

**Identifizierung neuer Interaktionspartner  
der Kinase MARKK aus *Rattus norvegicus***

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

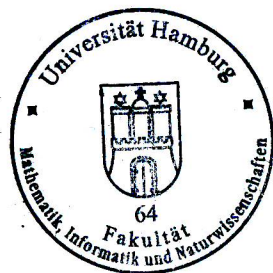
vorgelegt im Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

von  
Cindy Johne  
aus Güstrow

Hamburg  
2007

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. E. MANDELKOW  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Priv.-Doz Dr. H. QUADER  
Tag der Disputation: 09. März 2007

Hamburg, den 15. Februar 2007



A handwritten signature in black ink, consisting of a large 'R' followed by a cursive 'L' and a long horizontal flourish.

Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Alzheimer Krankheit (AD) .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2</b>	<b>Das Zytoskelett der Zelle .....</b>	<b>10</b>
3.2.1	Das Mikrotubuli-Netzwerk .....	10
3.2.1.1	Beeinflussung der Stabilität des Mikrotubuli-Netzwerkes .....	12
3.2.1.2	Die MARKK – MARK – MAP(Tau) – Signaltransduktionskaskade.....	13
3.2.1.3	Die MARK-aktivierende Kinase MARKK.....	14
3.2.2	Das Aktin-Netzwerk .....	16
3.2.2.1	Beeinflussung des Aktin-Netzwerkes - F-Aktin assoziierte Proteine.....	18
3.2.2.2	Die Aktin-regulierende Kinase TESK1 .....	19
3.2.3	Koordination von MT- und Aktin-Netzwerk .....	23
<b>3.3</b>	<b>Die MAPK-Signaltransduktionswege.....</b>	<b>25</b>
3.3.1	Spred – ein Inhibitor des ERK/MAPK-Signaltransduktionsweges .....	26
<b>3.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>Material</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Bezugsquellen .....</b>	<b>29</b>
4.1.1	Chemikalien .....	29
4.1.2	Enzyme.....	29
4.1.3	Antikörper .....	29
4.1.4	Molekulargewichtsmarker .....	30
4.1.5	Vom Hersteller bezogene Chemikalien-Zusammensetzungen (Kits).....	31
<b>4.2</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Software.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Medien und Zusätze .....</b>	<b>32</b>
4.4.1	Bakterienmedien .....	32
4.4.2	Hefemedien .....	33

4.4.3	Zellkulturmedien.....	33
<b>4.5</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Bakterien- und Hefestämme, Viren und Zelllinien.....</b>	<b>36</b>
4.6.1	Bakterienstämme.....	36
4.6.2	Hefestamm .....	36
4.6.3	Baculovirus .....	36
4.6.4	Eukaryontische Zelllinien .....	37
<b>4.7</b>	<b>Vektoren.....</b>	<b>37</b>
<b>4.8</b>	<b>Hergestellte und bestehende Konstrukte .....</b>	<b>38</b>
<b>4.9</b>	<b>Hergestellte und bestehende Baculoviren .....</b>	<b>40</b>
<b>4.10</b>	<b>cDNA Bibliothek.....</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>Methoden</b>	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>41</b>
5.1.1	DNA Amplifikation mittels PCR.....	41
5.1.2	Erstellung von Punktmutationen.....	41
5.1.3	Restriktionsverdau .....	42
5.1.4	Dephosphorylierung von geschnittener DNA.....	42
5.1.5	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden.....	42
5.1.6	Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese.....	42
5.1.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	43
5.1.8	Ligation.....	43
5.1.9	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	43
5.1.10	Isolation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> (Mini- und Midimaßstab) .....	44
5.1.11	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	45
5.1.12	Sequenzierung .....	45
5.1.13	Herstellung von Glycerindauerkulturen.....	45
5.1.13	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	45
<b>5.2</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>46</b>
5.2.1	Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine .....	46
5.2.1.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	46
5.2.1.2	Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> .....	47
5.2.2	Aufreinigung rekombinanter His-Fusionsproteine aus Insektenzellen.....	48

5.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
5.2.4	SDS-Polyacryamidgelelektrophorese .....	49
5.2.5	Western Blot .....	50
5.2.6	Ko-Immunopräzipitation.....	51
5.2.7	GST-Pulldown Bindungsassay .....	51
5.2.8	Kinase-Aktivitäts-Assay .....	52
5.2.9	Generierung spezifischer Antikörper .....	53
<b>5.3</b>	<b>Hefe Zwei-Hybrid Methoden .....</b>	<b>53</b>
5.3.1	Amplifikation von cDNA Bibliotheken.....	54
5.3.2	Hefetransformation und direkte Zwei-Hybrid Test .....	55
5.3.2.1	Transformation in <i>S. cerevisiae</i> .....	55
5.3.2.2	Direkter Hefe Zwei-Hybrid Test.....	55
5.3.3	Hefe Zwei-Hybrid cDNA Bibliothek Screen.....	56
5.3.3.1	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> für den Zwei-Hybrid cDNA-Bank Screen ....	57
5.3.3.2	Berechnung der Transformationseffizienz.....	57
5.3.3.3	Identifizierung positiver Beuteklone.....	58
5.3.3.3.1	Hefe Köder-Verlustkulturen .....	58
5.3.3.3.2	<i>E. coli</i> Transformation mit Beuteplasmiden aus Hefen .....	59
5.3.3.3.3	Hefe Retransformation mit Beuteplasmid aus <i>E. coli</i> .....	59
5.3.3.3.4	Sequenzierung positiver Klone .....	59
<b>5.4</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>59</b>
5.4.1	Kultivierung von verschiedenen Säugerzelllinien .....	59
5.4.2	Transfektion von Säugerzellen.....	60
5.4.2.1	Calzium-Phosphat-Transfektion .....	60
5.4.2.2	Effekten <sup>®</sup> -Transfektion .....	61
5.4.2.3	Lipofectamin <sup>™</sup> -Transfektion.....	61
5.4.3	Immunfluoreszenz.....	61
5.4.4	Kultivierung von Sf9-Zellen .....	62
5.4.5	Baculovirus Expressionssystem.....	62
5.4.5.1	Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren.....	63
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>6.1</b>	<b>Identifizierung neuer Interaktionspartner von MARKK .....</b>	<b>64</b>

6.1.1	Hefe Zwei-Hybrid Screen einer fötalen menschlichen Gehirn cDNA-Bank.....	64
6.1.2	Identifizierte Klone aus dem Hefe Zwei-Hybrid Screen .....	66
<b>6.2</b>	<b>Genauere Charakterisierung der MARKK – Spred1 Interaktion .....</b>	<b>67</b>
6.2.1	Kartierung der Interaktionsdomänen von MARKK und Spred1 mittels direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests.....	67
6.2.2	Untersuchung zur Dimerisierung von Spred1 mittels direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests .....	69
6.2.3	Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen MARKK und Spred1 .....	70
6.2.4	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Aktivität der MARKK in Gegenwart von Spred1	72
6.2.5	Expressionsstudien von MARKK und Spred1 .....	74
6.2.5.1	Einzelexpression von Spred1 und MARKK in CHO Zellen .....	74
6.2.5.2	Koexpression von Spred1 und MARKK WT in CHO Zellen .....	76
<b>6.3.</b>	<b>Untersuchungen zur Interaktion von TESK1 und Spred1 .....</b>	<b>77</b>
6.3.1	Kartierung der Interaktionsdomänen von TESK1 und Spred1 mittels direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests .....	78
6.3.2	Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen TESK1 und Spred1 .....	79
6.3.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Aktivität der TESK1 in Gegenwart von Spred1 ...	81
6.3.4	Koexpressionsstudien der Interaktionspartner Spred1 und TESK1 .....	83
6.3.4.1	Einzelexpression von TESK1 in CHO Zellen.....	84
6.3.4.2	Koexpressionsstudien von Spred1 und TESK1 in CHO Zellen .....	87
<b>6.4</b>	<b>Untersuchungen zur Interaktion von TESK1 und MARKK.....</b>	<b>88</b>
6.4.1	Interaktionstests von MARKK und TESK1 im Hefe Zwei-Hybrid System.....	89
6.4.2	Einfluss der Interaktion zwischen MARKK und TESK1 auf deren Aktivitäten	90
6.4.2.1	MARKK WT hat keinen Einfluss auf die Aktivität von TESK1.....	91
6.4.2.2	TESK1 inhibiert die Aktivität von MARKK .....	93
6.4.3	Koexpressionsstudien von MARKK und TESK1.....	96
6.4.3.1	Expression von MARKK und TESK1 in CHO Zellen .....	96
6.4.3.2	Expression von MARKK, MARK2 und TESK1 in CHO htau40 Zellen .....	98
6.4.3.3	Expressionsstudien in PC12 Zellen.....	101
<b>7.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>105</b>
<b>7.1</b>	<b>Identifizierung neuer Interaktionspartner der MARKK.....</b>	<b>105</b>
<b>7.2</b>	<b>Charakterisierung der Interaktion zwischen MARKK und Spred1.....</b>	<b>106</b>

<b>7.3</b>	<b>Charakterisierung der Interaktion von TESK1 und Spred1.....</b>	<b>108</b>
<b>7.4</b>	<b>Charakterisierung der Interaktion zwischen MARKK und TESK1 .....</b>	<b>112</b>
7.4.1	TESK1 – ein Modulator der Tau Toxizität? .....	117
7.4.2	Einfluss von TESK1 und MARKK auf die Differenzierung .....	118
<b>8.</b>	<b>Literatur</b>	<b>121</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>134</b>
9.1	Abkürzungen .....	134
9.2	Proteinsequenzen.....	135
9.3	Oligonukleotide.....	138
9.4	Abbildungsverzeichnis .....	138
9.5	Wissenschaftlicher Werdegang.....	141
	<b>Danksagung</b>	<b>142</b>

## 2. Zusammenfassung

Die Serin/Threonin-Kinase MARKK gehört zur Familie der Ste20 Kinasen und ist in verschiedenen Signaltransduktionswegen involviert. Neben einer Funktion in der p38/MAPK Signaltransduktionskaskade konnte eine Beteiligung an der Regulation der Tau-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Hierbei aktiviert MARKK die vier Mitglieder der MARK-Familie (MARK1-4), welche wiederum MAPs wie z.B. das neuronale Tau direkt phosphorylieren können (Timm *et al.* 2003, Drewes *et al.* 1995). Der Phosphorylierungsstatus von Tau reguliert dessen Fähigkeit, an Mikrotubuli zu binden und beeinflusst auf diesem Wege die Mikrotubuli-Stabilität. Kommt es zu einem verstärkten Ablösen des phosphorylierten Tau-Proteins von den Mikrotubuli, kann dies zur pathologischen Aggregation von Tau in intrazelluläre neurofibrilläre Bündel führen, wie man sie bei der Alzheimer Krankheit findet. Somit ist eine strikte Kontrolle der einzelnen Komponenten des MARKK – MARK – MAP(Tau) Signaltransduktionsweges unerlässlich.

Da über die Regulation der MARKK bislang wenig bekannt war, sollten im ersten Teil dieser Arbeit neue Interaktionspartner mit Hilfe eines Hefe Zwei-Hybrid Screens identifiziert werden. Neben weiteren Proteinen wurde auf diesem Wege eine Wechselwirkung zwischen MARKK und Spred1 ermittelt. Spred1 gehört zu einer Familie von Membran-assoziierten Regulatorproteinen, welche die durch Wachstumsfaktoren induzierte Aktivierung der ERK-Signaltransduktionskaskade unterdrücken (Wakioka *et al.* 2001). Die Charakterisierung der Interaktion ergab, dass MARKK und Spred1 zwar aneinander binden, doch dass die Interaktion keinen Einfluss auf die Aktivität der MARKK hat.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Aktin-regulierenden Kinase TESK1. Es ist bekannt, dass diese den Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin inaktiviert und auf diese Weise die Ausbildung von stabilen Stressfasern in der Zelle fördert (Toshima *et al.* 2001a). Wie aus Daten über sprouty4, einem Spred1-verwandten Protein, vermutet wurde, konnte eine Wechselwirkung zwischen TESK1 und dem MARKK-Interaktionspartner Spred1 ermittelt werden (Tsumura *et al.* 2004). Eine direkte Bindung konnte nicht nur in Hefe Zwei-Hybrid Tests und in einem GST-Pulldown Bindungsassay nachgewiesen werden, sondern auch durch Kollokalisationsstudien in einem



Modell-Zellsystem (CHO Zellen). Vor allem die Daten aus den Koexpressionsstudien deuten auf eine hemmende Wirkung von Spred1 auf die Kinase TESK1 hin. Spred1 kann also über diese neu charakterisierte Interaktion Einfluss auf die Aktin-Stabilität nehmen. Somit stellt die Spred1 – TESK1 Wechselwirkung eine neue Schnittstelle zwischen dem zentralen ERK-Signalübertragungsweg (Differenzierung, Proliferation) und der Organisation des Aktin-Netzwerkes dar.

Aus den Ergebnissen der beiden ersten Abschnitte leitete sich eine Arbeitshypothese ab, bei der der gemeinsame Interaktionspartner Spred1 als Brückenprotein (scaffold) eine Verbindung zwischen der Mikrotubuli-regulierenden Kinase MARKK und der Aktin-regulierenden Kinase TESK1 schafft. Überraschender Weise konnte auch eine direkte Interaktion zwischen MARKK und TESK1 festgestellt werden. Mittels *in vitro* Aktivitäts-Assays und Überexpressionstudien in verschiedenen Zellsystemen wurde die funktionelle Relevanz dieser neu identifizierten Wechselwirkung belegt. Hierbei zeigte sich, dass TESK1 die Kinaseaktivität der MARKK inhibieren kann, während MARKK nicht in der Lage ist, einen Einfluss auf TESK1 auszuüben. Dass die Hemmung der MARKK dabei durch die Bindung der beiden Kinasen erfolgt und nicht über Phosphorylierung vermittelt wird, kann aus den Daten der Aktivitäts-Assays geschlossen werden.

Die untersuchte Wechselwirkung zwischen MARKK und TESK1 stellt einen neuen Knotenpunkt zur Regulation der Mikrotubuli- und Aktin-Organisation in der Zelle dar und ermöglicht eine direkte Koordination der beiden Zytoskelett-Komponenten. Auch im Hinblick auf die mögliche Rolle von MARKK bei der Bildung von hyperphosphorylierten Tau-Aggregaten in der Alzheimer Krankheit wäre eine weiterführende Analyse der Interaktion von MARKK und TESK1 interessant.

## 3. Einleitung

### 3.1 Die Alzheimer Krankheit (AD)

„*Ich habe mich sozusagen selbst verloren*“

So beschrieb die Patientin Auguste D. dem Arzt Dr. Alois Alzheimer ihr Leiden. Bei der nach Alzheimer benannten Erkrankung, welche er im Jahre 1907 erstmals wissenschaftlich beschrieb, handelt es sich um eine Form der Altersdemenz (Alzheimer 1907). Sie ist mit über 60 % die häufigste auftretende Art von Demenz. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko, an Alzheimer zu erkranken. So sind ca. 1 % aller 65-Jährigen betroffen, während es bei Personen über 95 Jahren schon bis zu 55 % sind (Hendrie 1997, Lopes und Bottino 2002). Mit der weiter steigenden Lebenserwartung wird auch die Anzahl der Alzheimer Patienten in den nächsten Jahren zunehmen.

Bei der Alzheimer Krankheit handelt es sich um eine progressive neurodegenerative Erkrankung des Gehirnes. Erste Symptome sind der beginnende Verlust des Kurzzeitgedächtnisses und Wortfindungsstörungen (Haupt *et al.* 1991). Im weiteren Verlauf der Krankheit kommt es zu verstärkten Sprachproblemen, zum Verlust des abstrakten Denkens und zu starken Verhaltensstörungen, die mit zeitlicher und räumlicher Desorientierung verbunden sind (Gilleard *et al.* 1993, Kurz 1997). Die klinische Phase umfasst nur das letzte Drittel, der sich über mehrere Jahrzehnte entwickelnden Krankheit, welche auf das fortschreitende Absterben von Nervenzellen des Gehirnes zurückzuführen ist (Kurz 1997). Erste morphologische Veränderungen in der Hirnregion des mediobasalen Temporallappens sind schon bis zu 30 Jahre vor den ersten klinischen Symptomen erkennbar (Braak und Braak 1991, Braak *et al.* 1994).

Über die Ursachen der Alzheimer Krankheit ist wenig bekannt. Nur etwa 3 - 5 % der Erkrankungen sind genetisch bedingt (Mutter *et al.* 2005). Unbestrittener Hauptrisikofaktor ist das Lebensalter.

Post mortale Untersuchungen an den Gehirnen von Alzheimer Patienten ergaben drei Hauptmerkmale: I) Reduktion des Gehirngewichts, II) Zeichen von Atrophie (Gewebeschwund) und III) Erweiterung des Ventrikelsystems. Diese Beobachtungen können auf die folgenden Veränderungen auf zellulärer Ebene zurückgeführt werden:

I) Verlust von Synapsen, II) Verlust von Nervenzellen und III) Ablagerung von abnormal aggregierten Proteinen (Weis 1997).

Es können zwei Arten von Proteinaggregaten unterschieden werden: die extrazellulären  $\beta$ -Amyloid-Plaques und die intrazellulären neurofibrillären Bündel. Die extrazellulären Amyloid-Plaques bestehen hauptsächlich aus den ca. 4 kDa großem A $\beta$  Peptiden. A $\beta$  Peptide entstehen durch proteolytische Spaltung des  $\beta$ -Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP,  $\beta$ -amyloid-precursor-protein) (Selkoe 1998). APP ist ein Membranprotein, welches im ER synthetisiert wird und anschließend über den zentralen sekretorischen Vesikelverkehr der Zelle an die Plasmamembran transportiert wird. Die proteolytischen Spaltung des vollständigen APP-Proteins durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen erfolgt wahrscheinlich sowohl während des sekretorischen Vesikelverkehrs, als auch im endosomalen Kompartiment nach erneuter Endozytose (Morishima-Kawashima und Ihara 2002). Die Ursachen für die im Alter vermehrte Produktion und anschließende Ablagerung des A $\beta$  Peptids im Gehirn sind nicht bekannt.

Die zweite Form der Proteinablagerungen, die in Gehirnen von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden kann, sind die neurofibrillären Bündel (NFT, neurofibrillary tangles). Hauptbestandteil ist in diesem Fall das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau. Die physiologische Funktion dieses Proteins ist die Bindung an Mikrotubuli, welche dadurch stabilisiert werden (Weingarten *et al.* 1975). Außerdem fördert es die Polymerisation von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zu Mikrotubuli (siehe auch 3.2.1). Das in den NFTs vorhandene Tau bildet Filamente, die auf Grund ihrer Struktur als paarige helikale Filamente (PHF, paired helical filaments) bezeichnet werden (Kosik *et al.* 1986, Friedhoff *et al.* 2000). Genauere Untersuchungen des aggregierten Taus haben gezeigt, dass dieses durch verschiedene Modifikationen gekennzeichnet ist (Mandelkow und Mandelkow 1998). So konnte neben Ubiquitylierung und Glykosylierung eine abnormale Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins an vielen verschiedenen Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden (Trojanowski und Lee 1995, Johnson und Hartigan 1998, de Vrij *et al.* 2004). Der Phosphorylierungsstatus von Tau hat einen starken Einfluss auf die Bindung an MT (Gustke *et al.* 1992, Drewes *et al.* 1995). Das in der Alzheimer Krankheit vorkommende hyperphosphorylierte Tau ist nicht mehr in der Lage an die MT zu binden, was zu einer Destabilisierung des gesamten MT-Netzwerkes in Neuronen führt. Solch eine dramatische Veränderung des Zytoskeletts kann nicht kompensiert werden, was letztendlich zum Absterben der Nervenzellen führt.

## 3.2 Das Zytoskelett der Zelle

Für viele zelluläre Prozesse ist die Existenz eines intakten Zytoskeletts eine entscheidende Grundvoraussetzung. Doch Vorgänge wie Zellmigration, Differenzierung und Zellteilung erfordern nicht nur das Vorhandensein eines funktionellen Zytoskeletts, sondern auch die koordinierte Dynamik der einzelnen Komponenten.

Das Zytoskelett einer Zelle setzt sich aus drei unterschiedlichen fibrillären Bestandteilen zusammen, die ein komplexes gerüstartiges Netzwerk ausbilden. Es handelt sich hierbei um Aktin-Filamente (Mikrofilamente), Mikrotubuli (MT) und Intermediärfilamente. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Proteinbausteine, der Struktur und ihrer Lokalisation in der Zelle, was die Wahrnehmung unterschiedlichster Funktionen ermöglicht (Alberts *et al.* 1997).

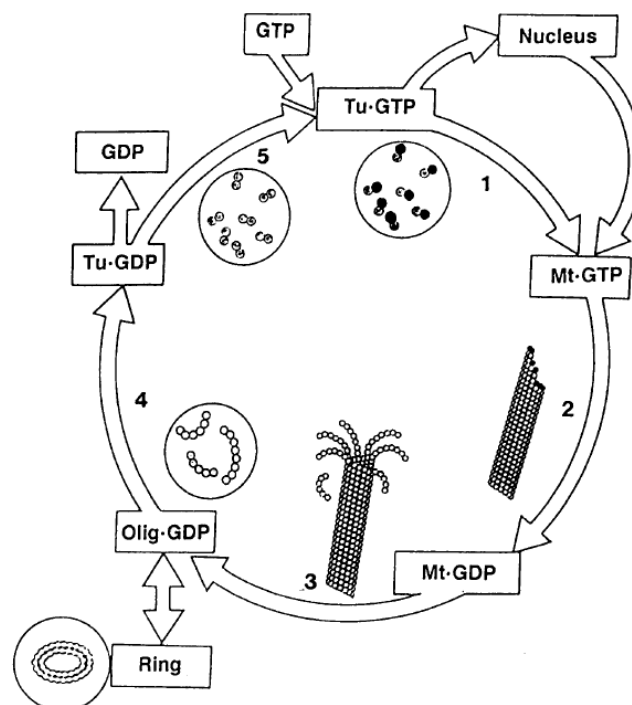
Da im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der beiden Kinasen MARKK und TESK1 auf die Dynamik des Mikrotubuli- und Aktin-Netzwerkes untersucht wurde, soll im folgenden näher auf diese beiden Komponenten des Zytoskeletts eingegangen werden.

### 3.2.1 Das Mikrotubuli-Netzwerk

Mikrotubuli (MT) bestehen aus filamentartigen Polymeren, die sich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Untereinheiten zusammensetzen. Ein einzelner Mikrotubulus ist ein aus 13 Protofilamenten aufgebauter Hohlzylinder, der einen Durchmesser von 25 nm aufweist (Alberts *et al.* 1997). Da alle der parallel verlaufenden Protofilamente über die gleiche Ausrichtung ihrer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten verfügen, weist jedes MT-Filament eine Polarität auf. Das so genannte MT Plus-Ende ist zur Zellperipherie gerichtet und zeichnet sich durch schnelles Wachstum aus. Im Gegensatz dazu wachsen MT am Minus-Ende nur langsam. Das Minus-Ende ist am Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC, microtubule organizing center), welches in den meisten tierischen Zellen als Centrosom bezeichnet wird, verankert. Ein Hauptbestandteil des Centrosoms ist  $\gamma$ -Tubulin, das bei der Nukleation von MT eine entscheidende Rolle spielt (Nogales 2001).

