Größe der aufgetrennten Banden abschätzen zu können, wurde ein standardisierter DNA-

Längenmarker (Smart-Ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Gele liefen bei einer Spannung von 100 V und wurden anschließend in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Nach Entfärbung im Wasserbad wurden die Gele mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die DNA mit dem interkalierten Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografiert werden konnte. Im Fall einer präparativen Elektrophorese wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

### **3.1.3 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Nach Auftrennung in einem Agarosegel wurde die gewünschte DNA-Bande mit dem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Eluation gewünschter DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte mit dem „Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers (Dianova).

### **3.1.4 Restriktion von DNA**

Für analytische Schnitte wurden ca. 50 ng DNA mit 1 U Restriktionsendonuklease (NEB) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Schnitte wurden unter identischen Bedingungen mit ca. 1 µg DNA und 5 bis 10 U Enzym durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 Volumen 6 x Probenpuffer (15% Ficoll in TAE, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF) gestoppt und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### **3.1.5 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden**

Um bei einer Klonierungsreaktion eine Religation linearisierter Vektoren zu vermeiden, wurden die resultierenden 5'-DNA-Enden einer Dephosphorylierung unterzogen. Hierfür wurde der Ansatz, der den linearisierten Vektor enthielt, mit 10% Volumenteil des 10-fach konzentrierten Dephosphorylierungspuffers versetzt. Nach Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase (Roche), erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C.

### 3.1.6 Ligation

Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmentenden geschah mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Die Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen. Für die Konstruktion von Plasmiden wurden die linearisierte Vektor-DNA und das zu inserierende Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im Ligase-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, pH 7,5 @ 25°C) mit 2 U T4-DNA-Ligase bei RT für 4 h oder über Nacht bei 16°C.

### 3.1.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen BL21 wurde CaCl<sub>2</sub>-Methode verwendet. Durch Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> wird die Zellmembran durchlässig für DNA-Moleküle (Dagert und Ehrlich, 1979). 50 mL Luria-Bertani-(LB)-Medium (1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Caseinhydrolysat, 0.5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 50 µg/ml Chloramphenicol) wurden mit 500 µl einer Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli* Stammes BL21 (Stratagene) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4 - 0.5 bei 37°C und 170 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Kultur 10 min auf Eis abgekühlt. Nach 10-minütiger Abzentrifugation bei 1000 g und 4°C wurde das Pellet in 25 ml eiskalter steriler 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut 5 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3.5 ml eiskalter steriler 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und in diesem Zustand bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt.

### 3.1.8 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Standardtransformation wurden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 3-5 µl Ligationsansatz oder 1-2 µl Plasmid-DNA zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzschock für 45 s bei 42°C im Wasserbad, gefolgt von einer zweiminütigen Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 200 µl auf RT erwärmtem SOC-Medium wurden die Bakterien für 60 min unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die gesamten Zellen (bei Ligation)

oder 10 µl (Plasmid-DNA) der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit dem geeigneten Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.9 Erstellung von Punktmutation

Um eine Punktmutation in ein Stück DNA einzufügen, wurde der QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet. Dabei wurden Primer eingesetzt, die zusätzlich eine oder mehrere Punktmutationen tragen. Durch PCR wurde während der Amplifizierung der gesamten DNA die Mutation inseriert.

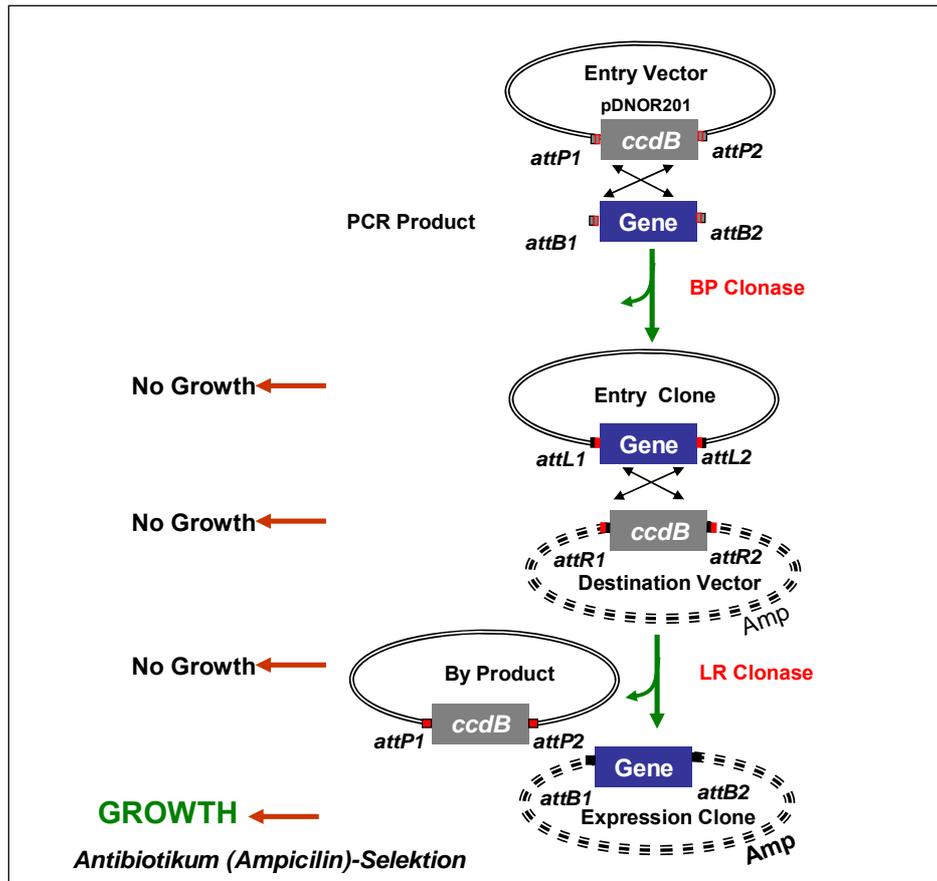
Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

### 3.1.10 Klonierung mit dem Gateway-System

Die Invitrogen Gateway Technologie basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda. Sequenzspezifisch wird von diesem Phagen die eigene DNA ins Wirtsgenom integriert und kann auch wieder herausgeschnitten werden. Die dafür notwendigen „Klonasen“ wurden zu einem Klonierungssystem zusammengestellt, mit dem beliebige DNA-Fragmente, z.B. ORFs zunächst in Plasmide kloniert, und anschließend zwischen Plasmiden hin und her geschoben werden können.

Zunächst wird ein Gen/ORF amplifiziert, indem attB-Rekombinationssequenzen sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende angehängt werden. Das DNA-Segment kann aus dem PCR-Produkt in der ersten Reaktion (BP-Reaktion) in einen "Eingangs-Vektor" (*Entry Vector*, pDONR) rekombiniert werden. Von dort aus kann es in der zweiten Reaktion (LR-Reaktion) in verschiedene "Ziel-Vektoren" (*Destination Clone*, pDEST) transferiert werden. Daraus entstehen die Expressionsklone mit gewünschten Genen. Die verwendeten Enzyme ersetzen das ccdB-Gen aus den pDONR- und pDEST Vektoren durch den ORF, und das ccdB-Gen erscheint in einem Beiprodukt. Über die Antibiotikum-Resistenz der Vektoren kann auf rekombinante Klone selektioniert werden. Bakterien, die einen nicht-rekombinanten Entry Vector, welcher das ccdB Gen trägt, enthalten, sind nicht lebensfähig, denn das ccdB-Protein inhibiert die DNA Gyrase. Das Prinzip des Gateway-Systems ist in der Abbildung 9 schematisch dargestellt.

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Klonierung mit dem Gateway-System (Invitrogen)**

Für die Integration des Lambda Phagen werden die „attachment sites (*att*)“ im Phagen (*attP*) und im Bakteriengenom (*attB*) benötigt. Während der Exzision des Phagengenoms aus dem Wirtgenom rekombinieren *attR* und *attL* miteinander. Bei der BP-Clonase handelt es sich um ein Gemisch aus der  $\lambda$ -Integrase und dem Integrations-Host Faktor, während die LR-Clonase aus Integrase, Integrations-Host Faktor und Exzisionase besteht.

Für die Klonierung von GST-14-3-3 $\zeta$  Konstrukten wurde pDONR201 als Eingangsvektor und pDEST15 als Zielvektor verwendet. pDEST15 kodiert ein GST-Gen, worauf das Gen des Zielproteins angeschlossen werden kann. Dieser Vektor eignet sich für die Proteinexpression in *E. coli*.

### 3.1.11 Plasmid isolation aus *E. coli*

Um kleine oder große Menge von Plasmid-DNA zu isolieren, wurden jeweils Mini- und Midi-Präparationen durchgeführt. Alle Plasmidpräparationen basieren auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Für die Mini-Präp wurde „Invisorb Spin Plasmid Mini-Kit“ (Invitex) und für Midi-Präparation „Nucleobond AX Kit“ der Firma

Macherey-Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### **3.1.12 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde die Konzentration der DNA bestimmt. Dabei wurde die Absorption der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm gemessen. Eine OD von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al. 1989). Die Verunreinigung mit Proteinen lässt sich durch den Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  vermitteln. Hierbei gilt 1.8 als guter Reinheitsgrad für DNA.

### **3.1.13 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde durch die Sanger-Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt.

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:

Denaturierung	95°C	30 sec	} 25 x Wiederholungen
Annealing	40°C	30 sec	
Elongation	60°C	4 min	

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

## **3.2 Biochemische Arbeitsmethoden**

### **3.2.1 Herstellung von Zellhomogenaten**

Nach dem Ernten wurden die Zellpellets in Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM Chapso, 100 mM NaCl, 3 mM Na-EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM Benzamidin, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche))

resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 14000 rpm, 4°C) wurde der resultierende Überstand für weitere Studien verwendet.

### 3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Verfahren basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G250 von 465nm zu 595nm, wenn der Farbstoff mit den Proteinen Komplexe bildet (Bradford *et al.*, 1976). 2 µl Proteinlösung wurden mit 200 µl Bradfordreagenz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Probe bei 595 nm gegen einen Nullwert ohne Protein gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer mit Proteinstandards (BSA) erstellten Eichkurve.

### 3.2.3 SDS-PAGE

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Laemmli-Systems. Es wurden sowohl isokratische (10%- oder 17%-ige) als auch diskontinuierliche Trenngele mit einem linearen Gradienten von 7-15% Polyacrylamid eingesetzt. Die Sammelgele waren jeweils 4%-ig. Die Proteine wurden mit 5 x Protein-Probenpuffer (500 mM Tris pH 6,8, 5% (w/v) SDS, 50% Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und unmittelbar darauf für 3 min bei 95°C erhitzt.

### 3.2.4 Anfärbung der Gele

#### Coomassie-Färbung

Gefärbt wurde mit einer Lösung aus 0,1% Coomassie Blue R-250 (w/v), 45% Methanol und 9% Essigsäure für 20 min. Entfärbt wurde in einer Lösung aus 50% Methanol und 10% Essigsäure für 20 min.

#### Silber-Färbung

Die Silberfärbung wurde wie folgt durchgeführt: 1. Fixierung der Proteine für 20 min in einer Lösung aus 30% Ethanol und 10% Essigsäure. 2. Vernetzung für 30 min bis über Nacht in einer Lösung aus 30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% Glutaraldehyd und

0,2% Natriumthiosulfat. 3. Dreimaliges Waschen in Millipore-Wasser jeweils 10 min. 4. Färbung für 30 min in 0,1% Silbernitrat-Lösung mit 0,02% Formaldehyd. 5. Zweimaliges Waschen mit Wasser jeweils 20 sek. 6. Entwicklung nach Bedarf in 2.5%-iger Natriumcarbonat-Lösung mit 0,01% Formaldehyd. 7. Stoppen der Reaktion mit 0,05 M EDTA.

### 3.2.5 Westernblot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in Anlehnung an Towbin *et al.* (1979) auf PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran (Milipore) wurde zuerst durch Methanol aktiviert. Anschließend wurden die Membran, das Gel sowie die Filterpapiere in Blotting-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 5 % Methanol, 0.0375 % (w/v) SDS) für 10 min bei RT äquilibriert. Das Blotting erfolgte mit einer Semi-Dry-Blotkammer der Firma Brenzel-Bio-Analytik bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup>.

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte immunologisch mit Antikörpern. Dafür wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT mit Blockierungspuffer (5% (w/v) Milchpulver in TBS-Tween, 10 mM Tris-HCl pH 7,2; 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween20) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach gründlichem Waschen in TBS-Tween wurde die Membran 1 h bei 37 °C mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert.

Nach erneutem sorgfältigem Waschen wurde der Blot nach Vorschrift des Herstellers mit ECL-Luminolreagenz (Amersham) behandelt. Die Signale wurden mit einem LAS-3000 Gerät (Fuji) aufgenommen.

### 3.2.6 Präparation GST-markierter Proteine

Durch die Verwendung spezifischer Markerstrukturen („Tags“) lassen sich rekombinante Fusionsproteine nach Überexpression in Bakterien leicht isolieren. Hochaffine immobilisierte Liganden gegen die Markerstruktur erlauben eine gezielte Aufreinigung entsprechend markierter Fusionsproteine. In dieser Arbeit wurden GST-Fusionsproteine eingesetzt, deren Aufreinigung über immobilisiertes Glutathion erfolgte.

Nach Transformation der Vektorkonstrukte in den elektrokompetenten *E. coli*-Stamm BL21 wurde eine Bakterienkultur bei 37°C unter kräftigem Schütteln bis auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,6 angezogen. Nach Zugabe von 0,2 µM IPTG wurde die Proteinexpression induziert und die Kultur bei 24°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Sedimentation (4000 rpm, 10 min) der Bakterien und die Aufnahme des Zellpellets in Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM Chapso, 100 mM NaCl, 3 mM Na-EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM Benzamidin, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)). Der Aufschluss der Zellen wurde zweimal in einer „French-Press“ durchgeführt. Das resultierende Lysat wurde durch Zentrifugation (45 min, 45.000 rpm) von groben Zelltrümmern sowie unlöslichen Membranbestandteilen befreit. Anschließend wurde eine 50% Glutathion-Sepharose-4B-Suspension (Amersham-Pharmacia) in Verhältnis 1:10 zu dem Lysat gegeben und 2 h bei 4°C auf einer rotierenden Plattform inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 10 Volumen PBS wurden die immobilisierten Fusionsproteine von der Matrize mittels Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) eluiert. Die Elution erfolgte durch 15-minütige Inkubation bei 4°C auf einer Plattform und anschließende Zentrifugation bei 500 x g für 5 min. Der Elutionsvorgang wurde dreimal durchgeführt und die Eluate wurden zusammengeführt und über Nacht bei 4°C gegen einen großen Überschuss (1:1000) an Lysispuffer mit 50% Glycerol dialysiert.

### **3.2.7 Aufreinigung rekombinanter His-Fusionsproteine**

Zur Gewinnung His-markierter rekombinanter Proteine wurden Sf9 Zellen, die vorher mit Baculoviren infiziert wurden, geerntet und mit Lysispuffer aufgeschlossen.

Das Zelllysate 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 Aufnehmen 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% Glycerol) dialysiert und bei -20°C gelagert.

### 3.2.8 Koimmunopräzipitation

Die Methode der Koimmunopräzipitation wurde in dieser Arbeit dazu eingesetzt, um die Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen zu untersuchen. Dazu wurde das Lysat der Sf9-Zellen verwendet, die mit HA-markierter MARK infiziert wurden. Der an Agarose immobilisierte Anti-HA-Antikörper wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml zu den Lysaten gegeben und anschließend zusammen für 4 h oder über Nacht auf einer sich drehenden Plattform bei 4°C inkubiert. Wurden Proteine ohne HA-Markierung exprimiert bzw. endogene Proteine untersucht, wurde der entsprechende spezifische Antikörper zu den Lysaten gegeben, worauf eine weitere zweistündige Inkubation mit 10% Volumen 50% Protein-G-Agarose (Amersham Pharmacia Biotech) folgte. Die Matrix und daran bindenden Proteine wurden durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (20 sec bei 4°C, 12000 rpm) sedimentiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit dem Lysispuffer (ohne Detergentien), worauf die sedimentierte Matrix in SDS-Probenpuffer resuspendiert wurde und die gebundenen Proteine durch Westernblot analysiert wurden.

### 3.2.9 *In vitro* GST-Pulldown Assay

Diese Methode dient zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion.

Zuerst wurde die Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) nach dem Herstellerprotokoll behandelt, bis eine 50%-ige Glutathione-Sepharose-Suspension entstand. Um die Interaktion zwischen einem bakteriell exprimierten GST-Fusionsprotein mit anderen in Sf9-Zellen produzierten oder endogenen Proteinen zu testen, wurden das GST allein als Kontrolle und das GST-Fusionsprotein in gleicher Molarkonzentration mit den Zelllysaten über Nacht bei 4°C auf einer sich drehenden Plattform inkubiert. Daraufhin wurde die bereitstehende Glutathion-Sepharose-Suspension dazugegeben, worauf sich ein zweistündiger Inkubationsschritt unter gleichen Bedingungen anschloss. Durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 min bei 4°C wurde die Matrix mit den gebundenen Proteinen sedimentiert. Der Überstand wurde für spätere Untersuchungen separat aufbewahrt, während die Matrix dreimal mit 10-fachen Volumen des Matrixvolumens mit PBS gewaschen wurde. Zum Schluss wurde die Matrix in SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95°C für 3 min gekocht und im Westernblot analysiert.

### 3.2.10 Kinase-Aktivitätstest

Als Aktivitätstest für die rekombinante MARK wurde die Fähigkeit zur Phosphorylierung des Peptids TR1 (<sub>255</sub>-NVKSKIGSTENLK-<sub>268</sub>, die erste repetitive Sequenz des Tau-Proteins) oder das gesamte hTau40 gemessen.

Um die Wirkung von MARKK auf MARK in bezug auf die Tau-Phosphorylierung *in vivo* zu untersuchen, wurden die Sf9-Zellen mit HA/MARK alleine oder mit His/MARKK zusammen infiziert. Nach Durchführung der Koimmunopräzipitation wurden die Immunopräzipitate für die Kinase-Assays verwendet. Für *in vitro* Untersuchungen wurden die in *E. coli* exprimierte MARK (von Dr. T. Timm freundlicherweise zur Verfügung gestellt) mit anderen Komponenten zusammen gemischt.

Die Reaktion (10 µl, davon 1/10 Vol. Kinasen) wurde in Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris pH 7,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Benzamidin, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) mit je 5 µCi γ-[<sup>32</sup>P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech) und 150 µM TR1-Peptid als Substrat durchgeführt. Die Inkubation bei 30°C für 2 h wurde durch Zugabe von TCA (TCA-Endkonzentration 10%) gestoppt. Nach einer 30-minütigen 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, Milipore) 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.

Wurde das gesamte hTau40 als Substrat eingesetzt, wurden die Proteine aus dem Assay nach der Inkubation in SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 3 min bei 95°C gekocht und anschließend in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der radioaktiv markierten Proteinbanden wurde das getrocknete Gel mit einer entladenen Phosphoimagerplatte für 5 min in einer Filmkassette inkubiert. Durch das Laserlicht des Phosphoimagers wurde das Abfallen der durch die β-Strahlung angeregten Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau bewirkt. Die dabei ausgestrahlten Lichtblitze werden vom Phosphorimager (Bio Image Analyser BAS 3000, Fuji) registriert und mit dem Programm „TINA“ (RAYtest Isotopenmessgerät GmbH) datentechnisch verarbeitet.

### 3.2.11 Grobe Fraktionierung

Bei einer groben Fraktionierung entstehen drei Fraktionen: Zellkerne, die löslichen Proteine (Zytosol) und Vesikel. Diese Methode ermöglicht die Charakterisierung der Lokalisierung von Proteinen.

Die Sf9-Zellen wurden geerntet und in Homogenisierungspuffer (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem elektrischen Homogenisator (Firma Heidolph, DIAX 900) bei Stufe 4 für 30 sek homogenisiert. Das Lysat wurde 10 min bei 1.500 x g zentrifugiert und der Überstand (*PNS: postnuclear supernatant*) wurde in ein neues Röhrchen überführt. Das Pellet (Nuklei und intakte Zellen) wurde für spätere Analyse aufbewahrt. Der Überstand wurde 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert. In dem daraus entstehenden Überstand befanden sich die löslichen zytosolischen Proteine und im Pellet die Vesikel-/Membranfraktionen. Das Pellet wurde anschließend in Homogenisierungspuffer plus 1% Detergenz Triton X-100 resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und zum Schluss 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand (Membran) und das Pellet (unlösliche Vesikelfraktionen) wurden getrennt für die weitere Analyse bearbeitet.

### 3.2.12 Subzelluläre Fraktionierung

Durch subzelluläre Fraktionierung kann eine Trennung verschiedener zellulärer Organellen aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften, wie z.B. Größe, Dichte und Ladungen erzielt werden. Dieses Verfahren erfolgt durch Zellaufschluss und anschließende Zentrifugation bei bestimmter Geschwindigkeit, die für jedes Organell spezifisch ist. Nicht nur eine Trennung, sondern auch eine Anreicherung von Signalkomplexen und von seltenen Proteinen wird dadurch ermöglicht. Weitere funktionelle Analysen können mit diesem Verfahren kombiniert werden.

#### 3.2.12.1 Präparation der Iodixanol-Dichtegradienten

In dieser Arbeit wurden die vesikulären Fraktionen von einander getrennt. Hierzu wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, wobei Iodixanol als Medium für die Gradienten verwendet wurde. Iodixanol ist ein nichtionisches inertes Gradientenmedium von relativ geringer Viskosität, das ursprünglich als

Röntgenkontrastmittel entwickelt worden war. Es verhindert die Aggregatbildung von Zellproteinen im Zelllysat. Iodixanol ist in 60%-iger (w/v) Konzentration als OptiPrep™ (Axis-Shield, Norwegen) erhältlich. Der Gradient bestand aus 9 Konzentrationen von Iodixanol (2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20% und 30%). Die 60%-ige Lösung wurde mit Homogenisierungspuffer (10 mM HEPES pH 7,4; 1 mM EDTA, 0,25 M Sucrose, Proteasen Inhibitor Cocktail (Roche)) zu benötigten Konzentrationen verdünnt. Für den Gradienten wurden unterschiedliche Mengen der einzelnen Iodixanol-Lösungen verwendet. Das jeweilige Volumen ist in der Tabelle 2 dargestellt.

<b>Iodixanol-Konzentration (%)</b>	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	30
<b>Volumen im Gradienten (ml)</b>	0,8	1,6	1,6	1,6	0,4	1,6	0,4	0,4	0,24

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Iodixanol-Gradienten**

### ***3.2.12.2 Fraktionierung durch Iodixanol-Dichtegradienten***

Die Sf9-Zellen aus einer T25 Kulturflasche wurden in 2 ml Homogenisierungspuffer (10 mM HEPES pH 7,4; 1 mM EDTA, 0,25 M Sucrose) aufgenommen, der zuvor mit Protease-Inhibitoren (Roche) versetzt worden war. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe eines elektrischen Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 min bei 1500 x g zentrifugiert, dann der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und weiter für 1 h bei 60.000 x g zentrifugiert. Das resultierende Pellet (Vesikelfraktion) wurde in 800 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen und auf einen diskontinuierlichen Iodixanol-Gradienten aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde die Suspension in einem Beckman SW41.14 Rotor bei 35,000 rpm für 2.5 h zentrifugiert. Insgesamt wurden 12 Fraktionen nach Durchstechen des Bodens des Zentrifugationsröhrchens gesammelt.

### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Sf9-Zellkultur

Sf9 ist eine Insektenzelllinie (*Spodoptera frugiperda*). Sie ist sehr empfindlich für die Infektion mit Polyhedrenviren (AcNPV Baculovirus) und kann für Baculovirus-Expression verwendet werden. Sf9-Zellen wurden in Kulturflaschen mit Grace-Medium (Gibco) mit 10% FCS in Kultur gehalten und bei 27°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

##### 3.3.1.1 Herstellung von rekombinatem Baculovirus

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde das Baculovirussystem „BaculoGold“ von PharMingen verwendet.

Virogene Partikel wurden durch gemeinsame Präzipitation von 1 µg des Transferplasmid-Konstrukts mit 0,25 µg linearisierter „BV BaculoGold DNA“ auf 2x10<sup>6</sup> Sf9-Zellen und anschließende Inkubation bei 27°C in TNM-FH Medium (PharMingen) erzeugt.

Nach fünf Tagen wurde der die Viren enthaltende Zellüberstand auf 5 x 10<sup>6</sup> frische Zellen (in 5 mL TNM-FH Medium) gegeben und für weitere drei Tage bei 27 °C kultiviert. Im Lysat dieser Zellen konnte das Protein mittels Westernblot nachgewiesen werden. Der Überstand der Zellen, d.h. das Medium mit den Viren, wurde durch eine Membran mit 0,22 µm Porengröße filtriert und als Arbeitslösung bei 4 °C gelagert.

##### 3.3.1.2 Infektion von Sf9 Zellkulturen

Für die Expression der Proteine wurden die Sf9-Zellen bei einer Dichte von 90% mit Baculoviren infiziert. Die MOI (*Multiple of Infection*) lag bei 1-3. Nach Zugabe der Viren wurden die Zellen bei 27°C für 66-72 Stunden inkubiert.

#### 3.3.2 CHO-Zellkultur

CHO-Zellen stammen aus den Ovarien chinesischer Hamster. Die Zellen wurden für die Experimente in HAM-Medium (Gibco) mit 10 % FCS in Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Kulturschrank kultiviert.

### ***3.3.2.1 Effectene-Transfektion***

Die Proteinexpression in CHO-Zellen wurde durch Transfektion mittels *Effectene Transfection Kit* (Qiagen) erzielt. Das Effectene Reagenz 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  $1 \times 10^4$  Zellen pro 24-Loch-Platte ausgesät. Nachdem die Zellkonfluenz 50-60% betrug, wurden die Zellen mit dem „Effectene-Transfektions-Reagenz Kit“ nach Angaben des Herstellers transfiziert.

### ***3.3.2.2 Immunofluoreszenz***

$1 \times 10^4$  CHO-Zellen wurden in einer 24-Lochplatte auf Deckgläschen ausgesät und nach ca. 24 h transfiziert. Die transfizierten CHO-Zellen wurden am folgenden Tag (nach 16 h) mit 4 % PFA (4 % Formaldehyd in  $1 \times$  PBS-Puffer) für 15 min bei RT fixiert und anschließend dreimal mit  $1 \times$  PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit eiskaltem ( $-20^\circ\text{C}$ ) 80% Methanol für 5 min bei  $-20^\circ\text{C}$ . Die fixierten Zellen wurden erneut 3-mal mit  $1 \times$  PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde mit 10 % Ziegen-Serum in  $1 \times$  PBS für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  blockiert. Die Deckgläschen wurden anschließend direkt mit dem primären Antikörper für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  behandelt, 3-mal mit  $1 \times$  PBS gewaschen und danach mit einem sekundären Antikörper für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach drei Waschschritten mit  $1 \times$  PBS wurden die Deckgläschen in einem Tropfen Permafluor (Immuntech, Marseille) eingebettet. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit dem LSM510-Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt.

### 3.4 Hefe-Zwei-Hybrid-Methoden

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System 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.

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.

Alle Hefe-Interaktionsstudien dieser Arbeit wurden mit dem MATCHMAKER Zwei-Hybrid System 3 (Clontech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.4.1 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmiden

Für die Hefetransformation wurde eine AH109-Übernachtskultur 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.

### 3.4.2 Direkter Zwei-Hybrid-Test

Die Plasmide zweier bekannter Proteine (Köder und Beute) wurden gemeinsam in den Hefestamm AH109 transformiert. Die Transformanten wurden zunächst auf -Leu/-Trp-Selektionsplatten 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-Selektionsplatten 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 das Hefewachstum (Protein-Protein-Interaktion) gut vom Nichtwachstum (keine Wechselwirkung) unterschieden werden.

Um eine noch stringente Selektion der positiven Klone zu erreichen, wurden 100 µl X- $\alpha$ -Gal-Lösung (Clontech, 2 mg/ml DMF), ein Substrat der Galaktosidase, auf den Selektionsplatten ausgestrichen. Das *MEL1/lacZ*-Reportergen kodiert für die  $\alpha$ -/ $\beta$ -

Galaktosidase. Die  $\alpha$ -Galaktosidase ist ein sekretorisches Protein, das bei einer Proteinwechselwirkung direkt ins Medium abgegeben wird. Durch die Umsetzung ihres Substrates X- $\alpha$ -Gal kann neben Wachstum auch eine Blaufärbung der Hefen auf den Indikatorplatten beobachtet werden.

## 4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit handelt von der Regulation der Serin/Threonin-Kinase MARK2. Der Ergebnisteil ist in drei Abschnitte untergliedert. Im ersten Abschnitt wird die Interaktion zwischen MARK2 und MARK-Kinase (MARKK) biochemisch überprüft und die Relevanz dieser Interaktion in Zellen in Bezug auf die Aktivitätsregulation der MARK2 untersucht. Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 $\zeta$ , wobei sowohl *in vitro* als auch in Zellen Untersuchungen durchgeführt wurden. Im letzten Abschnitt sollte eine Komplexbildung dieser drei Proteine und die funktionelle Relevanz dieser Interaktionen überprüft werden.

### 4.1 Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2 und MARKK

Die aus Gehirn gereinigte MARK ist an zwei Stellen phosphoryliert, T215/S219 in MARK1 bzw. T208/S212 in MARK2. Die Behandlung mit Serin/Threonin-spezifischen Phosphatasen führt zum Verlust der Kinaseaktivität (Drewes et al., 1997). Bei der Suche nach einem MARK-aktivierenden Faktor konnte Dr. T. Timm aus unserer Arbeitsgruppe eine MARK Kinase (MARKK) aus Schweinegehirn isolieren. Die Reinigung erfolgte durch mehrere Chromatographieschritte, unter anderem durch Affinitätschromatographie. Als Ligand für die Affinitätschromatographie wurde ein verkürztes His-markiertes MARK2 Konstrukt (AS1-370) eingesetzt. Um eine höhere Stabilität in der Substrat-Kinase-Bindung zu erzielen, wurden zwei Mutationen in MARK2 eingeführt (T208A/S212A) und somit die dominant negative Mutante von MARK2 hergestellt. Der Einsatz der inaktiven MARK2 Kinase erschien von Vorteil, da durch die Eliminierung der Phosphorylierungsstellen in der Aktivierungsschleife eine stabilere Wechselwirkung zwischen MARK2 und Interaktionspartnern erzeugt wird (Timm et al., 2003). MARKK phosphoryliert das Thr208 in der MARK2 und erhöht dadurch die Phosphorylierungs-Aktivität der MARK2 gegenüber Tau um das 10-15fache.

In diesem Abschnitt wird eine direkte Wechselwirkung zwischen MARK2 und MARKK überprüft und die Relevanz dieser Interaktion in Zellen untersucht.

### 4.1.1 Identifizierung der MARKK als Interaktionspartner von MARK2

Die erfolgreiche Anwendung der Affinitätschromatographie mit MARK als Ligand zur Reinigung des MARK-aktivierenden Faktors wirft die Frage auf, ob eine Wechselwirkung zwischen MARK und MARKK nur transient während der Phosphorylierung vorliegt. Es wäre ebenfalls möglich, dass die beiden Proteine dauerhaft aneinander binden oder die Wechselwirkung durch ein drittes Molekül vermittelt wird.

Zuerst wurde versucht, eine direkte Interaktion zwischen MARK und MARKK durch biochemische Methoden zu bestätigen. Zum einen wurde Koimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt, wobei die mit den zu untersuchenden Kinasen infizierten Sf9-Zellen verwendet wurden. Zum anderen wurde die Methode *in vitro* GST-Pulldown eingesetzt, um eine Vermittlung der Interaktion durch andere Proteine möglichst auszuschließen und somit eine direkte Bindung zu verifizieren.

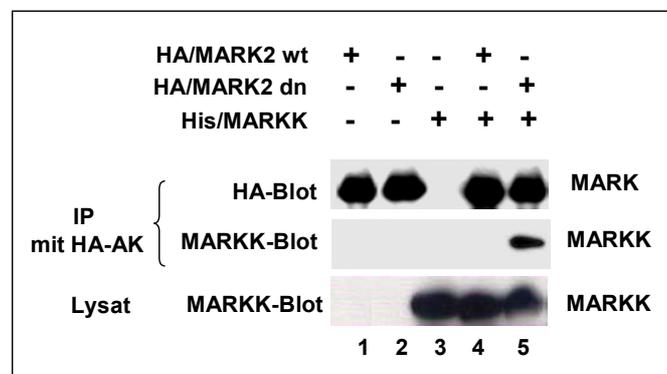
#### 4.1.1.1 Interaktion von MARKK mit MARK2 in Sf9-Zellen

Um eine ideale Menge von mehreren Proteinen in Zelllysaten zu bekommen, wurde das Baculovirusexpressionsvektorsystem (BEVS) gewählt. Das BEVS gilt als eines der leistungsfähigsten eukaryotischen viraler Expressionssysteme und ist im Gegensatz zum bakteriellen System in der Lage, posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierung, Glykosylierung und Acetylierung durchzuführen. Der „*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*“ (VcNPV) ist der am häufigsten verwendete Baculovirus im BEVS. In dieser Arbeit wurde die Insektenzelllinie Sf9 gewählt, die aus Ovarienzellen der Spezies „*Spodoptera frugiperda*“ isoliert und kloniert wurde (Vaughn et al., 1977).

In Sf9-Zellen wurde keine Expression von endogener MARK oder MARKK detektiert. Aus diesem Grund wurde die Expression dieser Proteine mittels Baculovirus-Transfektion in die Sf9-Zellen erzielt. Hierzu wurden die MARK2 mit HA (Hämagglutinin)-Tag und MARKK mit His (poly-Histidin-Sequenz)-Tag an ihrem N-terminalen Ende versehen. Infizierte Zellen wurden nach 66 Stunden geerntet und mit Lysispuffer aufgeschlossen.

Die Zelllysate wurden mit HA-Antikörper-Agarose immunopräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot die kopräzipitierten Proteine analysiert.

Wie aus der Abbildung 10 ersichtlich, konnte die HA/MARK2 mit dem HA-Antikörper-Agarose-Konjugat erfolgreich immunopräzipitiert werden (IP: MARK2). In dem Immunkomplex mit der dominant negativen (dn) Mutante von MARK2 (T208A/S212A) konnte auch MARKK nachgewiesen werden (IP: MARKK; Spur 5), aber nicht in dem Ansatz mit MARK2-Wildtyp (IP: MARKK; Spur 4). Die Quantifizierung mit dem Programm AIDA ergab, dass ungefähr 3,5% der gesamten MARKK aus dem Lysat mit HA/MARK2-dn kopräzipitiert wurde. Eine unspezifische Bindung der MARKK an den HA-Antikörper oder an die Agarose-Matrix wurde dadurch ausgeschlossen, dass in dem Kontrollansatz ohne HA/MARK keine MARKK detektiert werden konnte (Spur 3). Auch Lysate der infizierten Sf9-Zellen wurden im Westernblot untersucht. Es zeigt sich eine ähnliche Expression von MARKK in den Ansätzen der Einzel- und Doppelinfektion (Lysat: Spur 3-5).



**Abbildung 10: Interaktion von MARK2 und MARKK in Sf9-Zellen**

Westernblots der Immunopräzipitate und Zelllysate sind dargestellt. Sf9-Zellen wurden mit HA/MARK2 Wildtyp (wt) bzw. dominant negativer Mutante (dn) allein oder mit His/MARKK zusammen infiziert. Immunopräzipitation wurde mit HA-Antikörper-Agarose durchgeführt. Immunopräzipitate (IP) und Lysat wurden im Westernblot mit dem HA- und MARKK-Antikörper untersucht. Die Quantifizierung mit dem Programm AIDA ergab, dass ungefähr 3,5% der gesamten MARKK aus dem Lysat mit HA/MARK2-dn kopräzipitiert wurde.

Es wurde keine Bindung zwischen MARK-Wildtyp und MARKK detektiert. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Wechselwirkungen zwischen Kinasen und Substraten oft transient verlaufen. Das Substrat wird nach der Phosphorylierung sofort von der Kinase

abgelöst, so dass die Kinase wieder einsatzbereit ist. Die inaktive Mutante von MARK2 (T208A/S212A) kann aufgrund der Mutationen nicht durch MARKK in der Aktivierungsschleife phosphoryliert werden. Somit wird keine Konformationsänderung bei MARK ausgelöst, sie bleibt in der Substratbindungsstelle von MARKK stecken und der Komplex MARK:MARKK wird detektierbar.

### **4.1.1.2 Interaktion von MARK2 und MARKK in vitro**

Da sich in Zelllysaten eine Vielzahl von Proteinen befindet, könnte die Interaktion zwischen MARK und MARKK durch andere Proteine vermittelt sein. Um eine direkte Interaktion von MARK und MARKK zu bestätigen, wurde in einem zellfreien System ein Pulldown-Experiment durchgeführt. Dafür wurden zuerst GST-markierte Konstrukte von MARK2 hergestellt.

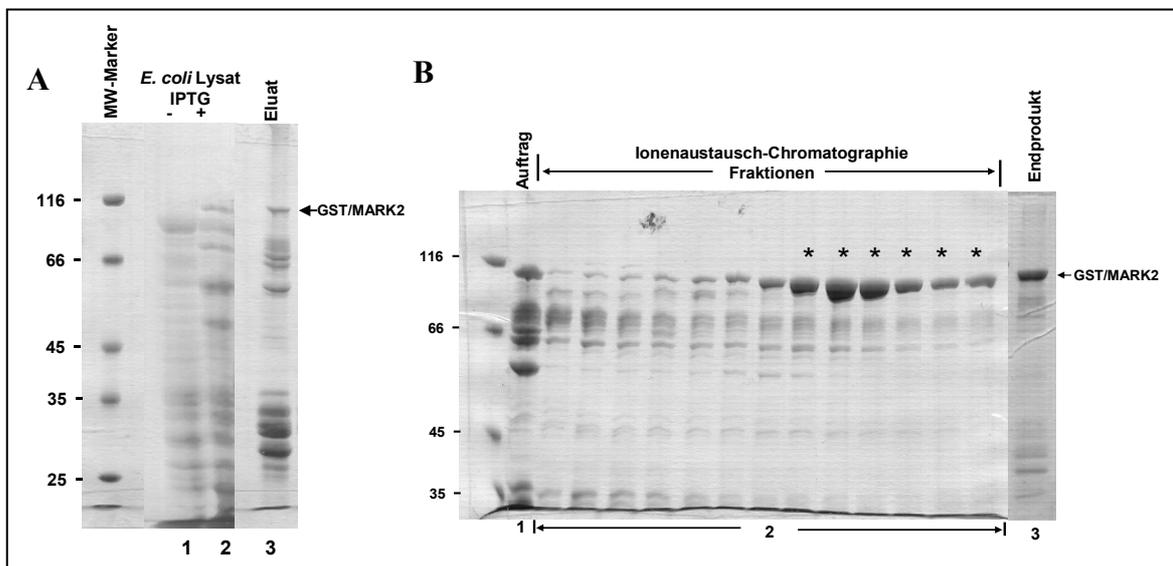
#### **4.1.1.2.1 Expression und Reinigung GST-markierter MARK2**

Glutathion S-Transferase (GST) besitzt eine hohe Affinität zu ihrem Substrat Glutathion, welches sich durch Ankopplung an Sepharose leicht immobilisieren lässt. Durch Bindung von GST Fusions-Proteinen an die Sepharose werden diese sedimentierbar, was nicht nur ihre Reinigung, sondern auch die Untersuchung ihrer Interaktionspartner erleichtert.

Zur Expression von GST/MARK2 wurde der Vektor pGEX-3X verwendet. Dieser Vektor kodiert das GST-Protein, an welches die Kinase fusioniert wurde. Für die Expression wurde der *E. coli* Stamm BL21 (Stratagene) verwendet. Die inaktive Mutante GST/MARK2-T208A/S212A wurde durch enzymatischen Verdau von pGEX-3X/MARK2 und pNG2-MGA-MARK2 (T208A/S212A) (MPA) mit den Enzymen XhoI und DraIII und anschließende Ligation des pGEX-Vektor und MARK-Inserts hergestellt.

Die Abbildung 11 dokumentiert die Reinigung der rekombinanten GST/MARK2. Die Spur 1 und 2 in der Abbildung 11A beinhalten jeweils das Lysat nicht induzierter bzw. induzierter Zellen. In Spur 2 ist nach Induktion mit IPTG auf Höhe der Markierung eine neue Proteinbande zu sehen. In Spur 3 ist das Protein nach Affinitätsaufreinigung mit Glutathion-Sepharose erkennbar, allerdings mit Verunreinigungen, die auf einen starken

Abbau der GST/MARK2 vom C-terminalen Ende her hindeutet. Um den Anteil der Verunreinigung zu reduzieren, wurde ein zweiter Reinigungsschritt durchgeführt, die Ionenaustauschchromatographie. Die dabei erhaltenen Fraktionen (Abb. 11B), in denen die GST/MARK2 eine hohe Dominanz aufweist (durch Stern gekennzeichnet) wurden vereinigt und in Spur 3 (Abb. 11B) aufgetragen. Ein Vergleich zwischen dem Auftrag (Abb. 11B: Spur 1) und dem Endprodukt (Abb. 11B: Spur 3) zeigt, dass die meisten Verunreinigungen durch diesen Schritt entfernt werden konnten. Die Lagerung der Proteine erfolgte nach Dialyse gegen einen Puffer, der 50% Glycerol enthielt, bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Abbildung 11: Expression und Reinigung GST-markierter MARK2**

Die Expression erfolgte im *E. coli* Stamm BL21. Gezeigt sind wichtige Fraktionen der Expression und Reinigung in 10%-igen SDS-Gelen.

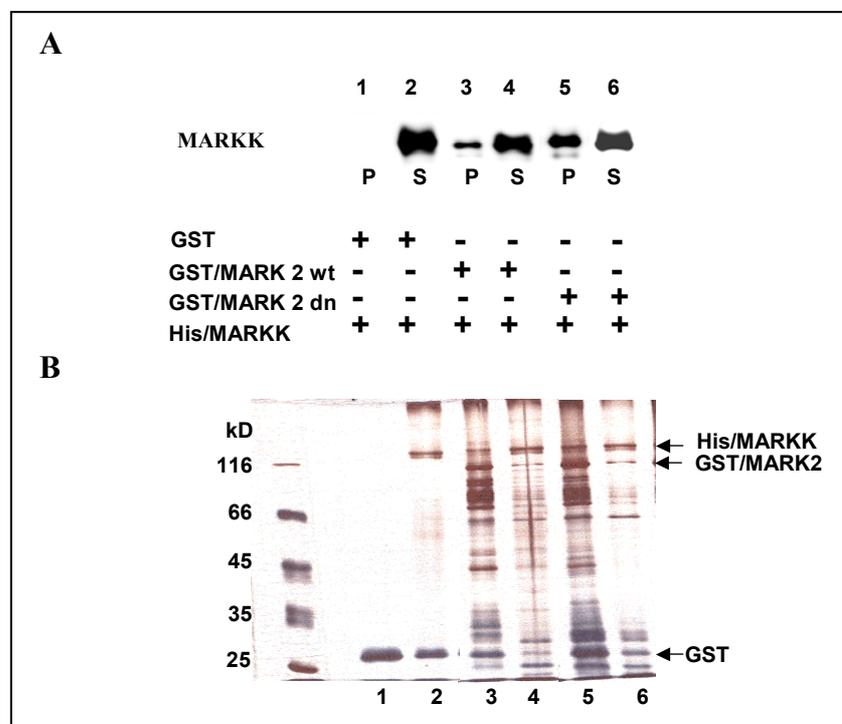
(A) **Expression und Eluat der Affinitätsaufreinigung mit Glutathion-Sepharose.** Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Die Reinigung erfolgte durch Inkubation mit Glutathion-Sepharose und anschließende Elution. Das Eluat enthielt das gewünschte Protein und zahlreiche Verunreinigungen. Ein Westernblot mit GST-Antikörper zeigte, dass diese Verunreinigungen durch den C-terminalen Abbau zustande kamen.

(B) **Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie.** Das Eluat aus der Affinitätsaufreinigung wurde weiter durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Dieser Reinigungsschritt erhöhte die Dominanz von GST/MARK2.

#### 4.1.1.2.2 *In vitro* Pulldown-Assay mit GST/MARK2

Der Pulldown-Assay wird methodisch genutzt, um Proteine aus einem komplexen Gemisch mittels spezifischer Interaktionen zu präzipitieren.

Hierfür wurden die Vollängenkonstrukte GST/MARK2 -Wildtyp oder dominant negative GST/MARK2 (dn) (T208A/S212A) als Köder eingesetzt. Die GST/MARK2 wurde mit His/MARKK, die aus Sf9-Zellen gereinigt wurde, inkubiert und anschließend über eine sedimentierbare Glutathion-Sepharose-Matrix präzipitiert. Das daraus resultierende Pellet (gebundene Fraktion) und der Überstand (ungebundene Fraktion) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch mit Anti-MARKK Antikörper untersucht.



**Abbildung 12: Interaktion von MARK und MARKK *in vitro***

1,5  $\mu$ M GST, GST-markierte MARK2-wt oder MARK2-dn (T208A/S212A) wurden mit 1,5  $\mu$ M His-markierter MARKK in einem gesamten Volumen von 50  $\mu$ l auf einem Rotator für 4 Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurde 5  $\mu$ l 50% Glutathion-Sepharose dazu gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Die ungebundenen (Überstand: S) und gebundenen Fraktionen (Pellet: P) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot auf MARKK untersucht.

**(A) Westernblot der Fraktionen aus dem Pulldown-Assay.** Der Überstand (S) und das Pellet (P) aus dem Pulldown-Assay wurden im Westernblot untersucht. Mit dem Anti-MARKK-Antikörper konnte MARKK nachgewiesen werden.

**(B) Silbergefärbtes 10%-iges SDS-Gel mit Fraktionen aus dem Pulldown-Assay.** Die Pfeile am Rand zeigen die eingesetzten Proteine (His/MARKK, GST und GST/MARK2).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Koimmunopräzipitationsexperimenten in Sf9-Zellen wurde hier eine Wechselwirkung zwischen MARKK und MARK2-Wildtyp detektiert (Abb. 12, Spur 3). Der Grund dürfte nicht nur in den höheren Konzentrationen der Proteine liegen, sondern auch, dass *in vitro*, anders als in Zellen, keine Konkurrenz um die Bindungsstellen an MARK besteht, so dass mehr MARKK an MARK binden konnte und auch nicht von anderen Proteinen verdrängt wurde. Mit inaktiver MARK2 wurde mehr MARKK in dem Pellet detektiert (Spur 5), was auf eine stärkere Bindung beider Kinasen schließen lässt. Die Spezifität der Interaktion zwischen GST-markierter MARK2 und MARKK wird dadurch belegt, dass bei dem Kontrollansatz ohne MARK keine MARKK im Pellet zu sehen ist (Spuren 1).

Die gleichen Proben wurden nach SDS-PAGE durch Silberfärbung visualisiert, um die Menge der als Köder eingesetzten GST-Konstrukte zu überprüfen (Abb. 12B). Die Verunreinigung stammte zum größten Teil aus dem C-terminalen Abbau der GST/MARK (vgl. Abb. 11).

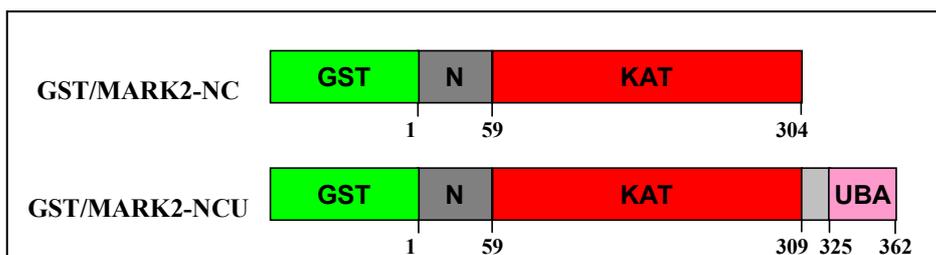
Um die Bindung zwischen MARK2 und MARKK zu quantifizieren, wurden die Stärken der Banden auf dem MARKK-Blot (Abb. 12A) mit dem Programm AIDA ermittelt. Es ergab, dass 25% der gesamten MARKK im Lysat durch GST/MARK2-wt und 41% der gesamten MARKK durch GST/MARK2-dn präzipitiert wurde. Anhand der Formel  $K_d = \frac{[\text{MARK2}] \cdot [\text{MARKK}]}{[\text{MARK2:MARKK}]}$  wurde der  $K_d$ -Wert berechnet. Die Interaktion MARK2-wt:MARKK hat einen  $K_d$ -Wert von ungefähr 3,4  $\mu\text{M}$ , während der  $K_d$ -Wert der Interaktion MARK2-dn:MARKK bei 1,3  $\mu\text{M}$  liegt.

#### 4.1.2 Bestimmung der MARKK-Bindungsstelle an MARK2

Durch die Koimmunopräzipitation und *in vitro* GST-Pulldown Experimente konnte eine direkte Interaktion von MARK2 und MARKK bestätigt werden. In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Bereiche der beiden Proteine miteinander interagieren. Um die Interaktionsdomänen zu charakterisieren, wurden Zwei-Hybrid-Tests mit verschiedenen Domänen der MARK2 von in unserer Gruppe durchgeführt. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass MARKK an die katalytische Domäne der MARK bindet. In diesem Abschnitt sollte dies biochemisch verifiziert werden.

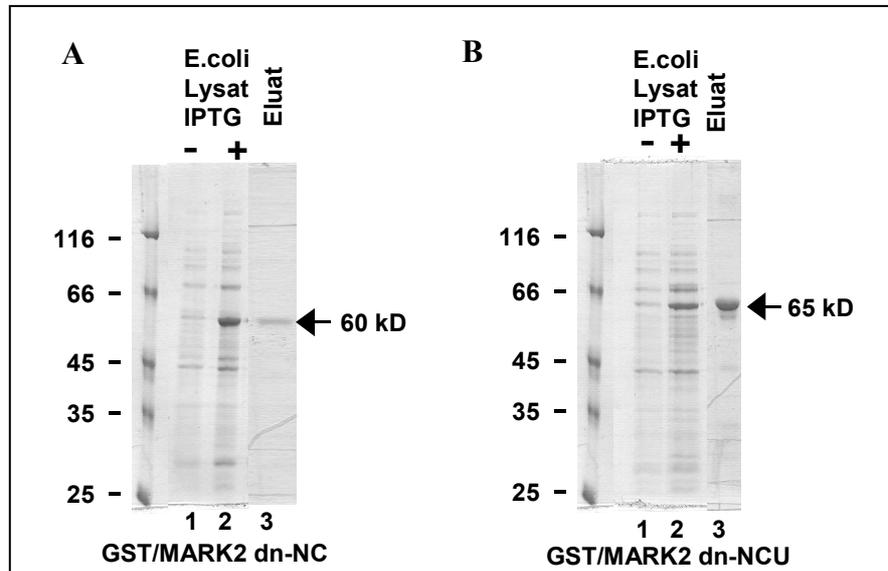
##### 4.1.2.1 Klonierung und Expression der GST/MARK Konstrukte

Zwei verkürzte GST/MARK2 Konstrukte wurden hergestellt. Das eine (GST/MARK2-dn NC) beinhaltet GST, das N-terminale Ende und die katalytische Domäne der MARK2 (AS1-304) und das andere (GST/MARK2-dn NCU) zusätzlich noch die UBA-Domäne (Ubiquitin-assoziierte Domäne) (AS1-362). Aufgrund der stärkeren Bindung der dominant negativen MARK2 Mutante (T208A/S212A) an MARKK wurden nur Konstrukte dieser MARK2 Mutante hergestellt. Die Abbildung 13 zeigt die Domänenstruktur der GST/MARK2 Konstrukte.



**Abbildung 13: Domänenstruktur der GST/MARK2 dn (T208A/S212A) Konstrukte**

Zwei verkürzte GST-markierte Konstrukte von MARK2 wurden hergestellt, in die zwei Punktmutationen (T208A und S212A) eingefügt wurden.



**Abbildung 14: Expression und Reinigung GST-markierter MARK2 Konstrukte**

In den abgebildeten Coomassiegefärbten 10%-igen SDS-Gelen wurden die Expression (Spur 1 und 2) und Reinigung (Spur 3) von GST/MARK2-dn (T208A/S212A)-NC (**Abb. A**) und -NCU (**Abb. B**) gezeigt. Die gewünschten Proteine sind durch Pfeile gezeigt. Aus einer 1,5-Liter Kultur wurden 1 mg GST/MARK2 dn-NC bzw. 1,8 mg GST/MARK2 dn-NCU Protein erhalten.

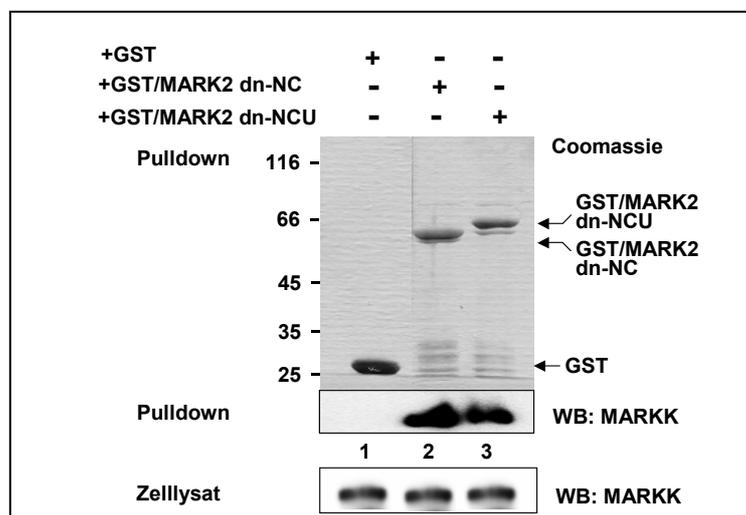
Zur Expression der GST/MARK2 Konstrukte wurde der *E. coli* Stamm BL21 verwendet. Obwohl sich diese zwei Konstrukte nur um 40 Aminosäuren voneinander unterscheiden, wurde ein großer Unterschied bei ihrer Löslichkeit festgestellt. Während das NCU-Konstrukt gut löslich ist und sich gut reinigen ließ (**Abb. 14B**), erwies sich das NC-Konstrukt als schlecht löslich und konnte nur in geringer Menge gereinigt werden (**Abb. 14A**). Allerdings konnte die für den Pulldown-Assay benötigte Menge an Protein aufgereinigt werden.

#### 4.1.2.2 Pull-down-Assay mit GST/MARK2 Konstrukten

Hierzu wurde die MARKK in Sf9-Zellen exprimiert. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die Zelllysate mit 1,5  $\mu$ M GST-MARK-dn Konstrukten inkubiert. Durch die Zugabe der Glutathion-Matrix und weitere Inkubation wurden die Proteine sedimentiert. Zum Schluss wurden die Pellets durch SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-gefärbt oder im Westernblot auf die Anwesenheit von MARKK untersucht.

Der Immunoblot in der Abbildung 15 zeigt deutlich, dass sowohl GST/MARK2 -dn-NC als auch -NCU an MARKK binden können. Es wurde kein signifikanter Unterschied der Bindung von MARKK an diese zwei Konstrukte festgestellt. Bei dem Kontrollansatz mit GST als Köder ist kein Signal sichtbar, was die Spezifität der Bindung zwischen MARK2 und MARKK belegt. Das Coomassiegefärbte Gel zeigt die als Köder eingesetzten GST-Konstrukte, deren Mengen hier vergleichbar sind.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die MARKK an die katalytische Domäne von MARK bindet. Die benachbarte Ubiquitin-assoziierte Domäne wird für diese Interaktion nicht benötigt.



**Abbildung 15: MARKK bindet an die katalytische Domäne von MARK2**

Gezeigt sind die Pull-down-Fractionen in einem Coomassiegefärbten 10%-igen SDS-Gel und im Westernblot. 1,5  $\mu$ M GST-MARK-dn-NC, -NCU oder GST wurden mit Lysat MARKK infizierter Sf9-Zellen inkubiert und anschließend über eine sedimentierbare Glutathion-Matrix präzipitiert. Die gebundenen Proteine wurden immunologisch mit MARKK-Antikörper untersucht. Die vergleichbaren Mengen an GST-Konstrukten belegt das Coomassiegefärbte SDS-Gel. Sowohl bei GST/MARK2 -dn-NC als auch bei -NCU wurde MARKK detektiert, aber nicht bei dem Kontrollansatz GST. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen NC- und NCU-Konstrukte festgestellt werden.

#### 4.1.3 MARKK stimuliert die MARK2-Aktivität in Zellen

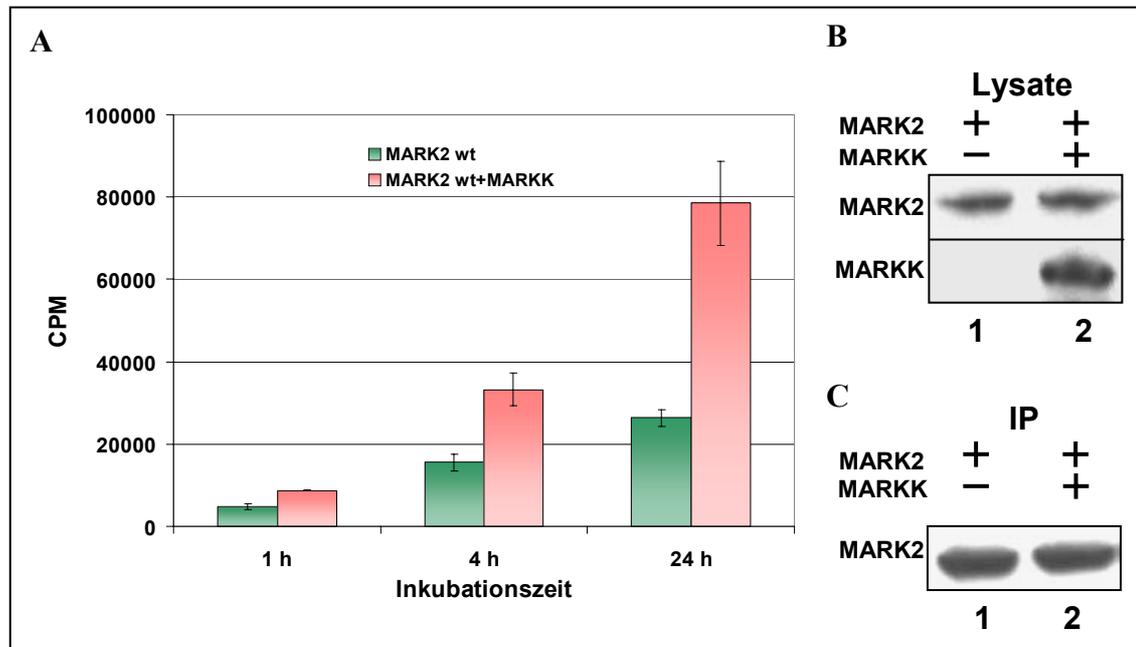
Inkubiert man die zwei Kinasen *in vitro* zusammen, wird MARK2 von MARKK an Thr208 phosphoryliert und ihre Phosphorylierungs-Aktivität gegenüber Tau wird bis zu 15-fach erhöht (Timm et al., 2003). Durch die Koimmunopräzipitation wurde eine direkte Wechselwirkung zwischen MARK2 und MARKK in Zellen bestätigt. Es stellt sich hier die Frage, ob diese Interaktion eine funktionelle Relevanz in Zellen hat. Dies wurde durch Kinase-Aktivitätstest überprüft.

Die Sf9-Zellen wurden mit HA/MARK2 allein oder mit His/MARKK zusammen infiziert. Nach 66 Stunden wurden die Zellysate mit HA-Antikörper, der durch Ankopplung an eine Agarose-Matrix immobilisiert worden war, immunopräzipitiert. Die sedimentierten Fraktionen wurden im Kinase-Assay in Anwesenheit von [<sup>32</sup>P]γ-ATP auf ihre Aktivität untersucht. Als Substrat diente die erste repetitive Sequenz des Tau-Proteins, das TR1-Peptid (255-NVKSKIGSTENLK-268). In diesem TR1-Peptid befindet sich in dem KXGS-Motif die wichtigste Phosphorylierungsstelle Ser262, die durch MARK phosphoryliert wird (Biernat et al., 1993).

Die Abbildung 16A zeigt die Phosphorylierung des TR1-Peptides anhand des Einbaus von radioaktivem Phosphat aufgetragen gegen die Inkubationszeit der Kinase mit dem Substrat. Nach 24 Stunden Inkubation wurde bei der Doppelinfektion mit MARK2 und MARKK ein Einbau von radioaktivem Phosphat detektiert, der 2,5-fach höher ist als der bei Einzelinfektion mit MARK2 allein. Der Immunoblot in Abbildung 16C zeigt, dass vergleichbare Mengen der immunopräzipitierten MARK2 in dem Kinase-Assay eingesetzt wurden. Aus der Abbildung 16B wird ersichtlich, dass sowohl MARK2 als auch MARKK in den Sf9-Zellen in vergleichbarer Menge exprimiert wurden.