Für Zellen ist nicht nur die Stabilität des MT-Netzwerkes von Bedeutung, sondern vielmehr die Fähigkeit, sich den jeweiligen zellulären Prozessen durch geordneten Auf-, Ab- und Umbau anzupassen. Besonders deutlich wird dies bei den dramatischen strukturellen Veränderungen während der Zellteilung. Doch auch die Mikrotubuli in

ruhenden Zellen sind sehr dynamische Gebilde, die ständig depolymerisieren und polymerisieren, allerdings ohne das Gesamtpolymerisationsniveau im Gleichgewicht zu verändern. Diese besondere Eigenschaft der MT, die als „dynamische Instabilität“ bezeichnet wird, ist in Abbildung 1 dargestellt (Mitchison und Kirschner 1984, Mandelkow *et al.* 1991). Entscheidend hierfür ist die Tatsache, dass die Tubulin-Untereinheiten GTP gebunden haben, welches bei der Polymerisation von MT-Filamenten zu GDP hydrolysiert (Abb. 1). Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Tubulin besitzen ein GTP, wenn sie an einen wachsenden MT binden. Das Anlagern weiterer  $\alpha/\beta$  Untereinheiten bewirkt anschließend die GTP-Hydrolyse im endständigen  $\beta$ -Tubulin (Carrier 1982).



**Abbildung 1: Dynamische Instabilität der Mikrotubuli (aus Mandelkow *et al.* 1991)**

(A) Die Eigenschaft der „dynamischen Instabilität“ bezeichnet die Fähigkeit einzelner MT innerhalb einer Filamentpopulation zu wachsen, während andere zur gleichen Zeit schrumpfen. Das in einer Zelle vorhandene Tubulin ist nicht vollständig zu MT-Filamenten polymerisiert, sondern bildet auch immer einen Vorrat an freien  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten (5). GTP beladene Tubulin-Untereinheiten lagern sich zu einem Kern/Nucleus (bei der MT-Neubildung) oder am wachsenden MT-Ende an und verlängern so das Filament (1/2). Kommt es allerdings zu einer verstärkten Hydrolyse des GTPs an den endständigen Untereinheiten, nehmen die Protofilamente eine gebogene Konformation ein und depolymerisieren (3). Hierbei kommt es zu Bildung von Tubulin-Oligomeren (teilweise mit ringförmiger Struktur), welche in die Tubulin-Dimere zerfallen (4).

Auf Grund ihrer Beschaffenheit und ihrer Eigenschaften erfüllen Mikrotubuli eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen in Zellen. Sie leisten nicht nur einen wichtigen Betrag zur Erhaltung und Stabilität der Zellmorphologie, sondern gewährleisten den Transport von

Organellen und Vesikeln. Weiterhin sind MT bei Prozessen wie der Polarisation von Zellen (z. B. Entwicklung eines Neurons) und der Zellbewegung von entscheidender Bedeutung.

### 3.2.1.1 Beeinflussung der Stabilität des Mikrotubuli-Netzwerkes

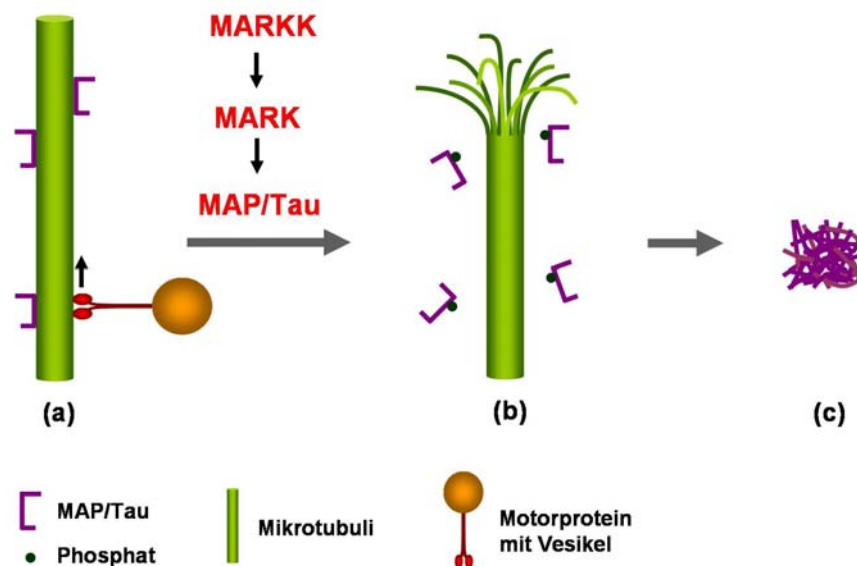
Die Dynamik des Mikrotubuli-Netzwerkes in der Zelle wird durch viele unterschiedliche Faktoren reguliert. So sind Mikrotubuli einer Reihe von post-translationalen Modifikationen unterworfen. Während Acetylierung und Detyrosylierung als Marker für stabile MT angesehen werden, die keinen direkten Einfluss auf die Stabilität ausüben, scheinen Polyglycylierung und Polyglutamylierung für ein intaktes MT-Netzwerk essentiell zu sein (Mandelkow und Mandelkow 1995, Rosenbaum 2000).

Neben den post-translationalen Modifikationen wird die Organisation und Dynamik der Mikrotubuli vor allem durch eine Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) beeinflusst. Je nach Funktion können diese in drei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe umfasst die strukturellen MAPs, die durch ihre direkte Interaktion MT stabilisieren. Die zweite Gruppe setzt sich aus Motor-Proteinen, wie Kinesin und Dynein zusammen. In einer dritten Gruppe werden sehr unterschiedliche MAPs zusammengefasst. Hierzu gehören auch Kinasen wie cdk5 und GSK3 $\beta$  (Mandelkow und Mandelkow 1995, Drewes *et al.* 1998). Als +TIPs werden Proteine bezeichnet, die selektiv das MT +Ende binden und dort die Dynamik regulieren, sowie auch die Interaktion zu anderen zellulären Strukturen vermitteln (Akhmanova und Hoogenraad 2005, Galjart und Perez 2003).

Die Gruppe der strukturellen MAPs umfasst sowohl das ubiquitär vorkommende MAP4, als auch die gehirnspezifischen Proteine MAP2 und Tau. Das Tau-Protein ist das am intensivsten untersuchte Mitglied, da es eine wichtige Rolle bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen spielt (siehe auch 3.1). Tau, ein nativ ungefaltetes Protein, weist mehrere funktionell unterschiedliche Domänen auf. Der N-Terminus bindet nicht an Mikrotubuli und wird als Projektionsdomäne bezeichnet. Die C-terminale Domäne umfasst drei bzw. vier Sequenzwiederholungen mit je 31-32 Aminosäuren (Repeats), welche die charakteristischen KXGS-Motive beinhalten. Zusammen mit den flankierenden Regionen sind die Repeats für die Bindung an MT und deren Stabilisierung verantwortlich (Gustke *et al.* 1994).

### 3.2.1.2 Die MARKK – MARK – MAP(Tau) – Signaltransduktionskaskade

Die Interaktion zwischen Mikrotubuli und Tau wird über Phosphorylierungen durch unterschiedliche Kinasen reguliert (Stoothoff und Johnson 2005). Eine besondere Bedeutung spielt hierbei die Phosphorylierung des Serins 262 (Nummerierung nach hTau40, längste humane Isoform) innerhalb des KXGS-Motives des ersten Repeats (Biernat *et al.* 1993, Schneider *et al.* 1999, Johnson und Stoothoff 2004). Die dafür verantwortliche Kinase wurde 1995 identifiziert und erhielt den Namen MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase – MARK – (Drewes *et al.* 1995, Drewes *et al.* 1997). Sie wird ihrerseits durch eine Kinase, die MARK-Kinase (MARKK), phosphoryliert und auf diesem Wege aktiviert (Timm *et al.* 2003). Somit ergibt sich der Signaltransduktionsweg **MARKK → MARK → MAP's** (Abb. 2).



**Abbildung 2: Der MARKK – MARK – MAP Signaltransduktionsweg** (modifiziert nach Timm *et al.* 2006) (a) Mikrotubuli werden durch das Binden von MAPs (z. B. Tau) stabilisiert. Sie stellen unter anderem die Bahnen für den Vesikelverkehr in der Zelle. Die Phosphorylierung der MAPs durch MARK, welche ihrerseits durch MARKK aktiviert wird, bewirkt deren Ablösen von den Mikrotubuli (b). Dies führt zum Zusammenbruch des MT-Netzwerkes. Im pathologischen Fall der Alzheimer Krankheit kommt es zu einer Aggregation des ungebundenen Tau-Proteins in paarige helikale Filamente (c).

Die Serin/Threonin Kinasen der MARK-Familie gehören zu der Gruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängigen Proteinkinasen (Hanks und Hunter 1995). Es sind 4 Isoformen bekannt (MARK1-4), die die folgende Domänenstruktur aufweisen: eine aminoternale Kopfsequenz gefolgt von einer konservierten Kinasedomäne, eine Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA) und die „Spacer“-Domäne vor der

carboxyterminalen Schwanzsequenz (Drewes *et al.* 1997, Panneerselvam *et al.* 2006, Drewes 2004).

Die Aktivität der MARK ist für Prozesse, wie den axonalen Transport und die Differenzierung von Neuronen von essentieller Bedeutung (Biernat *et al.* 2002, Mandelkow *et al.* 2004). Für Homologe der MARK in Hefen (Kin1/2) und in *C. elegans* bzw. *D. melanogaster* (PAR-1) konnte gezeigt werden, dass diesen eine wesentliche Rolle bei der Polaritätsentwicklung zukommt (Levin und Bishop 1990, Guo und Kemphues 1995, Shulman *et al.* 2000).

Die Aktivierung der MARK kann nicht nur durch die MARKK, sondern auch durch LKB1 erfolgen (Timm *et al.* 2003, Lizcano *et al.* 2004). Beide Kinasen phosphorylieren einen Threoninrest (Thr208 in MARK2) innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne, was zu einer Stabilisierung des katalytischen Zentrums und somit zu einer erhöhten Kinaseaktivität führt. Im folgenden Abschnitt soll näher auf die aktivierende Kinase MARKK eingegangen werden, da diese Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

### 3.2.1.3 Die MARK-aktivierende Kinase MARKK

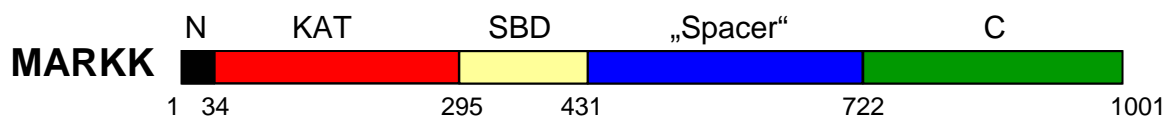
Die MARK-Kinase MARKK konnte aus Schweinehirn über mehrere Reinigungsschritte einschließlich Affinitätschromatographie isoliert werden (Timm *et al.* 2003). Diese Serin/Threonin-Kinase gehört zur Familie der Ste20-Kinasen, welche in zwei Unterfamilien geteilt werden: die p21-aktivierten Kinasen (PAKs) und die „germinal center kinases“ (GCKs) (Dan *et al.* 2001). Die GCKs gliedern sich in 8 Unterfamilien, wobei MARKK der GCK-Unterfamilie VIII angehört, welche auch als TAO-Familie bezeichnet wird (Manning *et al.* 2002, Dan *et al.* 2001).

In der Literatur sind mehrere Mitglieder dieser Familie beschrieben. Die Verwendung von unterschiedlichen Namen für zum Teil identische Kinasen ist schnell irreführend. So ist MARKK identisch mit der TAO-1 (thousand-and-one aminoacids) Kinase aus der Ratte (Hutchison *et al.* 1998). Das humane Homolog zur MARKK wird als PSK2 (prostate-derived Ste20-like kinase 2) und als hKFC-B (human kinase from chicken isoform B) bezeichnet (Zihni *et al.* 2006, Yustein *et al.* 2003). Auch TAO-2 (Chen *et al.* 1999) und deren humanes Homolog PSK (prostate-derived Ste20-like kinase; Moore *et al.* 2000, Mitsopoulos *et al.* 2003), sowie eine weitere humane Isoform hKFC-C (human kinase from chicken isoform C; Yustein *et al.* 2003) gehören zur Unterfamilie VIII der GCK-Kinasen.



Weiterhin werden dieser Familie die humane JIK-Kinase (JNK/SAPK inhibitory kinase; Tassi *et al.* 1999, Yoneda *et al.* 2001), die auch den Namen hKFC-A (human kinase from chicken isoform A; Yustein *et al.* 2003) trägt, sowie deren Spleißvariante KDS/DPK (Kinase domain with homology to Ste20p, Carter *et al.* 2000; dendritic cell derived protein kinase, Zhang *et al.* 2000) und deren Homolog in Hühnern KFC (kinase from chicken; Yustein *et al.* 2000) zugerechnet.

Alle Mitglieder der TAO-Unterfamilie zeichnen sich durch die gleiche Domänenstruktur aus (Abb. 3, Sequenz siehe Abb. 39). An eine kurze aminoternale Kopfsequenz schließt sich die hoch konservierte Kinasedomäne an. Die darauf folgende Substrat-Bindungsdomäne (SBD) weist bei den einzelnen Isoformen eine unterschiedliche Länge und Sequenz auf. Daran schließt sich die so genannte „Spacer“-Domäne an, welche auch stark konserviert ist, gefolgt von einer carboxyterminalen unterschiedlich langen Schwanzsequenz.



**Abbildung 3: Domänenstruktur von MARKK**

MARKK und andere Mitglieder der GCK Unterfamilie VIII weisen die dargestellte Domänenstruktur auf. Hierbei sind die aminoternale Kopfsequenz (N), die sich daran anschließende katalytische Domäne (KAT) und die „Spacer“-Domäne hoch konserviert. Dahingegen variieren die Substrat-Binde-Domäne (SBD) und der carboxyterminale Schwanzbereich (C) in der Länge und Sequenz unter den einzelnen Mitgliedern.

Für die verschiedenen Mitglieder der TAO-Unterfamilie wurden unterschiedliche Funktionen beschrieben. Fast alle weisen in Richtung der MAPK-Signaltransduktionskaskade (siehe 3.3). So ist bekannt, dass TAO1/MARKK und auch hKFC-B/PSK2 den Stress-induzierten p38 Signaltransduktionsweg durch direkte Phosphorylierung von MKK3 aktivieren können (Hutchison *et al.* 1998, Zihni *et al.* 2006, Yustein *et al.* 2003). Auch für TAO2 und JIK konnte eine regulatorische Funktion innerhalb der MAPK-Signalübertragungskaskade gezeigt werden (Chen *et al.* 1999, Tassi *et al.* 1999). Das humane Homolog der MARKK PSK2 kann nicht nur den JNK-Signaltransduktionsweg aktivieren, sondern bei Überexpression auch Apoptose induzieren (Zihni *et al.* 2006). Außerdem konnten die Kinasen PSK1 und PSK2 interessanter Weise mit dem Zytoskelett in Verbindung gebracht werden. PSK1 kann dabei scheinbar auf das Aktin- und das MT-Netzwerk einwirken. So führt die Überexpression von PSK1 in Swiss 3T3 Zellen zum einen zu einer Abnahme von Aktin-Stressfasern und zu Veränderungen in

der Organisation der Adhäsionspunkte (focal adhesion) (Moore *et al.* 2000). Andererseits konnten Mitsopoulos und Mitarbeiter die Kolo-kalisation von PSK1 mit Kern-nahen Mikrotubuli und deren Stabilisierung nachweisen (Mitsopoulos *et al.* 2003). Die Ergebnisse aus Experimenten mit unterschiedlichen Mutanten lassen darauf schließen, dass für die beschriebenen Effekte die katalytische Aktivität nicht nötig ist, sondern dass die carboxyterminale Domäne dafür verantwortlich ist. Dieser Bereich der Kinasen ist bei den Mitgliedern der TAO-Unterfamilie sehr heterogen. Daher ist es nicht möglich, Rückschlüsse auf ähnliche Funktionsweisen der MARKK zu ziehen.

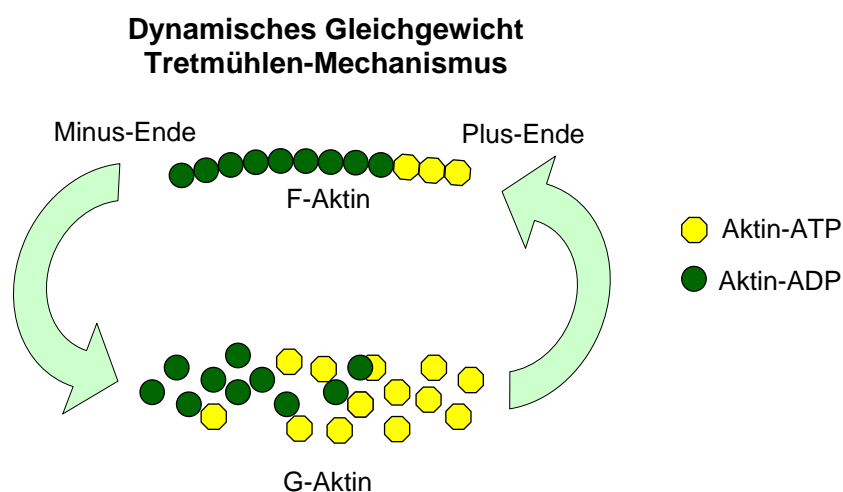
Über die Regulation der MARKK und ihrer Homologe ist bislang nur wenig bekannt. Zihni und Mitarbeiter konnten in ihren Studien zeigen, dass PSK2 aktiviert wird, wenn Zellen mit Apoptose-induzierenden Reagenzien, wie Staurosporin und Sorbitol, behandelt werden (Zihni *et al.* 2003). Alle Kinasen der TAO-Unterfamilie (auch MARKK) sind im aktiven Zustand phosphoryliert. Inwieweit dies auf Autophosphorylierung oder auf die Wirkung einer vorgeschalteten aktivierenden Kinase zurückzuführen ist, ist noch unklar. Weiterhin wurde für einige Mitglieder der Familie eine inhibitorische Wirkung des C-Terminus festgestellt. Ergebnisse aus Aktivitätstests mit TAO-2 und hKFC-A/B/C belegen, dass die aminoternale katalytische Domäne allein aktiver ist als die vollständige Kinase (Yustein *et al.* 2003, Chen *et al.* 1999). Außerdem konnten Yustein und Kollegen die Ausbildung von Homodimeren von hKFC-A (JIK) und hKFC-C (TAO-2/PSK) mittels Ko-Immunoprecipitation nachweisen (Yustein *et al.* 2003). Welche Auswirkungen die Dimerbildung auf die Aktivität hat, ist nicht bekannt.

Der Carboxyterminus von MARKK, welcher „Spacer“ und Schwanzsequenz umfasst, besitzt große amphipathische Bereiche, die wahrscheinlich zu Interaktionen mit anderen Proteinen fähig und für die Ausbildung der Dimere verantwortlich sind (Lupas *et al.* 1991, Yustein *et al.* 2003). Da also vermutet werden konnte, dass eine Wechselwirkung mit möglichen Regulatoren über diesen Bereich der Kinase erfolgt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Hefe Zwei-Hybrid cDNA-Screen mit diesen C-terminalen MARKK Domänen durchgeführt, um neue Interaktionspartner zu identifizieren.

### **3.2.2 Das Aktin-Netzwerk**

Neben den Mikrotubuli bildet Aktin ein weiteres stark heterogenes und hoch dynamisches Netzwerk in der Zelle. Aktin-Polymere bilden dabei flexible zweisträngige helikale

Filamente, die auf Grund ihres geringen Durchmessers (5-8 nm) auch als Mikrofilamente bezeichnet werden (Alberts *et al.* 1997). Die Organisation dieser Filamente kann je nach Zelltyp, aber auch in verschiedenen Bereichen innerhalb einer Zelle sehr unterschiedlich sein. Je nach Funktion werden Aktin-Strukturen unterteilt in: das Lamellopodium, ein netzwerkartiges Geflecht in der Zellrinde an der Bewegungsfront motiler Zellen; die Filopodia, dünne fingerartige Zellausläufer mit gebündelten parallel angeordneten Aktinfasern und die Stressfasern, kontraktile Aktinfaserbündel, die mit Zelladhäsionspunkten assoziiert sind (Nobes und Hall 1995, Small *et al.* 2002). Neben dem polymerisierten Aktin (auch als F-Aktin bezeichnet) gibt es in der Zelle auch einen Vorrat an ungebundenen, freien Aktin-Monomeren (G-Aktin). Vergleichbar mit den Mikrotubuli weisen auch Aktinfilamente eine Polarität auf. Das schneller wachsende Filamentende wird als Plus-Ende (auch barbed end) und das depolymerisierende Ende als Minus-Ende (auch pointed end) bezeichnet. Die Aktinpolymerisation ist an die Hydrolyse von ATP gekoppelt, wobei je ein Molekül ATP an ein Aktinmolekül gebunden ist. Lagert sich ATP-gebundenes G-Aktin an das Plus-Ende des Filamentes an, kommt es zur Hydrolyse. Das so entstandene ADP-F-Aktin ist leichter in der Lage vom Minus Ende des Filamentes abzu dissoziieren. Nach Erreichen der Maximallänge befinden sich Aktinfilamente in einem dynamischen Fließgleichgewicht, bei dem es gleichzeitig ständig zu Polymerisation und Depolymerisation kommt, ohne dass sich jedoch die Länge des Filamentes wesentlich ändert (Abb. 4). Diese Eigenschaft wird als Tretmühlen-Mechanismus (Treadmilling) bezeichnet (Wegener 1982, Alberts *et al.* 1997).

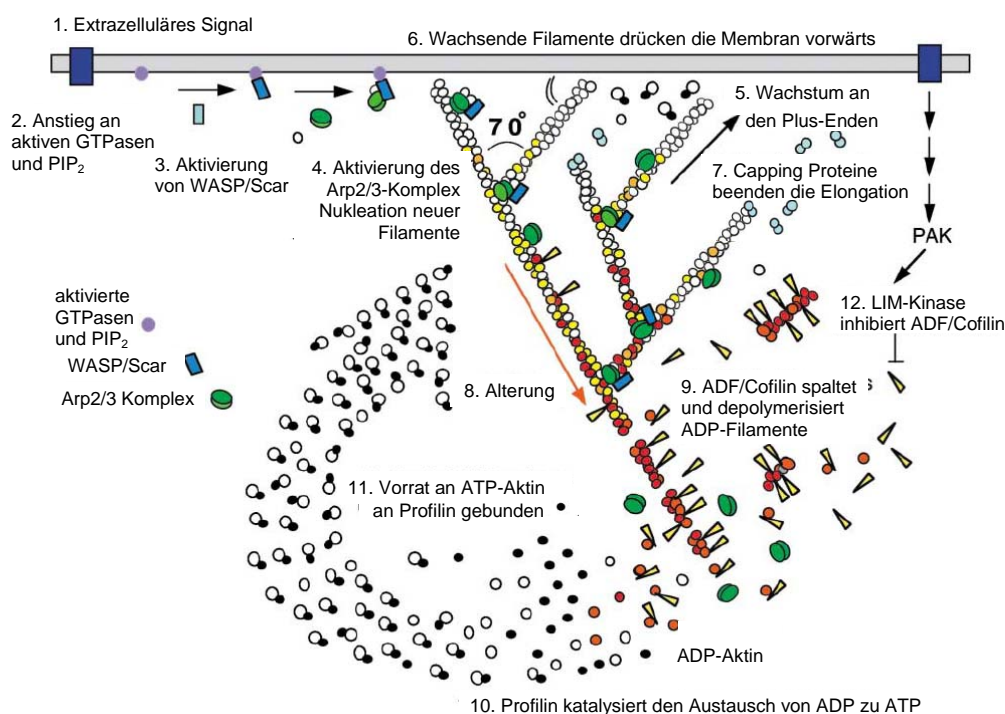


**Abbildung 4: Dynamisches Gleichgewicht der Aktin-Polymerisation (Tretmühlen-Mechanismus)** (modifiziert nach Alberts *et al.* 1997) Im dynamischen Gleichgewicht erfolgt eine gleichzeitige Anlagerung

von G-Aktin (ATP gebunden) am Plus-Ende des Aktinfilaments und Abdissoziation am Minus-Ende (ADP gebunden).