Wie erwähnt kann MARKK *in vitro* die Aktivität von MARK2 auf TR1-Phosphorylierung bis zu 15-fach erhöhen. Der Versuch in Zellen zeigt eine deutlich niedrigere aktivierende Wirkung von MARKK auf MARK2. Dies kann dadurch erklärt werden, dass in den Zellen andere Proteine vorhanden sind, die inhibierende Wirkungen direkt auf MARK2 oder auf MARKK ausüben können. Das phosphorylierte Thr208 in MARK2 könnte durch Phosphatasen dephosphoryliert werden, was zum Verlust der MARK-Aktivität führt. Es könnte auch der Fall sein, dass die MARKK-Bindungsstellen

an MARK2 durch andere Proteine bedeckt oder besetzt sind. Aus diesen Gründen hat MARKK in Zellen nur beschränkten Zugang zu der Aktivierungsschleife von MARK, was zu einem niedrigeren Aktivierungsgrad führt.



**Abbildung 16: MARKK stimuliert die MARK2-Aktivität zur Tau-Phosphorylierung in Zellen**

Sf9-Zellen wurden mit HA/MARK2 allein oder mit MARKK zusammen infiziert. Mittels HA-Antikörper-Agarose wurde MARK2 immunopräzipitiert. Die Präzipitate (IP) wurden für Kinase-Assay eingesetzt, wobei das der ersten repetitiven Sequenz des Tau-Proteins nachempfundene Peptid TR1 als Substrat diente.

**(A) Diagram <sup>32</sup>P-Einbau in das TR1-Peptid aufgetragen gegen die Inkubationszeit.** Durch Koexpression von MARKK wurde die Aktivität von MARK2 deutlich erhöht. Bei einer Inkubationszeit mit dem Substrat-Peptid von 24 h steigt der <sup>32</sup>P-Einbau bis zu 2,5-fach (CPM: counts per minute). Dargestellt ist der Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

**(B) Westernblot der Sf9-Zelllysate zum Nachweis der Expression von MARK2 und MARKK.** Die Lysate der Sf9-Zellen, die zuvor mit HA/MARK2 und His/MARKK infiziert worden waren, wurden im Westernblot auf die Expression der Proteine untersucht.

**(C) Westernblot der Immunopräzipitate zum Nachweisen der HA/MARK2-Mengen.** Die Immunopräzipitate (IP), die für den Kinase-Assay eingesetzt worden waren, wurden im Westernblot untersucht, um vergleichbare Mengen der Kinasen in beiden Ansätzen zu bestätigen.

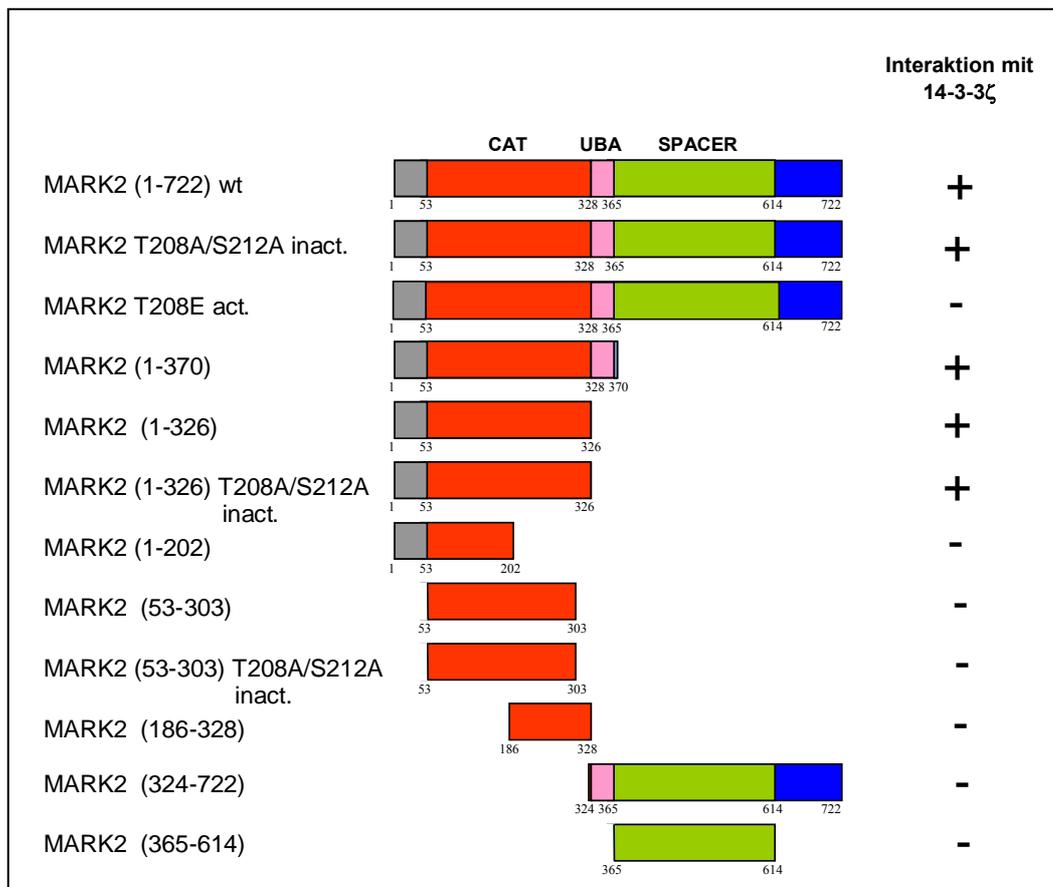
## 4.2 Charakterisierung des 14-3-3 $\zeta$ als Interaktionspartner von MARK2

In einem von unserer Hefe-Gruppe durchgeführten Zwei-Hybrid-Screen mit einer fötalen menschlichen c-DNA-Gehirnbank wurden 14-3-3 $\beta$  und - $\zeta$  als Interaktionspartner von MARK2 identifiziert (Dr. D. Matenia und Mitarbeiter, MPG-ASMB). Diese mögliche Interaktion zwischen MARK und 14-3-3 $\zeta$  sollte im Folgenden genauer untersucht werden. Es wurde auf die 14-3-3 $\zeta$ -Isoform konzentriert, weil diese besonders im Gehirn exprimiert wird (Martin et al., 1994). Mutationen in Leonardo, dem Homolog von 14-3-3 $\zeta$  in *Drosophila*, führen zu erheblichen Defiziten bei Lern- und Gedächtnisprozessen, welche höchstwahrscheinlich auf Störung der synaptischen Vesikelkaskade zurückzuführen sind (Broadie et al., 1997). Außerdem wurde entdeckt, dass 14-3-3 $\zeta$  in der Alzheimer-Erkrankung involviert ist, wo auch die MARK2 eine bedeutende Rolle spielt. 14-3-3 Proteine, vor allem die  $\zeta$ -Isoform, wurden in den neurofibrillären Bündeln der Alzheimer-Patienten detektiert (Layfield et al., 1996; Umahara et al., 2004). Die  $\zeta$ -Isoform interagiert direkt mit Tau und diese Wechselwirkung fördert die Tau-Phosphorylierung durch Kinasen wie PKA und NCLK (*neuronal Cdc2-like protein kinase=CDK5*) (Hashiguchi et al., 2000).

### 4.2.1 Kartierung der Interaktionsdomänen im Zwei-Hybrid-System

Um die Interaktionsdomänen von MARK2 und 14-3-3 $\zeta$  zu charakterisieren, wurden direkte Zwei-Hybrid-Tests durchgeführt. Es wurden die kodierenden Sequenzen von MARK2 in den Köder- und von 14-3-3 $\zeta$  in den Beute-Vektor kloniert. Nach Kotransfektion in den Hefestamm AH109 wurde das Wachstum unter selektiven Bedingungen getestet.

Die Abbildung 17 zeigt, dass sowohl MARK2-Wildtyp als auch die inaktive Mutante (T208A/S212A) mit 14-3-3 $\zeta$  interagieren. Interessanterweise wurde keine Interaktion zwischen 14-3-3 $\zeta$  und der aktiven Mutante von MARK2 (T208E) detektiert. Für eine Interaktion mit 14-3-3 $\zeta$  werden das N-terminale Ende und die katalytische Domäne (AS1-326) von MARK2 benötigt.



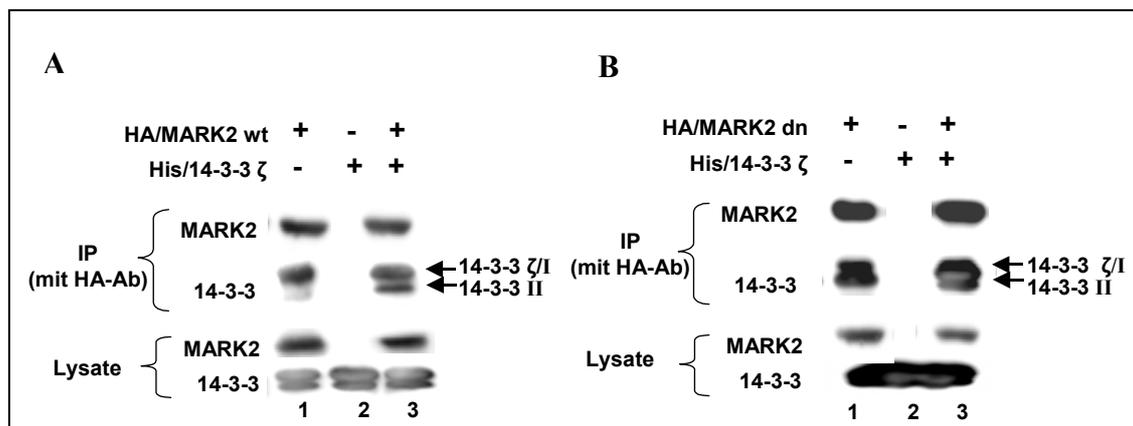
**Abbildung 17: Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3ζ im Zwei-Hybrid-System**

Es wurde die Interaktion verschiedener MARK2-Konstrukte mit 14-3-3ζ getestet. Die roten Kästchen markieren die katalytische Domäne von MARK2. Das kürzeste Konstrukt, bei dem eine Interaktion mit 14-3-3ζ detektierbar war, ist das Konstrukt AS1-326.

#### 4.2.2 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 $\zeta$

Die beobachtete Interaktion von MARK2 und 14-3-3 $\zeta$  sollte biochemisch durch Koimmunopräzipitations-Experimente bestätigt werden.

Die Sf9-Zelllysate, die aus den mit MARK2 allein oder mit His/14-3-3 $\zeta$  zusammen infizierten Zellen gewonnen wurden, wurden mit HA-Antikörper-Agarose inkubiert. Es wurde die Interaktion zwischen 14-3-3 und sowohl MARK2-Wildtyp als auch der dominant negativen Mutante von MARK2 (T208A/S212A) untersucht. Wie aus der Abbildung 18 ersichtlich ist, konnten zwei endogene 14-3-3-Isoformen mit MARK2 kopräzipitiert werden (Abb. 18A und B, Spur1). Aufgrund der Unklarheit, um welche Isoformen diese zwei Banden handeln, werden in dieser Arbeit die größere Isoform (obere Bande) als 14-3-3I und die kleinere (untere Bande) als 14-3-3II bezeichnet. Im Vergleich zum Wildtyp bindet die dominant negative MARK2 viel stärker an die II-Isoform (vgl. Abb. 18A1 und B1). Interessanterweise wurden auch bei einer Expression von 14-3-3 $\zeta$  nur zwei 14-3-3-Banden detektiert (Abb. 18A und B, Spur3). Der Grund dafür ist, dass die I- und  $\zeta$ -Isoformen das gleiche Molekulargewicht besitzen (30 kD), so dass bei einer Überexpression von 14-3-3 $\zeta$  die 14-3-3I-Bande komplett überdeckt wird. Die Erhöhung des Signals der oberen Bande belegt, dass eine Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 $\zeta$  besteht. Die Spur2 in der Abbildung 18A/B, wo Sf9-Zellen nur mit 14-3-3 $\zeta$  infiziert wurden, diente zur Kontrolle, die eine unspezifische Bindung von 14-3-3 $\zeta$  an den HA-Antikörper oder die Matrix ausschließen sollte.



**Abbildung 18: Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 in Sf9-Zellen**

Dargestellt sind Westernblots der Immunopräzipitate mit HA-Antikörper aus Sf9-Zellen. Sf9-Zellen wurden mit HA/MARK2-wt (Abb. A), HA/MARK2-dn (Abb. B) allein oder mit 14-3-3 $\zeta$  zusammen infiziert. Mittels HA-Antikörper-Agarose wurde MARK2 immunopräzipitiert. Die gebundenen Proteine wurden mit HA- und 14-3-3-Antikörpern im Westernblot untersucht. Der verwendete 14-3-3-Antikörper ist gegen alle Isoformen von 14-3-3 gerichtet. Wie aus den Abbildungen ersichtlich, binden sowohl das überexprimierte 14-3-3 $\zeta$  als auch die endogenen Isoformen an die MARK2. Dabei zeigte die dominant negative MARK2 im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Bindungsstärke an die kleinere endogene Isoform. Bei einer Überexpression von 14-3-3 $\zeta$  könnte sich auch die I-Isoform in der IP befinden, aber von  $\zeta$ -Isoform überdeckt werden. Der Ansatz mit 14-3-3 $\zeta$  allein belegt die Spezifität dieser Interaktion.

#### 4.2.3 Bestimmung der 14-3-3-Bindungsstelle in MARK

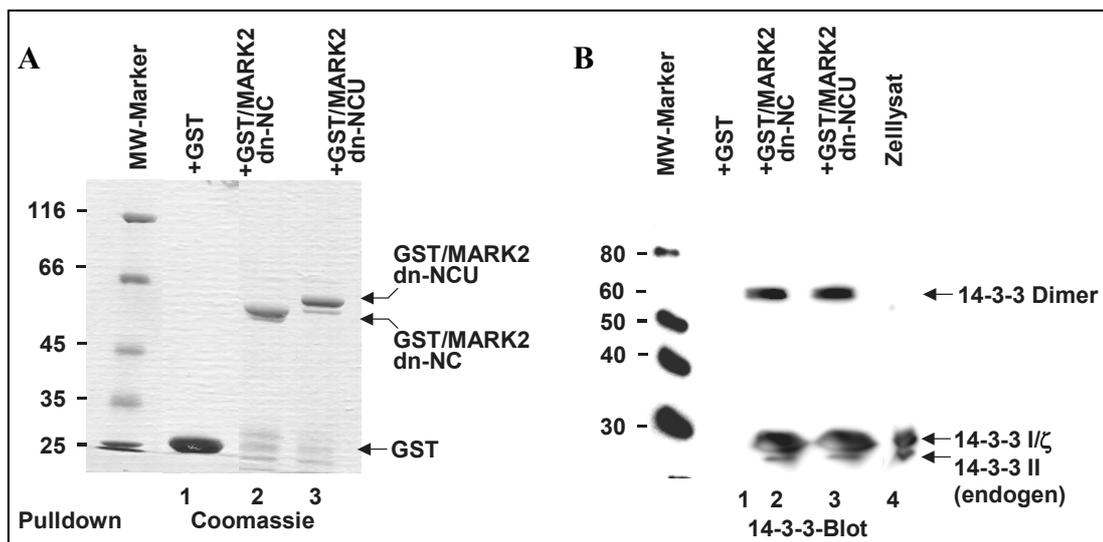
Nachdem die Wechselwirkung zwischen MARK2 und 14-3-3 in Sf9-Zellen bestätigt werden konnte, wurde versucht, die Bindungsstelle bzw. -domäne an MARK2 zu bestimmen, die diese Interaktion vermittelt. Die Ergebnisse aus dem Zwei-Hybrid-System weisen darauf hin, dass die Wechselwirkung über die katalytischen Domäne von MARK2 erfolgt (s. Abb. 17). Dies sollte im Folgenden biochemisch bestätigt werden.

Zu diesem Zweck wurde ein GST-Pulldown-Experiment mit der inaktiven Mutante durchgeführt. Sf9-Zellen wurden mit 14-3-3 $\zeta$  infiziert und für 72 Stunden bei 27°C inkubiert. Nach der Zelllyse wurden 1,5  $\mu$ M GST/MARK2 -dn-NC (AS1-304) oder GST/MARK2 -dn-NCU (AS1-362) mit dem gleichen Volumen an Zelllysat inkubiert.

Wie aus der Abbildung 19B ersichtlich, konnte sowohl bei MARK2 NC- als auch bei NCU 14-3-3 in den Pulldown-Fractionen detektiert werden (Abb. 19B: Spur 2 und 3). Der 14-3-3-Antikörper erkennt drei Banden, die auf die infizierte 14-3-3 $\zeta$ -, die endogene II-Isoform hindeuten. Außerdem wurden in den Pulldown-Fractionen im Gegensatz um

Zelllysate auch Dimere von 14-3-3 detektiert, die möglicherweise durch die hohe Konzentration von 14-3-3 entstanden sind. Die endogene I-Isoform könnte aufgrund des gleichen Molekulargewichts durch die  $\zeta$ -Isoform überdeckt sein. Die Abbildung 19A belegt, dass die Mengen, die als Köder eingesetzten GST-Konstrukte vergleichbar sind. Die Quantifizierung ergab, dass ungefähr 25% des gesamten 14-3-3 Proteins jeweils mit den zwei MARK Konstrukten präzipitiert wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass die Bindung von 14-3-3 höchstwahrscheinlich an die katalytische Domäne von MARK2 erfolgt. Ob das N-terminale Ende von MARK2 (AS1-53) benötigt wird, muss noch geklärt werden.



**Abbildung 19: 14-3-3 bindet an die katalytische Domäne von MARK2**

GST-MARK-dn-NC, -NCU oder GST allein wurden zusammen mit Lysaten von mit 14-3-3 $\zeta$  infizierten Sf9-Zellen inkubiert und anschließend über eine sedimentierbare Glutathion-Matrix präzipitiert. Die gebundenen Proteine und das Ausgangsmaterial (Sf9-Zelllysate) wurden immunologisch mit 14-3-3-Antikörper analysiert.

**(A) GST-Pulldown Fraktionen auf dem Coomassiegefärbten Gel.**

**(B) Mit 14-3-3-Antikörper detektierter Westernblot der GST-Pulldown Fraktionen.** Sowohl bei GST/MARK2 -dn-NC als auch bei -NCU wurde 14-3-3 detektiert, nicht nur das infizierte exogene 14-3-3 $\zeta$ , sondern auch die endogene I-/II-Isoform. In dem Immunokomplex konnten auch 14-3-3-Dimere nachgewiesen werden, die möglicherweise aufgrund der hohen Konzentration an 14-3-3 entstanden sind.

#### 4.2.4 Bestimmung der MARK2-Bindungsstelle an 14-3-3 $\zeta$

Wechselwirkungen zwischen 14-3-3 und ihren Partnern werden häufig durch Erkennung eines Phosphoserin- oder -threoninrestes vermittelt (Muslin et al., 1996). So besitzen die meisten Bindungspartner von 14-3-3 Proteinen phosphorylierte Erkennungsmotive der Konsensussequenz RSXpSXP, RXRXXpSXP oder RXXpS, wobei pS einen Phosphoserinrest bezeichnet, an die 14-3-3 bevorzugt bindet (Muslin *et al.*, 1996; Aitken, 1996; Yaffe *et al.*, 1997; Fu et al., 2000). Die Interaktion zwischen Proteinkinasen und 14-3-3 erfolgt in den meisten Fällen über ein solches Erkennungsmotiv, z.B. Wee1 und PKC (Muslin et al. 1996; Wang et al., 2000). Hier bindet 14-3-3 an Stellen außerhalb der katalytischen Domäne, damit die katalytische Domäne für ihre Funktion unbesetzt bleibt. Mittlerweile sind auch phosphorylierungsunabhängige Bindungspartner bekannt, z.B. das Exoenzym S, p190RhoGEF und der R18-Peptid Inhibitor (Henriksson et al., 2002; Masters et al., 1999; Petosa et al., 1998; Wang et al., 1999; Zhai et al., 2001).

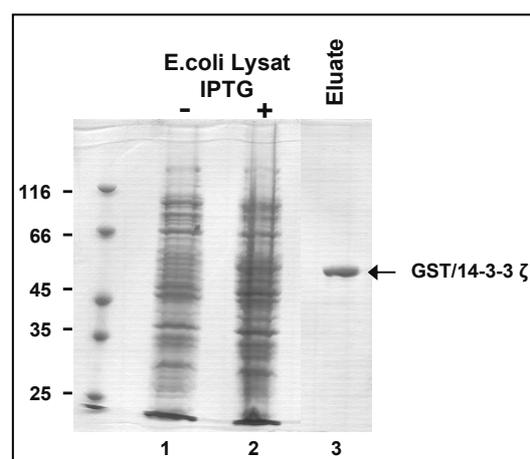
Eine Analyse der MARK-Sequenzen ergab, dass in MARK keine der bekannten Konsensus-Sequenzen vorhanden sind. Anders als bei Interaktionen zwischen 14-3-3 und den meisten Kinasen zeigen die Ergebnisse aus den Zwei-Hybrid- und Pulldown-Experimenten mit GST/MARK2 Konstrukten allerdings, dass die katalytische Domäne von MARK2 (AS1-304) in der Lage ist, mit 14-3-3 zu interagieren. Dies führt zu der Vermutung, dass der Wechselwirkung zwischen MARK2 und 14-3-3 ein anderer Mechanismus zugrunde liegt. Parallel zu dieser Arbeit wurde von Benton und Mitarbeiter eine Interaktion zwischen PAR-1 und 14-3-3 $\epsilon$  entdeckt. In Zwei-Hybrid-Experimenten konnten sie zeigen, dass 14-3-3 $\epsilon$  phosphorylierungsunabhängig an PAR-1 bindet (Benton et al., 2002).

Als nächstes sollte untersucht werden, welche Aminosäuren bzw. Domäne von 14-3-3 $\zeta$  bei der Wechselwirkung mit MARK2 eine Rolle spielt. Als erstes wurde 14-3-3 mit der Glutathion S-Transferase (GST) fusioniert. Durch Einfügen von Punktmutationen an drei kritischen Positionen in 14-3-3 sollte untersucht werden, welche Wirkungen die einzelnen Mutationen auf die Interaktion mit MARK2 ausüben und welcher Bereich in 14-3-3 für die Interaktion wichtig ist.

#### 4.2.4.1 Klonierung und Expression von GST-14-3-3 $\zeta$

Für die Klonierung von GST-fusioniertem 14-3-3 $\zeta$  wurde das Gateway-System (Invitrogen) verwendet. Dieses System basiert auf den Rekombinationseigenschaften der Clonase aus dem Phagen  $\lambda$  und ermöglicht eine schnelle und gerichtete Umklonierung spezifischer Gene in verschiedene Expressionssysteme. So können Proteine, die z.B. in *E. coli* nur schwach exprimiert werden oder unlösliche Aggregate bilden durch den Wechsel in ein anderes Expressionssystem möglicherweise besser exprimiert werden.

Die Klonierung erfolgte durch zwei PCR-Reaktionen. Als DNA-Matrize diente pEU-Myc/14-3-3 $\zeta$  (MPG-AMSB), welche in der ersten PCR-Reaktion in den „Entry Vektor“ pDONR201 (Invitrogen) eingeführt wurde. Aus diesem Vektor kann das Gen des Zielproteins durch eine zweite PCR-Reaktion in beliebige Expressionsvektoren („Destination Vektor“) inseriert werden. Hier wurde der Vektor pDEST15 (Invitrogen) für Expression in *E. coli* verwendet, der für ein GST Protein am N-Terminus der Zielproteine kodiert. Das erhaltene Endprodukt der Gateway-System-Klonierung kodiert für ein 14-3-3 $\zeta$  mit einem am N-Terminus fusionierten GST-Protein. Als Expressionsstamm diente der *E. coli* Stamm BL21-AI (Invitrogen). Die Reinigung erfolgte wie im Abschnitt 3.2.6 beschrieben. Wie in der Abbildung 20 (Spur 3) zu erkennen ist, wurde sauberes GST-14-3-3 $\zeta$  Protein im Eluat erhalten.



**Abbildung 20: Expression und Reinigung vom rekombinanten GST-markierten 14-3-3 $\zeta$  Protein**

Gezeigt ist ein Coomassiegefärbtes 10%-iges SDS-Gel mit *E. coli* Zellysaten vor und nach der Induktion sowie das Eluat aus der Affinitätsaufreinigung mit Glutathion-Sepharose. Die Expression erfolgte im *E. coli* Stamm BL21-AI (Invitrogen). Durch Inkubation mit Glutathion-Sepharose 4B (Amersham) und Elution wurde sauberes GST-14-3-3 Protein erhalten (Spur 3).

#### 4.2.4.2 Herstellung der 14-3-3 $\zeta$ -Mutanten durch Punktmutation

Ein gut untersuchter Interaktionspartner von 14-3-3 ist die Kinase Raf1. Aus den Untersuchungen in *Drosophila* stammen auch die Erkenntnisse, dass Mutationen an den drei Aminosäureresten Glu183, Phe199 und Tyr214 in 14-3-3 $\epsilon$  eine große funktionelle Rolle spielen. Bei einer Mutation dieser Reste kann 14-3-3 $\epsilon$  seine Funktion in der in Ras/Raf/MAPK Signalkaskade nicht mehr ausüben (Chang und Rubin, 1997). Diese drei Aminosäurereste sind hochgradig konserviert. In der  $\zeta$ -Isoform sind die entsprechenden Aminosäurereste E180, F196 und Y211.

Die Abbildung 21 zeigt die Struktur eines 14-3-3 $\zeta$ -Dimers (Liu et al., 1995). Das E180 befindet sich in der Tasche des U-förmigen 14-3-3 Dimers. An diese Stelle bindet auch das phosphorylierte Serin/Threonin der konservierten Erkennungsmotive. Eine Mutation an dieser Stelle führt zu einem vollständigen Verlust der Interaktion mit z.B. Raf1. Y196 und F211 sind in der hydrophoben Region außerhalb der Bindungstasche lokalisiert. Die Funktion dieser Aminosäurereste ist bis heute noch nicht bekannt.

Mittels „Quick-Change<sup>TM</sup> Site Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) wurden Mutationen an diesen drei Aminosäureresten eingeführt. Das negativ geladene Glu180 wurde durch ein positiv geladenes Lysin (E180K), das hydrophobe und ungeladene Phe196 durch das leicht polare Tyrosin (F196Y) und das Tyr211 durch Phenylalanin (Y211F) ausgetauscht. Die für die Mutagenese verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet. Die Expression und Reinigung der Mutanten erfolgte wie die des GST-14-3-3 Wildtypes (Abb. 20). Alle drei Proteine ließen sich in vergleichbarer Menge und Reinheit reinigen.



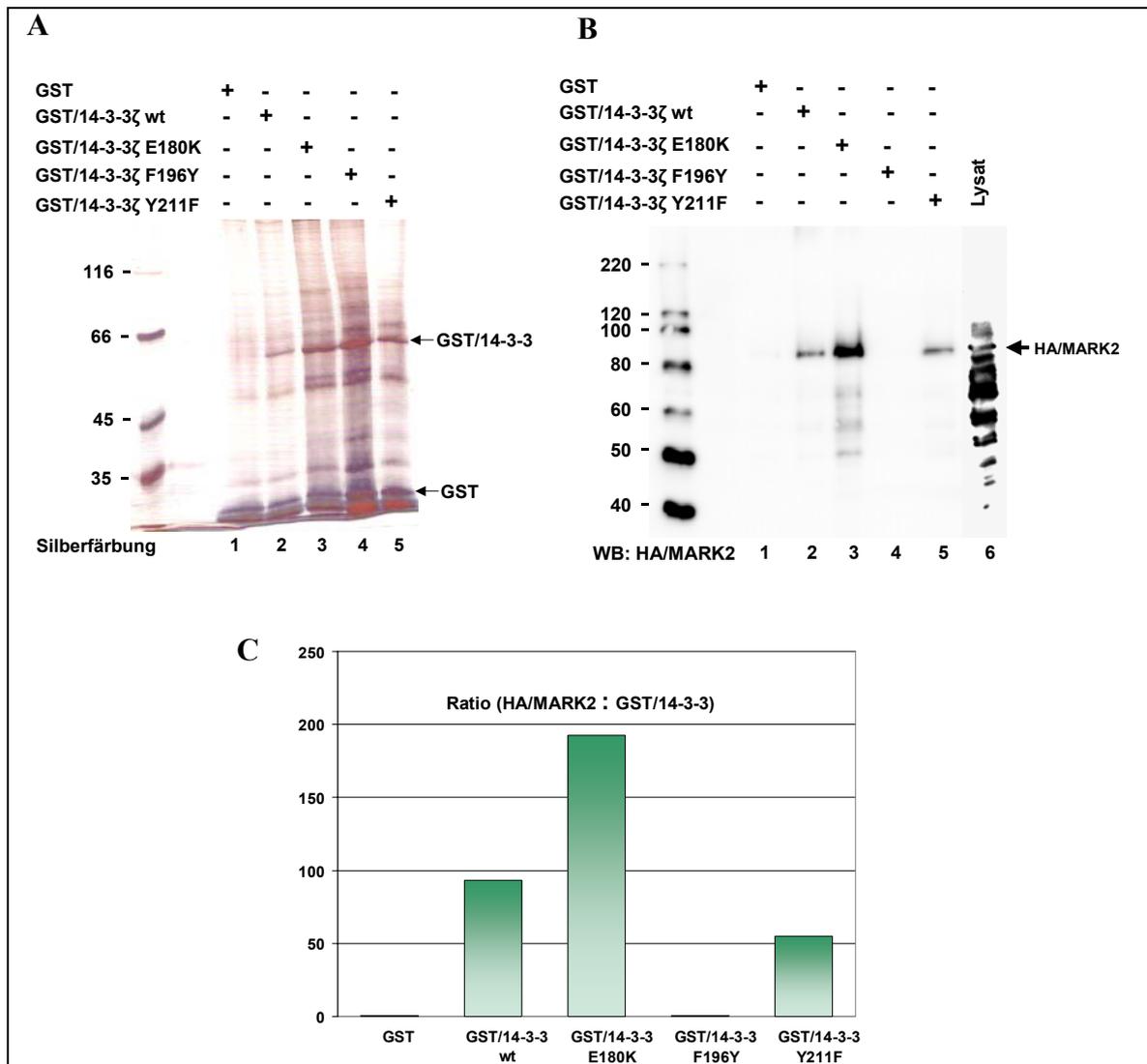
**Abbildung 21: Struktur eines 14-3-3 $\zeta$ -Dimers (Liu et al., 1995)**

Das 14-3-3-Monomer enthält 9  $\alpha$ -Helices. Unter physiologischen Bedingungen wird normalerweise ein Homo- oder Hetero-Dimer gebildet. Die Aminosäurereste, die durch Punktmutationen verändert wurden sind in Gelb gezeigt. Folgende Mutanten wurden hergestellt: E180K, F196Y, Y211F.

#### 4.2.4.3 Effekte der Mutationen in 14-3-3 $\zeta$ auf die Wechselwirkung mit MARK2

Die GST-markierten Konstrukte von 14-3-3 $\zeta$  wt oder die Mutanten wurden als Köder in einem GST-Pulldown-Experiment eingesetzt. Sie wurden mit Sf9-Zelllysaten inkubiert, die zuvor mit HA/MARK2 wt infiziert worden waren. Die sedimentierten Proteine (Pulldown) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde Silber-gefärbt oder immunologisch auf die Anwesenheit von MARK2 untersucht.

In dem Silber-gefärbten SDS-Gel (Abb. 22A) sind die Mengen der als Köder eingesetzten Proteine ersichtlich. Es zeigt, dass die Lysate vergleichbare Mengen an GST-Proteinen enthielten. Die zahlreichen Banden zeigen Proteine, die an 14-3-3 bzw. unspezifisch an das GST-Protein oder die Sepharose-Matrix gebunden sind. Die eingesetzten GST bzw. GST-14-3-3-Proteine wurden durch Pfeile am Rande des Gels gekennzeichnet. Wie der Immunoblot in der Abbildung 22B zeigt, wurde MARK in unterschiedlichen Mengen in Pulldown-Fractionen detektiert. Während bei GST (Spur 1) und F196Y-Mutante (Spur 4) keine MARK2 sichtbar ist, wurde bei der Mutante E180K eine hohe Menge von MARK2 detektiert (Spur 3). Mit 14-3-3 wt und Y211F wurde ungefähr die gleiche Menge an MARK2 kopräzipitiert (Spur 2 und 5). Ein Vergleich der Mengen eingesetzter GST-Konstrukte zeigt allerdings, dass deutlich weniger GST-14-3-3 Wildtyp als Köder



### Abbildung 22: Einfluss der Mutation in 14-3-3 $\zeta$ auf die Interaktion mit MARK2

GST oder 1  $\mu$ M GST-14-3-3 $\zeta$  Konstrukte wurden mit 100  $\mu$ l Sf9-Zelllysaten, die zuvor mit HA/MARK2 infiziert wurden, für 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ l 50% Glutathion-Sepharose dazu gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde das sedimentierte Pellet in 50  $\mu$ l 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und analysiert. 5  $\mu$ l davon wurden auf das Gel aufgetragen.

**(A) Silbergefärbtes 10% SDS-Gel mit Pull-down-Fractionen.** Auf dem Gel sind GST und GST-14-3-3 Konstrukte, die als Köder in den Pull-down-Assay eingesetzt wurden, gut zu erkennen. Die Proteine wurden durch Pfeile gekennzeichnet. Die zahlreichen Banden zeigen Proteine, die an 14-3-3 bzw. unspezifisch an das GST-Protein oder die Sepharose-Matrix binden.

**(B) Westernblot zum Nachweis der Wechselwirkung zwischen MARK2 und 14-3-3 Konstrukten.** Aufgetragen sind mit GST-Konstrukten zusammen präzipitierte Proteine aus Sf9-Zelllysaten. Mit dem HA-Antikörper wurde die MARK2 untersucht. Deutlich unterschiedliche Mengen an MARK2 wurden festgestellt, was auf unterschiedliche Bindungsstärke der einzelnen 14-3-3 Konstrukte hindeutet.

**(C) Quantifizierung der Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 $\zeta$ .** Dargestellt sind die Verhältnisse zwischen Beute (HA/MARK2) und Köder (GST-14-3-3). Die Intensität der einzelnen Banden aus dem silbergefärbten SDS-Gel und Westernblot wurde mit dem Programm AIDA ermittelt.

eingesetzt wurde als Mutante Y211F. Um solche Abweichung zu relativieren, wurde das Verhältnis zwischen Ausbeute (Pulldown/MARK2) und Köder (GST-Konstrukte) ermittelt und als Diagramm dargestellt. Auf diese Weise konnte die Bindungsstärke zwischen MARK2 und den 14-3-3-Konstrukten und somit der Einfluss einzelner Mutationen auf die Wechselwirkung der beiden Proteine bestimmt werden. Wie aus der Abbildung 22C ersichtlich führt die Mutation des F196Y zum vollständigen Verlust der Bindung zwischen 14-3-3 und MARK2. Die Mutation an Y211F hat einen schwächeren Einfluss, wobei der Wert auf 60% des vom Wildtyp sinkt. Im Gegensatz zu diesen zwei Mutationen führte die Mutation E180K zu einer zweifachen Erhöhung der Wechselwirkung zwischen MARK2 und 14-3-3 im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnte aufgrund einer Wechselwirkung zwischen Lysin und einem positiv geladenen Aminosäurerest von MARK2 zustande kommen.

Zusammengefasst führen diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass die MARK-Bindungsstellen in 14-3-3 anders als die konventionelle phosphorylierungsabhängige Bindungsstelle außerhalb der Interaktionstasche lokalisiert sind. Das Phenylalanin196 scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen.

#### 4.2.5 *In vitro* Untersuchung der Aktivität von MARK2

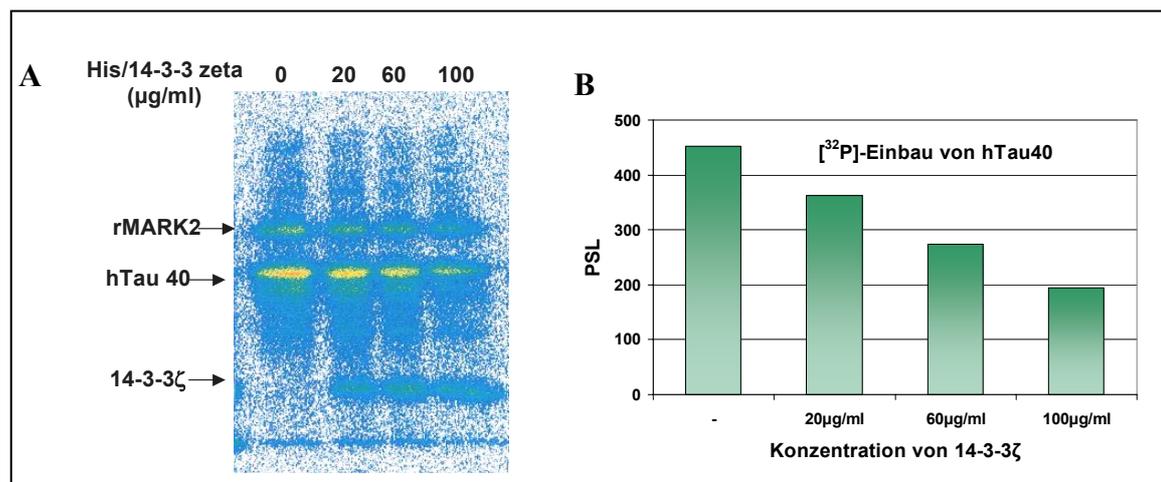
Aufgrund der Tatsache, dass 14-3-3 an die katalytische Domäne von MARK bindet, kann vermutet werden, dass diese Wechselwirkung die Aktivität von MARK beeinflusst. Im Folgenden sollte die funktionelle Wirkung dieser Interaktion untersucht werden.

##### 4.2.5.1 14-3-3 $\zeta$ inhibiert die Aktivität von MARK2

Die Höhe der MARK2-Aktivität kann über die Phosphorylierung des Tau-Proteins oder des Substratpeptids TR1 gemessen werden. Das in *E. coli* exprimierte His/14-3-3 $\zeta$  wurde mit MARK2-Wildtyp in Anwesenheit von hTau40 und [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP für 4 h inkubiert. Drei Konzentrationen von 14-3-3 $\zeta$  wurden verwendet.

Bekannt ist, dass MARK2 unter physiologischen Bedingungen Autophosphorylierung zeigt, die allerdings keinen Einfluss auf ihre Aktivität hat. Diese Phosphorylierung ist auf dem in der Abbildung 23A gezeigten Autoradiogramm sichtbar und wurde kaum von 14-3-3 $\zeta$  beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde die Phosphorylierung des Tau-Proteins durch die Anwesenheit von 14-3-3 reduziert. Mit steigender Konzentration von 14-3-3 sinkt der Phosphateinbau in hTau40. Da 14-3-3 keine enzymatische Aktivität besitzt, kann vermutet werden, dass die inhibierende Wirkung von 14-3-3 $\zeta$  auf MARK2 durch Bindung ermöglicht wird. Die Ergebnisse im Kapitel 4.2.4.3 zeigen, dass der Wildtyp und verschiedene Mutanten von 14-3-3 $\zeta$  eine unterschiedliche Bindungsstärke an MARK2 besitzen. Das bietet die Möglichkeit, die Verbindung zwischen den inhibitorischen Effekten und der Bindung an MARK2 zu überprüfen.

Interessanterweise wurde auch Phosphateinbau bei 14-3-3 $\zeta$  festgestellt. Das führt zu dem Schluss, dass MARK2 in der Lage ist, 14-3-3 $\zeta$  zu phosphorylieren (Abb. 23 A). Über die Phosphorylierung von 14-3-3 Isoformen ist bis heute wenig bekannt. Bei  $\zeta$ -Isoform wurden drei Phosphorylierungsstellen beschrieben, Ser58, Ser184 und Thr232. Welche(n) Stelle(n) eventuell durch MARK phosphoryliert werden, ist noch unklar.



**Abbildung 23: 14-3-3ζ inhibiert die MARK2-Aktivität der Tau-Phosphorylierung *in vitro***

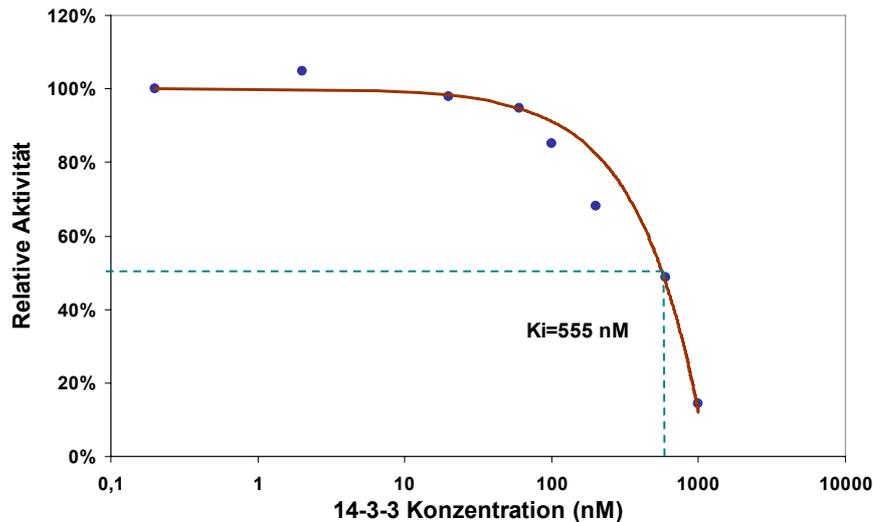
Die Aktivität der MARK2 wurde anhand der Phosphorylierung des hTau40 gemessen. 0,2 µg rekombinante MARK2 wurde mit His/14-3-3ζ in Anwesenheit von hTau40 und [<sup>32</sup>P]-γ-ATP in einem gesamten Volumen von 10 µl für 4 h bei 30°C inkubiert. Die Menge von 14-3-3ζ lag bei 0,2, 0,6 und 1 µg. Nach Fällung mit 10% TCA wurde das Pellet in 10 µl 2 X SDS-Probenpuffer resuspendiert und auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen.

**(A) Autoradiogramm des hTau40 in Anwesenheit von MARK2 und 14-3-3ζ.** Dargestellt ist die Phosphorylierung des hTau40 durch MARK2 in Anwesenheit von 14-3-3ζ. Es ist deutlich zu erkennen, dass steigende 14-3-3-Konzentrationen zum sinkenden Phosphorylierungsgrad von hTau40 führten. Die MARK2 zeigte Autophosphorylierung, deren Grad relativ konstant bei allen Ansätzen blieb. Auch 14-3-3ζ erwies sich als ein Substrat von MARK2.

**(B) Diagramm [32P]-Einbau von hTau40 gegen Konzentration von 14-3-3ζ.** Die Intensität der hTau40-Banden im Autoradiogramm wurde mittels des Programms AIDA ermittelt und als Diagramm dargestellt. Die Inhibition verläuft Konzentrations-abhängig (PSL: *photostimulated luminescence*).

#### 4.2.5.2 Die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von MARK2 und 14-3-3ζ

Um genauere Aussagen über die Bindung von MARK2 und 14-3-3ζ machen zu können, wurde die Kinase-Inhibitor-konstante der beiden Proteine bestimmt. Hierzu wurde die TR1 Phosphorylierung durch MARK2-wt (20 nM) unter dem Einfluss verschiedener 14-3-3ζ Konzentrationen im Kinaseassay gemessen. Anhand der Graphik in Abbildung 24 konnte eine  $K_i$  von 550 nM bestimmt werden.



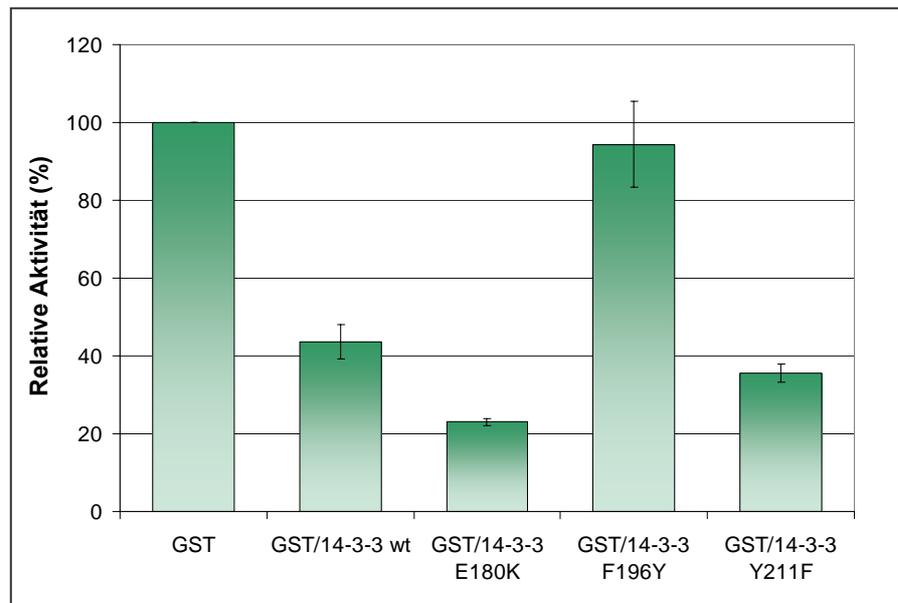
**Abbildung 24: Bestimmung der Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von MARK2 und 14-3-3 $\zeta$**

Die  $K_i$  der Inhibition von MARK2 durch 14-3-3 $\zeta$  wurde anhand der Phosphorylierung des Tau-Peptids TR1 gemessen. Für die Bestimmung der  $K_i$  von ca. 550 nM wurden 20 nM MARK2 und unterschiedliche 14-3-3 $\zeta$  Konzentrationen (0.2, 2, 4, 20, 200, 600, 1000 nM) im Kinaseassay eingesetzt.

#### 4.2.5.3 14-3-3 inhibiert MARK2 durch direkte Proteininteraktion

Um zu überprüfen, ob die inhibitorische Wirkung von 14-3-3 $\zeta$  auf MARK2 durch eine direkte Bindung entsteht, wurden Kinase-Assays mit Mutanten von 14-3-3 $\zeta$  durchgeführt. Ihre unterschiedlichen Bindungsstärken zu MARK2 sollten ausgenutzt werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Inhibierung und Proteininteraktion zu verifizieren oder auszuschließen.

Die Aktivität von MARK2 wurde anhand des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus in das TR1-Peptid gemessen. Eine signifikant inhibierende Wirkung wurde nur bei denjenigen 14-3-3 Konstrukten festgestellt (Abb. 25), die mit MARK2 interagieren können (14-3-3 Wildtyp, E180K und Y211F) (vgl. Abb. 22B). Bei der Mutante E180K, die am stärksten an MARK2 bindet (Abb. 22A und B) wurde auch die höchste Inhibierung gemessen, während die Mutante Y211F, bei der die Wechselwirkung mit MARK2 durch Mutation eliminiert wird, keinen inhibitorischen Effekt auf die MARK2-Aktivität ausübte. Diese Ergebnisse liefern ein Argument für die Annahme, dass die Inhibierung der MARK2 durch eine 14-3-3-Bindung stattfindet.



**Abbildung 25: Einfluss der 14-3-3 Konstrukte auf die Aktivität von MARK2**

Die relative Aktivität von MARK2 in Anwesenheit von den 14-3-3 Konstrukten wird als Diagramm dargestellt. Der Einfluss der Mutationen in 14-3-3 auf die MARK2 wurde anhand der Phosphorylierung de TR1-Peptides gemessen. 200 ng rekombinante MARK2 wurden mit 1 µg GST-14-3-3 in Anwesenheit des TR1 und [<sup>32</sup>P]-ATP in einem gesamten Volumen von 10 µl bei 30°C für 4 h inkubiert. Der Einbau von <sup>32</sup>P wurde mit einem Szintillationszähler gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

Die Kinaseaktivität der MARK2 im Kontrollansatz mit GST wurde mit 100% relativer Aktivität gleichgesetzt. Eine Abnahme des <sup>32</sup>P-Einbaus in TR1-Peptid wurde bei GST-14-3-3 wt, E180K und Y211F gemessen. Bei der Mutante E180K, die am stärksten an MARK2 bindet, war auch die höchste Inhibierung der MARK2 Aktivität festzustellen, während die Mutante F196Y, die kaum an MARK2 bindet, keinen signifikanten Einfluss hat.

## 4.2.6 Koexpressionsstudien zur Untersuchung der Interaktion

Neben dem biochemischen Nachweis einer Proteininteraktion ist es von Bedeutung, die Wechselwirkung der einzelnen Komponenten auch in einen zellulären Kontext zu bringen. Dieser Abschnitt beschreibt, welche Effekte 14-3-3 auf der zellulären Ebene auf die MARK2 ausübt.

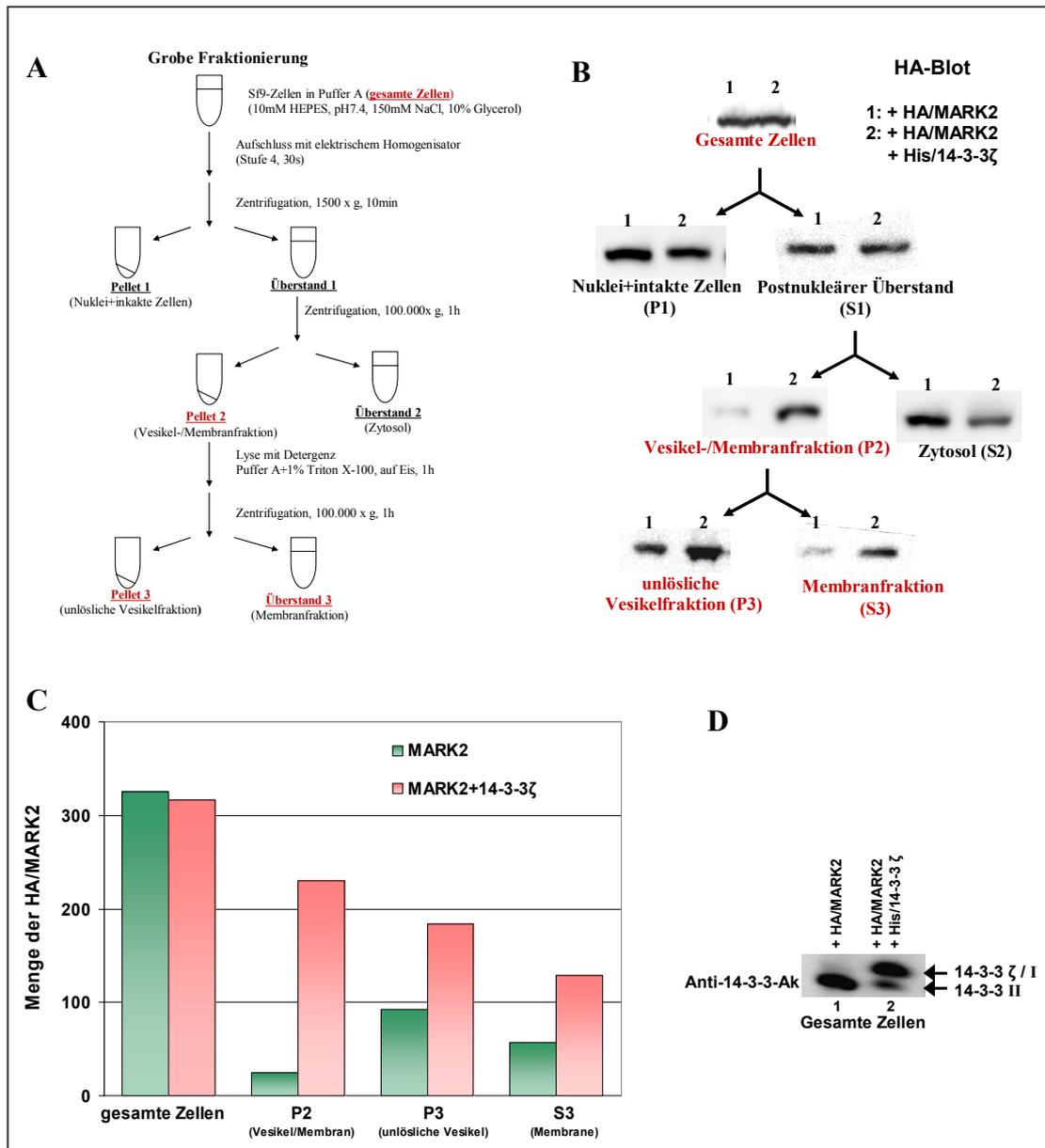
### 4.2.6.1 Überexpression von 14-3-3 $\zeta$ führt zur Translokation der MARK2

14-3-3 Proteine sind in viele zelluläre Prozesse involviert. Sie sind bei der räumlichen Anordnung von Signaltransduktionskomplexen und der subzellulären Lokalisation von assoziierten Proteinen von Bedeutung (Aitken et al., 1996; Morrison et al., 1994; Rittinger et al., 1999). Aus diesem Grund wurde zuerst untersucht, ob die zelluläre Lokalisation von MARK2 durch 14-3-3 beeinflusst wird.

Die Sf9-Zellen wurden mit MARK2 alleine oder mit 14-3-3 $\zeta$  zusammen infiziert. Anschließend wurden die Zellen einer groben Fraktionierung wie im Abschnitt 3.2.11 beschrieben unterzogen. Durch mehrere Zentrifugationsschritte wurde eine Trennung zellulärer Fraktionen, des Zytosols und der Vesikel- und Membranfraktion, erzielt. Die Lokalisation der MARK2 wurde immunologisch untersucht.

In der Abbildung 26A ist der Verlauf der Fraktionierung schematisch dargestellt. Die daraus resultierenden Fraktionen wurden im Westernblot auf Anwesenheit von MARK2 untersucht (Abb. 26B). Die Expression von MARK2 lag ungefähr auf gleichem Niveau in den einzel- und doppelinfizierten Zellen (gesamte Zellen). Während die zwei Fraktionen (Nuklei/intakte Zellen im Pellet und postnukleärer Überstand) aus der ersten Zentrifugation gleiche Mengen an MARK2 enthielten, erhöhte sich deutlich der Spiegel der MARK2 in der Vesikel- bzw. Membranfraktion bei einer Koexpression von 14-3-3 $\zeta$ . Nach Behandlung der Vesikelfraktion mit Detergentien wurden zwei Fraktionen erhalten: die Membranen (Vesikelmembranen und/oder Plasmamembranen) und die unlöslichen Vesikel. In beiden Fraktionen war deutlich mehr MARK2 zu erkennen, wenn eine Koexpression von 14-3-3 $\zeta$  in den Zellen vorlag. Das Diagramm in der Abbildung 26C stellt die Ergebnisse der kritischen Fraktionen aus dem Westernblot quantitativ dar. Die

gesamten Zellen wurden auch mit 14-3-3-Antikörper untersucht, um eine erfolgreiche Expression von 14-3-3 $\zeta$  zu bestätigen (Abb. 26D). Zusammengefasst kann gesagt werden, dass 14-3-3 $\zeta$  in der Lage ist, MARK2 vom Zytosol in Vesikel oder an die Plasmamembran zu translokalisieren.



**Abbildung 26: 14-3-3ζ führt zur Translokation von MARK2**

Die Sf9-Zellen wurden mit HA/MARK2 allein oder mit 14-3-3ζ zusammen infiziert. Anschließend wurde eine grobe Fraktionierung durchgeführt. Die Fraktionen daraus wurden im Westernblot auf MARK2 untersucht.

**(A) Schematische Darstellung des Verlaufs grober Fraktionierung.** Dargestellt ist der Verlauf einer groben Fraktionierung. Die entscheidenden Fraktionen sind rot markiert.

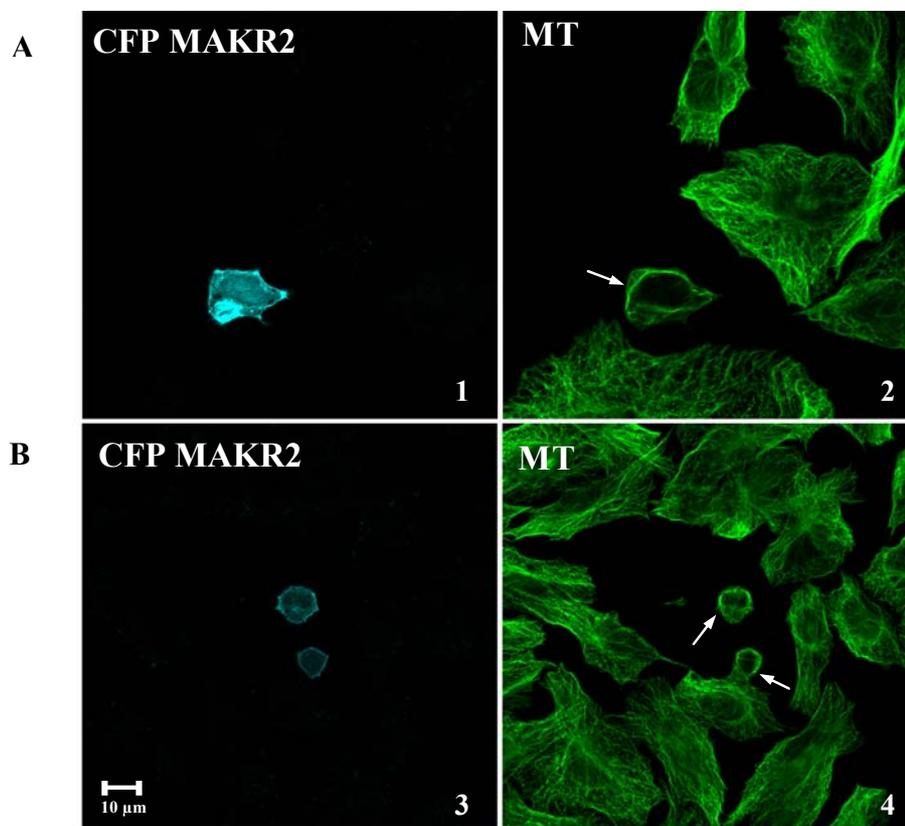
**(B) Westernblot der Fraktionen zum Lokalisieren der MARK2.** Die Proben aus der Fraktionierung wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit HA-Antikörper auf die Lokalisation der MARK2 untersucht. Die entscheidenden Fraktionen sind rot markiert.

**(C) Quantifizierung der MARK2 in den gesamten Zellen und ausgewählten Fraktionen.** Die Intensität der MARK2-Banden einzelner Fraktionen wurde mittels des Programms AIDA vermittelt und als Diagramm dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Koinfektion von 14-3-3ζ zu einer erhöhten Lokalisation von MARK2 in Vesikel oder in Membranen führte.

**(D) Westernblot der Sf9-Zelllysate zum Nachweis der Expression von 14-3-3.** Die gesamten Zellen wurden im Westernblot mit 14-3-3 Antikörper untersucht. Eine erfolgreiche Infektion von 14-3-3ζ wurde dadurch bestätigt.

#### 4.2.6.2 Kotransfektion von MARK2 und 14-3-3 $\zeta$ in CHO-Zellen

MARK2 phosphoryliert das neuronale Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau und bewirkt dadurch seine Ablösung von den Mikrotubuli. Eine Überexpression von MARK2 in CHO-Zellen führt daher zur Destabilisierung des Mikrotubulinetzwerks und somit zur Degeneration der Zellen (Drewes et al., 1997; Ebneith et al., 1998). Zwei Beispiele sind in der Abbildung 27 dargestellt. In der Abbildung 27A führte die Überexpression von MARK2 zur Destabilisierung der Mikrotubuli. In stark exprimierten Fällen wurden die Zellen kleiner, runder und starben ab (Abb. B3) und das Mikrotubulinetzwerk löste sich auf (Abb. B4).



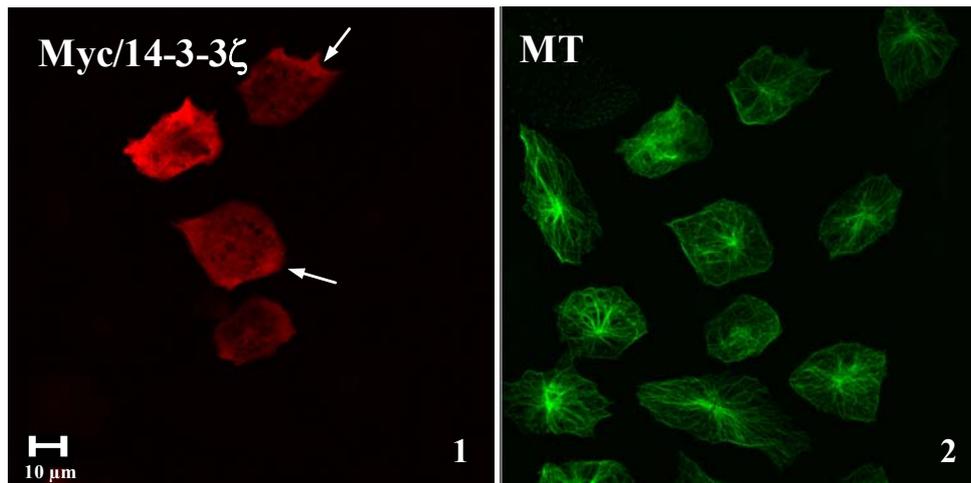
**Abbildung 27: Effekte der MARK2-Expression auf das MT-Netzwerk in CHO-Zellen**

CHO-Zellen wurden mit CFP-MARK2 transfiziert und nach 18 Stunden Inkubationszeiten fixiert. Für die Mikrotubulifärbung wurde Cy5-konjugierter DM1 $\alpha$ -Antikörper verwendet.

(A) MARK2 zeigte eine diffuse Verteilung in CHO-Zellen (Abb. 1). Überexpression von MARK2 führte zur Auflösung des Mikrotubulinetzwerks (Abb. 2).

(B) Zellen mit stark überexprimierter MARK2 wurden kleiner, runder und starben ab.