### 3.2.2.1 Beeinflussung des Aktin-Netzwerks – F-Aktin assoziierte Proteine

Die Stabilität und die Bildung der unterschiedlichen Aktin-Strukturen werden von vielen Aktin-bindenden Proteinen beeinflusst. Erst das Zusammenspiel aller Aktin-assoziierten Faktoren ermöglicht einen gezielten Auf- und Umbau des Aktin-Netzwerkes in der Zelle. Die sehr komplexen und vielfältigen Mechanismen der Aktin-Regulation sind von Pollard und Borisy in einer sehr übersichtlichen und verständlichen schematischen Darstellung zusammengefasst worden (Abb. 5) (Pollard und Borisy 2003).



**Abbildung 5: Tretmühlen-Modell der Aktinmaschinerie an der Bewegungsfront (leading edge) motiler Zellen (Pollard und Borisy 2003)**

Nur das Zusammenspiel verschiedener Aktin-assoziiierter Proteine ermöglicht einen koordinierten Auf-, Um- und Abbau des Aktin-Netzwerkes in der Zelle (nähere Erläuterungen zur Übersicht im Text).

Verschiedene Signale aus der Umgebung der Zelle können Rezeptoren in der Membran aktivieren (1), was unter anderem zu einem Anstieg an aktiven GTP-gebundenen GTPasen und einer erhöhten Konzentration an Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) führt (2). In einem nächsten Schritt können Proteine der WASP/Scar Familie durch die GTPase cdc42 und PIP<sub>2</sub> aktiviert werden (3). WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) erfüllt

zwei wichtige Funktionen. Zum einen verknüpft es zusammen mit VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) das Aktin-Netzwerk mit der Zellmembran und kann so einzelne Aktin-Strukturen lokal „fixieren“ (Yarar *et al.* 1999, Laurent *et al.* 1999, Rottner *et al.* 1999). Die zweite Aufgabe besteht in der Aktivierung des Arp2/3 Komplexes, der eine zentrale Rolle einnimmt. Die Bildung eines neuen Filamentes wird nun durch den aktiven Arp2/3 Komplex induziert (4) (Marchesky *et al.* 1999). In Lamellipodien führt Arp2/3 außerdem zu einer Verzweigung des Netzwerkes, da es sich seitlich an die Filamente anlagern kann und dann die Polymerisation neuer Filamente initiiert. Zusätzlich schirmt Arp2/3 das Minus-Ende des neu entstandenen Aktinstranges vor der Depolymerisierung ab (Mullins *et al.* 1998). Andere Proteine, wie z. B. CapZ verhindern durch ihr Binden an das Plus-Ende eine weitere Polymerisation (7). Sie stellen wichtige Regulatoren dar, die gezielt das Wachsen von Aktinfasern in bestimmten Bereichen unterbinden (Cooper und Schafer 2000). Proteine wie ADF/Cofilin und Gelsolin, die an das Minus-Ende der Aktinfilamente binden, tragen durch Fragmentierung und Depolymerisation zum Erhalt eines Reservoirs an ungebundenem Aktin bei (9) (Chen *et al.* 2000, Huang *et al.* 2005, Bamberg 1999). Das vom Minus-Ende abdissoziierte Aktin hat ein ADP gebunden. Für eine erneute Anlagerung an das Plus-Ende muss dieses gegen ATP ausgetauscht werden. Dieser Vorgang wird durch das Binden von Profilin beschleunigt (10).

Schon ein Blick auf die sehr vereinfachte Darstellung der verschiedenen Vorgänge in Abbildung 5 macht deutlich, wie komplex die gesamte Aktinmaschinerie aufgebaut ist. Eine genaue Kontrolle aller Schritte ist dabei unerlässlich. Ein wichtiges Instrument zur Regulation einzelner Komponenten ist die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung, über welche unter anderem die Aktivität von ADF/Cofilin modifiziert wird. Die Phosphorylierung, die zur Inaktivierung von Cofilin führt, kann durch die Kinasen LIMK (Lin-11, Isl-1, Me-3 Kinase) und TESK erfolgen (Soosairajah *et al.* 2005, Toshima *et al.* 2001a). Im folgenden Kapitel wird näher auf TESK1 eingegangen, da sie im Verlauf dieser Arbeit als Interaktionspartner der Kinase MARKK (siehe 3.2.1.3) identifiziert wurde.

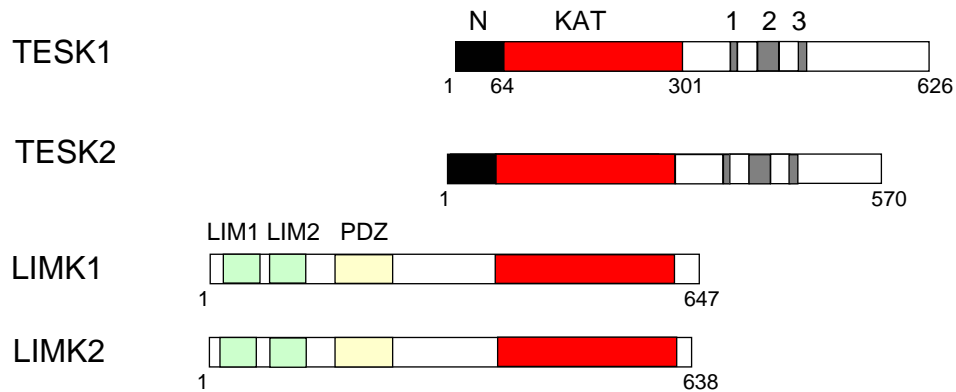
### **3.2.2.2 Die Aktin-regulierende Kinase TESK1**

Bei der Suche nach neuen, der LIMK ähnlichen Proteinkinasen, gelang es Toshima und Mitarbeitern 1995 eine bis dahin unbekannte Kinase zu identifizieren (Toshima *et al.*

1995). Die damals durchgeführten mRNA Expressionsanalysen ergaben eine starke und fast ausschließliche Expression im Testikelgewebe, was zum Namen der Kinase – TESK1 für Testikel-spezifische Proteinkinase 1 – führte. Mittlerweile hat sich allerdings gezeigt, dass die Expression von TESK1 keinesfalls so selektiv erfolgt, sondern dass die Kinase in vielen verschiedenen Zellen vorhanden ist (Toshima *et al.* 2001a). So ergaben Untersuchungen in transgenen Mäusen, bei denen das *lacZ*-Reportergen unter die Kontrolle des TESK1 Promotors gestellt worden war, nicht nur die Expression in den Testikeln, sondern auch in Niere, Herz und Gehirn (Toshima *et al.* 2001c). Eine Expression des Reportergens konnte dabei nicht nur in verschiedenen Neuronen (Körnerzellen, Pyramidenzellen, Neuronen in äußerer Kortexschicht) erwachsener Mäuse, sondern auch in Hirn und Rückenmark der Embryonen nachgewiesen werden. Zusammen mit den Erkenntnissen über das TESK-Homolog *cdi* (center divider) in *Drosophila melanogaster*, welches bei der embryonalen Entwicklung von Bedeutung ist, kann vermutet werden, dass TESK1 bei der neuronalen Differenzierung eine Rolle spielt (Matthews *et al.* 1999).

Neben TESK1 konnte eine weitere sehr ähnliche Kinase identifiziert werden, die als TESK2 bezeichnet wurde (Rosok *et al.* 1999, Toshima *et al.* 2001d). Zusammen mit LIMK1 und LIMK2 bilden sie die LISK-Familie (LIMK und TESK) innerhalb der Gruppe der Tyrosin-ähnlichen Kinasen TKL (tyrosine kinase like) (Manning *et al.* 2002). Die Verwandtschaft dieser sehr unterschiedlich strukturierten Kinasen beruht auf zwei Tatsachen. So ist die Ähnlichkeit von TESK1 innerhalb der katalytischen Domäne am stärksten mit LIMK1/2 und weist über 50 % Identität auf. Außerdem zeichnen sich LIMK und TESK durch ein besonderes Sequenzmotiv (DLTSKN bei TESK und DLNSHN bei LIMK) innerhalb der hoch konservierten Subdomäne VI-B der Kinasedomäne aus, welches sie von anderen Serin/Threonin Kinasen unterscheidet (Toshima *et al.* 1995).

Die Kinase TESK1 setzt sich aus einer kurzen aminoterminalen Kopfsequenz, an der sich die katalytische Domäne anschließt und der carboxyterminalen Domäne, die neben einem hohen Prolin-Anteil drei konservierte Bereiche aufweist, zusammen (Abb. 6, Sequenz Abb. 40).



**Abbildung 6: Domänenstruktur von TESK1 und TESK2 im Vergleich zu LIMK1 und LIMK2**

TESK setzt sich aus folgenden Domänen zusammen: aminoterminaler Kopfsequenz (N); katalytische Domäne (KAT), ein Prolin-reicher Carboxyterminus mit drei konservierten Regionen (1,2,3). TESK und LIMK sind verwandt, was auf die Ähnlichkeit innerhalb der katalytischen Domäne zurückzuführen ist. Die Sequenzen außerhalb dieser Domäne und die Gesamtstruktur der Kinasen sind allerdings sehr unterschiedlich. Die LIMK besitzt zwei LIM und eine PDZ Domäne im aminoterminalen Teil.

Die am besten untersuchte Funktion von TESK1 in der Zelle ist die Umorganisation des Aktin-Netzwerkes, was sich in einer verstärkten Ausbildung von Aktin-Stressfasern und Adhäsionspunkten (focal adhesion) äußert. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass TESK1 das Aktin-depolymerisierende Protein Cofilin (siehe 3.2.2.1) phosphoryliert und somit inaktiviert (Toshima *et al.* 2001a). Weiterhin ist bekannt, dass TESK1 eine Rolle bei der Zell-Ausbreitung und Anhaftung (cell spreading) spielt (LaLonde *et al.* 2005).

Die Aktivität von TESK1 kann durch Integrine stimuliert werden (Toshima *et al.* 2001a, Toshima *et al.* 2001b). Die Regulation der TESK1 ist, trotz vieler Einzelergebnisse, noch nicht im Detail geklärt. *In vitro* Aktivitätstests haben gezeigt, dass es sich bei TESK1 um eine Serin/Threonin Kinase handelt, die sich autophosphorylieren kann (Toshima *et al.* 1999). Die Autophosphorylierung findet in der Aktivierungsschleife statt, bei TESK1 am Serin 215 (Toshima *et al.* 1999, Hanks und Hunter 1995). Eine inaktive Kinase konnte durch die Mutation des für die Katalyse essentiellen Aspartat-Restes D170 in ein Alanin erzeugt werden. Eine Untersuchung der Aktivität verschiedener carboxyterminaler Deletionsmutanten von TESK2 ergab eine höhere katalytische Aktivität der Kinasedomäne ohne den C-Terminus. Somit kann ein autoinhibitorischer Mechanismus zur Regulation der Kinase vermutet werden (Toshima *et al.* 2001d). Ob dies allerdings auch für TESK1 zutrifft, ist unklar, da die C-terminalen Domänen beider Kinasen nur eine geringe Ähnlichkeit aufweisen (28 % Identität).

Zur weiteren Untersuchung der Regulation von TESK1 wurde die Beziehung zu den Rho GTPasen untersucht, welche die verwandte LIMK aktivieren können (Yang *et al.* 1998,

Maekawa *et al.* 1999). Bei der Koexpression von TESK1 WT mit jeweils aktiver RhoA (RhoV14), aktiver Rac (RacV12) oder aktiver cdc42 (cdc42V12) konnte jedoch keine Veränderung der TESK-Aktivität festgestellt werden (Toshima *et al.* 2001a). Auch eine Koexpression mit aktiver PAK3 (PAKAN) oder aktiver ROCK (ROCK $\Delta$ 3) hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von TESK1. Allerdings konnte eine Phosphorylierung von TESK1 durch PAK3 nachgewiesen werden, deren Funktion aber ungeklärt ist (Toshima *et al.* 2001a). Expressionsstudien mit TESK1 WT und einer inaktiven ROCK Mutante bzw. die Behandlung von TESK-transfizierten Zellen mit dem ROCK Inhibitor Y-27632 ergaben, dass die Ausbildung TESK-induzierter Aktin-Stressfasern gestört ist. Stattdessen akkumulierte Aktin an der Zellperipherie. Toshima und seine Mitarbeiter schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass die TESK1-induzierte Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts zwar unabhängig von Rho-GTPasen erfolgt, doch durch ROCK indirekt beeinflusst werden kann (Toshima *et al.* 2001a).

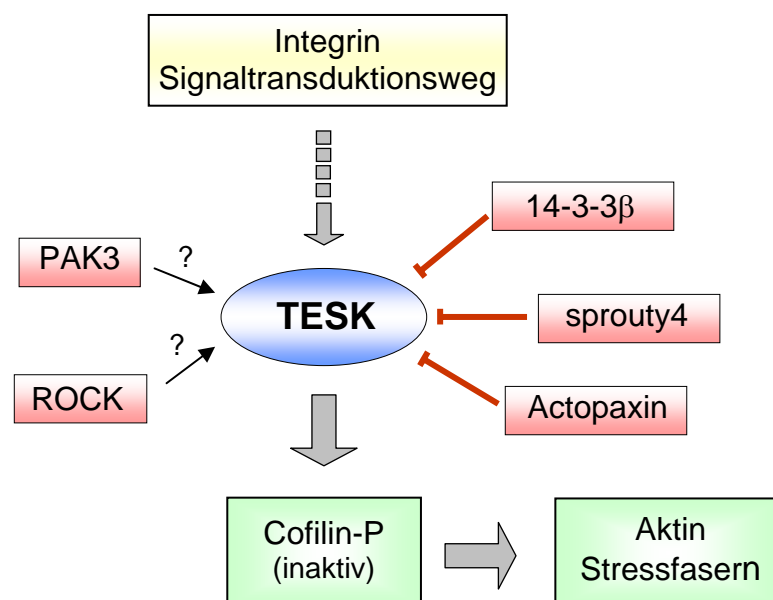
Alle bislang bekannten Bindungspartner wurden mittels Hefe Zwei-Hybrid System identifiziert und zeigten einen Einfluss auf die Aktivität von TESK1. Das kleine Brückenprotein 14-3-3, das eine Vielzahl unterschiedlichster Proteine bindet, ist für seine regulatorische Wirkung bekannt (Bridges und Moorhead 2004). Die Interaktion von 14-3-3 $\beta$  und TESK1 erfolgt über die dritte konservierte Region im C-Terminus (CR3) von TESK1 und ist abhängig von der Phosphorylierung des Serin 439. Die Bindung von 14-3-3 $\beta$  an TESK1 führt zu einer Verringerung der Kinaseaktivität und zu einer verstärkten Lokalisation von TESK an der Plasmamembran (Toshima *et al.* 2001b). Als weiterer Interaktionspartner von TESK1 konnte Actopaxin, ein Bestandteil des Zell-Adhäsionskomplexes, identifiziert werden (LaLonde *et al.* 2005). Es bindet an Aktin, Paxillin und ILK (integrin linked kinase) und spielt eine Rolle bei der Zellanheftung und Ausbildung von Adhäsionspunkten (Nikolopoulos und Turner 2000, Clarke *et al.* 2004). Auch die Bindung von Actopaxin hemmt die Aktivität von TESK1 und scheint im Zusammenhang mit der Funktion beider Proteine für die Zell-Ausdehnung und Anheftung (spreading) zu stehen (LaLonde *et al.* 2005).

Ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Kinaseaktivität der TESK1 übt der Interaktionspartner sprouty4 aus (Leeksa *et al.* 2002, Tsumura *et al.* 2004). Die vier Mitglieder der sprouty-Familie fungieren als Regulatoren des MAPK-Signaltransduktionsweges (siehe 3.3). Hierbei zeigen sie vor allem eine hemmende Wirkung, können aber auch zu einer Signalverstärkung beitragen und sind daher



wahrscheinlich für die Feinregulierung der Signalweiterleitung zuständig (Kim und Barsagi 2004, Christofori 2003). Expressionsstudien, die den funktionellen Zusammenhang beider Proteine klären sollten, haben gezeigt, dass sprouty4 die TESK-abhängige Umstrukturierung des Aktin-Netzwerkes und den positiven Einfluss auf Zell-Ausdehnung und Anhaftung verhindern kann (Tsumura *et al.* 2004). In *in vitro* Experimenten führte auch die Bindung von sprouty4 zu einer Inhibition der TESK-Aktivität (Tsumura *et al.* 2004). Die Übersicht in Abbildung 7 zeigt eine Zusammenfassung über die Funktion und Regulation der Aktin-beeinflussenden Kinase TESK1.

Die meisten Studien zur Funktion und Regulation von TESK1 beziehen sich auf dessen Rolle bei der Organisation des Aktin-Netzwerkes. Doch möglicherweise ist die Kinase auch für die Regulation des MT-Netzwerkes von Bedeutung, da sie in einem genetischen Screen als Verstärker der Tau-Toxizität identifiziert worden ist (Shulman und Feany 2003).



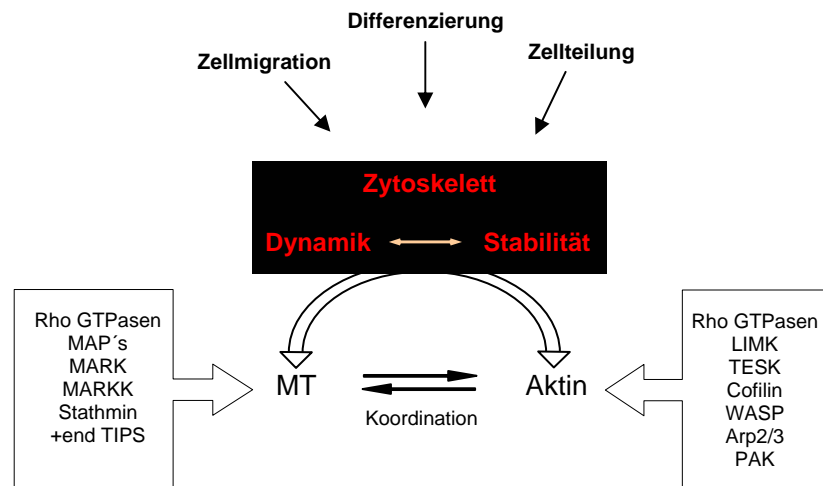
**Abbildung 7: Regulation von TESK1**

Die Kinase TESK1 kann durch die Stimulation von Integrinen aktiviert werden, was zu einer verstärkten Phosphorylierung von Cofilin führt. Diese Phosphorylierung am Serin3 führt zur Inaktivierung des Aktin depolymerisierenden Proteins. Es kommt zur vermehrten Ausbildung von Stressfasern in der Zelle. Die Interaktionspartner der TESK1, 14-3-3 $\beta$ , sprouty4 und Actopaxin sind alle in der Lage die Kinaseaktivität durch ihre Bindung zu hemmen. Welchen Einfluss PAK3 und ROCK ausüben, ist nicht geklärt.

### 3.2.3 Koordination von MT- und Aktin-Netzwerk

Für viele zelluläre Prozesse ist die Dynamik des Zytoskeletts unerlässlich. Vorgänge wie Migration, Zellteilung und Differenzierung/Polarisierung erfordern einen streng

kontrollierten und aufeinander abgestimmten Umbau aller Zytoskelett-Komponenten. Wie die Koordination zwischen Aktin und Mikrotubuli-Netzwerk im Detail funktioniert, ist noch nicht umfassend geklärt (Abb. 8).



#### Abbildung 8: Koordination von MT- und Aktin-Organisation

Prozesse wie Differenzierung, Zellteilung und Migration stellen eine Herausforderung für das Zytoskelett dar, da dramatische Veränderungen nötig sind. Diese erfordern eine erhöhte Dynamik der einzelnen Komponenten, die durch eine Vielzahl von regulatorischen Proteinen beeinflusst wird. Zusätzlich ist auch die Koordination zwischen den Zytoskelett-Komponenten wie Aktin und MT von entscheidender Bedeutung.

Vorhandene Daten lassen darauf schließen, dass die Rho GTPasen hierbei eine Schlüsselrolle einnehmen (Kaibuchi *et al.* 1999, Wittmann und Waterman-Storer 2001). Sie stellen Schalter dar, die die eingehenden Signale an ihre verschiedenen Effektoren selektiv weiterleiten. Gut untersucht sind die Signaltransduktionswege von RhoA, Rac und cdc42, welche gleichzeitig die Stabilität von Aktin und Mikrotubuli beeinflussen können (Raftopoulou und Hall 2004, Watanabe *et al.* 2005, Bishop und Hall 2000).

Eine weitere Schnittstelle zur Regulation des Aktin- und MT-Zytoskeletts konnte von Dr. Matenia und Mitarbeitern in unserem Labor charakterisiert werden. Hierbei handelt es sich um einen Signalübertragungsweg, der nicht über die Rho GTPasen läuft, sondern direkt durch die zwei Kinasen MARK2 und PAK5 vermittelt wird (Matenia *et al.* 2005). Wie der Name schon sagt, beeinflusst die MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase – MARK, die Bindung der Mikrotubuli assoziierten Proteine an Mikrotubuli und somit deren Stabilität (siehe 3.2.1.2). PAK5 hingegen ist bekannt für seine Wirkung auf das Aktin-Netzwerk (Dan *et al.* 2002, Bryan *et al.* 2004). Bei einer Überexpression der Kinasen in Zellen können antagonistische Effekte auf das Zytoskelett beobachtet werden. Während MARK2 zum Auflösen der MT führt und Aktin stabilisiert (Ausbildung von Stressfasern),

bewirkt PAK5 eine Stabilisierung der Mikrotubuli (Bündel) und gleichzeitig die Depolymerisation von Aktinfilamenten, sowie die Bildung von Filopodia (Matenia *et al.* 2005). Die Identifizierung von PAK5 als neuen Interaktionspartner von MARK2 in einem Hefe Zwei-Hybrid Screen war der Ausgangspunkt für genauere Untersuchungen. Durchgeführte *in vitro* Aktivitätstests ergaben, dass PAK5 die Aktivität von MARK2 hemmt, wogegen aber MARK2 nicht in der Lage ist die PAK5-Aktivität zu beeinflussen. Dies konnte auch bei Untersuchungen des Zytoskeletts in transfizierten Zellen bestätigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung nur über die Bindung beider Proteine und nicht durch eine Phosphorylierung vermittelt wird (Matenia *et al.* 2005). Dieser neue Weg der Wechselwirkung zwischen Aktin- und MT-Netzwerk lässt vermuten, dass die Koordination der Zytoskelett-Dynamik nicht nur über die viel beachteten Rho GTPasen stattfindet, sondern auf vielen verschiedenen Ebenen erfolgt.