Im Vergleich dazu hatte eine Überexpression von 14-3-3 $\zeta$  allein keine sichtbare Wirkung auf die Zellen, was auch durch die MT-Färbung bestätigt wurde (Abb. 28). Die 14-3-3-Färbung zeigte eine diffuse Verteilung von 14-3-3 in den Zellen. Allerdings wurde eine verstärkte Expression im Bereich der Plasmamembran beobachtet (durch Pfeile gekennzeichnet).



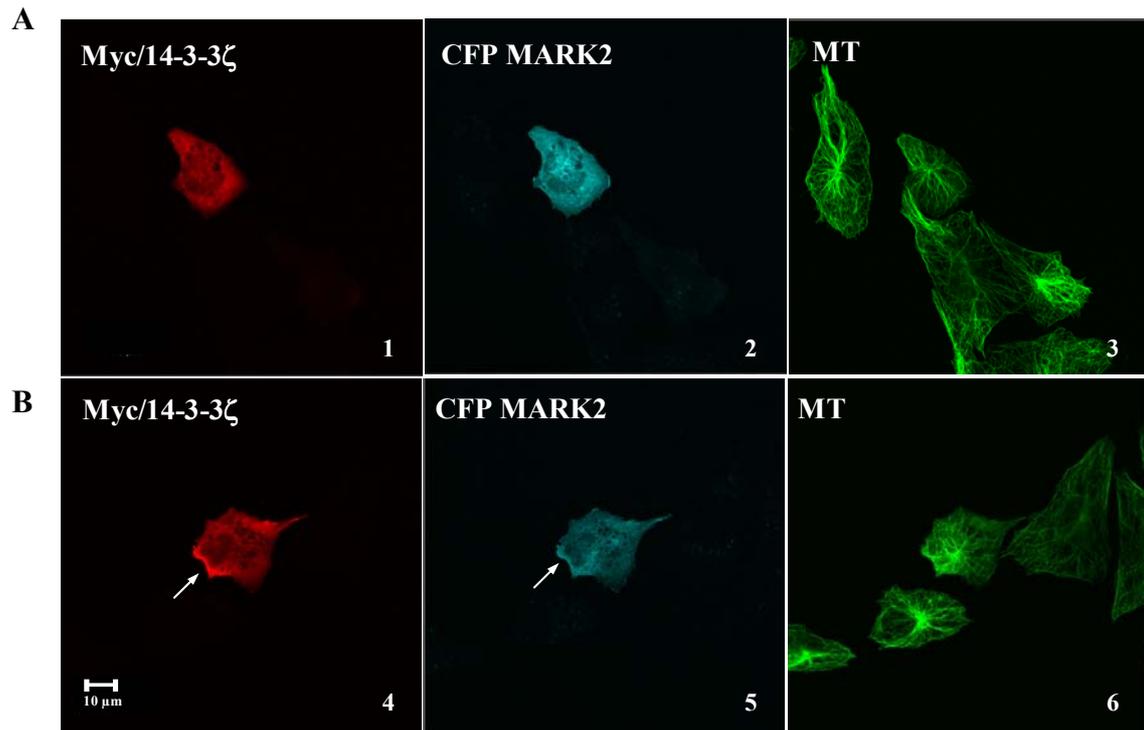
**Abbildung 28: 14-3-3 $\zeta$ -Expression in CHO-Zellen**

CHO-Zellen wurden mit Myc/14-3-3 transfiziert und nach 18 Stunden Inkubationszeiten fixiert. Für die Mikrotubulifärbung wurde Cy5-konjugierter YL1/2-Antikörper verwendet.

**(1) Verteilung von 14-3-3 $\zeta$  in CHO-Zellen.** Eine diffuse Verteilung von 14-3-3 $\zeta$  wurde beobachtet. Außerdem wurde eine verstärkte Lokalisation von 14-3-3 $\zeta$  an der Plasmamembran festgestellt (durch Pfeile gekennzeichnet).

**(2) MT-Färbung der mit 14-3-3 $\zeta$  transfizierten Zellen.** Überexpression von 14-3-3 $\zeta$  hat keinen Einfluss auf das Mikrotubulinetzwerk.

Der inhibitorische Effekt von 14-3-3 $\zeta$  auf MARK2 wurde als nächstes durch Koexpression in CHO-Zellen überprüft. In der Abbildung 29 werden zwei Beispiele der doppeltransfizierten Zellen gezeigt. Bei einer Kotransfektion von 14-3-3 $\zeta$  wurden die Mikrotubuli vor einem Abbau durch MARK2 geschützt und war stabil. Die Zellen zeigten eine normale MT-Morphologie (Abb. 29A und B). Außerdem wurde eine verstärkte Kolokalisierung beider Proteine an der Plasmamembran beobachtet (Abb. B4 und B5, durch Pfeile gekennzeichnet).



**Abbildung 29: 14-3-3 inhibiert die MT-destabilisierende Wirkung von MARK2**

CHO-Zellen wurden mit Myc/14-3-3 $\zeta$  und CFP-MARK2 transfiziert und nach 18 Stunden Inkubationszeiten fixiert. 14-3-3 $\zeta$  wurde mit einem Anti-myc-Antikörper und TRITC-gekoppeltem Sekundär-Antikörper visualisiert. Für die Mikrotubulifärbung wurde ein Cy5-konjugierter YL1/2-Antikörper verwendet.

**(A) Inhibierung der MARK2-Effekte auf MT durch 14-3-3 $\zeta$ .** Koexpression von 14-3-3 $\zeta$  stabilisiert die Mikrotubuli und die Zellen zeigten normale Morphologie.

**(B) Kolokalisierung der MARK2 und 14-3-3 $\zeta$  an der Plasmamembran.** Bei einer Koexpression von 14-3-3 $\zeta$  mit MARK2 wurde keine Veränderung der MT festgestellt. 14-3-3 $\zeta$  und MARK2 kolokalisieren zum Teil an der Plasmamembran (durch Pfeile gekennzeichnet).

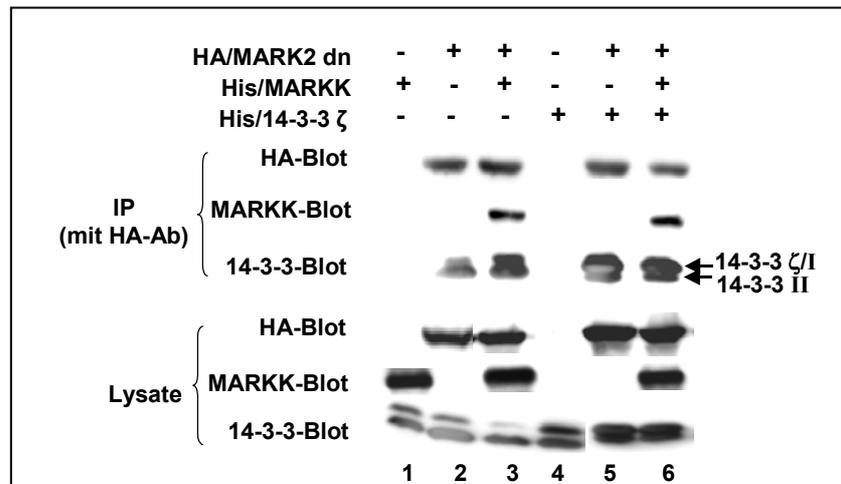
### **4.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2, MARKK und 14-3-3 $\zeta$**

In den vergangenen zwei Abschnitten wurden zwei Proteine untersucht, die eine regulatorische Wirkung auf MARK2 ausüben. Zum einen aktiviert MARKK die MARK2, indem sie MARK2 an Threonin208 phosphoryliert. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass 14-3-3 $\zeta$  die Aktivität von MARK2 inhibiert. Diese Inhibierung kommt durch eine direkte Bindung zustande. In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob diese drei Proteine als Komplex fungieren und wie MARK2 im Falle einer Komplexbildung reguliert wird.

#### **4.3.1 Identifizierung des Komplexes aus MARK2, MARKK und 14-3-3 $\zeta$**

##### ***4.3.1.1 Koimmunopräzipitation in Sf9-Zellen***

Um eine mögliche Komplexbildung von MARK2, MARKK und 14-3-3 zu überprüfen, wurden als erstes Koimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Eine Komplexbildung wird bestätigt, wenn die drei Proteine zusammen immunopräzipitiert werden können. Hierfür wurden die Sf9-Zellen mit HA/MARK2-dn (T208A/S212A), His/MARKK und His/14-3-3 $\zeta$  infiziert. Aufgrund der Erkenntnisse aus dem Abschnitt 4.1.1, dass in Zellen keine MARKK-Bindung bei MARK2-Wildtyp festgestellt werden konnte, wurde für die folgende Untersuchung die inaktive Mutante von MARK2 verwendet. Nach Zellyse wurden Zellysate mit HA-Antikörper-Agarose immunopräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot untersucht.



**Abbildung 30: Komplexbildung von MARK2-dn, MARKK und 14-3-3 in Sf9-Zellen**

Westernblot der Immunopräzipitate mit HA-Antikörper aus Sf9-Zellen. Die Sf9-Zellen wurden mit HA/MARK2 T208A/S211A, His/MARKK und His/14-3-3 $\zeta$  allein oder in verschiedenen Kombinationen infiziert. Die Zelllysate wurden mit 5  $\mu$ g/ml HA/Antikörper-Agarose für 4 h bei 4°C inkubiert und anschließend sedimentiert. Die gebundenen Proteine wurden immunologisch mit dem entsprechenden Antikörper (HA, MARKK und 14-3-3) im Westernblot untersucht. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, wurde ein Komplex aus MARKK und 14-3-3 und der dominant negativen MARK2 detektiert (Spur 3 und 6). In diesem Komplex befanden sich zwei (Spur 3) bis drei (Spur 6, I-Isoform von  $\zeta$  überdeckt) 14-3-3 Isoformen.

In der Abbildung 30 sind in Spur 3 und 6 alle drei Proteine zu erkennen. Zwei Isoformen von 14-3-3 sind in beiden Ansätzen zu sehen. Die untere Bande stellt die II-Isoform dar, während die obere die endogene I-Isoform (Spur 3) oder/und die infizierte  $\zeta$ -Isoform (Spur 6) zeigt. Bei einer Überexpression von 14-3-3 $\zeta$  wird die I-Isoform aufgrund des gleichen Molekulargewichtes überdeckt. Das deutlich erhöhte Signal der oberen Bande belegt eine Bindung der  $\zeta$ -Isoform (Spur 5 und 6). Bei den Einzelinfektionsansätzen mit MARKK (Spur 1) oder 14-3-3 $\zeta$  (Spur 4) war kein Signal zu sehen, was die Spezifität der Bindung belegte. Zusammengefasst kann geschlussfolgert werden, dass MARK2, MARKK und 14-3-3 in Sf9-Zellen einen Komplex bilden, an welchen verschiedene Isoformen von 14-3-3 beteiligt sein könnten.

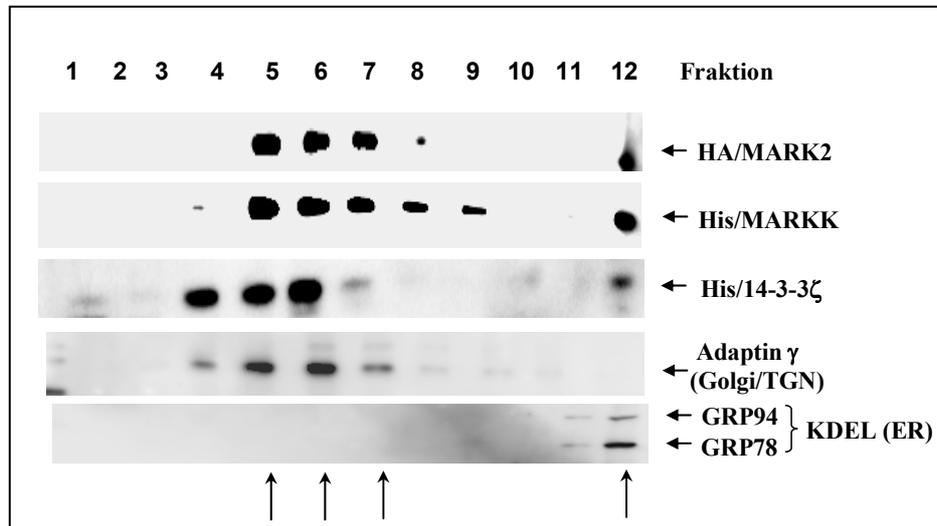
#### **4.3.1.2 Kofraktionierung in Golgi/TGN Kompartimenten**

Die Ergebnisse im Abschnitt 4.2.6.1 legten dar, dass 14-3-3 in der Lage ist, eine Translokation von MARK2 in vesikuläre Kompartimente zu bewirken. Hier stellt sich die Frage, ob die drei Proteine, MARK2, MARKK und 14-3-3, in den Vesikelfraktionen kolokalisieren. Dies könnte die Komplexbildung dieser drei Proteine verifizieren.

Die Sf9-Zellen wurden mit HA/MARK2, His/MARKK und His/14-3-3 $\zeta$  infiziert. Die infizierten Zellen wurden einer subzellulären Fraktionierung unterzogen. Die Vesikel-/Membranfraktion (Pellet P2 aus der Abbildung 25A) wurde direkt auf einen Iodixanolgradienten (2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20% und 30%) aufgetragen und bei 36.000 rpm für 2,5 h zentrifugiert. Die Fraktionen wurden durch Durchstechen des Bodens der Zentrifugationsröhrchen gesammelt. Die schwerste Fraktion wurde mit 12 nummeriert und die leichteste hingegen mit 1. Nach dem Auftrennen wurden die Proben immunobiologisch untersucht. Zur Identifizierung der Vesikel diente  $\gamma$ -Adaptin als Marker für Golgi/trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und die Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)-Sequenz als Marker für Endoplasmatisches Retikulum (ER). KDEL-Signal ist eine konservierte Sequenz in der C-terminalen Region der Proteine, die ins ER zurücktransportiert bzw. im ER zurückgehalten werden.

Wie aus der Abbildung 31 ersichtlich, wurden die Proteine erfolgreich fraktioniert. Die Lokalisation der Proteine beschränkte sich auf bestimmte Fraktionen. MARK2 und MARKK zeigten ein fast identisches Lokalisationsmuster (Fraktion 5-7). Im Vergleich dazu verschob sich die Lokalisation von 14-3-3 $\zeta$  um eine Fraktion (Fraktion 4-6). Eine Kolokalisation der drei Proteine ist in den Fraktionen 5 und 6 zu erkennen, die auch von dem Antikörper gegen den Golgi-Marker erkannt wurden. Die kürzere endogene II-Isoform von 14-3-3 (s. Abb. 18) kommt in den Zellen meistens als zytosolisches Protein vor und wurde aus diesem Grund bereits während der ersten Zentrifugation von der Vesikelfraktion abgetrennt. Auch in der letzten Fraktion, in der sich das ER oder Proteinaggregate befanden, war eine Kolokalisation der drei Proteine zu erkennen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass MARK2, MARKK und 14-3-3 in Golgi/TGN kolokalisieren. Somit konnte die Bildung eines Komplexes aus diesen drei Proteinen verifiziert werden.



**Abbildung 31: MARK2, MARKK und 14-3-3ζ kolokalisieren in Golgi/TGN**

Mit verschiedenen Antikörpern detektierte Westernblots der Fraktionen aus der subzellulären Fraktionierung. Sf9-Zellen aus einer T75 Kulturflasche wurden mit HA/MARK2, His/MARKK und His/14-3-3ζ infiziert. Mit den Zellen wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Die Vesikelfraktion wurde auf einen Iodixanolgradienten (2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20% und 30%) aufgetragen und zentrifugiert. 12 Fraktionen wurden gesammelt. Die schwerste Fraktion wurde mit 12 nummeriert und die leichteste hingegen mit 1. Für die Charakterisierung der Vesikelfraktionen wurden  $\gamma$ -Adaptin als Marker für Golgi/TGN und die Sequenz Lys–Asp–Glu–Leu (KDEL) als Marker für ER verwendet. Auf dem Westernblot wurden mit dem KDEL-Antikörper zwei Proteine detektiert, das GRP78 (*Glucose regulated protein 78*) und GRP94. Beide Proteine besitzen die KDEL-Sequenz am C-terminalen Ende. Fraktionen, wo eine Kolokalisation von MARK2, MARKK und 14-3-3ζ nachgewiesen wurde, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

### 4.3.2 MARKK und 14-3-3 $\zeta$ inhibieren gegenseitig ihre Bindung an MARK2 wt

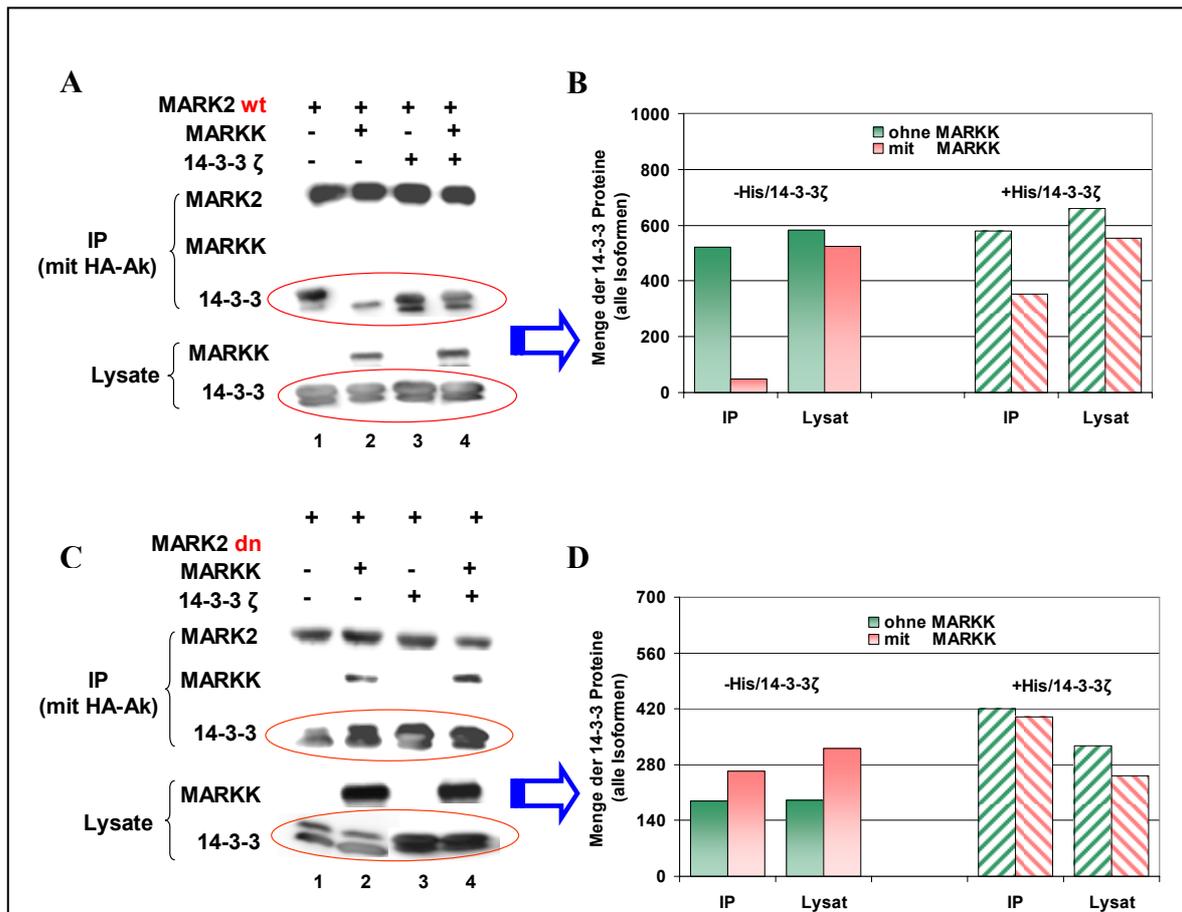
Die Bildung des Komplexes aus MARK2, MARKK und 14-3-3 könnte eine bedeutende Rolle bei der Regulation von MARK2 spielen. Hier stellen sich die Fragen, wie die Wechselwirkungen von MARKK und 14-3-3 an MARK2 reguliert werden und ob diese zwei Proteine kooperativ oder kompetitiv an MARK2 binden.

#### 4.3.2.1 MARKK inhibiert die Bindung zwischen MARK wt und 14-3-3

Die gestellten Fragen sollten durch Koimmunopräzipitationsexperimente beantwortet werden. Zu diesem Zweck wurden die drei Proteine in Sf9-Zellen in verschiedenen Kombinationen überexprimiert. Durch Koimmunopräzipitation wurden die Bindungsverhältnisse untersucht. Es wurden parallele Experimente mit MARK2-Wildtyp und der inaktiven Mutante (T208A/S212A) durchgeführt. Die immunopräzipitierten Proteine und die Lysate wurden auf alle drei Proteine untersucht.

Die Abbildung 32A und B stellen die Ergebnisse mit MARK2-Wildtyp dar. Wurden die Zellen nur mit MARK2 infiziert, konnten die endogene 14-3-3 I- und II-Isoform gut an sie binden (Spur 1; vgl. Abb. 18). Wenn MARKK koinfiziert wurde, verschwand die obere 14-3-3I-Bande in der MARK-IP, obwohl die Expression in den Zellen auf gleichem Niveau blieb (Lysate). Bei einer Überexpression von 14-3-3 $\zeta$  war dieser Effekt durch MARKK geringer ausgeprägt. Im Gegensatz dazu wurde die Interaktion zwischen MARK und der II-Isoform von 14-3-3 (untere Bande) nicht von MARKK beeinflusst. Da MARKK nur transient an MARK2-Wildtyp bindet (s. Abb. 10 und 32A), kann eine Konkurrenz um die Bindungsstellen an MARK zwischen MARKK und 14-3-3 nicht der Hauptgrund für die abgeschwächte Wechselwirkung zwischen MARK und 14-3-3 bei einer Koexpression von MARKK sein. Eine Möglichkeit, wodurch MARKK eine Inhibierung der Wechselwirkung zwischen MARK und 14-3-3 auslösen könnte, könnte eine Modifikation der MARK2 z.B. durch Phosphorylierung durch MARKK sein. Daraufhin könnte eine Konformationsänderung hervorgerufen werden, so dass die Bindungsstelle an MARK für 14-3-3 nicht mehr zugänglich ist.

Diese Vermutung wurde durch das parallel durchgeführte Experiment mit der dominant negativen Mutante (T208A/S212A) von MARK2, deren Aktivierungsschleife nicht von MARKK phosphoryliert werden kann, verifiziert. Wie aus der Abbildung 32C ersichtlich, wurde bei allen Ansätzen ungefähr die gleiche Menge an 14-3-3 koimmunopräzipitiert. Die aktive Mutante von MARK (T208E) besitzt durch Mutation eine ähnliche Konformation wie die der durch MARKK am Thr208 phosphorylierten MARK. Diese Mutante konnte im Hefe-Zwei-Hybrid Test nicht mit 14-3-3 interagieren (s. Abb. 17). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung an MARK in der Aktivierungsschleife durch MARKK eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung zwischen MARK2 und 14-3-3 spielt.



**Abbildung 32: Effekt der MARKK auf die Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 in Sf9-Zellen**

Sf9-Zellen wurden mit HA/MARK2 allein oder mit MARKK oder 14-3-3 $\zeta$  zusammen infiziert. Mittels HA-Antikörper-Agarose wurden die Proteine immunopräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden im Westernblot mit dem entsprechenden Antikörper auf die Anwesenheit einzelner Proteine untersucht.

**(A) Inhibition der Wechselwirkung zwischen MARK2-Wildtyp und 14-3-3 durch MARKK.** Westernblot der Immunopräzipitate und Lysate aus Sf9-Zellen. Die Koinfektion von MARKK bewirkte im Vergleich zur Einzelinfektion mit MARK2 eine Abnahme der Menge an 14-3-3 $\zeta$  in dem Immunokomplex. Dieser Effekt von MARKK galt sowohl für die endogene I-Isoform (Spur1 und 2) als auch für die überexprimierten  $\zeta$ -Isoform, aber nicht für die II-Isoform (Spur3 und 4). Die Expressionen der 14-3-3 in den einzelnen Ansätzen waren vergleichbar (Lysate).

**(B) Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen MARK2 und 14-3-3.** Die Intensitäten der 14-3-3-Banden (alle Isoformen) aus dem Immunoblot A (mit rotem Oval gekennzeichnet) wurden mittels des Programms AIDA ermittelt und als Diagramm dargestellt. Eine Überexpression von MARKK führte zu einem 90% Verlust der Bindung endogenen 14-3-3I an MARK2. Wurde 14-3-3 $\zeta$  überexprimiert (gestreifte Balken) konnte wegen des Überschusses an 14-3-3 mehr 14-3-3 in dem Immunopräzipitat detektiert werden. Allerdings lag der Wert nur bei 60% des Ansatzes, wo keine MARKK überexprimiert wurde. Die Überexpression von MARKK hatte keine signifikante Wirkung auf den Expressionsgrad von 14-3-3 (Lysat-Balken).

**(C) Wechselwirkung zwischen dominant negativer MARK2 und 14-3-3.** Westernblot der Immunopräzipitate und Lysate aus Sf9-Zellen. Die Wechselwirkung zwischen 14-3-3 und MARK2-dn wurde nicht von MARKK beeinflusst. Es ist keine deutliche Veränderung bei präzipitierten 14-3-3 Proteinen zu erkennen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit MARK2 wt wurde auch MARKK in den Immunopräzipitaten nachgewiesen.

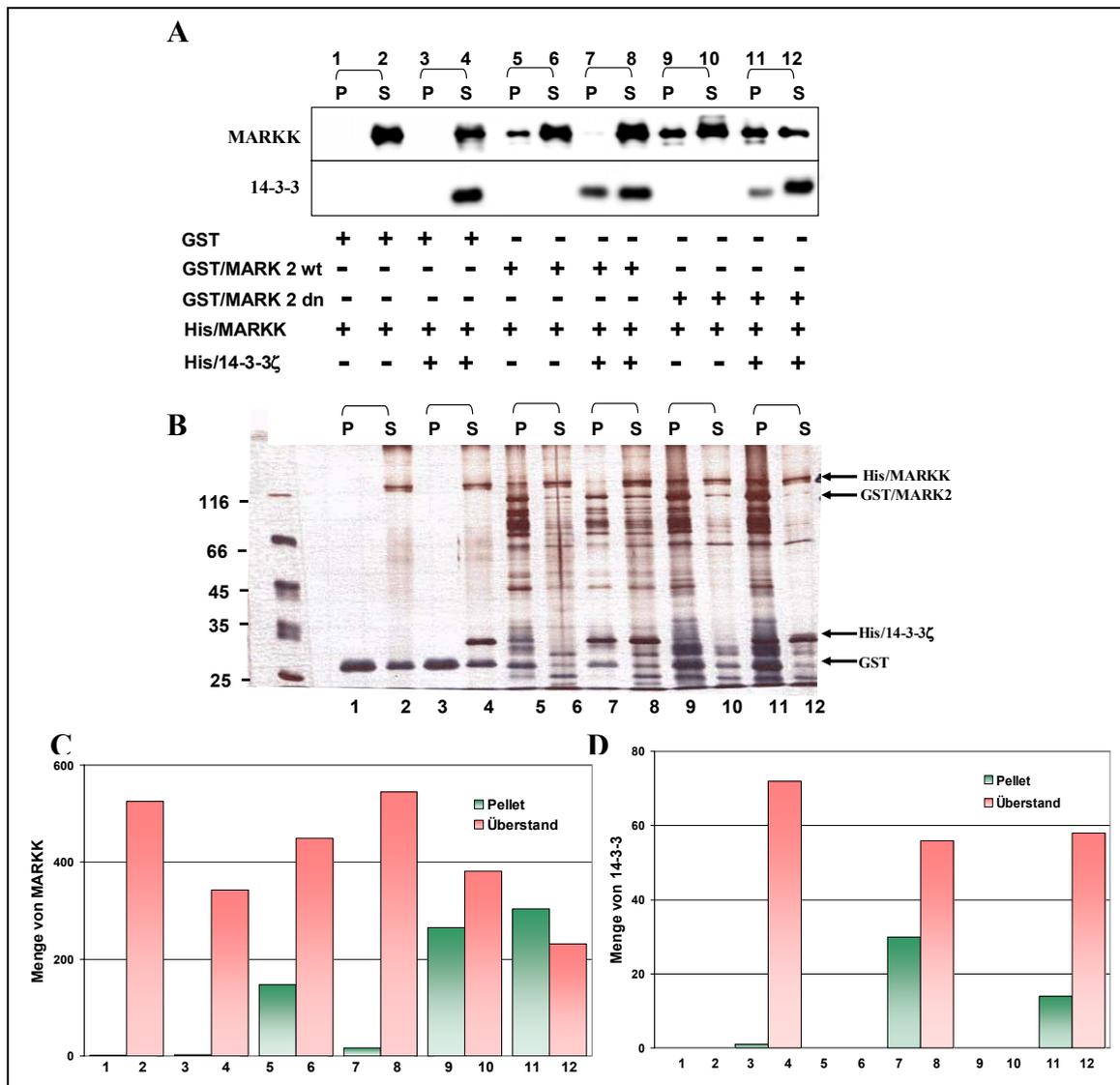
**(D) Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen MARK2-dn und 14-3-3.** Kein signifikanter Einfluss von MARKK auf die Wechselwirkung zwischen MARK2-dn und 14-3-3 wurde festgestellt.

#### 4.3.2.2 Die Bindung zwischen MARK2 wt und MARKK wird durch 14-3-3 $\zeta$ inhibiert

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die im letzten Abschnitt dargelegten Ergebnisse auch *in vitro* ohne Einflüsse anderer Proteine verifiziert werden können. Zu diesem Zweck wurden GST-markierte MARK2 Volllängekonstrukte verwendet und ein *in vitro* Pulldown-Experiment durchgeführt.

Wie in Abbildung 33A gezeigt, konnte eine direkte Interaktion zwischen MARKK und MARK2-Wildtyp beobachtet werden (Spur 5). Diese Wechselwirkung war allerdings im Vergleich zu dem Ansatz mit MARK-dn (Spur 9) deutlich schwächer. Diese relativ schwache Bindung von MARKK und MARK2-Wildtyp wurde durch Zugabe von 14-3-3 $\zeta$  fast vollständig inhibiert (Spur 7).

Die Experimente mit der dominant negativen Mutante von MARK2 ergaben, dass die Wechselwirkung zwischen MARK2-dn und MARKK nicht von 14-3-3 beeinflusst wurde (Spur 9-12). Dazugegebenes 14-3-3 konnte auch an den Komplex aus MARK2-dn und MARKK binden (Spur 11). Aufgrund der Besetzung der Bindungsstellen an MARK2-dn durch MARKK konnte im Vergleich zum Ansatz mit MARK2-Wildtyp deutlich weniger 14-3-3 detektiert werden (Vgl. Spur 7 und 11). Die Beobachtung, dass MARKK und 14-3-3 gleichzeitig an dominant negativer MARK2 binden können, stimmt mit den Ergebnissen aus dem Koimmunopräzipitation-Experiment in Sf9-Zellen überein (Abb. 32C und D). Bei Bindung an MARK2-Wildtyp wurden allerdings gegenseitige Inhibierungen zwischen MARKK und 14-3-3 festgestellt. In Sf9-Zellen wurde die Bindung von 14-3-3 durch MARKK eliminiert, während *in vitro* 14-3-3 die MARKK von MARK2 verdrängte. Die Konzentrationen einzelner Komponenten könnten dabei eine entscheidende Rolle spielen.