### **3.3 Die MAPK-Signaltransduktionswege**

Die MAPK-Signaltransduktionswege nehmen eine zentrale Position bei der Verarbeitung und Weiterleitung vieler verschiedener Signale in der Zelle ein und sind daher in eine Vielzahl von Prozessen involviert. Hierzu gehören unter anderem die Differenzierung von Zellen und die Induktion von Proliferationsvorgängen, die auch an einen geordneten Umbau des Zytoskeletts gebunden sind. Es ist bekannt, dass die Mikrotubuli-regulierende Kinase MARKK/TAO1, die Ausgangspunkt dieser Arbeit ist, Komponenten dieser Signalübertragungswege aktivieren kann. Auch der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Interaktionspartner von MARKK, Spred1, ist ein Regulator der ERK/MAPK-Signalübertragungskaskade (siehe auch 3.3.1). Aus diesen Gründen sollen die wichtigsten Fakten über die MAPK-Signaltransduktionswege, welche Informationen mittels Proteinphosphorylierungen via Kinasen weiterleiten, in diesem Kapitel zusammengefasst werden.

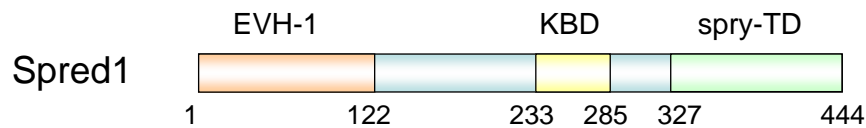
Diese hoch konservierten Signalübertragungswege bestehen im Kern aus drei Komponenten. Die Signalweiterleitung erfolgt von der Zelloberfläche über aktivierende Faktoren zu den MAPKKK (MAPK Kinase Kinase), von dort zu den MAPKK (MAPK Kinase) und führt letztendlich zur Aktivierung der MAPK (mitogen-activated protein kinase). Diese kann dann über Transkriptionsfaktoren die Transkription bestimmter Zielgene beeinflussen (Robinson und Cobb 1997). Es werden drei Hauptsignaltransduktionswege: ERK, p38 und JNK/SAPK, unterschieden, wobei die

Weiterleitung innerhalb eines Weges sehr selektiv ist, aber Wechselwirkungen (crosstalk) zwischen den verschiedenen Kaskaden möglich sind (Garrington und Johnson 1999). Eine strikte Regulation auf allen Ebenen ist notwendig und erfolgt unter anderem durch die Mitglieder der Spred/sprouty Familie (Torii *et al.* 2004).

### 3.3.1 Spred – ein Inhibitor des ERK/MAPK-Signaltransduktionsweges

Spred (sprouty related with EVH-1 domain) Proteine gehören zu einer neuen Proteinfamilie, deren Mitglieder den ERK-Signalübertragungsweg hemmen. Spred1 wurde in einem Hefe Zwei-Hybrid Screen über seine Interaktion mit den Rezeptor Tyrosin Kinasen c-Kit und c-Fms identifiziert (Wakioka *et al.* 2001). Die Aktivierung dieser Zelloberflächenrezeptoren geschieht durch Binden des jeweiligen spezifischen Liganden (c-Kit: stem cell factor - SCF; c-Fms: colony stimulating factor-1 - CSF) und führt in der Zelle zur Aktivierung des ERK-Signaltransduktionsweges (Scheijen und Griffin 2002). Neben Spred1 sind zwei weitere Mitglieder dieser Familie bekannt - Spred2 und Spred3, die ähnliche Funktionen erfüllen (Wakioka *et al.* 2001, Kato *et al.* 2003). Alle besitzen an ihrem Carboxyterminus die so genannte sprouty-Translokationsdomäne (spry-TD), welche reich an Cysteinen ist (Abb. 9, Sequenz siehe Abb. 41). Diese Domäne findet man auch bei den sprouty-Proteinen, welche ebenfalls den ERK/MARK-Signaltransduktionsweg regulieren (Sequenzvergleich siehe Abb. 42). Diese Region des Proteins ist nicht nur für die Lokalisierung an die Plasmamembran verantwortlich, sondern ist auch essentiell für die Ausbildung von Dimeren (Wakioka *et al.* 2001, King *et al.* 2005). Weiterhin ist bekannt, dass über diesen Bereich die Interaktion zu Ras und Raf stattfindet, welche Aktivatoren des ERK-Signalübertragungsweges sind. Inwieweit die spry-TD essentiell für die Wirkungsweise von Spred1 ist, wird unterschiedlich diskutiert (Wakioka *et al.* 2001, King *et al.* 2005). Am aminoterminalen Ende der Spreds befindet sich eine EVH-1 (Ena/Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) homology-1) Domäne. Proteine mit einer EVH-1 Domäne, wie VASP, Mena und N-WASP regulieren die Aktinfilament-Polymerisation, indem sie über Prolin-reiche Sequenzabschnitte mit Proteinen wie Profilin und Zyxin interagieren (Ball *et al.* 2002, Renfranz und Becherle 2002). Die Funktion der EVH-1 Domäne in den Spred-Proteinen oder Bindungspartner sind bislang nicht bekannt (Harmer *et al.* 2005). Zwischen EVH-1 und spry-TD besitzen Spred1 und Spred2 zusätzlich eine c-Kit Bindungsdomäne (KBD) (Wakioka *et al.* 2001, Kato *et al.* 2003). In der Literatur gibt es unterschiedliche Aussagen dazu, wann und in welchem Ausmaß

Spred1 und Spred2 dort an einem Tyrosinrest (Tyr 258 in humanem Spred1) phosphoryliert werden (Kato *et al.* 2003, King *et al.* 2005, Nonami *et al.* 2004).



#### Abbildung 9: Domänenstruktur von Spred1

Am Aminoterminus von Spred1 befindet sich eine EVH-1 Domäne (Ena/Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) homology-1). Die sprouty-Translokationsdomäne (spry-TD) umfasst die letzten 117 Aminosäuren am Carboxyterminus. Dazwischen liegt die c-Kit Bindungsdomäne (KBD).

Ähnlich wie die verwandten Mitglieder der sprouty-Familie beeinflussen Spreds die ERK-Signaltransduktionskaskade. Es konnte gezeigt werden, dass Spred mit Ras interagiert und dessen Aktivierung verhindert, das heißt, die Bildung von GTP-Ras unterbindet (King *et al.* 2005). Somit ist Ras nicht mehr in der Lage sein Substrat c-Raf zu aktivieren. Auch Raf kann von Spred gebunden werden, so dass die Bildung eines Komplexes Ras – Raf – Spred wahrscheinlich ist, wobei der Signalfloss zwischen Ras und Raf durch Spred gestört wird (Wakioka *et al.* 2001, Kato *et al.* 2003, King *et al.* 2005). Weiterhin konnte Spred mit der Zellmigration und der Organisation des Aktin-Zytoskeletts in Verbindung gebracht werden (Miyoshi *et al.* 2004). So führt die Überexpression von Spred1 in NIH3T3 Zellen zu einer Abnahme an Aktin-Stressfasern. Dies wurde durch die Interaktion von Spred mit aktivem RhoA erklärt, welche wiederum eine Unterbrechung in der Signalweiterleitung zur Folge hat. Die RhoA Kinase ROCK kann nicht mehr aktiviert werden (Miyoshi *et al.* 2004). Das Expressionsmuster von Spred1-3 ist unterschiedlich. Während Spred1 und Spred3 fast ausschließlich im Gehirn vorkommen, ist Spred2 in fast allen Geweben vorhanden (Kato *et al.* 2003, Bundschu *et al.* 2005, Engelhardt *et al.* 2004).

### 3.4 Zielsetzung der Arbeit

In Gehirnen von Alzheimer Patienten findet man neben extrazellulären Amyloid-Plaques hyperphosphoryliertes Tau, welches zu paarigen helikalen Filamenten aggregiert ist. Der Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins wird unter anderem durch die Kinasen der MARK-Familie reguliert, welche durch die vorgeschaltete Kinase MARKK aktiviert

werden (Timm *et al.* 2006). Die über diesen Signaltransduktionsweg (MARKK → MARK → Tau) erzielte Phosphorylierung von Tau führt zum Ablösen des Tau-Proteins von den Mikrotubuli und somit zu einer Destabilisierung des gesamten MT-Netzwerkes. Die Aktivität beider Kinasen muss somit streng reguliert werden, da es ansonsten, wie bei der Alzheimer Krankheit, zum Absterben der Zelle kommen kann.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Interaktionspartner der MARKK, um Erkenntnisse über deren Regulation zu erlangen. Zu diesem Zweck wurde ein Hefe Zwei-Hybrid Screen mit MARKKs carboxyterminaler Domäne durchgeführt, in dessen Verlauf das Regulatorprotein Spred1 als neuer Bindungspartner ermittelt werden konnte. Mittels verschiedener biochemischer und zellbiologischer Methoden sollte die neu identifizierte Interaktion mit MARKK näher charakterisiert werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit einer weiteren Kinase –TESK1. Diese ist vor allem für ihre Wirkung auf das Aktin-Zytoskelett bekannt. Auch ein Einfluss auf das Mikrotubuli-Netzwerk über das Tau-Protein wird angenommen (Shulman und Feany 2003).

Eine Interaktion von TESH1 und dem MARKK-Bindungspartner Spred1 konnte vermutet werden, da eine Wechselwirkung zwischen TESH1 und sprouty4 bekannt war (Tsumura *et al.* 2004). Spred1 und sprouty4 gehören zu verwandten Proteinfamilien, welche den MAPK-Signalübertragungsweg beeinflussen. In Hefe Zwei-Hybrid Tests und zellbiologischen Experimenten sollte eine solche Interaktion überprüft werden.

Aus den gewonnenen Ergebnissen der ersten beiden Teile ergab sich die Frage nach einer direkten Interaktion zwischen der Mikrotubuli-regulierenden Kinase MARKK und der Aktin-regulierenden Kinase TESH1. Da eine solche Wechselwirkung in direkten Hefe Zwei-Hybrid Bindungsstudien nachgewiesen werden konnte, sollte anschließend über verschiedene biochemische und zellbiologische Methoden geklärt werden, inwieweit sich beide Kinasen in ihrer Aktivität beeinflussen können.

## 4. Material

### 4.1 Bezugsquellen

#### 4.1.1 Chemikalien:

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in analysenreiner Qualität von Amersham Bioscience, Bio-Rad, Calbiochem, Difco, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Qiagen, Roche, Roth und Sigma bezogen.

#### 4.1.2 Enzyme

alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs
Quick Ligase	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Klenow Fragment	New England Biolabs
PWO DNA-Polymerase	ROCHE

#### 4.1.3 Antikörper

##### primäre Antikörper

Penta-His™; Tetra-His™	QIAGEN
c-Myc (9E10)	Santa Cruz
HA-tag polyklonaler Antikörper	Clontech
HA-tag monoklonaler Antikörper	Cell Signaling
HA-probe (F-7)	Santa Cruz
GST – Antikörper	Zymed Laboratories
TAO-1 (anti-MARKK)	BD Bioscience
Cofilin	Cytoskeleton
14-3-3 β (K-19)	Santa Cruz
YL1/2 (anti α-Tubulin)	Serotec
DM1α (anti α-Tubulin)	Sigma

$\gamma$ -Tubulin	Sigma
$\beta$ -Aktin	Sigma
$\gamma$ -Adaptin	Sigma
$\beta_1$ und $\beta_2$ -Adaptin	Sigma
Vimentin (clone V9)	Sigma
12E8 (anti Phospho-Tau)	Gabe von Dr. P. Seubert, Elan Pharmaceuticals

#### sekundäre Antikörper

anti-Ratte IgG, aus Kaninchen, HRP gekoppelt	DAKOCytomation
anti-Maus IgG, aus Ziege, HRP gekoppelt	DAKOCytomation
anti-Kaninchen IgG, aus Ziege, HRP gekoppelt	DAKOCytomation
anti-Maus IgG, aus Ziege, Cy5 gekoppelt	Immunoresearch
anti-Kaninchen IgG, aus Ziege, TRITC gekoppelt	Immunoresearch
anti-Ratte IgG, aus Ziege, Cy5 gekoppelt	Immunoresearch

#### Fluoreszenz-gekoppelte Farbstoffe

LysoTracker <sup>®</sup> Red DND-99 (Lysosomen)	Molecular Probes <sup>™</sup>
MitoFluor <sup>™</sup> Red 589	Molecular Probes <sup>™</sup>

### **4.1.4 Molekulargewichtsmarker**

#### **Proteinmarker**

##### Protein Molecular Weight Marker ( MBI Fermentas)

- $\beta$ -Galaktosidase (116 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Laktat – Dehydrogenase (35 kDa), Restriktionsendonuklease Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -Laktoglobulin (18,4 kDa), Lysozym (14,4 kDa)

##### Magic Mark ( Invitrogen)

- Größen (kDa): 120, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20



**DNA-Marker**Smart Ladder (MBI Fermentas)

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

**4.1.5 Vom Hersteller bezogene Chemikalien-Zusammensetzungen (Kits):**

BD BaculoGold™ Transfection Kit	BD Biosciences
ECL plus Western Blotting Detection Kit	Amersham Bioscience
Nucleobond PC100 Midi Kit	Macherey - Nagel
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	Invitex
Gel Extraction Kit (Ultra Clean™15)	Mo Bio Laboratories
Quick Change™ Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Effectene Transfection Reagenz	Qiagen

**4.2 Geräte:**

Brutschrank (water jacketed incubator)	Forma Scientific
Heizblock (TCR 100)	Roth
Luminescent Image Analyser	Fuji
Gelkammer horizontal	BIO-RAD
Sterilbank (HeraSafe)	HERAEUS
pH-Meter (Qph70)	Merck
Schüttler (innova 4230)	New Brunswick Scientific
Spektralphotometer	Eppendorf
Thermocycler (Mastercycler gradient)	Eppendorf
Blottingkammer (Semi-dry)	VWR
Vortex (Genie2)	Scientific Industries
Waage	Roth
Tischzentrifuge (pico)	HERAEUS
Kühlzentrifuge (5810 R)	Eppendorf
Wasserbad	GFL
Elektroporator	BTX
SDS Gelelektrophorese – Kammer	Amersham Bioscience

Mikroskop (CK2)	Olympus
konfokales Fluoreszenzmikroskop (LSM 510 Meta)	Zeiss
Phospho-Imager (BAS 3000)	Fuji
Szintillationszähler (Tricarb 1900 CA)	Packard Canberra Ltd
DNA-Sequenzierungsgerät (ABI Prism 310)	Perkin Elmer
French Press (Pressure Cell 20 kpsi)	SLM Aminco

### 4.3 Software

AIDA Biopackage	Raytest
LSM 5 Image Processing Software	Zeiss
VECTOR NTI	InfoMax & Invitrogen

### 4.4 Medien und Zusätze

#### 4.4.1 Bakterienmedien

##### LB-Medium

25 g/l LB Broth

##### SOC-Medium

20 g/l Bacto Trypton  
 5 g/l Hefe-Extrakt  
 10 mM NaCl  
 10 mM KCl  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM MgSO<sub>4</sub>  
 ad 980 ml H<sub>2</sub>O  
 nach dem Autoklavieren  
 20 ml Glucose (1M)

##### LB-Agar

25 g/l LB Broth  
 25 g/l Bacto-Agar

##### Ampicillin

100 mg/ml  
 (steril filtrieren in H<sub>2</sub>O)

##### Kanamycin

100 mg/ml  
 (steril filtrieren in H<sub>2</sub>O)

Die Medien wurden bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, in das kalte Medium (Endkonzentration von 100µg/ml).

#### 4.4.2 Hefemedien

##### Selektionsmedium

8 g/l Hefe-Stickstoffbasis ohne AS  
 55 mg/l Tyrosin  
 55 mg/l Uracil  
 55 mg/l Adenin  
 nach dem Autoklavieren auf 60°C  
 abkühlen lassen, dann Zugabe von:  
 10 ml/l 100 × AS-Dropout Lösung  
 100 ml/l 20% Glucose-Lösung

##### Aminosäure-Dropout-Lösung

(100 × Stock)

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

lösen in 100 ml Aqua bidest., steril filtrieren,  
 Lagerung bei 4°C, die im jeweiligen  
 Dropout nicht benötigten Aminosäuren  
 wurden weggelassen

##### 20% Glucose

200g Glucose in 1 l Aqua bidest. lösen und  
 autoklavieren

##### Vollmedium (YEPD)

11 g/l Hefe-Extrakt  
 22 g/l Bacto Pepton  
 55 mg/l Adenin  
 nach dem Autoklavieren  
 100 ml/l 20% Glucose-Lösung

##### Selektionsmedium-Agar

25 g/l Bacto Agar  
 in Selektionsmedium ansetzen

##### Vollmedium-Agar

25 g/l Bacto Agar  
 in Vollmedium ansetzen

#### 4.4.3 Zellkulturmedien

##### CHO Zellen Medium

F12 (HAM) Medium (GIBCO)	
FKS	100 ml/l
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml)	10 ml/l

##### CHO ht40 Medium

F12 (HAM) Medium (GIBCO)	
FKS	100 ml/l
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml)	10 ml/l
G418 (synthetisches Gentamycin)	600 µg/ml

##### HEK-293/COS/VERO Zellen Medium

Dulbecco's modif. Eagle Medium (GIBCO)	
FKS	100 ml/l
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml)	10 ml/l
L-Glutamin (200 mM)	10 ml/l

<u>Sf9-Zellen Medium</u>	Grace's Insekten Medium (GIBCO)	
	FKS	100 ml/l
	Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml)	10 ml/l
<u>PC12-Zellen Medium</u>	Kulturmedium:	
	Dulbecco's modif. Eagle Medium (GIBCO)	
	HS	150 ml/l
	FKS	50 ml/l
	Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml)	10 ml/l
	Differenzierungsmedium:	
	DMEM:F12 1:1 (GIBCO)	
	HS:FKS 1:1	1 ml/l
	NGF (10 µg/ml)	10ml/l

## 4.5 Puffer und Lösungen

### 50 × TAE

2 M Tris X  
50 mM EDTA  
57,1 ml/l Essigsäure  
auf pH 8 einstellen

### 10 × TBS-T

1,5 M NaCl  
100 mM Tris X  
5 ml/l Tween20  
auf pH 7,2 einstellen

### Ammoniumpersulfat (APS)

10 % (w/v) APS in Aqua bidest. lösen  
Lagerung -20°C

### DTT-Lösung

1 M DTT in 0,01 M Na-Acetat lösen  
Lagerung -20°C

### 2 × BES Puffer

50 mM BES  
280 mM NaCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
auf pH 6,9 einstellen  
steril filtrieren, Lagerung -20°C

### 10 x SDS Puffer

250 mM Tris X  
1,9 M Glycin  
1 % (w/v) SDS

### Blocking Puffer

5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T

### 10 x Blotting Puffer

0,48 M Tris X  
0,39 M Glycin  
0,3 % (w/v) SDS

### Calciumchlorid-Lösung

2,5 M Calciumchlorid  
steril filtrieren

### 1 × Blotting Puffer

10 % 10 x Blotting Puffer  
5 % Methanol

5 × Kinase Puffer

250 mM TrisHCl pH 7,3  
 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM EGTA  
 5 mM DTT  
 5 mM Benzamidin  
 2,5 mM PMSF

10 × Lithium Acetat (LiAc)

1 M LiAc  
 auf pH 7,5 einstellen und  
 autoklavieren

Coomassie-Färbelösung

0,1 % (w/v) Coomassie Blau R-250  
 50 % Methanol  
 7,5 % Essigsäure

Coomassie Entfärber (Intensiv)

50 % Methanol  
 10 % Eisessig

Coomassie Entfärber (Normal)

5 % Methanol  
 7,5 % Eisessig

5 × DNA-Probenpuffer

9 mM Tris pH 7,4  
 0,45 mM EDTA  
 46 % (v/v) Glycerol  
 0,005 % (w/v) Bromphenolblau

TB

10 mM Pipes  
 15 mM CaCl<sub>2</sub>  
 250 mM KCl  
 mit KOH auf pH 6,7 einstellen  
 dann Zugabe von 55 mM MnCl<sub>2</sub>  
 steril filtrieren

100 × TE

1 M Tris HCl  
 100 mM EDTA  
 auf pH 8 einstellen und autoklavieren

2 × Protein Probenpuffer

160 mM Tris pH 6,8  
 10 % (w/v) SDS  
 20 % (v/v) Glycerol  
 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

5 × Protein Probenpuffer

50 mM Tris pH 6,8  
 12,5 % (w/v) SDS  
 20 % (v/v) Glycerol  
 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
 0,025 % (w/v) Bromphenolblau

45 % PEG

45 % (w/v) PEG (4000)  
 in Aqua bidest. lösen und steril filtrieren

Plate Mixture

45 % PEG 4000  
 0,1 M Lithiumacetat  
 10 mM Tris pH 7,4  
 1 mM EDTA

RIPA Puffer

50 mM Tris pH 7,2  
 150 mM NaCl  
 2 mM Na-O-Vanadat  
 25 mM β-Glycerophosphat  
 10 mM Na-Pyrophosphat  
 0,5% (w/v) Desoxycholat  
 1 % (v/v) Triton X-100  
 0,1 % (w/v) SDS  
 auf pH 7,2 einstellen  
 vor Gebrauch je 10 ml 1 Tablette Protease  
 Inhibitoren Cocktail lösen

X-Gal Stock Lösung

2 mg/ml X-Gal in DMF lösen

LiAc/TE-Mix

400 µl 100 × TE  
 4 ml 10 × LiAc  
 35,6 ml Aqua bidest.

<u>STET-Puffer</u>		<u>PEG/LiAc-Mix</u>	
8% (w/v)	Saccharose	56 ml	PEG (45%)
50 mM	EDTA	7 ml	LiAc (10 ×)
50 mM	Tris HCl pH 8	750 µl	TE (100 ×)
5% (v/v)	Triton X-100	6,25 ml	Aqua bidest.

## 4.6 Bakterien- und Hefenstämmen, Viren und Zelllinien

### 4.6.1 Bakterienstämmen

Für die durchgeführten Transformationen zur Plasmidanreicherung diente der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  mit dem Genotyp:

*F,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$  (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA supE44  $\lambda$  thi-1 gyrA96 relA1.*

Nach einer Mutagenese erfolgte die Transformation in XL-1 Blue Zellen (Stratagene) mit dem Genotyp:

*recA1 endA1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)].*

Für die Proteinexpression wurden Bakterien des Stammes *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup> (Invitrogen) mit folgendem Genotyp:

*F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA* verwendet.

### 4.6.2 Hefenstamm

Für alle durchgeführten Experimente wurden Hefen des Stammes AH109 (Clontech) mit folgendem Genotyp verwendet:

*MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his 3-200 gal4 $\Delta$  gal80 $\Delta$  LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-His3 GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2 URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ.*

### 4.6.3 Baculovirus

Für die Infektion der Insektenzellen (Sf9) zur Proteinexpression wurde das *Autographa californica* Multiple Polyhedrosis Virus (AcNPV) verwendet. Durch Co-Transformation der Baculovirus DNA (Orbigen) und eines Baculovirus-Transfervektors, der das gewünschte Gen enthielt, wurden rekombinante Viren erzeugt. Diese waren in der Lage,

anstelle des viralen Polyhedrinproteins, das gewünschte rekombinante Protein zu exprimieren.

#### 4.6.4 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Organismus	Spezifikation
<b>HEK 293</b>	<i>Homo sapiens</i>	embryonale Nierenzellen
<b>COS</b>	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Fibroblasten aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze
<b>CHO</b>	<i>Cricetulus griseus</i>	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster
<b>CHO htau40</b>	<i>Cricetulus griseus</i>	CHO Zellen, die stabil mit der längsten humanen Tau-Isoform (htau40) transfiziert sind; Quelle: MPASMB
<b>VERO</b>	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Fibroblasten aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze
<b>PC12</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	Zellen eines Nebennierentumors
<b>Sf9</b>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Zellen aus den Ovarien der Larven

#### 4.7 Vektoren

Bezeichnung	Charakterisierung	Anwendung	Quelle
pGBKT7	7,3 kb, Kana <sup>R</sup> , Tryptophan Selektionsmarker, Gal4-DNA-Bindedomäne vor MCS	Interaktionsuntersuchungen im Hefe-Zwei-Hybrid System	Clontech
pGADT7	8,0 kb, Amp <sup>R</sup> , Leucin Selektionsmarker, Gal4-Aktivierungsdomäne vor MCS	Interaktionsuntersuchungen im Hefe-Zwei-Hybrid System	Clontech
pACT2	8,1 kb, Amp <sup>R</sup> , Leucin Selektionsmarker, Gal4-Aktivierungsdomäne vor MCS	Interaktionsuntersuchungen im Hefe-Zwei-Hybrid System, Träger der cDNA-Bibliothek	Clontech
pEU_myc / pEU_HA	5,5 kb, Amp <sup>R</sup> , am N-Terminus myc bzw. HA-Tag	Expressionsvektor für Säugetierzellen	MPASMB
pVL1392	9,6 kb, Amp <sup>R</sup> , am N-Terminus His-Tag, MCS modifiziert	Baculovirus-Transfervektor	MPASMB
pEYFP-C1	4,7 kb, Kana <sup>R</sup> , YFP als N-terminales Fusionsprotein	Expressionsvektor für Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	Clontech
pECFP-C1	4,7 kb, Kana <sup>R</sup> , CFP als N-terminales Fusionsprotein	Expressionsvektor für Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	Clontech

pShuttleCMV /mRFP1	8 kb, Kana <sup>R</sup> , mRFP als N-terminales Fusionsprotein	Expressionsvektor für Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	MPASMB
pGEX 3X	4,9 kb, Amp <sup>R</sup> , am N-Terminus mit GST-Fusionsprotein	Expressionsvektor für <i>E. coli</i>	Amersham Bioscience
pCR <sup>®</sup> -BluntII-TOPO	3,5 kb, Kana <sup>R</sup>	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i>	Invitrogen

## 4.8 Hergestellte und bestehende Konstrukte

### Eukaryotische Expressionskonstrukte

#### ▪ *Spred1\_pEUmyc*

Das vollständige Spred1 WT Gen wurde mittels PCR in zwei Teilen aus der verwendeten cDNA-Bank isoliert und in den pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO Vektor kloniert. Die Amplifikation wurde mit folgenden Primern durchgeführt: Spred N-Terminus SP 1/ SP 6 und Spred C-Terminus SP 5/ SP 9. Die Subklonierung des vollständigen Spred1 in den pEUmyc Vektor erfolgte über die Schnittstellen NdeI/XhoI (N-Terminus), XhoI/NheI (C-Terminus) und NdeI/NheI (pEUmyc).

#### ▪ *Spred1\_pEYFP-C1*

Für die Klonierung in den Fluoreszenzvektor wurde Spred1 mittels PCR und den Primern SP10/SP2 amplifiziert und anschließend mit SalI und NheI geschnitten. Die NheI Schnittstelle wurde mit Klenow Polymerase aufgefüllt. Die Ligation erfolgte in den pEYFP-C1, der über XhoI und SmaI geöffnet worden war.

#### ▪ *Spred1\_pECFP-C1*

Durchführung siehe Spred1-pEYFP-C1

#### ▪ *Spred1\_pVL*

Die Klonierung erfolgte aus Spred1\_pEUmyc über die NdeI und NheI Schnittstellen.

#### ▪ *TESK1 WT\_pVL*

TESK1 WT wurde aus TESK1 WT\_pECFP-C1 mit NdeI und SalI isoliert, wobei die SalI Schnittstelle mit Klenow Polymerase aufgefüllt wurde. Der pVL Vektor wurde mit NdeI und NheI (Schnittstelle mit Klenow Polymerase aufgefüllt) geöffnet.

#### ▪ *TESK1 WT\_pShuttleCMV/mRFP1*

Die TESK1 WT wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer TESK\_F\_Xho\_For und TESK\_F\_Nhe\_Rev aus TESK1 WT\_pECFP-C1 amplifiziert. Die Klonierung erfolgte über die eingefügten XhoI und NheI Schnittstellen.

#### ▪ *TESK1 D170A\_pECFP-C1*

Die dominant negative Mutante wurde mit Hilfe des Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) unter Verwendung der Primer TESK\_D170A\_For und TESK\_D170A\_Rev hergestellt.

#### ▪ *TESK1 D170A\_pVL*

TESK1 D170A wurde aus TESK1 D170A\_pECFP-C1 mit NdeI und BamHI isoliert und in den pVL Vektor subkloniert.

#### ▪ *TESK1 ΔC\_pVL*

Der TESK1 N-Terminus wurde aus TESK1 ΔC\_pGADT7 über NdeI und BamHI in den pVL Vektor subkloniert.

#### ▪ *TESK1 ΔN\_pVL*

Der TESK1 C-Terminus wurde aus TESK1 ΔN\_pGADT7 über NdeI und BamHI in den pVL Vektor subkloniert.



## Hefe Expressionskonstrukte

- *Spred1\_pGBKT7*

Für die Klonierung in den Hefektor wurde Spred1 über die NdeI und NheI (mit Klenow Polymerase aufgefüllt) Schnittstelle aus Spred1\_pEU\_myc geschnitten und mit dem NdeI/SmaI verdautem pGBKT7 ligiert.

- *Spred1\_pGADT7*

Die Klonierung erfolgte über die Schnittstellen NdeI und BamHI aus Spred1\_pGBKT7.

- *Spred1 $\Delta$ C\_pGADT7*

Der N-Terminus von Spred1 wurde über NdeI/XhoI aus dem Spred1 N-Terminus\_pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO in den pGADT7 umklont.

- *Spred1 $\Delta$ N\_pACT2*

Isolierter Klon aus dem Hefe Zwei-Hybrid cDNA-Bank Screen.

- *Spred1 spyTD\_pGADT7*

Die C-terminale Domäne von Spred1 wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer SP12 und SP13 aus Spred1\_pEUMyc amplifiziert. Die Klonierung erfolgte über die BamHI und EcoRI Schnittstellen.

- *Spred1 spyTD\_pGBKT7*

Durchführung siehe Spred1 spy TD\_pGBKT7

- *TESK1WT\_pGADT7*

Die Klonierung erfolgte aus TESK1 WT\_pVL über NdeI und BamHI.

- *TESK1WT\_pGBKT7*

Die Klonierung erfolgte aus TESK1 WT\_pVL über NdeI und BamHI.

- *TESK1  $\Delta$ C\_pGADT7*

Die N-terminale Domäne von TESK1 wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer TESK\_N\_Nde\_For und TESK\_N\_Bam\_Rev aus TESK1 WT\_pECFP-C1 amplifiziert. Die Klonierung erfolgte über die eingefügten BamHI und NdeI Schnittstellen.

- *TESK1  $\Delta$ C\_pGBKT7*

Durchführung siehe TESK1 $\Delta$ C\_pGADT7

- *TESK1  $\Delta$ N\_pGADT7*

Die C-terminale Domäne von TESK1 wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer TESK\_C\_Nde\_For und TESK\_C\_Bam\_Rev aus TESK1 WT\_pECFP-C1 amplifiziert. Die Klonierung erfolgte über die eingefügten BamHI und NdeI Schnittstellen.

- *TESK1  $\Delta$ N\_pGBKT7*

Durchführung siehe TESK1 $\Delta$ N\_pGADT7

- *MARKK C-term (AS 432-900)\_pGBKT7*

Die Subklonierung erfolgte aus MARKK C-term (AS 432-900)\_pEYFP (Quelle: MPASMB) über NdeI und BamHI.

- *MARKK C-term (AS 432-900)\_pGADT7*

Durchführung siehe MARKK C-term (AS 432-900)\_pGBKT7

- *MARKK C-term (AS 432-700)\_pGBKT7*

Die Subklonierung erfolgte aus MARKK C-term (AS 432-700)\_pEYFP (Quelle: MPASMB) über NdeI und BamHI.

- *MARKK C-term (AS 432-700)\_pGADT7*

Durchführung siehe MARKK C-term (AS 432-700)\_pGBKT7

- *MARKK C-term (AS 701-900)\_pGBKT7*

Die Subklonierung erfolgte aus MARKK C-term (AS 701-900)\_pEYFP (Quelle: MPASMB) über NdeI und BamHI.

- *MARKK C-term (AS 701-900)\_pGADT7*

Durchführung siehe MARKK C-term (AS 701-900)\_pGBKT7

## E. coli Expressionskonstrukte

- *Spred1\_pGEX 3X*

Für die Klonierung in den GST-Fusionsvektor wurde Spred1 mittels PCR und den Primern SP15/SP16 amplifiziert und anschließend mit BamHI und EcoRI geschnitten.

Es wurden folgende bestehende Konstrukte verwendet:

- TESK1 WT\_pECFP-C1
- MARKK K57A\_pGADT7
- MARKK K57A\_pGBDT7
- MARKK WT\_pEYFP-C1
- MARK2 WT\_pECFP-C1
- Cofilin WT\_pVL
- MARKK C-term (AS 432-1001)\_pGBKT7
- MARKK C-term (AS 432-1001)\_pGADT7
- MARKK N-term (AS 1-295)\_pGADT7
- MARKK N-term K57A (AS 1-295)\_pGADT7
- MARK2 T208E\_pECFP-C1

## 4.9 Hergestellte und bestehende Baculoviren

Es wurden Baculoviren verwendet, die für folgende Proteine kodieren:

▪ generierte Baculoviren:	▪ bestehende Baculoviren:
- TESK WT _ His	- MARKK WT _ His
- TESK D170A _ His	- MARKK N-term _ His
- TESK ΔC _ His	
- TESK ΔN _ His	
- Cofilin _ His	

## 4.10 cDNA-Bibliothek

Die Ausgangs- cDNA-Bibliothek (Human fetal brain Matchmaker<sup>TM</sup> cDNA library) wurde von der Firma BD Bioscience Clontech bezogen. Die Poly(dT) gepimten cDNAs aus fötalen menschlichen Gehirn sind hinter die Gal4-Aktivierungsdomäne in dem Zwei-Hybrid Vektor pACT2 kloniert. Die cDNA-Bibliothek umfasst  $3,5 \times 10^6$  unabhängige Klone mit Längen zwischen 500-4000 bp.

## 5. Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 DNA Amplifikation mittels PCR

Zur funktionellen Untersuchung von Genen oder Genfragmenten ist es notwendig, diese in geeignete Expressionsvektoren zu klonieren. Meist ist eine selektive Amplifikation der jeweiligen DNA zum Beispiel aus einer cDNA-Bibliothek der erste Arbeitsschritt. Dies geschieht mittels Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Diese Methode macht sich die Eigenschaft von Doppelsträngiger-DNA zu Nutze, sich bei hohen Temperaturen in ihre Einzelstränge aufzutrennen. Durch die Verwendung von einer hitzestabilen Polymerase und selektiven, komplementären Primern kann die DNA verdoppelt werden. Bei mehrfacher Wiederholung steigt die Anzahl der Kopien und somit die DNA-Menge exponentiell an.

Die vorgenommenen PCRs wurden wie folgt durchgeführt:

#### Ansatz:

50-200 ng DNA  
 1 µl Primer forward (10pmol/µl)  
 1µl Primer reverse (10pmol/µl)  
 ad 12,5 µl mit Aqua bidest.  
 12,5 µl PWO Master Mix (Roche)

#### Programm:

2 min bei 95°C	} 20-30 Zyklen
30 sec bei 95°C	
30 min bei X°C	
90 min bei 72°C	
10 min bei 72°C	
Kühlen bei 4°C	X – je nach Primerpaar

#### 5.1.2 Erstellung von Punktmutationen

Für die Erzeugung von Punktmutationen wurde der QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Hierzu wurden Primer generiert, die homolog zu der mutierenden DNA-Sequenz sind, aber zusätzlich eine oder mehrere gewünschte Punktmutationen trugen. Mittels PCR wurde die Mutation in das Ausgangsplasmid inseriert. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

### 5.1.3 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an jeweils spezifischen Sequenzen und erzeugen dabei entweder stumpfe (blunt ends) oder überhängende (sticky ends) Enden. Für einen analytischen Verdau wurden 0,1-0,5 µg DNA im empfohlenen Puffer mit 2-10 Units Enzym für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Ein präparativer Ansatz wurde unter den gleichen Bedingungen allerdings mit 1-3 µg DNA durchgeführt. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von DNA-Probenpuffer oder 15-minütige Inkubation bei 65°C.

### 5.1.4 Dephosphorylierung von geschnittener Vektor-DNA

Um die Möglichkeit einer Religation eines geschnittenen Vektors ohne die gewünschte Insert-DNA zu verringern und somit die Klonierungseffizienz zu steigern, wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert. Die verwendete Phosphatase (CIP, calf intestine alkaline phosphatase) entfernt die freie 5'-Phosphatgruppe. Direkt nach dem Restriktionsverdau (5.1.3) wurde die geschnittene DNA mit 20 Units der CIP-Phosphatase für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

### 5.1.5 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden

Für eine blunt end Ligation wurden 5'-überhängende DNA-Enden, die nach einem Restriktionsverdau entstanden waren, durch das Enzym DNA-Polymerase I Large Fragment (Klenow) aufgefüllt. Hierzu wurde der Restriktionsansatz (20 µl) mit 50 µM dNTP, 3 µl Klenow-Puffer und 50 Units Klenow bei 25°C für 15 min inkubiert.

### 5.1.6 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrates wandern DNA Moleküle im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei wegen des Widerstandes der Agarose Gelmatrix umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge.

Es wurden 0,8%ige Agarosegele verwendet (0,8 g Agarose auf 100 ml 1 × TAE), die bei einer konstanten Spannung von 100 V für ca. 1 Stunde liefen. Als Laufpuffer diente 1 × TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen 5 × DNA Probenpuffer gemischt. Zum Größenvergleich wurde der DNA-Längenmarker Smart Ladder (Clontech) genutzt.

Zur Detektion der DNA-Banden wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,4 %) für ca. 30 min inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer UV-Fotoeinheit. Für Klonierungen wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (5.1.7).

### **5.1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der Ultra Clean™ 15 DNA Purifikation Kit (Mo Bio Laboratories) verwendet. Die Reinigung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und erfolgt hierbei nach dem Prinzip eines Anionenaustauschers. Die Glasmilch (Silikate) bindet in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen spezifisch DNA. Diese kann nach dem Waschen durch Verwendung von Lösungen mit niedrigerem Salzgehalt (z. B. 1 × TE) wieder eluiert werden.

### **5.1.8 Ligation**

DNA Ligasen sind Enzyme, die freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA durch die Katalyse einer Phosphodiesterbindung verknüpfen. Für die Ligation von DNA Fragmenten mit überhängenden Enden wurde die T4 Quick Ligase von NEB verwendet. Restringierter Vektor und Insert wurden im Verhältnis 1:4 in 10 µl Aqua bidest. mit 10 µl 2 × Quick Ligase Puffer und 1µl (2000 Units) Ligase gemischt. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 20 Minuten.

Für die Ligation von stumpfen Enden wurde die T4 DNA Ligase (NEB) verwendet und der Ansatz (20 µl: Vektor und Insert DNA im Verhältnis 1:4, 2 µl 10 × Ligasepuffer, 4 µl 50 % PEG und 1µl Ligase (400 Units)) über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* (DH5α) mit dem gesamten Ansatz transformiert (5.1.9).

### **5.1.9 Transformation kompetenter *E. coli***

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

#### Transformation durch Hitzeschock

Die kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zum gesamten Ligationsansatz wurden 200 µl der kompetenten Bakterien zugegeben, gemischt und danach der Ansatz 25

min auf Eis inkubiert. Beim anschließenden Hitzeschock wurde der Ansatz für 90 Sekunden auf 42°C erwärmt, um die Aufnahme der Plasmid-DNA durch die Bakterien zu ermöglichen. Es erfolgte eine Inkubation für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 900 µl antibiotikafreiem SOC-Medium wurden die Transformationsansätze für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. In dieser Zeit konnten die transformierten Bakterien die zur Selektion benutzten Antibiotika-Resistenzmarker exprimieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze auf LB<sub>Ampicillin/Kanamycin</sub>-Agar-Platten ausplattiert. Nur Bakterien, die ein intaktes Plasmid aufgenommen hatten, konnten auf Grund der dadurch erworbenen Antibiotika-Resistenz wachsen. Die nach ca. 24 Stunden auf der Platte sichtbaren Kolonien wurden zum Animpfen von Übernachtskulturen und anschließender Plasmidpräparation genutzt.

### Elektroporation

Die elektrokompetenten *E. coli* wurden langsam auf Eis aufgetaut, sowie die Küvetten und das SOC Medium auf Eis gekühlt. Die aufgetauten Zellen (20 µl) wurden mit 2 µl Plasmid-DNA gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann in die gekühlte Küvette pipettiert und dem elektrischen Impuls (2,5 kV bei 0,2 cm-Küvette) ausgesetzt. Das Ausspülen der Zellen aus der Küvette erfolgte mit 200 µl SOC. Nach einem Inkubationsschritt (1 h, 37°C) wurden die Ansätze auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Die Selektion erfolgte über das Antibiotikum, welches im Agar der Kulturplatten enthalten war. So konnten auf den Platten nur Bakterien wachsen, die durch Aufnahme des Plasmids die jeweilige Antibiotika-Resistenz erworben hatten.

#### **5.1.10 Isolation von Plasmiden aus *E. coli* (Mini- und Midimaßstab)**

Die Plasmid-Minipräparation wurde nach dem Herstellerprotokoll mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Kit (Invitex) durchgeführt. Hierzu wurde eine Übernachtskultur einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium bei 37°C geschüttelt. Von der Suspension wurden 2 ml eingesetzt. Diese Plasmidisolation fand Anwendung, wenn Klonierungsschritte mittels Restriktionsverdau überprüft werden sollten. Die DNA-Aufreinigung erfolgt hierbei nach dem Prinzip eines Anionenaustauschers.

Dies gilt auch für die durchgeführten Plasmidisolationen im Midimaßstab. Hier wurde der Nucleobond AX Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die DNA wurde aus einer 50-200 ml *E. coli* Übernachtskultur isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 5.1.11 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260\text{nm}$  und  $\lambda = 280\text{nm}$ . Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> erlaubt eine Aussage über die Reinheit der DNA. Ein Wert von 1,8 zeigt einen guten Reinheitsgrad an. Die Konzentrationsbestimmung (C in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) erfolgt nach folgender Formel:

$$C = \text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

### 5.1.12 Sequenzierung

Die automatische Sequenzanalyse basiert auf einer DNA-Kettenverlängerungsreaktion nach der Didesoxy-Methode nach F. Sanger. Der Reaktionsansatz (20  $\mu\text{l}$ ) enthielt 350 ng Plasmid DNA als Matrize, 2  $\mu\text{l}$  PCR-Reaktionsgemisch (BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix, Applied Biosystems), 6  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (Applied Biosystems) und 10 pmol Sequenzierungsprimer. Nach erfolgter PCR (25 Zyklen mit je 30 s - 95°C, 30 s - 40°C und 4 min - 60°C) wurden nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide durch Ethanol-fällung abgetrennt. Der PCR Ansatz (20  $\mu\text{l}$ ) wurde mit 35  $\mu\text{l}$  95 % Ethanol bei -20°C für 30 min inkubiert, anschließend zentrifugiert (14.000 rpm 4°C 30 min) und das Pellet in 40  $\mu\text{l}$  Aqua bidest. resuspendiert.

### 5.1.13 Herstellung von Glycerindauerkulturen

Von als korrekt befundenen Klonen wurden Glycerindauerkulturen angefertigt. Es wurden 10 ml LB-Medium mit den Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert (10 min, 3500 rpm, RT) und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 0,8 ml Glycerin gründlich gemischt und sofort bei -80°C eingefroren.

### 5.1.14 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

#### chemisch kompetente Zellen

Damit Bakterien Plasmid-DNA in ausreichendem Maß aufnehmen können, müssen diese kompetent gemacht werden. Ausgehend von einer Glycerindauerkultur des Bakterienstammes *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde eine Übernachtskultur (37°C) auf LB-Agar Platten angelegt. Mit 10-15 großen Kolonien dieser Vorkultur wurden 200 ml SOB-Medium

angeimpft und bei 18°C unter Schütteln 2-3 Tage inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden anschließend für 10 min auf Eis inkubiert und pelletiert (10 min, 3000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml vorgekühltem TB-Puffer aufgenommen und vorsichtig mit 1,4 ml DMSO (Endkonzentration 7 %) vermischt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die kompetenten Zellen zu je 200 µl aliquotiert und bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

#### elektrokompetente Bakterienzellen

Ausgehend von einer Glycerindauerkultur wurde 1 ml LB-Medium als Vorkultur angeimpft und für 5 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 100 µl in 10 ml LB Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde in 100 ml LB-Medium überführt, wiederum bei 37°C unter Schütteln kultiviert bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 und anschließend bei 4°C 15min bei 4000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 1 l eiskaltem 10%igen Glycerol resuspendiert und dann erneut zentrifugiert (4°C, 15min bei 4000 rpm). Nach zweimaligem Waschen (I: 500 ml 10 % Glycerol; II: 250 ml 10 % Glycerol) wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem Glycerol (10 %) resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden zu je 50 µl aliquotiert und bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

## **5.2 Biochemische Methoden**

### **5.2.1 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine aus *E. coli***

#### **5.2.1.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli***

Zur Erzeugung großer Mengen eines bestimmten Proteins werden häufig bakterielle Expressionssysteme verwendet. Das am meisten genutzte Bakterium *E. coli* bietet durch seine unkomplizierte Kultivierung und durch die mögliche Verwendung stark induzierbarer Promotoren eine einfache Möglichkeit der Überexpression rekombinanter Proteine.

Die cDNA des gewünschten Proteins bzw. Proteinfragmentes wurde hierzu in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert. Der verwendete pGEX 3X-Vektor besitzt den



bakteriellen *tac* Promotor. Im uninduzierten Zustand bindet ein spezifischer Repressor an den Operator des Promotors und blockiert die Expression des rekombinanten Proteins. Die Induktion des Systems kann durch verschiedene Galactoside (z. B. Lactose, Allolactose und IPTG) erfolgen. In den vorgenommenen Experimenten wurde L-Arabinose als Induktor verwendet. Arabinose bindet an den Repressor, was die Abdissoziation vom Operator zur Folge hat und die Expression von rekombinanten Proteinen ermöglicht.

Für die Induktion wurde zuerst eine Vorkultur aus einer einzelnen Kolonie nach der Transformation angesetzt (6 h, 37°C). Ausgehend von dieser Vorkultur (5 ml) wurde eine Übernacht-Kultur (50 ml LB-Medium) bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Übernacht-Kultur mit LB-Medium mit 0,2 % Glucose auf 1 l aufgefüllt und wiederum bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Eine Bakterienpopulation mit einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 befindet sich in ihrer logarithmischen Wachstumsphase und ist für die Induktion rekombinanter Proteine besonders gut geeignet. Die Expression wurde durch die Zugabe von L-Arabinose (Endkonzentration 0,8 %) induziert. Die Kultur wurde dann für 1 h bei 37°C geschüttelt. Zur Kontrolle wurde ein entsprechendes Aliquot uninduzierter Bakterienkultur vor der Induktion vom Ansatz entnommen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, 15 min) geerntet und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Bakterienpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **5.2.1.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli***

Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Bei der Affinitätschromatographie beruht die Trennung auf einer spezifischen reversiblen Wechselwirkung zwischen dem Protein/Peptid und seinem an eine Matrix gebundenen Bindungspartner.