**Abbildung 33: Inhibition der Interaktion zwischen MARK2 und MARKK durch 14-3-3 *in vitro***

1,5  $\mu$ M GST, GST/MARK2, His/MARKK und His/14-3-3 $\zeta$  wurden für das Pulldown-Experiment eingesetzt. Nach 4 Stunden Inkubation in einem gesamten Volumen von 50  $\mu$ l wurde 5  $\mu$ l 50% Glutathion-Sepharose dazu gegeben und weiter für eine Stunde inkubiert. Das sedimentierte Pellet (P) wurde in 20  $\mu$ l 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Zu dem Überstand (S) wurden 10  $\mu$ l 6 x SDS-Probenpuffer gegeben.

(A) **Westernblot der gebundenen und ungebundenen Fraktionen aus dem GST-Pulldown Assay.** 5  $\mu$ l der jeweiligen Fraktionen wurden hier pro Spur aufgetragen.

(B) **Silbergefärbtes 10%-iges SDS-Gel mit den gebundenen und ungebundenen Fraktionen aus dem GST-Pulldown Assay.** Für die Silberfärbung wurden 3  $\mu$ l/Spur aufgetragen. GST/MARK2 wurde stark von dem C-terminalen Ende abgebaut, was in dem silbergefärbten Gel zu erkennen war. Die eingesetzten Proteine wurden durch Pfeile am Rand des Geles gekennzeichnet.

(C) **Quantifizierung der MARKK-Menge.** Die Intensität der MARKK-Banden aus dem Immunoblot A wurde mittels des Programms AIDA ermittelt und als Diagramm dargestellt.

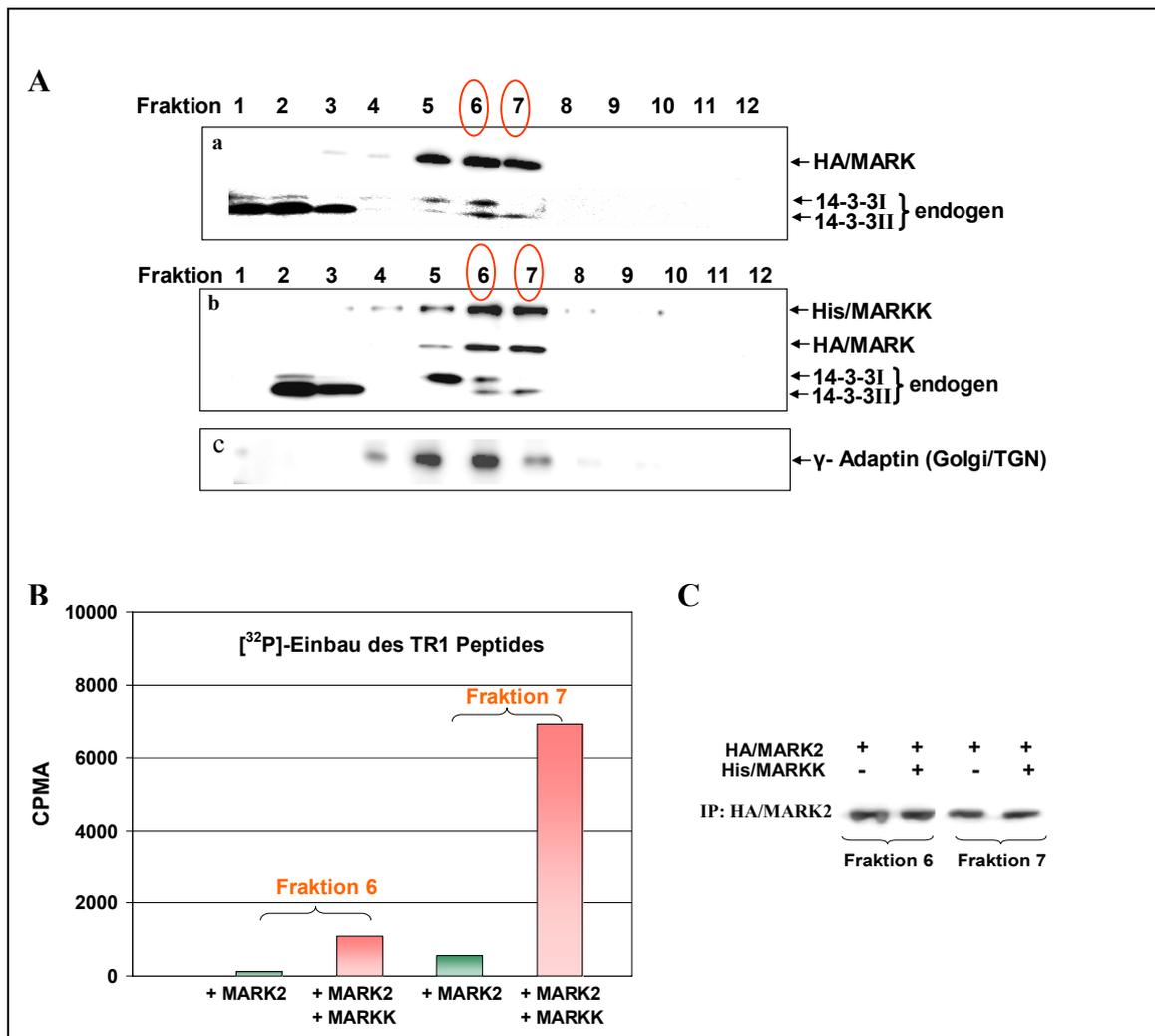
(D) **Quantifizierung der 14-3-3-Menge.** Die Intensität der 14-3-3-Banden aus dem Immunoblot A wurde mittels des Programms AIDA ermittelt und als Diagramm dargestellt.

### 4.3.3 14-3-3 inhibiert die Aktivierung von MARK2 in Anwesenheit von MARKK

#### 4.3.3.1 Aktivitätsvergleich der Fraktionen aus Iodixanol-Dichtegradienten

Die subzelluläre Fraktionierung ermöglicht nicht nur eine Bestimmung der Proteinlokalisierung und den Zugang zu den intrazellulären Organellen, sondern zahlreiche andere Proteine können von dem zu untersuchenden Proteinkomplex abgetrennt werden und somit die Komplexitäten der gesamten Proteine reduziert werden. Aus diesem Grund werden die aufgereinigten Organellen als gute Objekte für die funktionellen Untersuchungen der sich darin befindenden Proteine betrachtet. Im Abschnitt 4.3.1.2 konnte gezeigt werden, dass MARK2, MARKK und 14-3-3 in Golgi/TGN kolokalisieren. Mit diesen Vesikeln sollte die Regulation der MARK untersucht werden.

Die S9-Zellen wurden mit HA/MARK2 allein oder mit His/MARKK zusammen infiziert. Nach einer subzellulären Fraktionierung wurde die Lokalisation der Proteine untersucht (Abb. 34). Wie erwartet wurden die MARK2 und MARKK in Golgi/TGN nachgewiesen (Abb. 34A). In den Fraktionen 6 und 7 wurde MARK2 in vergleichbarer Menge beobachtet, was einen Vergleich der Aktivität ermöglichte. Allerdings konnten die Fraktionen nicht direkt für den Kinase-Assay eingesetzt werden, denn das Gradientenmedium Iodixanol inhibiert die Aktivität von MARK (Daten nicht gezeigt). Um den Einfluss des Iodixanolmediums zu beseitigen und gleichzeitig die Kinase zu konzentrieren, wurden die Fraktionen mittels HA-Antikörper-Agarose immunopräzipitiert. Die Aktivität der Immunopräzipitate wurde anschließend anhand der Phosphorylierung des TR1-Peptides gemessen. Wie das Diagramm in der Abbildung 33B zeigt, wurde die Aktivität von MARK2 durch Anwesenheit von MARKK fast 10-fach erhöht. Diese Erhöhung ähnelt der *in vitro* erzielten Aktivierung (Timm et al., 2003) und ist deutlich stärker bei den im Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Experimenten, (vgl. Abb. 15A), wo die gesamten Zellysate statt der gereinigten Vesikelfraktionen als Material für die Immunopräzipitation dienten. Dies führte zu der Annahme, dass durch die Fraktionierung Proteine entfernt wurden, die mit MARKK um die Bindungsstellen an MARK2 konkurrieren oder inhibierend auf MARK2 oder MARKK wirken.



### Abbildung 34: 14-3-3 $\zeta$ inhibiert die MARK-Aktivität

Die Sf9-Zellen wurden mit HA/MARK2 allein oder mit MARKKK zusammen infiziert. Mit den Zellen wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt, wobei die vesikulären Fraktionen auf Iodixanol-Gradienten aufgetrennt wurden. Zwei der Fraktionen (Fraktion 6 und 7) wurden mit HA-Antikörper-Agarose immunopräzipitiert. Die Aktivität der Immunopräzipitate wurde im Kinase-Assay eingesetzt, wo TR1-Peptid als Substrat diente.

**(A) Subzelluläre Fraktionierung der Sf9-Zellen.** Die Fraktionen wurden im Westernblot auf die Lokalisation von MARK2, MARKKK und die endogenen 14-3-3 Proteine untersucht. Es wurde Kolokalisation von MARK2 und MARKKK beobachtet (Abb. A:b: Fraktion 5-7). Zwei Isoformen endogener 14-3-3 Proteine wurden detektiert, die teilweise mit MARK2 und MARKKK kolokalisierten (Abb. A:a und b: Fraktionen 5-7). Allerdings kam der größte Teil von 14-3-3 in den leichteren Fraktionen vor. Fraktionen, in denen die Kolokalisation der drei Proteine detektiert wurde und die Mengen an MARK2 vergleichbar waren, wurden mit roten Ovalen gekennzeichnet. Mit diesen Fraktionen wurde anschließende eine Immunopräzipitation durchgeführt.

**(B) Phosphateinbau des TR1-Peptides in Anwesenheit immunopräzipitierter HA/MARK2.** Die immunopräzipitierte MARK2 wurde in Kinase-Assay auf ihre Aktivität untersucht. Als Substrat diente das TR1-Peptid von Tau. Bei einer Koinfektion von MARKKK wurde die Aktivität von MARK2 erhöht. Die MARK2 aus Fraktion 7 zeigte im Vergleich zu der aus Fraktion 6 eine 5-fache Steigerung der Aktivität. Als signifikanter Unterschied war die Abwesenheit von 14-3-3I in Fraktion 7 auszumachen.

**(C) Westernblot zum Nachweis der Menge immunopräzipitierter HA/MARK2.** Die immunopräzipitierte MARK2, die in dem Kinase-Assay eingesetzt wurde, wurde im Westernblot untersucht. Die Mengen an MARK2 waren bei Einzel- und Doppelinfektion sowohl in Fraktion 6 und 7 vergleichbar.

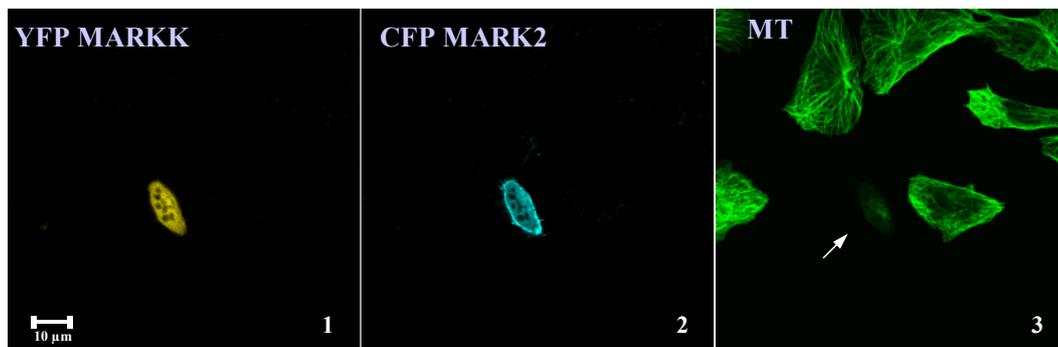
Erstaunlicherweise wurde auch eine 10-fache Erhöhung bei Fraktion 7 im Vergleich zu Fraktion 6 gemessen, sowohl bei Einzelinfektion mit MARK2 als auch bei der Doppelinfektion mit MARK2 und MARKK. Um zu überprüfen, ob die Mengen an der Kinase MARK2 in diesen zwei Fraktionen vergleichbar waren, wurden die Präzipitate mit HA-Antikörper auf MARK2 untersucht. Die Abbildung 34C schließt eine Abweichung der Menge an MARK2 aus. Eine Erklärung für diese Erhöhung wäre, dass ein oder mehrere inhibierende(r) Faktor(en) aus der Fraktion 7 abgetrennt wurde(n) und in Fraktion 6 noch vorhanden ist (sind). Aufgrund der Beobachtung, dass 14-3-3 die Aktivität von MARK2 durch Bindung inhibiert, wurde als erstes die Lokalisation von 14-3-3 in den Fraktionen untersucht. Die Immunoblots a und b in Abbildung 34A zeigen, dass die II-Isoform von 14-3-3 in den ersten Fraktionen vorkam, während die I-Isoform in der Golgi/TGN lokalisiert ist, wo auch MARK2 und MARKK lokalisieren. Allerdings wurde 14-3-3I nur bis Fraktion 6 detektiert. In Fraktion 7 wurde nur die II-Isoform nachgewiesen, diese in ungefähr gleicher Menge wie in der Fraktion 6. Der einzige Unterschied zwischen Fraktion 6 und 7 ist die Anwesenheit von endogenem 14-3-3I in Fraktion 6. Diese Ergebnisse zeigen, dass 14-3-3, in diesem Falle die endogene I-Isoform, der inhibierende Faktor sein könnte. Seine Abtrennung aus der Fraktion 7 führte zu einer 10-fachen Erhöhung von MARK2-Aktivität.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass 14-3-3 in der Lage ist, als inhibierender Faktor im Proteinkomplex MARK2/MARKK/14-3-3 zu wirken. Der inhibierende Effekt auf MARK gewinnt gegenüber dem stimulierenden Effekt von MARKK.

#### 4.3.3.2 Koexpressionsexperiment in CHO-Zellen

Sollte die im letzten Abschnitt beschriebene Rolle von 14-3-3 physiologisch relevant sein, so sollte 14-3-3 in Zellen in der Lage sein, die MT-destabilisierende Wirkung von MARK in Anwesenheit von MARKK zu unterbinden. Im Folgenden sollte dies auf der zellulären Ebene untersucht werden.

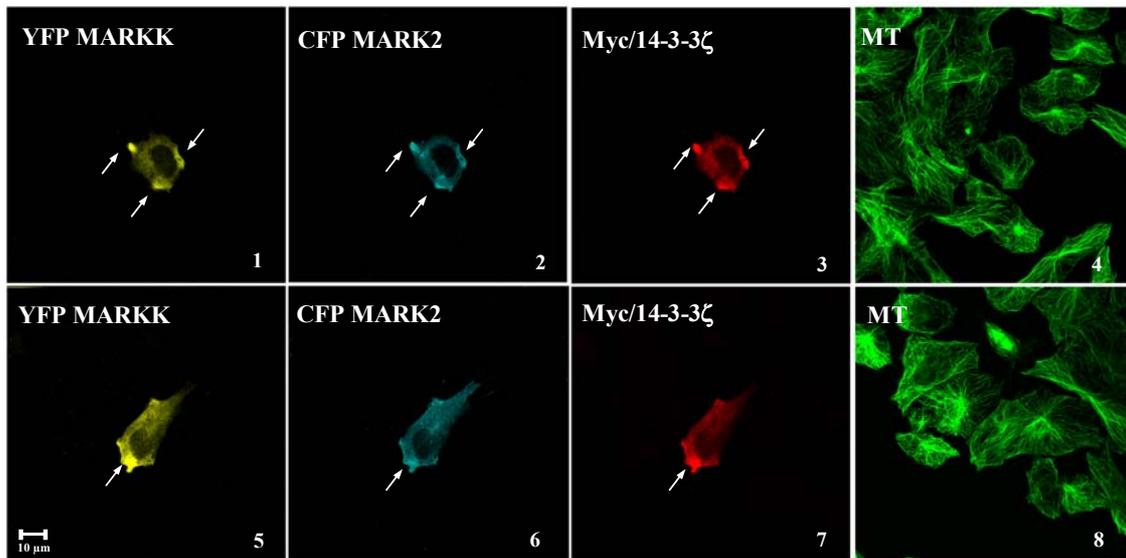
Wie gezeigt, bewirkt MARK2 allein eine Destabilisierung bis Auflösung des Mikrotubulinnetzwerks (s. Abb. 27). Dieser Effekt wird durch Anwesenheit von MARKK verstärkt (Timm et al., 2003). Wie aus der Abbildung 35 ersichtlich, führten MARK und MARKK zu deutlichen morphologischen Veränderungen. Die Zellen wurden kleiner und eine Auflösung der Mikrotubuli wurde festgestellt.



**Abbildung 35: Koexpression von MARK2 und MARKK führt zum Verlust des MT-Netzwerks**  
CHO-Zellen wurden mit CFP-MARK2 und YFP-MARKK transfiziert und nach 18 Stunden Inkubationszeiten fixiert. Für die Mikrotubulifärbung wurde Cy5-konjugierter YL1/2-Antikörper verwendet. Eine Auflösung der Mikrotubuli wurde bei der Koexpression von MARKK und MARK2 beobachtet.

Um die Rolle von 14-3-3 $\zeta$  zu untersuchen, wurden die Zellen einer Tripeltransfektion (MARK2, MARKK und 14-3-3 $\zeta$ ) unterzogen. Die Abbildung 36 zeigt zwei Beispiele transfizierter Zellen. Alle drei Proteine wurden gut exprimiert, allerdings wurden keine Veränderungen der Morphologie bei den transfizierten Zellen beobachtet. Das Mikrotubulinnetzwerk wurde auch nicht beeinflusst (Abb. 36: 4 und 8). Zusammengefasst kann gesagt werden, dass 14-3-3 $\zeta$  auch in Zellen in der Lage ist, nicht nur die MT-destabilisierende Wirkung von MARK2, sondern auch die MARK2-stimulierende Wirkung von MARKK zu unterbinden. Außerdem wurde eine Kolo-kalisierung dieser drei

Proteine beobachtet, vor allem an der Plasmamembran (Abbildung 36:1-3; 5-7, durch Pfeile gekennzeichnet).



**Abbildung 36: 14-3-3 inhibiert die MT-destabilisierende Wirkung von MARK2 in Anwesenheit von MARKK**

CHO-Zellen wurden mit Myc/14-3-3, YFP-MARKK und CFP-MARK2 transfiziert und nach 18 Stunden Inkubationszeiten fixiert. 14-3-3 wurde mit Anti-myc-Antikörper und TRITC-gekoppeltem Sekundär-Antikörper visualisiert. Für die Mikrotubulifärbung wurde ein Cy5-konjugierter YL1/2-Antikörper verwendet.

Koexpression von 14-3-3 stabilisiert das Mikrotubulinetzwerk in Anwesenheit von MARKK. Es wurde Kolokalisation von MARK, MARKK und 14-3-3 an der Plasmamembran beobachtet (durch Pfeile gekennzeichnet).

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Aufklärung der Regulation der Proteinkinase MARK.

MARK (MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase) wurde aufgrund ursprünglich ihrer Aktivität entdeckt, das Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP) Tau zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung findet ausschließlich innerhalb der Mikrotubuli-bindenden Domäne statt und führt zur Ablösung des Tau-Proteins von den Mikrotubuli, den Schienen des axonalen Transports und damit zu deren Destabilisierung. Das an dieser Stelle phosphorylierte Tau-Protein wurde auch in neurofibrillären Bündeln (NFTs: *neuronal fibrillary tangles*), Kennzeichen der Alzheimer-Demenz, nachgewiesen (Morishima-Kawashima et al., 1995; Hasegawa et al., 1992; Delacourte und Buee, 2000).

MARK gehört zur Familie der KIN1/PAR-1/Snf1-Kinasen, die in Säugetieren vier Mitglieder in mehreren Spleißvarianten zählt. Die Mitglieder dieser Familie spielen vor allem eine entscheidende Rolle bei der Polaritätsentwicklung sowie der Errichtung und Erhaltung der asymmetrischen Organisation von Zellen (Böhm et al., 1997; Cox et al., 2001; Biernat et al., 2002). Außerdem sind sie auch in die MAPK-Kaskade (Müller et al., 2001), den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg (Kato et al., 2001; Ossipova et al., 2005) und die Regulation des Zellzyklus (Peng et al., 1998) involviert.

### 5.1 Interaktion zwischen MARK und MARKK

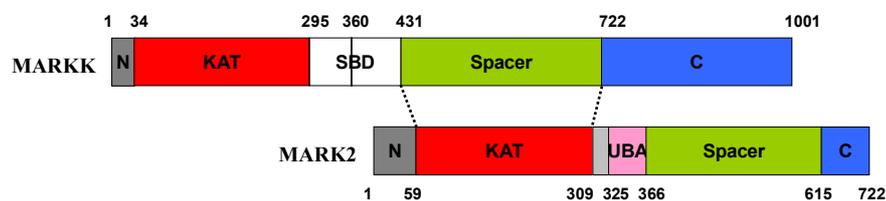
In der aus Schweinegehirn gereinigten MARK2 wurden in einem tryptischen Peptid der Aktivierungsschleife je ein phosphoryliertes Threonin (Thr208) und Serin (Ser212) gefunden. Eine Dephosphorylierung des Proteins mit Serin/Threonin-spezifischen Phosphatasen führte zum Verlust der Kinaseaktivität. Die Mutagenese dieser beiden Aminosäuren zu Alanin führt zur Inaktivierung der Kinase (Drewes et al., 1997).

Die Suche nach der MARK-aktivierenden Kinase führte zu einer Serin/Threonin-Kinase, die MARKK (MARK-Kinase) genannt wurde (Timm et al., 2003). Die Isolierung dieser Kinase aus Schweinegehirn erfolgte durch mehrere chromatographische Schritte, u.a. mittels Affinitätschromatographie mit einem verkürzten Konstrukt (AS1-370) der dominant negativen MARK2 (T208A/S212A) als Ligand. MARKK bzw. ihr Homolog aus Ratte TAO1, gehört zur Gruppe der Ste20-Kinasen, die sich in zwei Familien unterteilen lassen, die p21-aktivierten Proteinkinasen (PAKs) und die „*germinal center kinases*“ (GCKs). MARKK/TAO1 sowie die verwandten Kinasen PSK/TAO2 und JIK/KDS gehören zur Gruppe VIII der GCK-Kinasen und sind in die MKK3/p38- und MKK6/JNK-Stress-aktivierten Signalwege involviert (Hutchinson et al., 1998; Chen et al., 1999; Chen und Cobb, 2001; Tassi et al., 1999; Carter et al., 2000). Bei PSK, dem humanen Homolog von TAO2 wurde eine regulatorische Funktion bei dem Aktin- und Mikrotubulinnetzwerk nachgewiesen (Moore et al., 2000; Mitsopoulos et al., 2003). Überexpression der PSK in Zellen führt zur Abnahme der Stressfasern und Reorganization von Aktin (Moore et al., 2000). Außerdem kann PSK  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin phosphorylieren und stabilisieren (Mitsopoulos et al., 2003). Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser beiden Effekte sind noch unklar.

In dieser Arbeit wurde eine direkte Wechselwirkung zwischen MARKK und MARK2 einerseits durch Koimmunoprecipitationsexperimente in infizierten Sf9-Zellen und andererseits in einem zellfreien System durch GST-Pulldown-Experimente verifiziert. In Sf9-Zellen wurde eine Interaktion nur zwischen MARKK und der dominant negativen Mutante von MARK2 festgestellt, aber nicht mit dem MARK2-Wildtyp. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Interaktion zwischen der Kinase (MARKK) und dem Substrat (MARK) oft nur transient verläuft. Nach einer Phosphorylierung wird das Substrat sofort von der Kinase abgelöst, so dass die Kinase wieder einsatzbereit ist. Der Austausch von Threonin und Serin gegen nicht phosphorylierbare Aminosäurereste in der Aktivierungsschleife von MARK erhöht ihre Verweildauer in der Substratbindungsstelle von MARKK. *In vitro* konnte auch eine Bindung der MARKK an MARK2-Wildtyp nachgewiesen werden. Der Grund dafür besteht darin, dass *in vitro* die Vielzahl von Proteinen, die in Zellen mit MARKK um die Bindungsstelle an

MARK konkurrieren, nicht existiert. Außerdem waren die Konzentrationen der *in vitro* eingesetzten Proteine viel höher als die der in Zellen exprimierten.

Die Frage, welche Domäne von MARK und MARKK miteinander wechselwirken, wurde durch Hefe-Zwei-Hybrid Tests und GST-Pulldown Assays beantwortet. Als MARKK-Bindungsstelle wurde die katalytische Domäne der MARK2 identifiziert, während die „Spacer“-Domäne der MARKK als Interaktionsdomäne fungiert (Abbildung 37). Diese „Spacer“-Domäne befindet sich in der regulatorischen Hälfte der MARKK und ist in allen Kinasen der GCK VIII Gruppe konserviert.



**Abbildung 37: Interaktionsmodell von MARK2 und MARKK.**

Die katalytische Domäne von MARK interagiert mit der „Spacer“-Domäne von MARKK.

*In vitro* Experimente zeigten, dass MARKK die MARK2 an Thr208 in der Aktivierungsschleife phosphoryliert, was eine 15-fache Erhöhung der MARK2-Aktivität bewirkt (Timm et al., 2003). Die Relevanz dieser Funktion in Zellen konnte in dieser Arbeit dadurch bestätigt werden, dass die in Sf9-Zellen exprimierte MARK durch eine Koexpression von MARKK aktiviert wird. Allerdings ist der aktivierende Effekt in Zellen im Vergleich zu dem in den *in vitro* Experimenten viel geringer und lag nur bei einer 3-fachen Aktivitätserhöhung. Dieser *in vitro*/in Zellen-Unterschied wurde auch bei anderen Kinasen festgestellt. TAO1 z.B. kann die MEK3-Aktivität (bzgl. der p38-Phosphorylierung) *in vitro* bis zu 100-fach, in Zellen jedoch nur 3-fach erhöhen (Hutchison et al., 1998). Der Grund dafür könnte einerseits darin liegen, dass die Kinasen in Zellen inhibitorischen Effekten anderer Proteine ausgesetzt sind. Die phosphorylierten Kinasen könnten z.B. durch Phosphatasen dephosphoryliert werden, was zum Verlust der Aktivität führt. Andererseits ist es auch vorstellbar, dass die Kinase-Bindungsstellen (MARKK oder TAO1) am Substrat (MARK oder MEK3) von anderen Proteinen abgeschirmt oder besetzt sind und somit die Kinase nur einen beschränkten Zugang zum Substrat bekommt.

Parallel wurde die aktivierende Wirkung von MARKK auf MARK2 in CHO- und PC12-Zellen verifiziert. Die Koexpressionsexperimente in CHO-Zellen ergaben, dass die Aktivität bzw. die Fähigkeit der MARK, Tau zu phosphorylieren und somit die Mikrotubuli zu destabilisieren, durch MARKK erhöht wurde. PC12-Zellen weisen hohe Expressionen der endogenen MARK und MARKK auf. Durch die Behandlung mit NGF (*neuronal growth factor*) wird die Expression von MARK erhöht und MARK durch MARKK aktiviert (Timm et al., 2003). Die endogene MARK und MARKK kolokalisieren u.a. an der Plasmamembran und im Wachstumskegel von Neuronen. Mittels siRNA Experimente wurde eine entscheidende Rolle der MARKK bei der Differenzierung von PC12-Zellen beobachtet (Timm et al., 2003).

Die Aktivierung der MARK durch MARKK erfolgt durch eine Phosphorylierung der einzigen Stelle Thr208 in der Aktivierungsschleife. Die Aktivierungsschleife der MARK wird dadurch stabilisiert und der Zugang zum katalytischen Zentrum wird freigehalten. Der andere Aminosäurerest Ser212, der auch phosphoryliert im Gehirn vorkommt, spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Aktivität von MARK. Dieser Rest, der nicht von MARKK phosphoryliert wird, übt nach seiner Phosphorylierung möglicherweise einen inhibierenden Effekt auf die Aktivität von MARK aus. Die Kinase, die diesen Aminosäurerest phosphoryliert, ist noch nicht bekannt. Mutationen an dieser Stelle, sowohl zum Glutamat als auch zum Alanin, führen zu einem vollständigen Verlust der Aktivität von MARK. Es wird vermutet, dass Ser212 bei der Stabilisierung der MARK Struktur bzw. der Aktivierungsschleife von Bedeutung ist (Timm et al., 2003).

### **5.2 Interaktion zwischen MARK und 14-3-3**

Um neue, biologisch relevante Bindungspartner von MARK2 zu finden, wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid Screen in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Dabei wurden 14-3-3 $\beta$ - und  $\zeta$ -Isoform als neue Interaktionspartner der MARK identifiziert. 14-3-3 Proteine sind eine Familie von Molekülen, die eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen eukaryotischer Zellen spielen, z.B. bei der Aktivierung der

MAP Kinase, der Apoptose, der Zellzyklusregulation und von Genregulationsprozessen (Aitken, 1996; Fu et al., 2000). In *Drosophila* wird 14-3-3 als Par-5 bezeichnet und ist zusammen mit MARK/PAR-1 von großer Bedeutung bei der Polaritätsentwicklung (Morton et al., 2002).

### 5.2.1 14-3-3-Bindungsstellen an MARK

Die Wechselwirkung zwischen MARK2 und 14-3-3 konnte in dieser Arbeit durch eine Immunopräzipitation biochemisch verifiziert werden. 14-3-3 Proteine erkennen spezifisch kurze Phosphoserin/Threonin Motive. Dabei gibt es bestimmte Konsensus-Sequenzen, z.B. RSXpSXP, RXRXXpSXP oder RXXpS, an die 14-3-3 Proteine bevorzugt binden (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997). Allerdings sind mittlerweile viele Proteine bekannt, deren Bindungen an 14-3-3 durch andere Sequenzen vermittelt werden, z.B. Cdk5 (Toyo-oka et al., 2003), PKC $\mu$  (Hausser et al., 1999) und LIM-Kinase (Gohla und Bokoch, 2002). In MARK existieren keine der erwähnten Konsensus-Sequenzen. Trotzdem konnten die *E. coli* exprimierten GST/MARK2-Konstrukte *in vitro* mit 14-3-3 interagieren. Da in *E. coli* keine posttranslationale Modifikation durchgeführt wird, könnte das auf eine phosphorylierungsunabhängige Wechselwirkung zwischen MARK und 14-3-3 hinweisen. Die phosphorylierungsunabhängige Bindung wurde auch bei anderen Proteinen detektiert, z.B. dem Exoenzym S, p190RhoGEF und dem R18-Peptid Inhibitor (Henriksson et al., 2002; Masters et al., 1999; Petosa et al., 1998; Wang et al., 1999; Zhai et al., 2001).