Vor der Reinigung erfolgte der Aufschluß der Bakterienzellen. Hierzu wurde das *E. coli*-Pellet in 30 ml Lysepuffer (PBS mit 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM BA, 1 µg/µl Pepstatin, 1 µl/ml Leupeptin, 1 % Triton X-100, 1 % Proteaseinhibitor Cocktail) resuspendiert. Nach dem Aufschluß der Zellen mittels French Press wurden die löslichen Proteine von Zelltrümmern und Zellorganellen durch Zentrifugation (2 × 30 min, 4°C, 14.000 rpm) abgetrennt. Der so erhaltene Überstand enthielt die löslichen Proteine und wurde für die Reinigung eingesetzt. Die Reinigung erfolgte im ersten Schritt im Batch-Verfahren durch die Zugabe von 1 ml 50 % Gluthathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B Beads und

Inkubation für 2h bei 4°C. Anschließend wurde die Suspension in eine Säule über einen Filter gegeben und so die Beads von der Suspension abgetrennt. Nach Waschen mit 3 × 10 ml PBS (mit 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/µl Pepstatin, 1 µl/ml Leupeptin) wurde das GST-markierte Protein mit einem Glutathion-haltigen Puffer eluiert. Es erfolgten drei Elutionsschritte zu je 200 µl (20mM reduziertes Glutathion, 200 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/µl Pepstatin, 1 µl/ml Leupeptin, 0,1 % Triton X-100, 1 % Proteaseinhibitor Cocktail). Vor der Lagerung der Proteine wurden diese über Nacht bei 4°C gegen einen Glycerol-haltigen Dialysepuffer (50 % Glycerol, 200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM PMSF) dialysiert. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (5.2.4) und Western Blot (5.2.5) kontrolliert.

### 5.2.2 Aufreinigung rekombinanter His-Fusionsproteine aus Insektenzellen

Bakterielle Expressionssysteme weisen neben vielen Vorteilen (kostengünstig, einfaches Handhaben) auch einige Nachteile auf, die bei einer Reihe von rekombinanten Proteinen zu unbefriedigenden Expressionsraten führen können. Eine zu starke Überexpression führt häufig zu unlöslichen Protein, welches in Einschlusskörpern (inclusion bodies) aggregiert. Ein weiteres Problem bei der Expression von rekombinanten Genen in *E. coli* ist die unterschiedliche Codon-usage von Pro- und Eukaryonten. Im Hinblick auf die Arbeit mit Kinasen muss auch das Problem, der in *E. coli* fehlenden posttranslationalen Modifikationen, die für die Aktivität oft essentiell sind, erwähnt werden. Somit ist es für einige Proteine nötig auf andere meist aufwendigere und kostenintensivere Systeme wie Insektenzellen auszuweichen.

Die verwendeten *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Zellen lassen sich durch Baculoviren, welche genetisch so verändert wurden, dass sie ein gewünschtes Gen tragen, infizieren. Unter dem Einfluß des starken Polyhedrin-Promotors wird das gewünschte Protein exprimiert (4.6.3 und 5.4.5).

Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte nach dem Prinzip der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie. Für die Aufreinigung der His-fusionierten Proteine wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Multivalentes Nickel ist an das Säulenmaterial gekoppelt und bietet Interaktionsmöglichkeiten zur Ausbildung von koordinativen Bindungen mit basischen Aminosäuren wie Histidin. Zu diesem Zweck wurden die rekombinanten Proteine mit einem Schwanz aus Histidinen fusioniert. Zur

Elution wird ein Puffer mit einer hohen Imidazolkonzentration genutzt, welches mit den Histidinen um die Bindungsplätze konkurriert.

Der Aufschluß der Sf9-Zellen erfolgte mittels French Press. Hierzu wurden die geernteten Zellen in Lysepuffer (50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 5mM CHAPS, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin, 25 mM Imidazol) resuspendiert. Das Abtrennen der freigesetzten Proteine von Zelltrümmern und Zellorganellen erfolgte durch Zentrifugation (2 x 30 min, 4°C, 14000 rpm). Die Reinigung erfolgte im ersten Schritt im Batch-Verfahren durch die Zugabe von Ni-NTA Superflow (300  $\mu$ l auf 10 ml Suspension) der Firma Qiagen und Inkubation für 2 h bei 4°C. Anschließend wurde die Suspension in einer Säule über einen Filter gegeben und so die Beads abgetrennt. Nach Waschen mit 3 x 5 ml Waschpuffer (50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin, 50 mM Imidazol) wurde das His-markierte Protein durch Puffer mit höherer Imidazolkonzentration eluiert. Es erfolgten drei Elutionsschritte mit je 200  $\mu$ l (50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin, 500 mM Imidazol). Vor der Lagerung der Proteine bei -20°C wurden diese über Nacht bei 4°C gegen einen Glycerol-haltigen Dialysepuffer (50 % Glycerol, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, 50 mM Tris/HCl pH 7,5) dialysiert.

Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (5.2.4) und Western Blot (5.2.5) kontrolliert.

### **5.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde das BCA Reagenz der Firma Sigma (BCA Protein Kit) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### **5.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Proteinproben wurden mit SDS-haltigem 2 bzw. 5 x Protein-Probenpuffer gemischt und für 5 min aufgekocht. Durch die Behandlung der Proteine mit SDS erhalten diese ein ungefähr gleiches Ladungs-Masse-Verhältnis und weisen eine ähnliche Form auf, was bei der Trennung ausgenutzt wird. Die Proteine können dann im SDS Gel nach ihrer Molaren Masse aufgetrennt werden.

Die Auftrennung erfolgte in 10%igen Acrylamidgelen zunächst bei 150 mV für 15 Minuten und anschließend bei 180 mV für eine Stunde. Als Größenvergleich in Coomassie gefärbten Gelen diente der Molekulargewichtsmarker der Firma Fermentas und für Western Blots der Marker MagicMark von Roche.

Die aufgetrennten Proteine konnten durch Anfärben des Gels in einem Coomassie-Blau Färbebad (50 min; schütteln) und anschließendes Entfärben (20 min, Intensiv-Entfärber, 45 min Normal-Entfärber) analysiert werden. Ein Anfärben der Proteine mit Rotiblu<sup>®</sup> erfolgte nach den Herstellerangaben (Roth).

### 5.2.5 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der Semi-Dry-Western Blot Methode auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert um eine Analyse der Proteine mittels Antikörpern durchführen zu können.

Vor dem Transfer der Proteine wurden hierzu das Trenngel, Membran und Filterpapiere wie folgt äquilibriert:

Trenngel	1 × Blottingpuffer 15 min
Membran	100 % Methanol 10 sec
	1 × Blottingpuffer 15 min
10 dicke Filterpapiere	1 × Blottingpuffer 15 min

Das Blotten wurde mit 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 1h 30 min durchgeführt.

Um zu sehen, ob der Blotvorgang erfolgreich war, wurde die Membran für wenige Sekunden in Ponceau S Rot-Lösung (0,2 % Ponceau S in 10 % Trichloressigsäure) geschwenkt und anschließend für ca. 10 Minuten in dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Proteine werden hierbei unspezifisch rot gefärbt. Der spezifische Nachweis einzelner Proteine kann mittels eines spezifischen Antikörpers gegen den fusionierten Tag oder gegen das Protein erbracht werden. Hierzu wurde im ersten Schritt die Membran in 5 % (w/v) entfetteter Milch (in TBS-T) für 1,5 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Überschüssiger Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Der verwendete sekundäre Antikörper erkennt die konstante Region des primären Antikörpers und bindet dort. Er ist mit einem Enzym, der Meerrettich Peroxidase gekoppelt. Nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen. Die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (Bestandteil des

Substrates). Diese Reaktion verläuft unter Aussendung von Licht. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit dem ECL plus Western-Blot Detection System (Amersham Bioscience) mit Hilfe einer Fotoeinheit detektiert.

### **5.2.6 Ko-Immunopräzipitation**

Zur Untersuchung der Interaktion verschiedener Proteine wird häufig die Methode der Ko-Immunopräzipitation angewandt. Es wurden myc-, HA- und His-markierte Proteine verwendet. Die zu untersuchenden Proteine wurden in Sf9-, COS- oder HEK293 Zellen überexprimiert und die Zellen lysiert (50 mM TRIS HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 3 mM Na-EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/v) NP40, 5 mM CHAPS, 1 mM DTT, 2 mM Benzamidin, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 % Protease Inhibitor). 300 µl Lysat wurden mit 25 µl HA-Probe (Santa Cruz) bzw. 50 µl Protein G plus Agarose (Santa Cruz) und 10 µl myc-Antikörper (9E10, Santa Cruz) über Nacht bei 4°C inkubiert. Der gebildete Agarose-Antikörper-Protein-Komplex wurde anschließend sedimentiert (3000 rpm, 4°C, 5 min) und dreimal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 2 × Protein Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 100°C aufgekocht. Die Auswertung erfolgte mittels Western Blot (5.2.5).

### **5.2.7 GST-Pulldown Bindungsassay**

Neben der Ko-Immunopräzipitation ist der GST-Pulldown Bindungsassay eine weitere Möglichkeit, die Interaktionen von Proteinen zu untersuchen. Hierzu wurde eines der untersuchten Proteine mit GST fusioniert, was für die Isolation des Proteinkomplexes aus den Zell-Lysaten genutzt werden kann. Im ersten Schritt wird das aufgereinigte GST-fusionierte Protein mit dem entsprechenden Zell-Lysat oder einer Lösung mit aufgereinigtem Protein bei 4°C über Nacht auf einem Rotor inkubiert. Zur Kontrolle wird ein Ansatz parallel mit GST allein mitgeführt. Anschließend wurde Glutathion Sepharose (Amersham Bioscience) zugegeben und für mindestens weitere zwei Stunden inkubiert. Die verwendete Glutathion Sepharose wurde zuvor nach dem Herstellerprotokoll so behandelt, dass man eine 50%ige Arbeitssuspension erhielt. Durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, 5 min) wurde die Sepharose mit den gebundenen Proteinen sedimentiert und dreimal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 2 × Protein Probenpuffer

aufgenommen und für 5 min bei 100°C aufgekocht. Die Auswertung erfolgte mittels Western Blot (5.2.5).

### 5.2.8 Kinase-Aktivitäts-Assay

Mit Hilfe der durchgeführten *in vitro* Aktivitätstests (Kinase Assay) wurden Einflüsse verschiedener Interaktionspartner auf die Aktivität der untersuchten Kinasen analysiert. Hierbei können aktivierende wie auch inhibierende Effekte festgestellt werden. Die zu untersuchenden Proteinkinasen wurden in Sf9-Zellen exprimiert und dann wie in 5.2.2 beschrieben aufgereinigt.

Der Reaktionsansatz (25 µl, davon maximal 5 µl Kinasen) setzte sich zusammen aus 150 µM kaltem ATP, 5 µCi  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P] radioaktiv markiertem ATP (Amersham Bioscience) und dem jeweiligen Substrat in 1 × Kinase Puffer. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 30°C und wurde durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 10 %) gestoppt (30 min auf Eis). Für die Untersuchungen der MARKK Aktivität wurde das LIP-Peptid (203\_GNKLDTFCGSPPYAAPELFQGKK-226 + Y), welches die Sequenz der MARK2 Aktivierungsschleife umfasst, als Substrat verwendet. Die TESK1 Aktivität hingegen wurde über die Phosphorylierung von aufgereinigtem Cofilin (aus Sf9-Zellen, siehe 5.2.2) analysiert. Je nach Substrat wurden unterschiedliche Methoden zur Auswertung durchgeführt. In beiden Fällen wurden die durch TCA ausgefällten Proteine durch Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min, bei RT) sedimentiert. Bei der Verwendung von Cofilin als Substrat wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet in 5 µl Protein Probenpuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung in 17%igen SDS Gelen. Die Proteine wurden mit Roti<sup>®</sup>-Blue (Roth) nach dem Herstellerprotokoll angefärbt und das Gel anschließend getrocknet. Zur Auswertung wurde eine entladene Phosphoimagerplatte für 30 min auf das Gel gelegt und anschließend in einem Phosphoimager (Fuji, BASImager) ausgelesen. Die Auswertung erfolgte mit der AIDA Software der Firma Raytest.

Zur Analyse der MARKK-Aktivität wurde ein Filter-Assay durchgeführt. Hierzu wird der nach der Fällung und Zentrifugation erhaltene Überstand auf einen Phosphozellulosefilter (P81 cation exchanger, Whatman<sup>®</sup>) aufgetragen. Der Überstand enthält ATP und das Peptid, welche nicht durch die TCA Zugabe ausgefällt wurden. Das basische Peptid kann an die Phosphozellulose binden, während freies ATP durch Waschen mit 0,1 M Phosphorsäure (6 × 5 min) abgetrennt wird. Die Filter wurden an der Luft getrocknet,

bevor die eingebaute Menge an radioaktivem Phosphat mittels Messung in einem Szintillationszähler (Tricarb 1900 CA, Packard) bestimmt wurde.

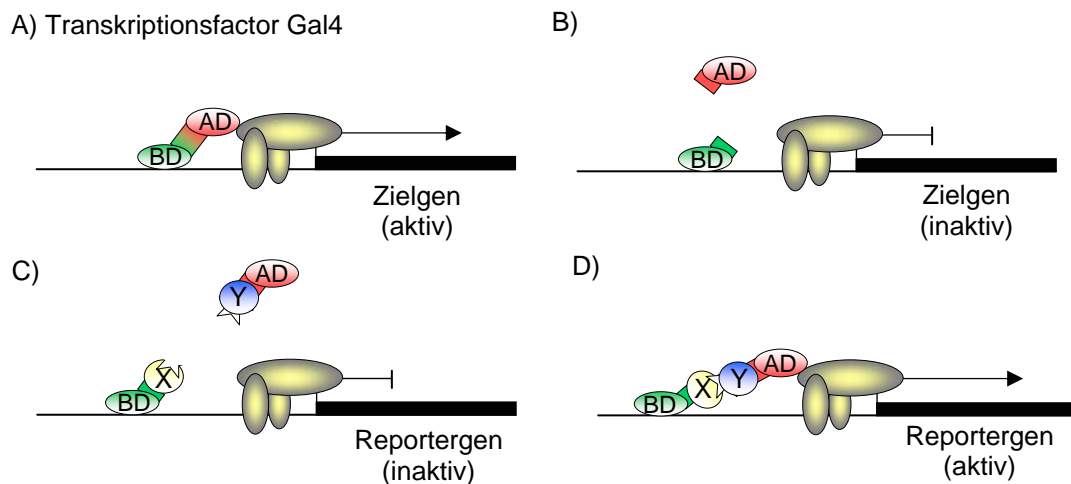
### 5.2.9 Generierung spezifischer Antikörper

Für eine tiefgründige biochemische und zellbiologische Untersuchung von Proteinen ist das Vorhandensein eines spezifischen Antikörpers eine Grundvoraussetzung. Da bei Beginn dieser Arbeit keine spezifischen Antikörper gegen TESK1 bzw. Spred1 kommerziell erhältlich waren, sollten solche in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec generiert werden. Nach Literaturrecherche und Analyse der Aminosäuresequenz der beiden Zielproteine wurden geeignete Peptidsequenzen ausgewählt, die für die Immunisierung eingesetzt werden sollten. Für TESK1 wurden die letzten 21 C-terminalen Aminosäuren (608-CHRGHHAKPPTPSLQLPGARS-628) und für Spred1 zwei Peptide (Peptid 1: 115\_FDRGIRRAIEDISQGC-130, Peptid 2: 163-ETVVTSEPYRSSNIRP-178) gewählt. Die Peptidsynthese und Immunisierung von zwei Ratten (TESK1) bzw. zwei Kaninchen (Spred1) wurde bei der Firma Eurogentec in Auftrag gegeben. Die erhaltenen Seren wurden anschließend von Dr. Timm und Frau Bülow in unserem Labor mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

## 5.3 Hefe Zwei-Hybrid Methoden

Seit ihrer Einführung 1989 (Fields und Song, 1989) hat sich die Hefe Zwei-Hybrid Methode zu einer weit verbreiteten und vielseitig genutzten Möglichkeit der Untersuchung von Protein – Protein Interaktionen entwickelt. Es ist nicht nur möglich, die Interaktion zweier bekannter Proteine bzw. Proteindomänen zu prüfen, sondern auch cDNA-Bibliotheken nach neuen Wechselwirkungspartnern zu durchsuchen. Man macht sich hierbei die Funktionsweise bestimmter Transkriptionsregulatoren der Hefe zunutze. Das häufig verwendete GAL4-Protein gehört zu dieser Gruppe der Transkriptionsaktivatoren. Die wesentliche Eigenschaft dieser Proteine besteht in ihrer zweigeteilten Domänenstruktur. Die DNA-Bindedomäne (DB) interagiert mit so genannten Upstream-Aktivatorsequenzen im Promotorbereich und führt so zur Rekrutierung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Doch die Transkription wird nur eingeleitet, wenn auch die zweite Domäne – die Aktivierungsdomäne (AD) – mit der Transkriptionsmaschinerie wechselwirkt. Werden beide Domänen voneinander getrennt, findet keine Transkription

statt. Im Hefe Zwei-Hybrid System wird die DB an ein bekanntes Protein X (Köder) und die AD an ein zweites Protein Y (Beute) fusioniert. Nur wenn X und Y miteinander interagieren, ist der Transkriptionsaktivator aktiv und die Reportergene werden exprimiert (Abb. 10). Als Reportergene dienen im verwendeten System (MATCHMAKER Two-Hybrid System<sup>3</sup>, Clontech) *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*. Eine Interaktion kann somit einfach anhand des Wachstums der Hefen auf Selektionsplatten und ihrer Blaufärbung festgestellt werden.



**Abbildung 10: Prinzip des Hefe Zwei-Hybrid Systems**

Der Gal4 Transkriptionsfaktor in Hefen aktiviert die Transkription bestimmter Zielgene, indem er mit der Transkriptionsmaschinerie in Wechselwirkung tritt. Gal4 besitzt eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne (DB) und eine C-terminale Aktivierungsdomäne (AD) (A). Werden beide Domänen voneinander getrennt oder fehlt eine der Domänen, kann die Transkription nicht aktiviert werden (B). Fusionsproteine der DNA-Bindungsdomäne z. B. MARKK C-term (As 1-432) (Köder) und der Aktivierungsdomäne z. B. unbekannte Proteine einer cDNA-Bibliothek (Beute) aktivieren die Transkription nur dann, wenn sie aneinander binden (C und D). Durch die Interaktion kommt es zur Rekonstruktion eines funktionellen Gal4 –Aktivators (D).

### 5.3.1 Amplifikation von c-DNA Bibliotheken

Bei der im Hefe Zwei-Hybrid Screen verwendeten cDNA-Bibliothek handelt es sich um eine fötale menschliche Gehirn cDNA-Bank der Firma Clontech. Die cDNA ist in den Zwei-Hybrid Vector pACT2 (4.7) hinter die GAL4 Aktivierungsdomäne kloniert. Um genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben, musste die cDNA-Bibliothek nach Vorschrift (MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System<sup>3</sup> & Libraries User Manual, Clontech) in *E. coli* amplifiziert werden.

### 5.3.2 Hefetransformation und direkter Zwei-Hybrid Test

Sollen zwei bekannte Proteine auf ihre mögliche Interaktion untersucht werden, müssen diese in geeignete Vektoren kloniert werden. Das „Köderprotein“ wird in den pGBKT7 –



Vektor kloniert, welches für die DNA-Bindedomäne und den Selektionsmarker *TRP1* (Tryptophan Biosynthese) kodiert. Das zweite „Beuteproteine“ wird mittels pGADT7-Vektor mit der Aktivierungsdomäne fusioniert. Dieses Plasmid trägt zusätzlich den Selektionsmarker *Leu2* (Leucin Biosynthese). Hefen des Stammes AH109 (4.6.2), welche für die Synthesen der Aminosäuren Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin auxotroph sind, können mit diesen Plasmiden transformiert werden. Über die Wahl des Kulturmediums (Selektionsmedium) kann auf das Vorhandensein der Plasmide und auf Interaktion selektioniert werden.

#### 5.3.2.1 Transformation von *S. cerevisiae*

Hefen des Stammes AH109 wurden als Übernachtskultur in 50 ml YEPD Medium bei 30°C im Schüttelinkubator (200 rpm) kultiviert. Pro Ansatz wurde je 1 ml Hefesuspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 1 min bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf 50-100 µl abgenommen und die Zellen im restlichen Medium resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl Carrier DNA (Heringssperma-DNA, 10mg/ml, Sigma) und 1 µg Plasmid-DNA zugegeben und gut gevortext. Nach der Zugabe von 500 µl Plate-Mixture und 20 µl 1 M DTT wurde erneut gut gevortext. Der Ansatz wurde für mindestens 8 h oder über Nacht bei RT inkubiert. Nach einem 10 minütigen Hitzeschock bei 42°C wurden die Zellen, die sich an der Wand des Eppendorf-Gefäßes abgesetzt hatten, auf Selektionsplatten –Leu/-Trp ausgestrichen. Diese wurden für mindestens drei Tage bei 30°C inkubiert.

#### 5.3.2.2 Direkter Hefe Zwei-Hybrid Test

Um die Interaktion zweier bekannter Proteine zu untersuchen, wurden beide Proteine (Köder- und Beuteplasmid) gemeinsam in AH109 transfiziert. Im ersten Schritt wurden die Transformanten auf –Leu/-Trp Selektionsplatten herangezogen. Mit Hilfe von sterilen Zahnstochern wurden je drei Kolonien auf –Leu/-Trp/-His bzw. –Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsplatten ausgestrichen und erneut drei Tage bei 30°C inkubiert. Nur nach erfolgreicher Transformation und bei stattfindender Wechselwirkung der beiden Proteine können die Hefen auf den Selektionsplatten wachsen. Die Selektionsplatten wurden zusätzlich mit X-Gal bestrichen (100 µl, 2 mg/ml in DMF), um eine noch stringenter Selektion zu erreichen. Das gering induzierbare *lacZ* Reportergen kodiert für die  $\alpha/\beta$ -Galactosidase. Dieses sekretorische Enzym wird von den Hefen mittels Exocytose an das

Medium abgegeben und kann sein Substrat X-Gal direkt zu einem blauen Substrat (5-Brom-4-chlorindigo) umsetzen. Somit kann bei einer starken Wechselwirkung neben dem Wachstum der Hefen auch eine Blaufärbung beobachtet werden.

### 5.3.3 Hefe Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek Screen

Die Methode des Zwei-Hybrid Systems eignet sich nicht nur zur Analyse der Wechselwirkung zweier bekannter Proteine, sondern auch zur Identifikation neuer, unbekannter Bindungspartner. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Interaktionspartner der C-terminalen Domäne von MARKK zu charakterisieren. Hierzu wurde das gewünschte Proteinfragment (AS 432-1001) in den „Ködervektor“ pGBKT7, welcher für die DNA-Bindungsdomäne kodiert, kloniert. Durchmustert wurde eine fötale menschliche Gehirn cDNA-Bank (Clontech), die im Beutevektor pACT2 an die Aktivierungsdomäne fusioniert war. Nur wenn Köder- und Beuteprotein aneinander binden, kommt es zur Rekonstruktion eines funktionsfähigen GAL4 Aktivators. Somit wird die Expression der Reportergene (*HIS3*, *ADE2* und *lacZ*) angeschaltet und die Hefen sind in der Lage auf den Selektionsplatten zu wachsen (Abb. 11).