Es wurde allerdings auch über eine phosphothreonin-abhängige Bindung von 14-3-3 an MARK/PAR-1 berichtet. In der C-terminalen „Spacer“-Domäne der MARK2 befindet sich das Thr539, das in allen Isoformen konserviert ist. Die atypische Proteinkinase C (aPKC) ist in der Lage, diesen Aminosäurerest zu phosphorylieren, wodurch eine Bindungsstelle für 14-3-3 erzeugt wird (Hurov et al., 2004; Suzuki et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnte in unserem Hefe-Zwei-Hybrid Screen keine Wechselwirkung zwischen 14-3-3 und der C-terminalen Hälfte (AS324-722) nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte sein, dass diese Stelle in Hefen nicht phosphoryliert wird, oder dass die Bindung von 14-3-3 an diese Stelle (Thr539) eine bestimmte Konformation oder

zusätzliche Stellen zur Stabilisierung benötigt, die in einem Hefe-Zwei-Hybrid System nicht vorhanden sind.

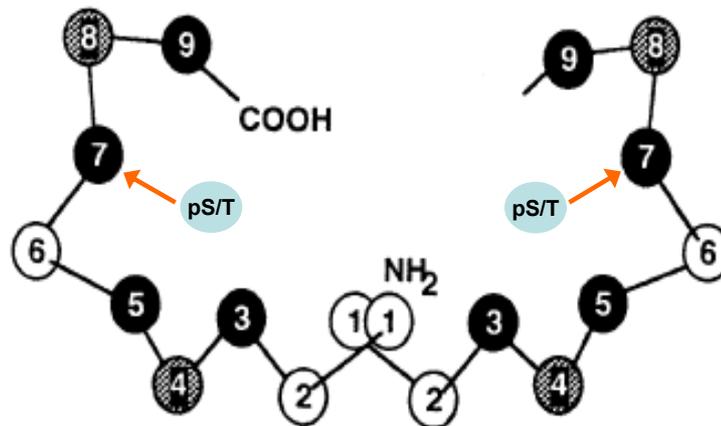
Unser Zwei-Hybrid Test ergab, dass das N-terminale Konstrukt (AS1-326) von MARK mit 14-3-3 interagiert. Diese Wechselwirkung wurde mittels GST-Pulldown-Experimente verifiziert, wobei GST-markierte dominant negative MARK2 Konstrukte [AS1-304 (NC) und AS1-362 (NCU)] als Köder eingesetzt wurden. Sowohl das infizierte 14-3-3 $\zeta$  als auch die zwei endogenen 14-3-3-Isoformen konnten mit beiden MARK-Konstrukten kosedimentiert werden. Das bedeutet, dass eine 14-3-3-Bindungsstelle am N-terminalen Ende oder in der katalytischen Domäne vorhanden ist. Es kann daraus postuliert werden, dass MARK2 mindestens über zwei 14-3-3-Bindungsstellen verfügt, eine in der „Spacer“-Domäne (möglicherweise um Thr539) und die andere zwischen AS 1-304.

Es ist allerdings keine Seltenheit, dass mehr als eine 14-3-3-Bindungsstelle in einem Protein identifiziert wurden. Es wurde z.B. gezeigt, dass bei den Interaktionspartnern, der Kinase Wee1 (Honda et al., 1997; Wang et al., 2000), dem Keratin K18 (Ku et al., 1998), und dem IGF-Rezeptor (Craparo et al., 1997) mehr als eine Stelle benötigt werden, damit eine stabile Wechselwirkung mit 14-3-3 möglich ist. Yaffe und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Bindungsaffinität zu 14-3-3 durch Erzeugung einer zweiten 14-3-3-Bindungsstelle auf einem Phosphopeptid über 30-fach erhöht wurde (Yaffe et al., 1997). Bei der Serin/Threonin-Kinase Raf1 wurde sogar eine dritte 14-3-3-Bindungsstelle in der cysteinreichen Domäne identifiziert, die im Gegensatz zu den anderen zwei Stellen unabhängig von einer Phosphorylierung agiert (Winkler et al., 1998; McPherson et al., 1999).

### 5.2.2 MARK-Bindungsstellen an 14-3-3

14-3-3 Proteine bilden unter physiologischen Bedingungen ein U-förmiges Mono- oder Heterodimer. Die amphipatische Tasche fungiert als Bindungsoberfläche für die Interaktionspartner. Die Aminosäuren in diesem Bereich sind hoch-konserviert. Dagegen stellen die äußeren N-terminalen Regionen des Proteins die variablen Bereiche innerhalb dieser Proteinfamilie dar. Auch die C-terminale Region kann als

Interaktionsfläche fungieren. Raf-1 und Bcr können z.B. mit der Region AS171-213 interagieren (Ichimura et al., 1995; Ichimura et al., 1997; Gu et al., 1998). Zwar könnten bestimmte hydrophobe und polare Aminosäurereste in dieser Region zur Bindung der Liganden beitragen, aber die genauen Eigenschaften der Interaktion mit diesem Bereich sind noch ungeklärt.



**Abbildung 38: Schematische Darstellung eines 14-3-3 Dimers (in Anlehnung an Liu et al., 1995)**

Jedes Monomer besteht aus 9  $\alpha$ -Helices, die hier als nummerierte Ovale dargestellt sind. Der Tönungsgrad spiegelt den Grad der Konservierung wider (je dunkler, desto konservierter). Die Pfeile zeigen die konventionelle Bindungsstelle für phosphoryliertes Serin/Threonin. Die Aminosäurereste, die für die Wechselwirkung mit MARK entscheidend sind, sind in der Helice 8 (F196) und 9 (Y211) lokalisiert.

Aus der Arbeit von Chang und Rubin stammen die Erkenntnisse, dass 14-3-3 $\epsilon$  die Ras-vermittelte Signaltransduktion in *Drosophila* positiv reguliert. Mutationen an drei Aminosäureresten von 14-3-3 $\epsilon$  (E183, F199 und Y214) inhibieren die Funktion von 14-3-3 $\epsilon$  in dem Ras/Raf/MAPK Signaltransduktionsweg (Chang und Rubin, 1997). Bei der Bestimmung der MARK2-Bindungsstelle mittels Mutagenese an den drei äquivalenten Stellen von 14-3-3- $\zeta$  wurde allerdings festgestellt, dass die zwei Aminosäuren außerhalb der Interaktionstasche (F196 und Y211) eine entscheidende Rolle bei der MARK/14-3-3-Interaktion spielen, aber nicht das E180 innerhalb der Interaktionstasche, das als konventionelle pS/T-Bindungsstelle gilt (Abbildung 38). GST-Pulldown Experimente mit GST-14-3-3 Wildtyp und Mutanten zeigten, dass die Mutation F196Y zu einem 100%-igen und Y211F zu einem 60%-igen Verlust der Interaktion führte. Der Austausch des Aminosäurerestes E180 gegen Lysin übte dagegen keinen inhibierenden Effekt auf die Bindung an MARK2 aus. Es wurde aus unbekanntem Gründen eine

erhöhte Bindungsstärke festgestellt. Vielleicht könnte eine Wechselwirkung zwischen dem positiv geladenen Lysin und einer negativ geladenen Aminosäure in MARK zustande kommen.

Wie schon erwähnt, existieren zwei 14-3-3-Bindungsstellen auf MARK, eine agiert phosphorylierungsabhängig (Thr539), die andere –unabhängig (im Bereich AS1-304). Aus diesen Daten könnte folgende Hypothese aufgestellt werden: Der Phosphothreoninrest (Thr539) interagiert mit 14-3-3 mittels der konventionellen Bindungsstelle E180 innerhalb der Interaktionstasche, während die Bindungsstellen Phe196 und Tyr211 in der äußeren Region außerhalb der Interaktionstasche phosphorylierungsunabhängig an die katalytische Domäne binden. Aufgrund der Größe der MARK ist es kaum möglich, dass diese zwei Stellen gleichzeitig an ein 14-3-3 Protein binden. Ob die zwei 14-3-3 Moleküle eines Dimers oder zwei Dimere jeweils einfach mit einer MARK interagieren, oder nur jeweils eine der zwei Bindungsstellen im Interaktionsprozess zum Einsatz kommt, ist noch offen.

In der Literatur sind weitere Verbindungen zwischen MARK und 14-3-3 beschrieben worden. MARK3/C-TAK1 vermittelt durch Phosphorylierung von Cdc25 dessen Bindung an 14-3-3 und verhindert so die Lokalisation von Cdc25 im Kern, wo die Phosphatase sonst für eine Aktivierung der Cdc2 und ein Voranschreiten des Zellzyklus sorgt (Ogg et al., 1994; Peng et al., 1998). Benton und Mitarbeiter berichteten, dass eine 14-3-3-Bindungsstelle an Raf-1 mittels Phosphorylierung durch MARK/PAR-1 erzeugt wird (Benton et al., 2002).

Interessanterweise hat sich 14-3-3 als ein Substrat für MARK herausgestellt. Durch eine Phosphorylierung können die zellulären Funktionen von 14-3-3 reguliert werden. Drei Phosphorylierungsstellen wurden bis heute bei 14-3-3 $\zeta$  identifiziert, Ser58 (Aitken et al., 1995), Ser184 (Megish et al., 1998) und Thr232 (Dubois et al., 1997). Während Ser58 eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung von 14-3-3 spielt, sind die anderen zwei Stellen bei Ligandenbindung von Bedeutung. Welche Stelle durch MARK phosphoryliert wird, bleibt noch zu klären.

## 5.3 Regulation der MARK durch 14-3-3

### 5.3.1 Regulation der Aktivität

Um die funktionelle Konsequenz der Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 zu untersuchen, wurde die Aktivität der MARK2 in An- und Abwesenheit von 14-3-3 gemessen. Es stellte sich heraus, dass *in vitro* die Phosphorylierungs-Aktivität von MARK2 gegenüber Tau durch 14-3-3 $\zeta$  inhibiert wurde, und zwar in einer Konzentrations-abhängigen Weise. Bei einem Verhältnis von 15:1 zwischen 14-3-3 und MARK2 wurde *in vitro* eine Inhibierung von 50% erzielt. Die Inhibitionskonstante von MARK durch 14-3-3 liegt bei 550nM. Da 14-3-3 keine enzymatischen Eigenschaften besitzt, wurde vermutet, dass diese Inhibierung durch eine direkte Proteininteraktion stattfindet. Diese Annahme wurde durch Kinase-Assays mit 14-3-3 Mutanten bestätigt. Aufgrund ihrer unterschiedlich starken Interaktion mit MARK2 konnte ein Zusammenhang zwischen Inhibierung und Bindung verifiziert werden. Die Mutante F199Y, die kaum an MARK2 bindet, konnte keinen Rückgang der Aktivität von MARK2 bewirken. Im Gegensatz dazu wurde bei der Mutante E180K, die im Vergleich zum Wildtyp stärker an MARK2 bindet, eine stärkere Reduzierung der Aktivität von MARK2 festgestellt als beim 14-3-3 Wildtyp. Sogar in Anwesenheit von MARKK konnte 14-3-3 die inhibitorische Wirkung auf MARK ausüben. Durch Koexpression von 14-3-3 wurde die MT-destabilisierende Wirkung von MARK und MARKK in CHO-Zellen aufgehoben.

Wie erwähnt sind 14-3-3 Proteine in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert, in denen sie entscheidende Wirkungen auf Kinasen ausüben. 14-3-3 $\beta$  kann z.B. den Cdc2-Regulator, die Kinase Wee1, stabilisieren und aktivieren, indem es das Degradierungssignal an Wee1 blockiert (Wang et al., 2000). Aufgrund ihrer Funktion als Adaptorprotein sind 14-3-3 Proteine in der Lage, Kontakte zwischen Kinasen und ihren Substraten zu vermitteln, was zu einer Steigerung der Substratphosphorylierung und somit einer Art Aktivierung der Kinase führt (Chun et al., 2004).

Kinasen, die durch 14-3-3 inhibitorisch reguliert werden, sind z.B. Phosphatidylinositol3-Kinase (PI3; Bonnefoy-Bérard et al., 1995), MHC-PKC (*myosin II heavy*

*chain specific protein kinase C*; Matto-Yelin et al., 1997) und Proteinkinase C (Hausser et al., 1999). Die Inhibierung erfolgt hierbei durch eine direkte Bindung an 14-3-3. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass 14-3-3 als „*molecular anvil*“ (molekularer Amboss) fungiert (Yaffe, 2002). Eine Bindung von 14-3-3 könnte eine Konformationsänderung der Kinasen und somit einen Verlust ihrer enzymatischen Aktivität auslösen. Der Inhibierung von MARK2 durch 14-3-3 könnte ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegen. Ein anderer Grund der Inhibierung durch 14-3-3 könnte auch in seiner sauren Eigenschaft liegen (van der Hoeven et al., 2000). In 14-3-3 befinden sich viele negativ geladene Aminosäurereste, die ihm einen pI-Wert von 4,5 verleihen. Wurde PKC $\zeta$  mit 14-3-3 oder mit anderen sauren Peptiden inkubiert, konnte bei allen Ansätzen eine Inhibierung der Kinaseaktivität erzielt werden. Das heißt, dass die Inhibierung durch 14-3-3 nicht proteinspezifisch ist. Dies sollte allerdings nicht für MARK gelten, denn durch Mutationen bestimmter Stellen konnte die Inhibierung aufgehoben werden, allerdings wird der pI-Wert durch diese Mutationen nicht oder kaum verändert.

Die Kinase Raf-1 unterliegt einer dualen Regulation durch 14-3-3 (Fu et al., 2002). Es wurden zwei mit 14-3-3 interagierende Phosphoserinreste in Raf-1 beschrieben, Ser259 in der N-terminalen regulatorischen Domäne und Ser622 in der C-terminalen Kinase-Domän. Die Bindung von 14-3-3 an Ser259 hält Raf-1 in einem inaktiven Zustand. Durch eine mitogene Stimulation wird Raf-1 zur Plasmamembran transportiert, worauf die Ablösung von 14-3-3 folgt, was teilweise zur Aktivierung der Raf-1 beiträgt. Während der Aktivierung interagiert 14-3-3 mit dem Ser622, wodurch die aktive Konformation der Raf-1 stabilisiert wird (Fu et al., 2000).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der *in vitro* Aktivitätsassays konnte der inhibitorische Effekt von 14-3-3 auf MARK2 auf der zellulären Ebene verifiziert werden. Überexpression von MARK2 führt in CHO-Zellen zur Destabilisierung und Auflösung des Mikrotubulinetzwerks (Drewes et al., 1997). Durch eine Koexpression von 14-3-3 $\zeta$  wurde dieser Effekt aufgehoben. Die Mikrotubuli wurden restabilisiert und es wurden keine morphologischen Veränderungen bei den Zellen beobachtet.

### 5.3.2 Regulation der zellulären Lokalisation

Ein anderer wichtiger Mechanismus, wodurch 14-3-3 Proteine die verschiedenen Prozesse kontrollieren, ist die Regulierung der zellulären Verteilung ihrer Interaktionspartner (Muslin und Xing, 2000). Diese Effekte werden u.a. dadurch erzielt, dass die Translokationssignale durch eine Bindung von 14-3-3 blockiert werden. Das führt zur Anreicherung der Interaktionspartner in bestimmten zellulären Kompartimenten. Die Fraktionierungsexperimente in Sf9-Zellen, die mit MARK2 allein oder mit 14-3-3 $\zeta$  zusammen infiziert wurden, zeigten, dass die Koexpression von 14-3-3 die Lokalisation der MARK2 beeinflusst. Die Menge von MARK2 in den Vesikel- bzw. Membranfraktionen wurde dadurch deutlich erhöht.

Eine Inhibierung der MARK2 durch Translokation ist beschrieben worden: Die Phosphorylierung des Thr539 durch aPKC $\zeta$  bewirkt eine Translokation der MARK2 von der Plasmamembran zum Zytosol und somit ihre Inhibierung (Hurov et al., 2004).

### 5.4 Komplexbildung aus MARK2, MARKK und 14-3-3

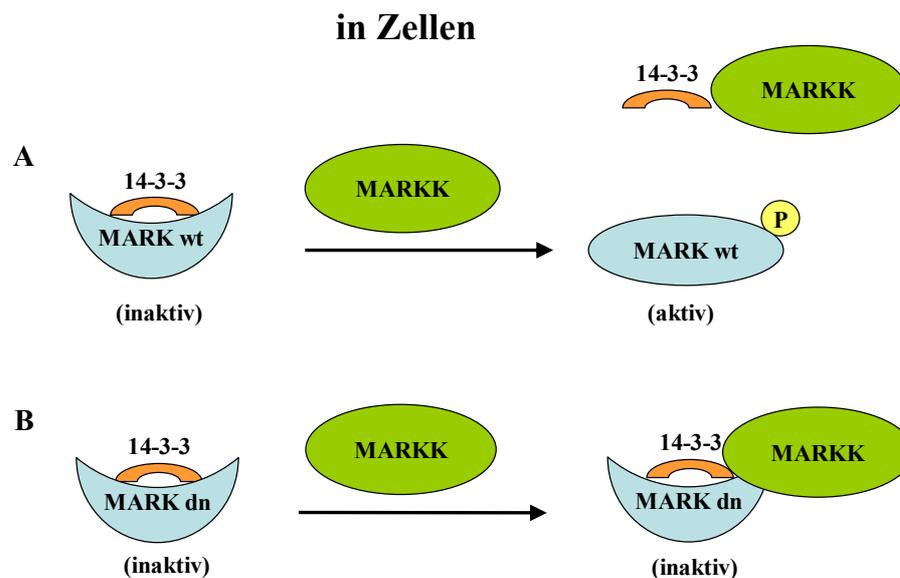
Aufgrund der nachgewiesenen Wechselwirkung zwischen MARKK, 14-3-3 und MARK stellt sich die Frage, ob diese drei Proteine als Komplex agieren und wie in diesem Falle die Wechselwirkungen verlaufen.

Koimmunopräzipitationsexperimente in Sf9-Zell-Extrakten legten dar, dass MARKK und 14-3-3 gleichzeitig mit der dominant negativen Mutante von MARK2 in den Immunopräzipitaten vorkamen. Die subzelluläre Fraktionierung ergab eine Kolokalisation der drei Proteine in den Golgi/trans-Golgi-Netzwerk (TGN)-Vesikeln. Auch in CHO-Zellen wurde die Kolokalisation dieser drei Proteine an der Plasmamembran beobachtet. 14-3-3 Proteine fungieren oft als Adaptor und vermitteln Kontakte zwischen ihren Interaktionspartnern (Aitken, 1996; Morrison, 1994). Diese Funktion sollte in der Komplexbildung dieser drei Proteine keine entscheidende Rolle

spielen, denn eine direkte Bindung zwischen MARKK und MARK wurde nachgewiesen und 14-3-3 beeinflusst außerdem auch funktionell die MARK.

Durch Hefe-Zwei-Hybrid- und Koimmunopräzipitation-Experimente wurde die N-terminale Region der MARK als Interaktionsdomäne sowohl für MARKK als auch für 14-3-3 identifiziert. Das führte zu der Vermutung, dass MARKK und 14-3-3 um die Bindungsstellen an MARK konkurrieren. Als erstes wurde der Einfluss der MARKK auf die MARK/14-3-3 Wechselwirkung in Sf9-Zellen untersucht. Interessanterweise wurde festgestellt, dass bei einer Koexpression von MARKK die Bindung zwischen MARK-Wildtyp und 14-3-3 deutlich reduziert wurde. Da MARKK und MARK-Wildtyp nur transient an einander binden, kann dieser Effekt von MARKK nicht auf das Konkurrieren der Bindungsstellen zurückgeführt werden. Viel wahrscheinlicher ist, dass die Konformation der MARK durch Phosphorylierung von MARKK so verändert wird, dass eine Bindung an 14-3-3 nicht mehr möglich ist. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde die Wechselwirkung zwischen der dominant negativen Mutante von MARK2 (T208A/S212A), die nicht durch MARKK in der Aktivierungsschleife phosphoryliert werden kann, nicht von MARKK beeinflusst. Statt dessen wurde eine gleichzeitige Bindung von MARKK und 14-3-3 an MARK festgestellt.

Die aktive Mutante von MARK (T208E) besitzt durch Mutation eine ähnliche Konformation wie die durch MARKK an Thr208 phosphorylierten MARK. Diese Mutante konnte in unserem Hefe-Zwei-Hybrid Test nicht mit 14-3-3 interagieren, was die Annahme unterstützt, dass die Phosphorylierung an Thr208 von MARK durch MARKK die Wechselwirkung zwischen MARK und 14-3-3 beeinträchtigt (Abb. 39).



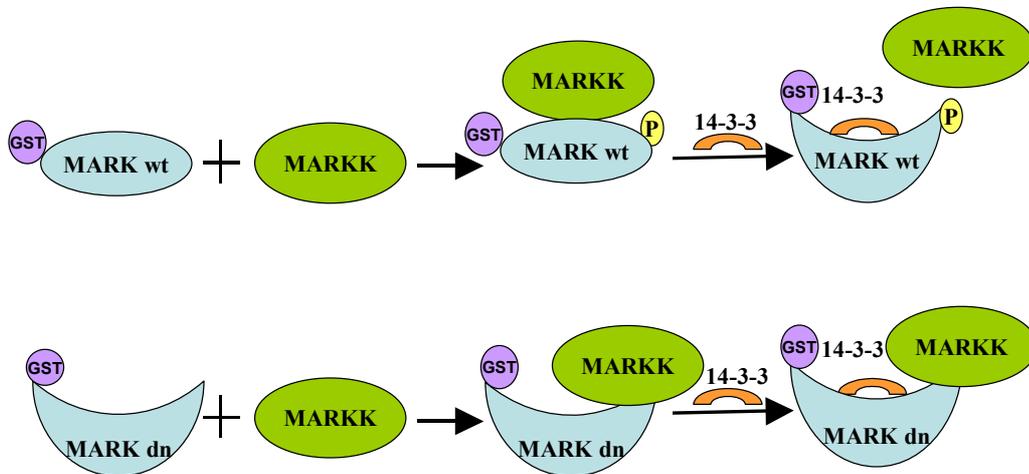
**Abbildung 39: Modelle der Wechselwirkungen zwischen MARK, MARKK und 14-3-3 in Zellen**

**(A) Wechselwirkung mit MARK-Wildtyp.** In Sf9-Zellen binden unter normalen Bedingungen endogene 14-3-3 Proteine an MARK wt und halten die Kinase inaktiv. Bei einer Überexpression von MARKK wird MARK phosphoryliert und aktiviert. Aufgrund der Konformationsänderung löst sich 14-3-3 von MARK ab, obwohl MARKK nur transient an MARK bindet und keine Bindungsstellen langfristig besetzt.

**(B) Wechselwirkung mit MARK dominant negativer Mutante (T208A/S212A).** 14-3-3 Proteine binden in Zellen an dominant negative MARK. Die MARKK haftet an der nicht phosphorylierbaren Aktivierungsschleife.

Im Gegensatz zur Situation in der Zelle konnte *in vitro* eine direkte Bindung zwischen MARKK und MARK-Wildtyp detektiert werden. Die gebundene MARKK wurde allerdings durch Zugabe von 14-3-3 verdrängt. Auf die dominant negative Mutante von MARK übt 14-3-3 keinen Einfluss aus. Der Kinase-Assay mit MARK aus den Fraktionen einer zellulären Fraktionierung zeigte, dass 14-3-3 in der Lage war, die Aktivität von MARK sogar in Anwesenheit von MARKK stark zu inhibieren. Durch 14-3-3 verliert MARKK den Zugang zu MARK und kann MARK somit nicht phosphorylieren. Aufgrund der schwachen Bindung zwischen 14-3-3 und MARKK (hier nicht gezeigt) kann das Ablösen der MARKK von MARK auch nicht der Hauptgrund dafür sein. Durch die Bindung von 14-3-3 an MARK wird das Thr208, die Phosphorylierungsstelle für MARKK entweder direkt blockiert oder ist durch eine Konformationsänderung nicht mehr zugänglich für MARKK (Abb.40).

*in vitro*



**Abbildung 40: Modelle der Wechselwirkungen zwischen MARK, MARKK und 14-3-3 *in vitro***

**(A) Wechselwirkung mit MARK-Wildtyp.** Werden GST/MARK und MARKK *in vitro* zusammen inkubiert, phosphoryliert und aktiviert MARKK MARK. Aufgrund der hohen Konzentration der Proteine und fehlenden Konkurrenz um die Bindungsstelle bleibt MARKK länger an MARK hängen als in Zellen. Durch Zugabe von 14-3-3 wird MARKK von MARK verdrängt.

**(B) Wechselwirkung mit MARK dominant negativer Mutante (T208A/S212A).** MARKK bindet viel stärker an MARK-dn als an Wildtyp. An diesen MARK/MARKK Komplex kann auch 14-3-3 binden, ohne die Interaktion von MARKK und MARK stark zu beeinträchtigen.

## Literaturverzeichnis

Aitken, A., Collinge, D. B., van Heusden, B. P., Isobe, T., Roseboom, P. H., Rosenfeld, G. and Soll, J. (1992) 14-3-3 proteins, a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 17, 498-501.

Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., Martin, H., Patel, Y. and Robinson, K. (1995) Post-translocationally modified 14-3-3 isoforms and inhibition of protein kinase C. *Mol. Cell Biochem.*, 149-150, 41-49.

Aitken, A. (1996) 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biol.*, 6, 341-347.

Aitken, A. (2002) Functional specificity in 14-3-3 isoforms interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Molecular Biology*, 50, 993-1010.

Bagrodia, S. and Cerione, R. A. (1999) Pak to the future. *Trends Cell Biol.*, 9, 350-355.

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

Baxter, H. C., Fraser, J. R., Liu, W. G., Forster, J. L., Clokie, S., Steinacker, P., Otto, M., Bahn, E., Wiltfang, J. and Aitken, A. (2002) Specific 14-3-3 isoform detection and immunolocalization in prion diseases. *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 387-391.

Beaulieu, P., Hamel, L. and Chevalier, S. (1999) C-TAK1/Kp78 $\beta$ , A serine/threonine kinase linked to prostate epithelial cell proliferation and activated by TGF $\beta$ 1. *FASEB J.*, 7, Suppl. S., A1488.

Benton, R., Palacios, I. M. and St Johnston, D. (2002) *Drosophila* 14-3-3/PAR-5 is an essential mediator of PAR-1 function in axis formation. *Dev. Cell*, 3, 659-671.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.-M. and Mandelkow, E. (1993) Phosphorylation of Ser 262 strongly reduces the binding of tau protein to microtubules. *Neuron*, 11, 153-163.

Biernat, J. and Mandelkow, E.-M. (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, 727-740.

Biernat, J., Wu, Y. Z., Timm, T., Zheng-Fischhöfer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L. and Mandelkow, E.-M. (2002) Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol. Biol. Cell*, 13, 4013-4028.

- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.
- Böhm, H., Brinkmann, V., Drab, M., Henske, A. and Kurzchalia, T. V. (1997) Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. *Curr. Biol.*, 7, 603-606.
- Bonnefoy-Berard, N., Liu, Y. C., von Willebrand, M., Sung, A., Elly, C., Mustelin, T., Yoshida, H., Ishizaka, K. and Altman, A. (1995) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 10142-10146.
- Brajenovic, M., Joberty, G., Kuster, B., Bouwmeester, T. and Drewes, G. (2004) Comprehensive proteomic analysis of human Par protein complexes reveals an interconnected protein network. *J. Biol. Chem.*, 279, 12804-12811.
- Broadie, K., Rushton, E., Skoulakis, E. M. C. and Davis, R. (1997) Leonardo, a *Drosophila* 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function. *Neuron*, 19, 391-402.
- Brown, A. J., Hutchings, C., Burke, J. F. and Mayne, L. V. (1999) Application of a rapid method (targeted display) for the identification of differentially expressed mRNAs following NGF-induced neuronal differentiation in PC12 cells. *Mol. Cell Neurosci.*, 13, 119-130.
- Buchwald, G., Hostinova, E., Rudolph, M. G., Kraemer, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Scheffzek, K. and Wittinghofer, A. (2001) Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation. *Mol. Cell Biol.*, 21, 5179-5189.
- Carter, T. G., Benton, B., Fruhling, D., Monks, C. R. F., Windmiller, D., Kupfer, A., Manfredi, J., Johnson, G. L. and Pleiman, C. M. (2000) KDS and TAO1, two related proteins with kinase domain homology to STE20, differentially relocate in mitogen stimulated T lymphocytes. Unpublished; accession number: AAF25817.
- Cau, J., Faure, S., Comps, M., Delsert, C. and Morin, N. (2001) A novel p21-activated kinase binds the actin and microtubule networks and induces microtubule stabilization. *J. Cell Biol.*, 155, 1029-1042.
- Chang, H. C. and Rubin, G. M. (1997) 14-3-3 epsilon positively regulates Ras-mediated signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 11, 1132-1139.
- Chen, Z. and Cobb, M. H. (2001) Regulation of stress-responsive mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways by TAO2. *J. Biol. Chem.*, 276, 16070-16075.
- Chen, Z., Hutchison, M. and Cobb, M. H. (1999) Isolation of the protein kinase TAO2 and identification of its mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase binding domain. *J. Biol. Chem.*, 274, 28803-28807.

- Ching, Y. P., Leong, V. Y. L., Wong, C. M. and Kung, H. F. (2003) Identification of an autoinhibitory domain of p21-activated protein kinase 5. *J. Biol. Chem.*, 278, 33621-33624.
- Chong, C., Tan, L., Lim, L. and Manser, E. (2001) The mechanism of PAK activation, Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J. Biol. Chem.*, 276, 17347-17353.
- Chun, J., Kwon, T., Lee, E. J., Kim, C. H., Han, Y. S., Hong, S.-W., Hyuan, S. and Kang, S. S. (2004) 14-3-3 Protein Mediates Phosphorylation of Microtubule-associated Protein Tau by Serum- and Glucocorticoid-induced Protein Kinase. *Mol. Cells*, 18, 360-368.
- Cleveland, D. W., Hwo, S.-Y. and Kirschner, M. W. (1977) Purification of Tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.*, 86, 207-225.
- Cotteret, S., Jaffer, Z. M., Beeser, A. and Chernoff, J. (2003) p21-Activated kinase 5 (Pak5) localizes to mitochondria and inhibits apoptosis by phosphorylating BAD. *Mol. Cell Biol.*, 23, 5526-5539.
- Cox, D. N., Lu, B., Sun, T. Q., Williams, L. T. and Jan, Y. N. (2001) Drosophila PAR-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Curr. Biol.*, 11, 75-87.
- Craparo, A., Freund, R. and Gustafson, T. A. (1997) 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, 272, 11663-11669.
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene*, 6, 23-28.
- Dan, C., Kelly, A., Bernard, O. and Minden, A. (2001) Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J. Biol. Chem.*, 276, 32115-32121.
- Dan, C., Nath, N., Liberto, M. and Minden, A. (2002) PAK5, a new brain-specific kinase, promotes neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Mol. Cell Biol.*, 22, 567-577.
- Daniels R. H. and Bokoch G. M. (1999) p21-activated protein kinase, a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem. Sci.*, 24, 350-355.
- Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Doring, F., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M and Mandelkow, E. (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.*, 11, 2131-2138.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H, E., Mandelkow, E.-M. and 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, 7679-7688.

- Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E.-M. and Mandelkow, E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*, 89, 297-308.
- Drewes, G., Ebnet, A. and Mandelkow, E.-M. (1998) MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 307-311.
- Drewes, G. (2004) MARKing tau for tangles and toxicity. *Trends Biochem. Sci.*, 29, 548-555.
- Dubois, T., Rommel, C., Howell, S., Steinhussen, U., Soneji, Y. Morrice, N., Moelling, K. and Aitken, A. (1997) 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site *in vivo* regulates Raf/14-3-3 interaction. *J. Biol. Chem.*, 272, 28882-28888.
- Ebnet, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., Mandelkow, E.-M. and 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.
- Elbert, M., Rossi, G. and Brennwald, P. (2005) The yeast PAR-1 Homologs Kin1 and Kin2 show genetic and physical interaction with components of the exocytic machinery. *Mol. Biol. Cell*, 16, 532-549.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 181-191.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2003) Cell polarity, Par5, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 67-72.
- Fantl, W., Muslin, A. J., Kituchi, A., Martin, J. A., Macnicol, A. M., Grosst, R. W. and Williams, L. T. (2002) Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins, *Nature*, 371, 612-614.
- Frost, J. A., Khokhlatchev, A., Stippec, S., White, M. A. and Cobb, M. H. (1998) Differential effects of PAK1-activating mutations reveal activity-dependent and – independent effects on cytoskeletal regulation. *J. Biol. Chem.*, 273, 28191-28198.
- Fu, H., Subramanian, R. R. and Masters, S. C. (2000) 14-3-3 proteins, structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40, 617-47.
- Gnesutta, N., Qu, J. and Minden, A. (2001) The serine/threonine kinase PAK4 prevents caspase activation and protects cells from apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 276, 14414-14419.
- Gohla, A. and Bokoch, G. M. (2002) 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr. Biol.*, 12, 1704-1710.
- Gu, M. and Du, X. (1998) A novel ligand-binding site in the zeta-form 14-3-3 protein recognizing the platelet glycoprotein Ibalph and distinct from the c-Raf-binding site. *J. Biol. Chem.*, 273, 33465-33471.

- Guo, S. and Kemphues, K. J. (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, 611-620.
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.-M. and Mandelkow, E. (1994) Domains of tau protein and interaction with microtubules. *Biochemistry*, 33, 9511-9522.
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titan, K., and Ihara, Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analysis of Tau in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.*, 267, 17047-17054.
- Hashiguchi, M., Sobue, K. and Paudel, K. (2000) 14-3-3 $\zeta$  is an effector of Tau protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 275, 25247-25254.
- Hausser, A., Storz, P., Link, G., Stoll, H., Liu, Y.-C., Altman, A., Pfizenmaier, K. and Johannes, F.-J. (1999) Protein kinase C  $\mu$  is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins. *J. Biol. Chem.*, 274, 9258-9264.
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P., Jarvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpaa, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olschwang, S., Olsen, A. S., Stratton, M. R., dela Chapelle, A. and Aaltonen, L. A. (1998) A serin/Threonin kinase gen defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 391, 184-187.
- Henriksson, M. L., Francis, M. S., Peden, A., Aili, M., Stefansson, K., Palmer, R., Aitken, A. and Hallberg, B. (2002) A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional *in Zellen*. *Eur. J. Biochem.*, 69, 4921-4929.
- Hofmann, K. and Bucher, P. (1996) The UBA-domain, a sequence motif found in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem. Sci.*, 21, 172-173.
- Honda, R., Ohba, Y. and Yasuda, H. (1997) 14-3-3 zeta protein binds to the carboxyl half of mouse weel kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 262-265.
- Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C. J., Lee, K. H. and Harrington, M. G. (1996) The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N. Engl. J. Med.*, 335, 924-930.
- Hurov, J. B., Stappenbeck, T. S., Zmasek, C. M., White, L. S., Ranganath, S. H., Russell, J. H., Chan, A. C., Murphy, K. M. and Piwnica-Worm, H. (2001) Immune system dysfunction and autoimmune disease in mice lacking Emk (PAR-1) protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, 21, 3206-3219.
- Hurov, J. B., Watkins, J. L. and Piwnica-Worms, H. (2004) Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr. Biol.*, 14, 736-741.
- Hutchison, M., Berman, K. S. and Cobb, M. H. (1998) Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.*, 273, 28625-28632.

- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1987) Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca<sup>2+</sup>, calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett.*, 219, 79-82.
- Ichimura, T., Uchiyama, J., Kunihiro, O., Ito, M. Horigome, T., Omata, S., Shinkai, F., Kaja, H. and Isobe, T. (1995) Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 270, 28515-28518.
- Ichimura, T., Ito, M., Itagaki, C., Takahashi, M., Horigome, T., Omata, S., Ohno, S. and Isobe, T. (1997) The 14-3-3 protein binds its target proteins with a common site located towards the C-terminus. *FEBS Lett.*, 413, 273-276.
- Illenberger, S., Zheng-Fischhöfer, Q., Preuss, U., Stamer, K., Baumann, K., Trinczek, B., Biernat, J., Godemann, R., Mandelkow, E.-M. and 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, 1495-1512.
- Jacobi, R., Moertl, E. and Koeppl, M. A. (2001) p21-activated protein kinase gamma-PAK suppresses programmed cell death of BALB3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 276, 16624-16634.
- Jaffer, Z. M. and Chernoff, J. (2002) p21-activated kinases, three more join the Pak. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 34, 713-717.
- Jenkins, S. M. and Johnson, G. V. (2000) Microtubule/MAP-affinity regulating kinase (MARK) is activated by phenylarsine oxide in situ and phosphorylates tau within its microtubule-binding domain. *J. Neurochem.*, 74, 1463-1468.
- Kato, T., Satoh, S., Okabe, H., Kitahara, O., Ono, K., Kihara, C., Tanaka, T., Tsunoda, T., Yamaoka, Y., Nakamura, Y. and Furukawa, Y. (2001) Isolation of a novel human gene, MARKL1, homologous to MARK3 and its involvement in hepatocellular carcinogenesis. *Neoplasia*, 3, 4-9.
- Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Nakamura, S., Honjyo, Y., Shibasaki, H. and Budka, H. (2002) 14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 61, 245-253.
- Ko, L., Odawara, T. and Yen, S. H. (1997) Menadione-induced tau dephosphorylation in cultured human neuroblastoma cells. *Brain Res.*, 760, 118-128.
- Kreis, T. E., Lowe, M. and Pepperkok, R. (1995) COPs regulating membrane traffic. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11, 677-706.
- Ku, N. O., Liao, J. and Omary, M. B. (1998) Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J.*, 17, 1892-1906.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

- Layfield, R., Fergusson, J., Aitken, A., Lowe, J., Landon, M. and Mayer, R. J. (1996) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins. *Neuroscience Lett.*, 209, 57-60.
- Levin, D. E. and Bishop, J. M. (1990) A putative protein kinase gene (*kin1+*) is important for growth polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 8272-8276.
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R. J., Fu, H. and Liddington, R. (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*, 376, 191-194.
- Lizcano, J. M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S. A., Udd P., Mäkelä, L. T., Hardie, D. G. and Alessi, D. R. (2004) LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.*, 23, 833-843.
- Lupas, A., van Dyke, A. and Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, 252, 1162-1164.
- Ma, D. and Jan, L. Y. (2002) ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12, 287-292.
- Macara, I. G. (2004) Par proteins, Partners in polarization. *Curr. Biol.*, 14, 160-162.
- Mandelkow, E. and Mandelkow, E.-M. (1995) Microtubules and Microtubule-associated Proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 72-81.
- Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E. and Milligan, R. A. (1991) Microtubule dynamics and microtubule caps, a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.*, 114, 977-991.
- Mandelkow, E.-M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., van Lint, J., Vandenheede, J. R. and Mandelkow, E. (1992) Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.*, 314, 315-321.
- Mandelkow, E.-M., Thies, E., Trinczek, B., Biernat, J. and Mandelkow, E. (2004) MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J. Cell Biol.*, 167, 99-110.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 1912-1934.
- Manser, E., Leung, H., Sallihuddin, Z. S., Zhao, L. and Lim, A. (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, 367, 40-46.
- Marignani, P. A., Kanai, F., Carpenter, C. L. (2001) LKB1 associates with Brg1 and is necessary for Brg1-induced growth arrest. *J. Biol. Chem.*, 276, 32415-32418.

- Marignani, P. A. (2005) LKB1, the multitasking tumour suppressor kinase. *J. Clin. Pathol.*, 58, 15-19.
- Martin, H., Rostas, J., Patel, Y. and Aitken, A. (1994) Subcellular localisation of 14-3-3 isoforms in rat brain using specific antibodies. *J. Neurochem.*, 63, 2259-2265.
- Martin, S. G. and St Johnston, D. (2003) A role for *Drosophila* LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature*, 421, 379-384.
- Masters, S. C., Pederson, K. J., Zhang, L., Barbieri, J. T. and Fu, H. (1999) Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 38, 5216-5221.
- Matenia, D., Griesshaber, B., Li, X.-Y., Thiessen, A., Johne, C., Jiao, J., Mandelkow, E. and Mandelkow, E.-M. (2005) PAK5 kinase is an inhibitor of MARK/PAR-1 which leads to stable microtubules and dynamic actin. *Mol. Biol. Cell*, 16, 4410-4422.
- Matto-Yelin, M., Aitken, A. and Ravid, S. (1997) 14-3-3 inhibits the *Dictyostelium* Myosin II Heavy-Chain-specific protein kinase C activity by a direct interaction: identification of the 14-3-3 binding domain. *Mol. Biol. Cell*, 8, 1889-1899.
- McPherson, R. A., Harding, A., Roy, S., Lane, A. and Hancock, J. F. (1999) Interactions foc-Raf-1 with phosphatidylserine and 14-3-3. *Oncogene*, 18, 3862-3869.
- Megidish, T., Cooper, J., Zhang, L., Fu, H. and Hakomori, S. (1998) A novel sphingosine-dependent protein kinase (SDK1) specifically phosphorylates certain isoforms of 14-3-3 protein. *J. Biol. Chem.*, 273, 21834-21845.
- Mitsopoulos, C., Zihni, C., Garg, R., Ridley, A. J. and Morris, J. D. H. (2003) The prostate-derived sterile 20-like kinase (PSK) regulates microtubule organization and stability. *J. Biol. Chem.*, 278, 18085-18091.
- Moore, B. W. and Perez, V. J. (1967) Specific acidic proteins of the nervous system. *Physiological Biochemical Aspects of Nervous Integration*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 343-359.
- Moore, T. M., Garg, R., Johnson, C., Coptcoat, M. J., Ridley, A. J. and Morris, J. D. H. (2000) PSK, a novel STE20-like kinase derived from prostatic carcinoma that activates the c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway and regulates actin cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.*, 275, 4311-4322.
- Morgen, A. and Burgoyne, R. D. (1992) Interaction between protein kinase C and Exo11 (14-3-3 protein) and its relevance to exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *Biochem. J.*, 15, 807-811.
- Morton, D. G., Shakes, D. C., Nugent, S., Dichoso, D., Wang, W., Golden, A. and Kemphues, K. J. (2002) The *Caenorhabditis elegans* par-5 gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Developmental Biology*, 241, 47-58.

- Muller, J., Ory, S., Copeland, T., Piwnica-Worms, H. and Morrison, D. K. (2001) C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol. Cell*, 8, 983-993.
- Murphy, D. B. and Borisy, G. G. (1975) Association of high molecular weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72, 2696-2700.
- Murphy, D. B., Vallee, R. B. and Borisy, G. G. (1977) Identity and polymerization-stimulatory activity of the nontubulin proteins associated with microtubules. *Biochemistry*, 16, 2598-2605.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. and Shaw, A. S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, 84, 889-897.
- Nelson, W. J. and Grindstaff, K. K. (1997) Cell polarity, par for the polar course. *Curr. Biol.*, 7, 562-564.
- Nishimura, I., Yang, Y. and Lu, B. (2004) PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell*, 116, 671-682.
- Ogg, S., Gabrielli, B. and Piwnica-Worms, H. (1994) Purification of a serine kinase that associates with and phosphorylates human Cdc25 C on serine 216. *J. Biol. Chem.*, 269, 30461-30469.
- O'Kelly, I., Butler, M. H., Zilberberg, N. and Goldstein, S. A. (2002) Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell*, 111, 577-588.
- Ossipova, O., Dhawan, S., Sokol, S. and Green, B. A. (2005) Distinct PAR-1 proteins function in different branches of Wnt signaling during vertebrate development. *Developmental Cell*, 8, 829-841.
- Pandey, A., Dan, I., Kristiansen, T. Z., Watanabe, N. M., Voldby, J., Kajikawa, E., Khosravi-Far, R., Blagoev, B., and 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, 3939-48.
- Pellettieri, J. and Seydoux, G. (2002) Anterior-posterior polarity in *C. elegans* and *Drosophila*--PARallels and differences. *Science*, 298, 1946-1950.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S. and Piwnica-Worms, H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control, regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, 277, 1501-1505.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Ogg, S., Thoma, R. S., Byrnes, M. J., Wu, Z., Stephenson, M. T. and Piwnica-Worms, H. (1998) C-TAK1 protein kinase phosphorylates human

- Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ.*, 9, 197-208.
- Petosa, C., Masters, S. C., Bankston, L. A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H. and Liddington, R. C. (1998) 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J. Biol. Chem.*, 273, 16305-16310.
- Reuther, G. W., Fu, H., Cripe, L. D., Collier, R. J. and Pendergast, A. M. (1994) Association of the protein kinase c-Bcr and Bcr-Ab1 with proteins of the 14-3-3 family. *Science*, 266, 129-133.
- Riechmann, V., Gutierrez, G. J., Filardo, P., Nebreda, A. and Ephrussi, A. (2002) PAR-1 regulates stability of the posterior determinant Oskar by phosphorylation. *Nature Cell Biol.*, 4, 337-342.
- Rudel, T. and Bokoch, G. M. (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*, 276, 1571-1574.
- Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E. and Mandelkow, E.-M. (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry*, 38, 3549-3558.
- Schurmann, A., Mooney, A. F., Sanders, L. C., Sells, M. A., Wang, H. G., Reed, J. C. and Bokoch, G. M. (2000) p21-activated kinase 1 (PAK1) phosphorylates the death agonist BAD and protects cells from apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 20, 453-461.
- Segrest, J. P., De Loof, H., Dohlman, J. H., Brouillette, C. G. and Anantharamaiah, G. M. (1990) Amphipathic helix motif, classes and properties. *Proteins*, 8, 103-117.
- Shen, Y. H., Godlewski, J., Bronisz, A., Zhu, J., Comb, M. J., Avruch, J. and Tzivion, G. (2003) Significance of 14-3-3 self-dimerization for phosphorylation-dependent target binding. *Mol. Biol. Cell*, 14, 4721-4733.
- Shulman J. M., Benton, R. and 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, 377-388.
- Skoulakis, E. M. and Davis, R. L. (1998) 14-3-3 proteins in neuronal development and function. *Mol. Neurobiol.*, 16, 269-284.
- Sloboda, R. D., Rudolph, S. A., Rosenbaum, J. L. and Greengard, P. (1975) Cyclic AMP-dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72, 177-181.
- Spicer, J., Rayter, S., Young, N., Elliott, R., Ashworth, A. and Smith, D. (2003) Regulation of the Wnt signalling component PAR1A by the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Oncogene*, 22, 4752-4756.

- Sun, T. Q., Lu, B., Feng, J. J., Reinhard, C., Jan, Y. N., Fantl, W. J. and Williams, L. T. (2001) PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nature Cell Biol.*, 3, 628-636.
- Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Klishikawa, M., Hirose, H., Amano, Y., Tzumi, N., Miwa, Y., and Ohno, S. (2004) aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr. Biol.*, 14, 1425-1435.
- Tang, Y., Zhou, H., Chen, A., Pittman, R. N. and Fiel, J. (2000) The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *J. Biol. Chem.*, 275, 9106-9109.
- Tassan, J. P. and Goff, X. L. (2004) An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family. *Biology of the Cell*, 96, 193-199.
- Tassi, E., Biesova, Z., Di Fiore, P. P., Gutkind, J. S. and Wong, W. T. (1999) Human JIK, a novel member of the STE20 kinase family that inhibits JNK and is negatively regulated by epidermal growth factor. *J Biol. Chem.*, 274, 33287-33295.
- Tiainen M., Ylikorkala A., Makela T. P. (1999) Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 9248-9251.
- Thorson, J. A., Yu, L. W., Hsu, A. L., Shih, N. Y., Graves, P. R., Tanner, J. W., Allen, P. M., Piwnica-Worms, H. and Shaw, A. S. (1998) 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol. Cell Biol.*, 18, 5229-5238.
- Timm, T., Li, X.-Y., Biernat, J., Jiao, J., Mandelkow, E., Vanderkerckhove, J., and Mandelkow, E.-M. (2003) MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/ PAR-1. *EMBO J.*, 22, 5090-5101.
- Tomancak, P., Piano, F., Riechmann, V., Gunsalus, K. C., Kempfues, K. J., Ephrussi, A. (2000) A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* PAR-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nature Cell Biol.*, 2, 458-460.
- Toyo-oka, K., Shionoya, A., Gambello, M. J., Cardoso, C., Leventer, R., Ward, H. L., Ayala, R., Tsai, L. H., Dobyns, W., Ledbetter, D., Hirotsune, S. and Wynshaw-Boris, A. (2003) 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nature Genet.*, 34, 274-285.
- Ubl, A., Berg, D., Holzmann, C., Kruger, R., Berger, K., Arzberger, T., Bornemann, A. and Riess, O. (2002) 14-3-3 protein is a component of Lewy bodies in Parkinson's disease – mutation analysis and association studies of 14-3-3 eta. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 108, 33-39.
- Umahara, T., Uchihara, T., Tsuchiya, K., Nakamura, A., Iwamoto, T., Ikeda, K. and Takasaki, M. (2004) 14-3-3 proteins and zeta isoforms containing neurofibrillary tangles in patients with Alzheimer's disease. *Acta. Neuropathol.*, 108, 279-286.

- Vaccari, T., Rabouille, C. and Ephrussi, A. (2005) The *Drosophila* PAR-1 spacer domain is required for lateral membrane association and for polarization of follicular epithelial cells. *Curr. Biol.*, 15, 255-261.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. and McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae) *In Vitro*, 13, 213-217.
- Wallenfang, M. R. and Seydoux, G. (2000) Polarization of the anterior-posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature*, 408, 89-92.
- Wang, B., Yang, H., Liu, Y. C., Jelinek, T., Zhang, L., Ruoslahti, E. and Fu, H. (1999) Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry*, 38, 12499-12504.
- Wang, Y., Jacobs, C. Hook, K. E., Duan, H., Booher, R. N. and Sun, Y. (2000) Bind of 14-3-3 $\beta$  to the carboxyl terminus of Wee1 increases Wee1 stability, kinase activity, and G2-M cell population. *Cell Growth & Differentiation*, 11, 211-219.
- Wilker, E. W., Grant, R. A., Artim, S. C. and Yaffe, M. B. (2005) A structural basis for 14-3-3 $\sigma$  functional specificity. *J. Biol. Chem.*, 280, 18891-18898.
- Winkler, D. G., Cutler, R. E. Jr, Drugan, J. K., Campbell, S. and Morrison, D. K. (1998) Identification of residues in the cysteine-rich domain of Raf-1 that control Ras binding and Raf-1 activity. *J. Biol. Chem.*, 273, 21578-21584.
- Wittmann, T. and Waterman-Storer, C. M. (2001) Cell motility, can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.*, 114, 3795-3803.
- Woodcock, J. M., Murphy, J., Stomski, F. C., Berndt, M. C. and Lopez, A. F. (2003) The dimeric versus monomeric status of 14-3-3 $\zeta$  is controlled by phosphorylation of Ser<sup>58</sup> at the dimer interface. *J. Biol. Chem.*, 278, 36323-36327.
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.*, 13, 2004-2008.
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C (1997) The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 91, 961-971.
- Yaffe, B. M. (2002) How do 14-3-3 proteins work? – Gatekeeper phosphorylation and the Molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.*, 513, 53-57.
- Yoo, L. I., Chung, D. C. and Yuan, J. (2002) LKB1-A master tumor suppressor of the small intestine and beyond. *Nature Rev. Cancer*, 2, 529-535.
- Yuan, H., Michelsen, K. and Schwappach, B. (2003) 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr. Biol.*, 13, 638-646.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S. J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L) *Cell*, 15, 589-592.

Zhai, J., Lin, H., Shamim, M., Schlaepfer, W. W. and Canete-Soler, R. (2001) Identification of a novel interaction of 14-3-3 with p190RhoGEF. *J. Biol. Chem.*, 276, 41318-41324.

Zhang, S. H., Kobayashi, R., Graves, P. R., Piwnica-Worms, H. and Tonks, N. K. (1997) Serine phosphorylation-dependent association of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1 with 14-3-3beta protein. *J. Biol. Chem.*, 272, 27281-27287.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MARK-Familie und Domänenstruktur der MARK2 .....	5
Abbildung 2: Domänenstruktur der MARK2 .....	8
Abbildung 3: Domänenstruktur der MARKK .....	9
Abbildung 4: Modell der Autoinhibierung von PAR-1/KIN1-2 (Elbert et al., 2005) .....	11
Abbildung 5: Domänenstruktur von PAK5 .....	12
Abbildung 6: Konservierung der Sequenzen der 14-3-3 Proteine (Wilker et al., 2005) ...	15
Abbildung 7: Humanes 14-3-3 $\zeta$ -Dimer mit gebundenem -Peptide (Rittinger et al., 1999) .....	17
Abbildung 8: 14-3-3 als Regulator der Proteinlokalisierung (Dougherty et al., 2004) .....	19
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Klonierung mit dem Gateway-System (Invitrogen) .....	31
Abbildung 10: Interaktion von MARK2 und MARKK in Sf9-Zellen .....	47
Abbildung 11: Expression und Reinigung GST-markierter MARK2 .....	49
Abbildung 12: Interaktion von MARK und MARKK <i>in vitro</i> .....	50
Abbildung 13: Domänenstruktur der GST/MARK2 dn (T208A/S212A) Konstrukte .....	52
Abbildung 14: Expression und Reinigung GST-markierter MARK2 Konstrukte .....	53
Abbildung 15: MARKK bindet an die katalytische Domäne von MARK2 .....	54
Abbildung 16: MARKK stimuliert die MARK2-Aktivität zur Tau-Phosphorylierung <i>in</i> <i>Zellen</i> .....	56
Abbildung 17: Charakterisierung der Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 $\zeta$ im Zwei- Hybrid-System .....	58
Abbildung 18: Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 in Sf9-Zellen .....	60
Abbildung 19: 14-3-3 bindet an die katalytische Domäne von MARK2 .....	61
Abbildung 20: Expression und Reinigung vom rekombinanten GST-markierten 14-3-3 $\zeta$ Protein .....	63
Abbildung 21: Struktur eines 14-3-3 $\zeta$ -Dimers (Liu et al., 1995) .....	65
Abbildung 22: Einfluss der Mutation in 14-3-3 $\zeta$ auf die Interaktion mit MARK2 .....	66
Abbildung 23: 14-3-3 $\zeta$ inhibiert die MARK2-Aktivität der Tau-Phosphorylierung <i>in vitro</i> .....	69
Abbildung 24: Bestimmung der Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von MARK2 und 14-3-3 $\zeta$ .....	70
Abbildung 25: Einfluss der 14-3-3 Konstrukte auf die Aktivität von MARK2 .....	71
Abbildung 26: 14-3-3 $\zeta$ führt zur Translokation von MARK2 .....	74
Abbildung 27: Effekte der MARK2-Expression auf das MT-Netzwerk in CHO-Zellen .	75
Abbildung 28: 14-3-3 $\zeta$ -Expression in CHO-Zellen .....	76
Abbildung 29: 14-3-3 inhibiert die MT-destabilisierende Wirkung von MARK2 .....	77
Abbildung 30: Komplexbildung von MARK2-dn, MARKK und 14-3-3 in Sf9-Zellen ...	79
Abbildung 31: MARK2, MARKK und 14-3-3 $\zeta$ kolokalisieren in Golgi/TGN .....	81
Abbildung 32: Effekt der MARKK auf die Interaktion zwischen MARK2 und 14-3-3 in Sf9-Zellen .....	84
Abbildung 33: Inhibierung der Interaktion zwischen MARK2 und MARKK durch 14-3-3 <i>in vitro</i> .....	86
Abbildung 34: 14-3-3 $\zeta$ inhibiert die MARK-Aktivität .....	88
Abbildung 35: Koexpression von MARK2 und MARKK führt zum Verlust des MT- Netzwerks .....	90
Abbildung 36: 14-3-3 inhibiert die MT-destabilisierende Wirkung von MARK2 in Anwesenheit von MARKK .....	91
Abbildung 37: Interaktionsmodell von MARK2 und MARKK .....	94

Abbildung 38: Schematische Darstellung eines 14-3-3 Dimers (in Anlehnung an Liu et al., 1995)..... 98

Abbildung 39: Modelle der Wechselwirkungen zwischen MARK, MARKK und 14-3-3 *in Zellen* ..... 104

Abbildung 40: Modelle der Wechselwirkungen zwischen MARK, MARKK und 14-3-3 *in vitro*..... 105

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Proteine der KIN1/PAR-1/MARK-Familie..... 4

Tabelle 2: Zusammensetzung der Iodixanol-Gradienten..... 39

# Anhang

## A1 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AID	Autoinhibitorische Domäne
AK	Antikörper
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
aPKC	atypische Proteinkinase C
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinder-Serum-Albumin
Cdc	Cell division control protein
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl) Dimethylammonio]-2-Hydroxy-1-Propanesulfonate
CKI	casein kinase I
COPI	Coat protein I
CPM	counts per minute
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
dn	dominant negative Mutante
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GST	Glutathion S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure
His	Histidin
IP	Immunopräzipitat(en)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
KA	Kinase-assoziierte Domäne
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kin/Kin	Kinase Gen Produkt
LacZ	β-Galactosidase
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
MAP	Mikrotubulin-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP/ERK (Extrazelluläre Signale-regulierte Kinase) Kinase
MPG-ASMB	Max Planck Gesellschaft -Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie

---

MT	Mikrotubuli
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase
PAR-1	Partitioning defective-1
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PHF	paarige helikale Filamente
pI	isoelektrischen Punkt
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDK1	Sphingosine-abhängige Proteinkinase 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S/Ser	Serin
Snf	sucrose non-fermenting kinase
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Tau	Tubulin-assoziierte Einheit ( <i>Tubulin-associated unit</i> )
TBS	Tris gepufferte Salzlösung ( <i>Tris Buffer Saline</i> )
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
T/Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
u.a.	unter anderen
UBA	Ubiquitin-assoziierte Domäne
UV	Ultraviolett
usw.	und so weiter
v/v bzw. w/v	Volumen pro Volumen bzw. Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
YFP	Yellow Fluorescent Protein

## A2 Proteinsequenz von MARK2

**N-Terminus**

1 MSSARTPLPTLNERDTEQPTLGHLDKSPSSKSNMLRGRNSATSADAEQPHIGNYRLLKTIG

61 KGNFAKVKLARHILTGKEVAVKIIDKTQLNSSSLQKLFREVRIMKVLNHPNIVKLFEVIE  
**CAT**

121 TEKTLYLVMEYASGGGEVFDYLVAHGRMKEKEARAKFRQIVSAVQYCHQKFIVHRDLKAEN

**208 212**

181 LLLDADMNIKIADFGFSNEFTFGNKLDTFCGSPPYAAPELFGGKKYDGPEVDVWSLGVIL

241 YTLVSGSLPFDGQNLKELRERVLRGKYRIPFYMSTDCENLLKKFLILNPSKRGTLQIMK  
**UBA**

301 DRWMNVGHEDELKPYVEPLPDYKDPRTTELMVSMGYTREEIQDSLQYNEVMATYLL

361 LGYKSSSELEGDTITLKPRPSADLTNSSAPSPSHKVQRSVSANPKQRRSSDQAVPAIPTSN

421 SYSKKTQSNNAENKRPEEETGRKASSTAKVPASPLPGLDRKKTTPPTSTNSVLSTSTNRS

**SPACER**

481 RNSPLLDRASLGQASIQNGKDSTAPQRPVSPSAHNISSSSGAPDRTNFPRGVSSRSTF

541 HAGQLRQVRDQQNLPGVTPASPSGHSQRRGASGSIFSKFTSKFVRRNLNEPESKDRVE

601 TLRPHVVGGGGTDKEKEEFREAKPRSLRFTWSMKTTSMEPNEMMREIRKVLNANSCQSE

**C-Terminus**

661 LHERYMLLCVHGTPGHENFVQWEMEVCKLPRLSLNGVRFKRISGTSMFAKNIASKIANEL

721 KL

## A2 Proteinsequenz von 14-3-3ζ

1 MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSVTEQGAELSNEERNLLSVAKYNVVGARRSSWR

61 VVSSIEQKTEGAEEKKQQMAREYREKIETEL RDICNDVLSLLEKFLIPNASQAESKVFYLK

121 MKGDYYRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQAYQEAFEISKEMQPTHPIRLGLALNFSVFYYE

181 ILNSPEKACSLAKTAFDEAIAEELDTLSEESYKSDSTLIMQLLRDNLTTLWTSDTQGDAAEAG

241 EGGEN

## A3 Primer-Sequenzen der ortsgerichteten Mutagenese von 14-3-3ζ

### E180K

5'-CTTTCTCTGGGGAATTCAGAATCTTATAATAGAACACAGA-3'  
 3'-GAAAGAGACCCCTTAAGTCTTAGAATATTATCTTGTGTCT-5'

### F196Y

5'-AATGGCTTCATCATAAGCTGTCTTTGCAAGAGAGCAAGCTTTCTC-3'  
 3'-TTACCGAAGTAGTATTCGACAGAAACGTTCTCTCGTTTCGAAAGAG-5'

**Y211F**

5'-CGTGCTGTCTTTGAATGACTCTTCACTTAGTGTATCAAG-3'

3'-GCACGACACAACTTACTGAGAAGTGAATCACATAGTTC-5'