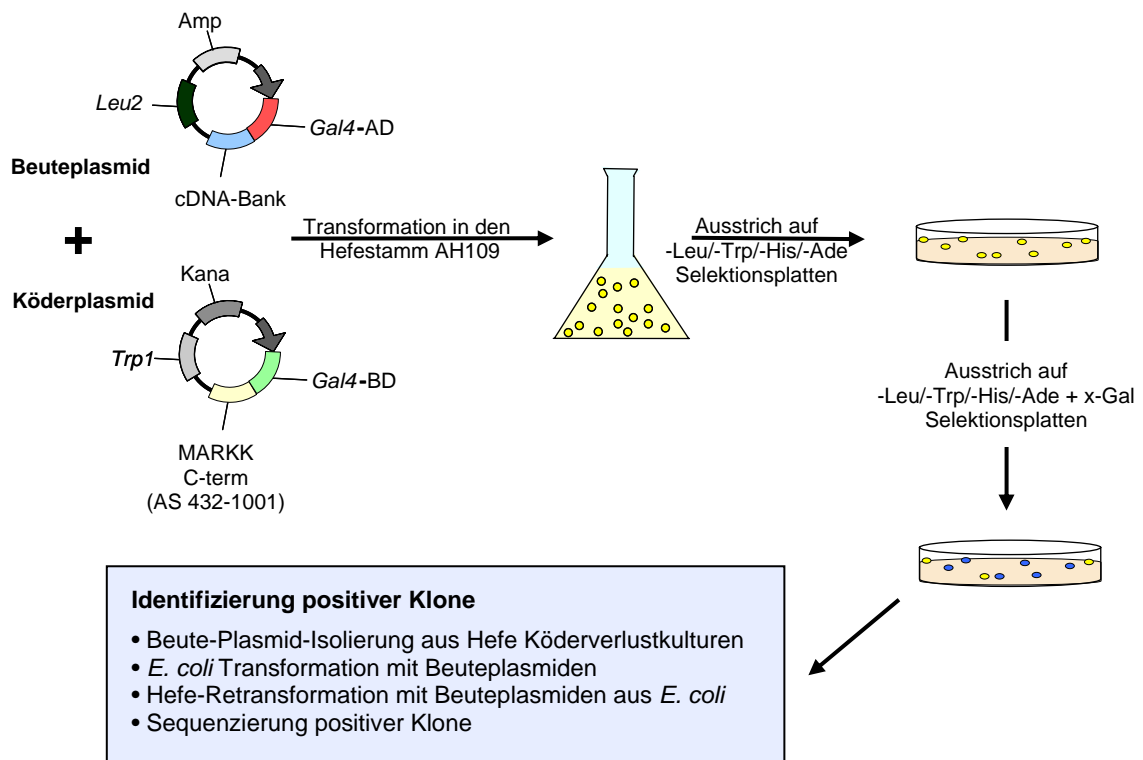


Abbildung 11: Ablauf eines Hefe Zwei-Hybrid cDNA-Screens

### 5.3.3.1 Transformation von *S. cerevisiae* für den Zwei-Hybrid cDNA-Bank Screen

Hefen des Stammes AH109 wurden mit dem Köderplasmid, MARKK C-term (AS 432-1001)\_pGBKT7, vortransformiert (5.3.2.1). Von den erhaltenen Kolonien wurden drei bis fünf für eine Vorkultur über Nacht bei 30°C (200 rpm) in –Trp Selektionsmedium (50 ml) herangezogen. Am nächsten Morgen wurde die Kultur um 250 ml –Trp Medium vergrößert und erneut über Nacht inkubiert. Sobald die Kultur eine OD<sub>600</sub> > 1 erreicht hatte, wurden 3 × 500 ml Vollmedium durch Zugabe der Hefesuspension auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,5 eingestellt. Nach 4 h Inkubation bei 30°C und 200 rpm wurde die Zellsuspension auf 4 Zentrifugenbecher verteilt und die Zellen bei 3500 rpm für 10 min bei RT sedimentiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden mit 200 ml 1 × TE gewaschen, erneut zentrifugiert, anschließend in je 10 ml frischen LiAc/TE-Mix resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Pro Ansatz wurden 2 ml Carrier-DNA (10 mg/ml) mit 500 µg cDNA-Bibliothek-Plasmid vermischt und zur Zellsuspension gegeben. Nach Schwenken der Transformationsansätze wurden je 70 ml frischer PEG/LiAc-Mix zugegeben und für 30 min bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Je 8,8 ml DMSO wurden tropfenweise zugefügt, bevor die Zellen für 1 h einem Hitzschock bei 42°C ausgesetzt waren. Die Zellen wurden für 3 min auf dem Eis gekühlt, anschließend in einem Zentrifugenbecher vereinigt und bei 3500 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 1 l Vollmedium aufgenommen und für 1 h (30°C, 200 rpm) im Schüttler kultiviert. Im Anschluß wurden die Zellen erneut pelletiert, mit 50 ml 1 × TE gewaschen und in 10 ml 1 × TE resuspendiert. Die so transformierten Hefezellen (je 250 µl) wurden auf 40 Selektionsplatten (-Leu/-Trp/-His/-Ade, 15 cm) ausgestrichen. Kolonien, die eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem Köder- und dem Beuteprotein anzeigen, erschienen nach 5-8 Tagen Inkubation bei 30°C.

In einem zweiten Selektionsschritt wurden 400 dieser Kolonien auf frische Selektionsplatten (-Leu/-Trp/-His/-Ade + X-Gal) ausgestrichen. Wachstum und Blaufärbung konnten nach dreitägiger Kultivierung bei 30°C ausgewertet werden.

### 5.3.3.2 Berechnung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz pro µg eingesetzter DNA wurden 5 µl und 10 µl Aliquots der unter 5.3.3.1 erhaltenen transformierten Zellsuspension auf –Leu/-Trp Selektionsplatten ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C kultiviert. Die Berechnung der

Transformationseffizienz, die optimal im Bereich von  $1 \times 10^3$ -  $10^4$  cfu/ $\mu$ g DNA liegen sollte und der Anzahl der gescreenten Klone (optimal  $1 \times 10^6$ ), erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Anzahl der gewachsenen Hefekolonien} \times \text{Vol. des Gesamtansatzes (10 ml)}}{\text{Vol. der ausgestrichenen Zellsuspension (5/10\mu l)} \times 500 \mu\text{g cDNA}}$$

$$\text{Anzahl gescreenter Klone} = \text{Transformationseffizienz} \times 500 \mu\text{g cDNA-Bibliothek}$$

### 5.3.3.3 Identifizierung positiver Beuteklone

Nicht alle der Hefekolonien, die nach einem cDNA-Bank Screen wachsen, verfügen auch über einen funktionellen Köder-Beute-Interaktionskomplex. So kann es zum Beispiel sein, dass das Beuteprotein allein schon in der Lage ist, die Transkription der Reportergene zu aktivieren. Diese als falsch positiv bezeichneten Klone werden in den folgenden Arbeitsschritten von den positiven Klonen getrennt. Hierzu wird zuerst eine Köder-Verlustkultur angelegt, aus der dann das Beuteplasmid isoliert werden kann. Im Anschluss wird eine Hefe-Retransformation mit dem isolierten Beuteplasmid zusammen mit dem Köderplasmid bzw. dem Köderleervektor durchgeführt. Falsch positive Klone wachsen auf den Selektionsplatten (-Leu/-Trp/-His/-Ade + lac Z) nicht nur in Hefen, die das Köderprotein exprimieren, sondern auch in denen, die nur den Köderleervektor enthalten.

#### 5.3.3.3.1 Hefe Köder-Verlustkulturen

Die nach dem cDNA-Bibliothek Screen zur weiteren Untersuchung ausgewählten Hefekolonien werden in 5 ml -Leu Selektionsmedium für 2-3 Tage (30°C, 200 rpm) kultiviert. Mittels Zentrifugation (1 min, 14000 rpm, RT) werden die Hefezellen pelletiert und anschließend in 200  $\mu$ l sterilem STET Puffer resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurde eine Spatelspitze Glassperlen (Sigma) zugefügt und für 5 min gevortext. Nach kurzem Aufkochen (3 min, 100°C) wurden die Ansätze auf Eis gekühlt und Zelltrümmer durch Zentrifugation (14000rpm, 10 min, 4°C) abgetrennt. 100  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 100  $\mu$ l Kaliumacetat (5 M) gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurde erneut bei 14000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde der Ultra Clean™ 15 DNA Purifikation Kit verwendet. Hierzu wurden 50  $\mu$ l des gewonnenen Überstandes mit 100  $\mu$ l Ultra Salt-Lösung und 5  $\mu$ l Glasmilch vermischt. Die

Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das DNA Pellet wurde in 10 µl 1 × TE ( 3 min, 55 °C) gelöst.

#### **5.3.3.3.2 *E. coli* –Transformation mit Beuteplasmiden aus Hefen**

Zur Amplifikation des isolierten Beuteplasmids (5.3.3.3.1) wurde die gesamte DNA-Menge in 50 µl kompetente DH5α Zellen transformiert (5.1.9). Anschließend wurde das Beuteplasmid im Minimaßstab (5.1.10) aufgereinigt.

#### **5.3.3.3.3 Hefe-Retransformation mit Beuteplasmid aus *E. coli***

Hefen des Stammes AH109 wurden mit dem im Screen verwendeten Köderplasmid und dem in *E. coli* amplifizierten Beuteplasmid cotransformiert (2.2.2). Gleichzeitig wurde in einem parallelen Ansatz das Beuteplasmid zusammen mit dem Köderleervektor transformiert. Das Wachstum der Hefen auf den Selektionsplatten (-Leu/-Trp/-His/-Ade + X-Gal) ließ eine klare Bestimmung von falsch positiven und eindeutig positiven Klonen zu.

#### **5.3.3.3.4 Sequenzierung der positiven Klone**

Zur Identifizierung der in dem Beuteplasmid klonierten cDNAs wurden die entsprechenden Beuteplasmide sequenziert (5.1.12). Hierzu wurde der Plasmid-spezifische Primer T7 verwendet.

Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit Datenbanken im Internet verglichen. Hierzu wurde das BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) – Programm unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> genutzt.

## **5.4 Zellkultur**

### **5.4.1 Kultivierung von verschiedenen Säugerzelllinien**

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in der Laminarbox durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen in Begasungsbrutschränken bei 37°C und 95% Luftfeuchte in einer mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre. Es wurden

folgende Zelllinien kultiviert: CHO WT, CHOtau40, VERO, HEK 293, COS und PC12 (4.6.4). Die Kultivierung erfolgte im jeweils erforderlichen Medium (4.4.3)

Die Passagierung dieser adhärent wachsenden Zelllinien wurde bei 80%iger Konfluenz vorgenommen. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für einige Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit frischem Medium vom Boden der Kulturflasche gespült, je nach Zellart 1:5 – 1:20 gesplittet und in eine neue Kulturflasche überführt.

## **5.4.2 Transfektion von Säugerzellen**

Die Aufnahme von Expressionsplasmiden in Säugerzellen wird als Transfektion bezeichnet. Je nach Zielsetzung werden unterschiedliche Zellen verwendet. Dies erfordert auch die Anwendung verschiedener Transfektionsmethoden, die jeweils eine möglichst hohe Transfektionseffizienz gestatten.

### **5.4.2.1 Calcium-Phosphat-Transfektion**

Bei der Calcium-Phosphat-Methode wird die Plasmid-DNA mit einem Calciumchlorid- und Phosphat-haltigen Puffer gemischt. Es bilden sich feine DNA-Calciumphosphat-Komplexe, die auf der Zelloberfläche anhaften und zur Aufnahme der DNA durch Endozytose führen. Dieses einfache und preiswerte Verfahren wurde für HEK 293 und COS Zellen angewandt.

Es wurden  $3-5 \times 10^5$  Zellen in 10 cm Schalen für ca. 72 h kultiviert (~ 80% Konfluenz). Für die Transfektion wurden 10 µg Plasmid-DNA in 900 µl Aqua bidest. gelöst und anschließend mit 100 µl 2,5 M Calciumchlorid versetzt. Dem Ansatz wurde tropfenweise unter leichtem vortexen 1 ml BES-Puffer zugegeben und dann für 1 h bei RT inkubiert.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und erhielten 10 ml frisches Kulturmedium, bevor der Transfektionsmix vorsichtig auf die Zellen getropft wurde. Im Lichtmikroskop sollten die DNA-Calciumphosphat-Präzipitate gut sichtbar sein. Nach 17 h wurden die Zellen erneut gewaschen und erhielten nun Medium mit verringertem Serumgehalt (DMEM 0,3% FCS), um Proliferationsvorgänge zu stoppen. Nach weiteren 24-48 h konnten die Zellen geerntet werden.

#### 5.4.2.2 Effectene®-Transfektion

Zur Transfektion von CHO WT, CHOtau40 und VERO Zellen wurde das Effectene® Reagenz der Firma Qiagen genutzt. Es handelt sich hierbei um eine so genannte Liposomen-vermittelte Transfektion. Das Reagenz besteht aus einem Lipidgemisch, das Vesikel bildet, die die zugefügte Plasmid-DNA aufnehmen kann. Der gebildete DNA-Lipid-Komplex kann an der Zellmembran anhaften und die Plasmid-DNA in die eukaryontische Zelle abgeben.

Für die durchgeführten Immunfluoreszenz-Experimente wurden  $1,25 \times 10^4$  Zellen je Kammer einer 24-Loch-Platte auf einem Deckglas für 24 h kultiviert. Die Transfektion wurde bei einer Zellkonfluenz von 40-50 % nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden nach 17 h fixiert (5.4.3) und Immunfluoreszenzpräparate angefertigt.

#### 5.4.2.3 Lipofectamin™-Transfektion

Lipofectamin™2000 der Firma Invitrogen wurde auf Grund hoher Effizienz zur Transfektion von PC12 Zellen eingesetzt. Auch dieses Reagenz funktioniert nach dem Prinzip der Liposomen-vermittelten Transfektion.

Es wurden  $3,5 \times 10^4$  Zellen je Kammer einer 24-Loch-Platte auf einem Deckglas für 17 h kultiviert. Die Transfektion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es erfolgte ein Mediumwechsel nach 4 h mit Kultivierungsmedium. Nach weiteren 17 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erhielten frisches Medium (DMEM-F12 mit 0,1% Serum). Zur Differenzierung der Zellen wurde dem Medium NGF (100 ng/ml) zugesetzt. Um eine ausreichende Differenzierung zu erzielen, wurden die Zellen für 55-72 h in NGF-haltigem Medium kultiviert.

#### 5.4.3 Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung der Expression verschiedener Proteine auf zellulärer Ebene wurden Immunfluoreszenzpräparate angefertigt. Hierzu wurden CHO und PC12 Zellen wie unter 5.4.2.2 und 5.4.2.3 beschrieben transfiziert. Die Fixierung erfolgte für 15 min bei RT in 4 % PFA (in  $1 \times$  PBS). Nachdem die Zellen dreimal mit  $1 \times$  PBS gewaschen worden waren, wurden sie mit eiskaltem Methanol (80 %) für 5 min bei  $-20^\circ\text{C}$  permeabilisiert. Es

wurde erneut dreimal mit  $1 \times$  PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurde für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit Ziegen-Serum (in  $1 \times$  PBS) blockiert. Anschließend wurden die Zellen zuerst mit primären Antikörpern und dann mit den jeweiligen Cy5- bzw. TRITC-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Zwischen der Behandlung mit primären und sekundären und nach dem sekundären Antikörper wurden die Zellen gründlich je dreimal mit  $1 \times$  PBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläser in einem Tropfen Permafluor (Immuntech, Marseille) eingebettet und für mindestens 24 h getrocknet.

Zur Lebend-Beobachtung von VERO Zellen erfolgte keine Fixierung, sondern eine Inkubation mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Farbstoffen nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Zellen einmal mit frischem Medium gewaschen und sofort mit der Beobachtung begonnen.

Die Auswertung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop LSM510 Meta der Firma Zeiss mit einem  $63 \times$  Öl-Objektiv.

#### **5.4.4 Kultivierung von Sf9-Zellen**

Sf9-Zellen sind Insektenzellen des ovarialen Gewebes der *Spodoptera frugiperda* Larven. Sie eignen sich besonders gut für Baculovirus-Infektionsversuche. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgt bei  $27^{\circ}\text{C}$  (Medium siehe 4.4.3). Es können Suspensionskulturen angelegt werden, doch für die durchgeführten Arbeiten wurden Sf9-Zellen in Kulturflaschen als adhärenente Monolayer gehalten. Die Zellen wurden alle drei Tage 1:3 gesplittet. Hierzu wurde das alte Medium entfernt und frisches zugesetzt, bevor die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Flasche gelöst und in frische Kulturflaschen umgesetzt wurden.

#### **5.4.5 Baculovirus Expressionssystem**

Das Baculovirus Expressionssystem ermöglicht die Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen. Zwei Eigenschaften machen es zu einem viel genutzten System: 1) Die Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen erfolgt mit allen posttranslationalen Modifikationen, was gegenüber der Expression in *E. coli* ein großer Vorteil ist, 2) Die Ausbeute an Protein ist im Vergleich zur Expression in Säugerzellen höher.



Für die durchgeführten Experimente wurde das Baculovirussystem der Firma Orbigen (Sapphire™ Baculovirus DNA) verwendet. Zur Erzeugung virogener Partikel wurden 2 µg Transferplasmid mit 0,25 µg Baculovirus DNA (Orbigen) gemischt und für 1 min bei RT inkubiert. Zu diesem Mix wurden 500 µl Transfektionspuffer B (BaculoGold™ Transfektionspuffer Set, BD Bioscience) zugegeben und dann auf die vorbereiteten Sf9 Zellen getropft. Die  $2 \times 10^6$  Zellen (je Kammer einer 6-Loch-Platte) waren zuvor mit 500 µl Transfektionspuffer A versetzt worden. Nach 4-stündiger Inkubation bei 27°C wurde die Transfektionslösung von den Zellen abgesaugt und 2 ml frisches Kulturmedium zugegeben. Nach 4 bzw. 7 Tagen wurde das Medium gewechselt. Die so gewonnene Suspension, welche Viruspartikel enthielt, wurde steril filtriert und diente als Arbeitslösung zur Infektion der Sf9-Zellen.

#### **5.4.5.1 Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren**

Sf9-Zellen wurden in Kulturflaschen bis zu einer 80%igen Konfluenz kultiviert und dann mit rekombinanten Baculoviren infiziert (0,5 ml Viruslösung in T75-Kulturflasche mit 15 ml Medium). Nach 48-72 h begannen die Zellen sich vom Boden abzulösen und wurden geerntet.

## 6. Ergebnisse

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Interaktionspartner der Proteinkinase MARKK. Dadurch sollten neue Erkenntnisse über die Regulation der Kinase und deren möglichen Wechselwirkungen in weiteren Signaltransduktionswegen gewonnen werden.

Der mittels Hefe Zwei-Hybrid Methode neu identifizierte Bindungspartner Spred1 wurde durch biochemische und zellbiologische Methoden genauer charakterisiert und die funktionelle Relevanz der Wechselwirkung in Zellen überprüft.

Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Aktin-regulierenden Kinase TESK1. Es sollte untersucht werden, in welchem Zusammenhang Spred1 und TESK1 stehen. Eine Interaktion konnte aus Daten über TESK1 und dem SPRED1-ähnlichen Protein sprouty4 vermutet werden (Tsumura *et al.* 2005). Dabei sollte auch analysiert werden, ob Spred1 ähnlich wie sprouty4 in der Lage ist, die Aktivität der Kinase zu hemmen.

Abschließend sollte geklärt werden, welchen Einfluss die beiden Kinasen MARKK und TESK1 direkt aufeinander ausüben. So wurden im dritten Abschnitt dieser Arbeit neben Interaktionstests im Hefe Zwei-Hybrid System unter anderem *in vitro* Aktivitäts-Assays durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit sich die beiden Kinasen in ihrer Aktivität beeinflussen können.

### 6.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner von MARKK

#### 6.1.1 Hefe Zwei-Hybrid Screen einer fötalen menschlichen Gehirn cDNA-Bank

Eine weit verbreitete Methode zur Identifikation von neuen Interaktionspartnern ist der Hefe Zwei-Hybrid Screen (5.3.3). Hiermit war es möglich eine fötale menschliche Gehirn cDNA-Bank nach möglichen Bindungspartnern zu durchmustern. Als Köderprotein diente die C-terminale Domäne von MARKK, MARKK C-term (AS 432 – 1001) im pGBKT7 Vektor, welches freundlicher Weise von Dr. D. Matenia (MP-ASMB) zur Verfügung gestellt wurde. Zu Beginn der Arbeit waren keine Bindungspartner für diesen Teil der MARKK bekannt. MARKK C-term\_pGBKT7 wurde zusammen mit der cDNA-Bank in kompetente Hefen des Stammes AH109 transformiert und diese anschließend auf stringente Selektionsplatten -Leu/-Trp/-His/-Ade ausgestrichen. Eine so hohe Stringenz

war nötig, da das verwendete Köderprotein auf geringer stringenten Selektionsplatten (-Leu/-Trp/-His) schon mit der Aktivierungsdomäne allein die Transkription der Selektionsmarker-Gene aktivieren konnte.

Die erzielte Transfektionseffizienz betrug  $1,1 \times 10^3$  cfu/ $\mu$ g cDNA und liegt damit noch im optimalen Bereich von  $1-10 \times 10^3$  cfu/ $\mu$ g cDNA.

Die verwendete fötale menschliche Gehirn cDNA-Bibliothek bestand aus  $3 \times 10^6$  unabhängigen Klonen, von denen im durchgeführten Screen  $5,2 \times 10^5$  Klone durchmustert werden konnten. Die Klone, die sich nach weiterer Analyse als eindeutig positiv erwiesen, wurden mittels DNA Sequenzierung und Vergleich mit der NCBI Datenbank (BLAST) identifiziert (5.3.3.3.4). Die wesentlichen Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 1 zusammengefasst.

	<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	<b>NCBI</b>
Enzyme	<b>Peptidyl-Prolyl-Isomerase H (PPIH)</b>	Formation des Spleißosomen-Komplex	BC003412.1
	<b>Lanosterol Synthase</b>	Cholesterin Biosynthese	
	<b>Matrix Metalloproteinase 17 (MMP17)</b>	Abbau der extrazellulären Matrix	NM_016155.2
	<b>Dipeptidylpeptidase 3 (DDP3)</b>	Serinprotease	NM_130443.1
	<b>Calmodulin 2 / Phosphorylase Kinase (PHK)</b>	Regulation des Glykogen Metabolismus	BC003354.1
Kernproteine	<b>Brain factor 1(BF1), forkhead box G1B (FOXG1B)</b>	Transkriptionsfaktor	BC050072.1
	<b>Zinc finger protein 20 (KOX13)</b>	Transkriptionsfaktor und DNA Synthese	BC045814.1
	<b>Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1</b>	Transkriptionsfaktor	BC004154.2
	<b>Nuclear protein E3</b>	unbekannt	NM_199070.1
	<b>Transkriptionsfaktor, der an IGHM Verstärker bindet</b>	Transkriptionsfaktor	BC001532.2
	<b>Histon-Lysin N-Methyltransferase 2 (EHMT2)</b>	Histonmodifizierung	NM_025256.4
	<b>Integrase interactor 1B (INI-1B)</b>	Organisation der Chromatinstruktur	AB017523.1
andere	<b>Spred1</b>	Inhibitor von Ras	AY299089
	<b>Nogo receptor like2 (NGRL-2)</b>	Differenzierung von Neuronen	AC130689.8
	<b>Reticulon1</b>	unbekannt	BC003003.1

	<b>Golgin-67</b>	Golgi Protein	AF164622
	<b>ATP-bindungs Kasette, Subfamilie A, Mitglied 2</b>	Bestandteil des gehirnspezifischen ABC-Transporters	NM_001606.2
	<b>Brain acetylcholinesterase putative membrane anchor</b>	Lokalisation der Achetylcholinesterase	AF230924
	<b>Ferritin</b>	Eisen Transport-und Speicherprotein	BC016009.1
	<b>Hämoglobin Alpha 1/2</b>	Untereinheit des Hämoglobin	NM_000517.3
	<b>Alpha-2 Collagen Type IV</b>	Protein der extrazellulären Matrix	NM_001846.1
	<b>CD14 antigen (CD14)</b>	Zellmembran Antigen	NM_000591.1
	<b>ELAV-like 4 (embryonic lethal abnormal vision)</b>	Regulation von mRNA Stabilität	BC036071.1
	<b>Organischer Kationen Transporter (Solute Carrier 22)</b>	Kationen Transporter in der Zellmembran	BC020565.1
unbekannt	<b>Sequenz auf Chromosom 19</b>		AC024592.5
	<b>Sequenz auf Chromosom 16</b>		AC0264706.6
	<b>Sequenz auf Chromosom 1</b>		AL451070
	<b>Sequenz auf Chromosom 21</b>		NT_030188.3
	<b>hypothetisches Protein MGC45416</b>		BC032808
	<b>hypothetisches Protein BC017335</b>		BC016349.1
	<b>KIAA0408</b>		BC018396.1
	<b>hypothetisches Protein SB156</b>		AY037165.1

**Tabelle 1: Zusammenfassung der im Hefe Zwei-Hybrid Screen identifizierten Interaktionspartner von MARKK C-term (AS 432-1001)**

### 6.1.2 Identifizierte Klone aus dem Hefe Zwei-Hybrid Screen

Die Auswertung der positiven Klone des Hefe Zwei-Hybrid Screens ergab ein sehr breites Spektrum an möglichen neuen Bindungspartnern von MARKK (Tabl. 1).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine genauere Untersuchung der Bindung von MARKK an das Regulatorprotein Spred1 erfolgen. Dies schien aus zwei Gründen von Interesse. Zum einen sind beide Proteine bei der Regulation der MAPK-Signaltransduktionskaskaden involviert (Wakioka *et al.* 2001, Hutchison *et al.* 1998), zum anderen ist für ein Spred-verwandtes Protein, sprouty4, die Wechselwirkung mit der Aktin-regulierenden Kinase TESK1 beschrieben worden (Leeksa *et al.* 2002). Da die dort

beschriebene Bindung über die zu Spred homologe C-terminale Domäne erfolgt, konnte vermutet werden, dass auch Spred1 und TESK1 miteinander interagieren. Eine Wechselwirkung beider Proteine wurde im Verlauf dieser Arbeit bestätigt (6.3). Diese ersten Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass Spred1 als eine Art Brückenprotein (scaffold) zwischen MARKK und TESK1 fungieren und auf diese Weise die Regulation des Mikrotubuli- und des Aktin-Netzwerkes in der Zelle miteinander verbinden könnte.

Spred1 (sprouty related protein with EHV-1 domain) wurde 2001 als neues Substrat der Rezeptor Tyrosin Kinasen c-Kit und c-Fms identifiziert (Wakioka *et al.* 2001). Gut untersucht ist die Funktion von Spred im ERK-Signalübertragungsweg. Hier bindet es an Ras und Raf und verhindert die Aktivierung von Raf, was zur Inhibition des ERK-Signaltransduktionsweges führt (Wakioka *et al.* 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Spred1 über die Bindung an RhoA Einfluss auf die Organisation von Aktin nehmen kann (Miyoshi *et al.* 2004).

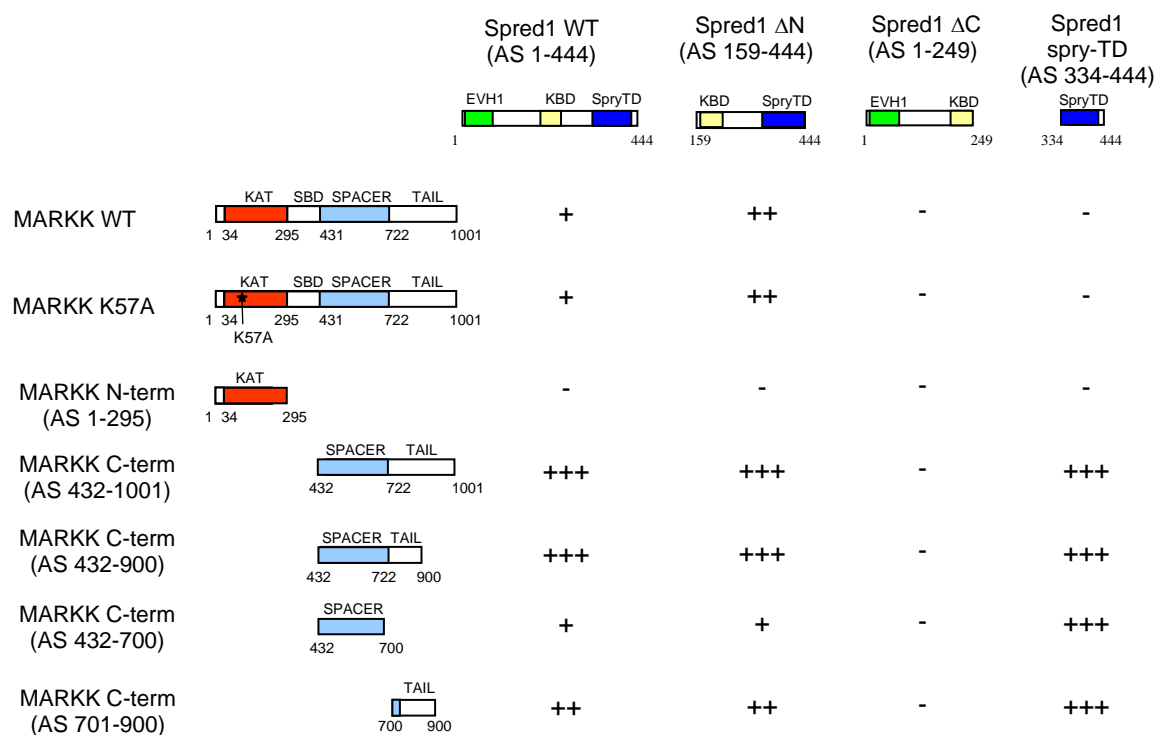
Der im Hefe Zwei-Hybrid Screen gefischte Klon umfasste nicht das vollständige Spred1-Gen, sondern die Sequenz für den carboxyterminalen Bereich AS 159-444 (Spred1  $\Delta$ N). Für die weiterführenden Arbeiten wurde das vollständige Spred1 Gen mittels PCR aus der verwendeten cDNA-Bank isoliert und in verschiedene Vektoren subkloniert (4.8).

## **6.2 Genauere Charakterisierung der MARKK – Spred1 Interaktion**

### **6.2.1 Kartierung der Interaktionsdomänen von MARKK und Spred1 mittels direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests**

Um die Interaktionsdomänen, welche für die Bindung von MARKK und Spred1 verantwortlich sind, genauer zu kartieren, wurden direkte Hefe Zwei-Hybrid Tests mit verschiedenen MARKK- und Spred1-Konstrukten durchgeführt. Hierzu mussten in einem ersten Schritt die verschiedenen Domänen und Mutanten der beiden Proteine in die Köder- bzw. Beutevektoren des Zwei-Hybrid Systems subkloniert werden (4.8). Die durchgeführten Tests ergaben, dass auch die beiden vollständigen Proteine MARKK WT und Spred1 WT miteinander in Hefen interagieren können (Abb. 12). Weiterhin war deutlich erkennbar, dass der C-Terminus (AS 432-1001) von MARKK für die Interaktion mit Spred1 verantwortlich ist. Dieser konnte eine sehr starke Bindung eingehen. Die N-terminale katalytische Domäne von MARKK (AS 1-295) zeigte keine Interaktion mit

Spred1. Somit hat die Mutation K57A innerhalb der Kinasedomäne, welche zu einer Inaktivierung führt, keinen Einfluss. Auch für Spred1 konnte die Interaktionsdomäne eindeutig ermittelt werden. Die stärkste Interaktion konnte mit der C-terminalen spry-TD Domäne (AS 334-444) beobachtet werden. Allerdings konnte dieses Fragment nicht an die vollständige MARKK binden. Hierfür scheint das Vorhandensein eines weiter N-terminal gelegenen Bereiches notwendig zu sein, da Spred1  $\Delta$ N (AS 159-444) diese Wechselwirkung eingehen konnte. Der N-Terminus von Spred1 interagiert nicht mit MARKK, sondern schien im Gegenteil hinderlich für eine Bindung zu sein. Spred1 WT (AS 1-444) zeigte eine schwächere Interaktion als Spred1  $\Delta$ N (AS 159-444).

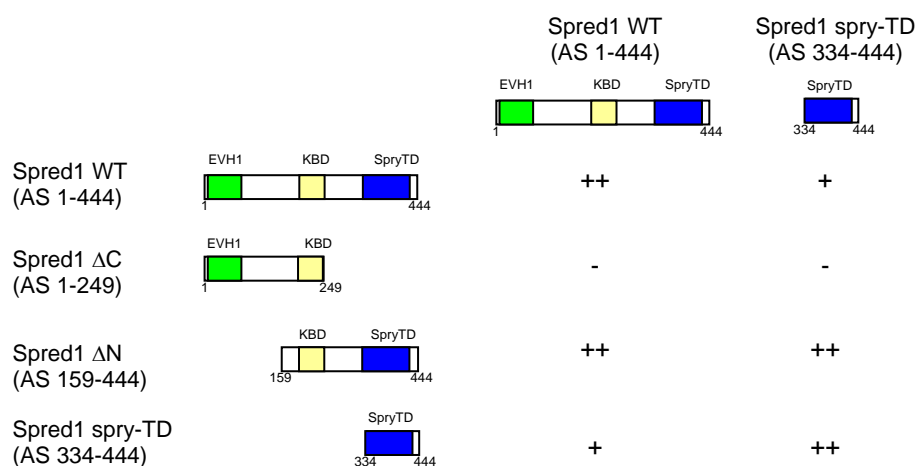


**Abbildung 12: Kartierung der Interaktionsdomänen zwischen MARKK und Spred1 mittels Hefe Zwei-Hybrid System**

Schematische Darstellung der Interaktionen verschiedener MARKK und Spred1 Konstrukte: In direkten Hefe Zwei-Hybrid Tests konnten die Interaktionsdomänen identifiziert werden. So scheint die Bindung in beiden Proteinen durch deren carboxyterminale Domänen vermittelt zu werden. Die einzelnen Domänen sind unterschiedlich farblich gekennzeichnet: Kinasedomäne (KAT, rot), Substratbindedomäne (SBD, weiß), Spacer-Domäne (hellblau), Schwanzdomäne (Tail, weiß), Ena/VASP homologe Domäne (EVH-1, grün), c-Kit Bindungsdomäne (KBD, gelb) und sprouty-Translokationsdomäne (spry-TD, blau).

## 6.2.2 Untersuchung zur Dimerisierung von Spred1 mittels direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests

Die Mitglieder der Spred-Proteinfamilie teilen folgende Domänenstruktur: die N-terminal gelegene Ena/VASP homologe Domäne (EVH-1), die zentrale c-Kit Bindungsdomäne (KBD) und die C-terminale sprouty Translokationsdomäne (spry-TD) (Abb. 9). Die spry-TD von Spred ist der spry-TD der Mitglieder der sprouty Familie ähnlich (22% Identität zwischen Spred1 und sprouty 4). Untersuchungen zu den Eigenschaften dieser Domäne in sprouty2 führten zur Identifikation eines Sequenzabschnittes, welcher für die Dimerisierung dieses Proteins verantwortlich ist (Hanafusa *et al.* 2002). Mit Hilfe von direkten Hefe Zwei-Hybrid Tests sollte untersucht werden, ob Spred1 auch in der Lage ist, Dimere auszubilden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 zusammengefasst.



**Abbildung 13: Interaktionen von Spred1 im Hefe Zwei-Hybrid System**

Schematische Darstellung der mittels direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests analysierten Interaktionen zwischen den einzelnen Spred1 Domänen: Spred1 ist in der Lage mit sich selbst zu interagieren. Die Wechselwirkung erfolgt über die sprouty-Translokationsdomäne (spry-TD). Die einzelnen Domänen sind unterschiedlich farblich gekennzeichnet: Ena/VASP homologe Domäne (EVH-1, grün), c-Kit Bindungsdomäne (KBD, gelb) und sprouty-Translokationsdomäne (spry-TD, blau).

Hierbei zeigte sich, dass Spred1 WT, wie vermutet, mit sich selbst interagieren kann. Die Bindung erfolgt wie bei sprouty über die C-terminale spry-TD Domäne. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch Spred1 Dimere bilden kann.

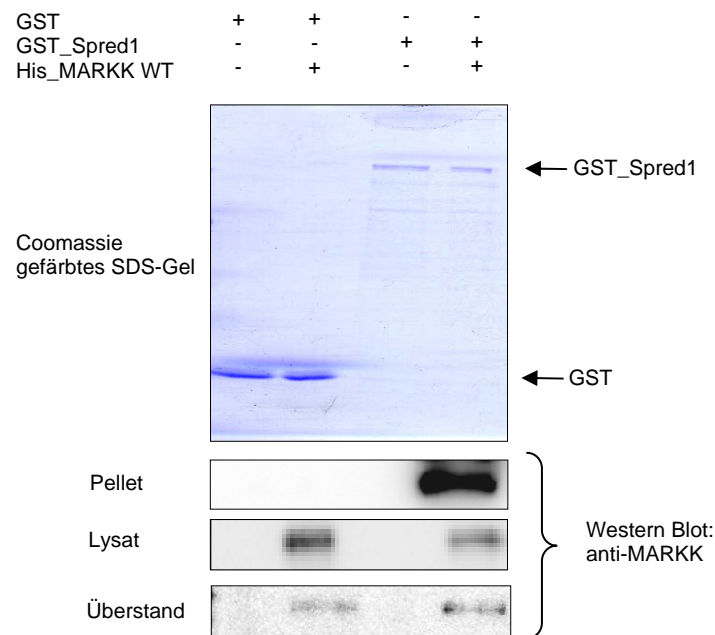
### 6.2.3 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen MARKK und Spred1

Die in Hefen ermittelte Bindung von MARKK und Spred1 sollte mittels GST-Pulldown überprüft werden. Diese *in vitro* Methode lässt auch eine Aussage darüber zu, ob die Interaktion zwischen zwei Proteinen direkt stattfindet. Denn anders als in Zellen, wo eine Vielzahl von Proteinen die Bindung beeinflussen kann, wurden im durchgeführten Pulldown aufgereinigte Proteine verwendet.

Hierzu wurde das GST-fusionierte Spred1 in *E. coli* exprimiert und anschließend durch Verwendung von Gutathion-Sepharose aufgereinigt (5.2.1). Die rekombinante Expression von Spred1 gestaltete sich sehr schwierig. Erste Versuche in Sf9-Zellen waren erfolglos, während die Expression eines His-markierten Fusionsproteins in *E. coli* nur zu unlöslichem Protein führte. Erst die Klonierung von GST\_Spred1 und die Expression in *E. coli* des Stammes BL21 AI (Invitrogen) machten eine Aufreinigung möglich. Die His-fusionierte Kinase MARKK ließ sich gut aus Sf9-Zellen mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufreinigen (5.2.2). Der hierzu verwendete Baculovirus wurde freundlicher Weise von Dr. T. Timm (MP-ASMB) zur Verfügung gestellt.

Im anschließenden Pulldown-Assay wurden beide Proteine zusammen inkubiert und über eine sedimentierbare Glutathion Sepharose-Matrix präzipitiert. Gleichzeitig wurden Kontrollansätze mit GST anstelle von GST\_Spred1 mitgeführt. Aufgereinigtes GST-Protein wurde freundlicherweise von Dr. J. Jiao (MP-ASMB) zur Verfügung gestellt. Das erhaltene Sepharose-GST-Protein Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (5.2.4 und 5.2.5). Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 zusammengefasst.





**Abbildung 14: Analyse der Interaktion von Spred1 und MARKK mittels GST-Pulldown**

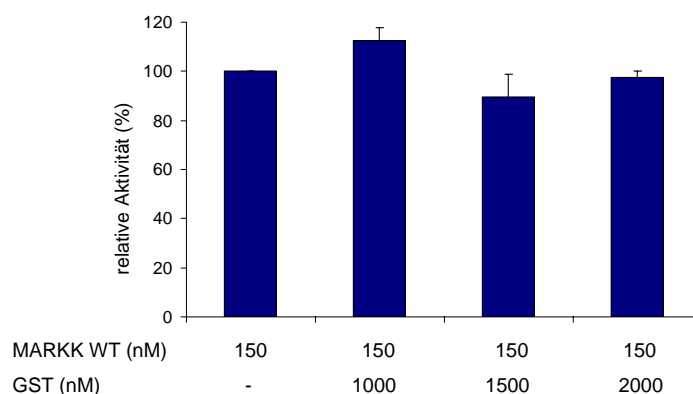
Für den Pulldown wurden aufgereinigte Proteine in einem Endvolumen von 150  $\mu$ l gemischt. Zunächst wurden 0,6  $\mu$ M GST oder 0,17  $\mu$ M GST\_Spred1 mit 15  $\mu$ l 50 % Gutathion-Sepharose bei 4°C für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde den entsprechenden Ansätzen 0,3  $\mu$ M His\_MARKK zugegeben und bei 4°C über Nacht auf einem Rotor inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen, das Pellet gründlich gewaschen und anschließend in 30  $\mu$ l 2  $\times$  Proteinprobenpuffer aufgenommen. Zur Auswertung wurden Lysate (10  $\mu$ l), die Überstände (10 $\mu$ l) und die Pellets (3  $\mu$ l) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

Die in den Hefe Zwei-Hybrid Tests ermittelte Interaktion von Spred1 und MARKK konnte durch die Ergebnisse des durchgeführten Pulldown-Assays klar bestätigt werden. Es handelt sich um eine sehr starke Bindung, wie die Western Blot Analysen eindeutig belegen. Die mitgeführten Kontrollen waren alle negativ, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um eine spezifische Bindung zwischen MARKK und Spred1 handelt. Der Einsatz der geringeren Menge an GST\_Spred1 Protein im Vergleich zu GST, muss mit der geringen Verfügbarkeit auf Grund der schwierigen Aufreinigung erklärt werden.

Das erhaltene Ergebnis zeigt, dass Spred1 und MARKK sehr stark aneinander binden können. Die Auswertung der gemessenen Signalintensitäten von MARKK im Western Blot (mittels AIDA Software, Raytest) lässt darauf schließen, dass nahezu das gesamte MARKK an Spred1 gebunden hat (sehr schwaches Signal im Überstand). Bei zusätzlicher Berücksichtigung der eingesetzten Mengen an GST\_Spred1 (0,17  $\mu$ M) und His\_MARKK (0,3  $\mu$ M) kann demnach geschlossen werden, dass mindestens zwei Moleküle MARKK an ein Molekül Spred1 binden können.

### 6.2.4 *In vitro* Untersuchungen zur Aktivität der MARKK in Gegenwart von Spred1

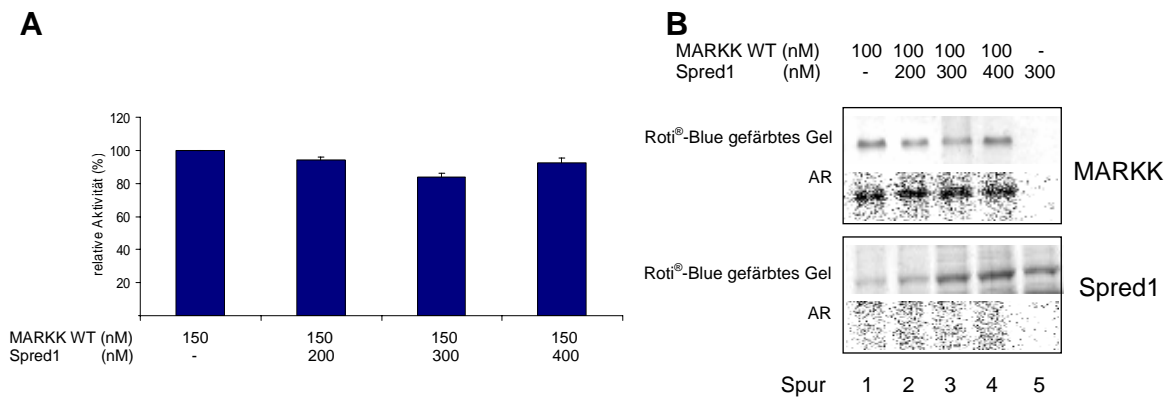
Bei der untersuchten MARKK handelt es sich um eine katalytisch aktive Proteinkinase, die einen Einfluss auf die Organisation des MT-Netzwerkes ausüben kann. Für den neu identifizierten Bindungspartner Spred1 ist bislang vor allem eine Funktion als Regulatorprotein bekannt. So interagiert es mit Ras und Raf und unterbindet die Signalweiterleitung, also die Aktivierung von Raf. Die neu charakterisierte Interaktion zu MARKK lässt darauf schließen, dass Spred1 auch die Aktivität dieser Kinase beeinflussen kann. Dieser Vermutung sollte mittels *in vitro* Kinase Aktivitäts-Assays nachgegangen werden (5.2.8). Die MARKK-Aktivität kann dabei über die Phosphorylierung des LIP-Peptids detektiert werden. Es handelt sich bei diesem Peptid um die Sequenz der MARK2 Aktivierungsschleife, weshalb es sich als spezifisches Substrat eignet. Die rekombinanten Proteine wurden aus Sf9-Zellen (His\_MARKK) bzw. *E. coli* (GST\_Spred1) aufgereinigt (5.2.1 und 5.2.2). Für die Aktivitäts-Assays wurden beide Proteine in verschiedenen Mengenverhältnissen in Anwesenheit des LIP-Substratpeptids und radioaktiv markiertem ATP für zwei Stunden inkubiert. Um auszuschließen, dass GST alleine die Aktivität von MARKK verändert, wurden die in Abbildung 15 dargestellten Kontrollen durchgeführt. Die Inkubation von MARKK WT allein mit dem LIP-Substratpeptid führte unter den gewählten Bedingungen zum Einbau von 0,025 mol Phosphat pro mol Peptid. Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Zugabe von GST, welches für die Aufreinigung an Spred1 fusioniert war, zu keiner Veränderung der MARKK WT-Aktivität führt (Abb. 15).



**Abbildung 15: *in vitro* Kinase Aktivitäts-Assay zur Kontrolle des Einflusses von GST auf MARKK WT**  
 GST und MARKK wurden zusammen mit dem LIP-Substrat (100  $\mu$ M) und radioaktivem ATP inkubiert. Die Aktivität der MARKK kann über die Phosphorylierung des LIP-Peptides analysiert werden. Im Diagramm sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Kinaseaktivität von MARKK WT allein wurde mit 100 % relativer Aktivität gleichgesetzt und entspricht einen Phosphateinbau

von 0,025 mol Phosphat je mol Substratpeptid. Die Zugabe unterschiedlicher Mengen an GST hat keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der MARKK.

Unter diesen Voraussetzungen war es möglich, den Einfluss von Spred1 auf MARKK zu untersuchen. Die Ergebnisse in Abbildung 16 zeigen allerdings, dass auch Spred1 nicht in der Lage war, die MARKK-Aktivität signifikant zu verändern.



**Abbildung 16: Spred1 übt keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von MARKK aus**  
 Spred1 und MARKK wurden zusammen mit dem LIP-Substrat (100  $\mu$ M) und radioaktivem ATP inkubiert. Die Aktivität der MARKK kann über die Phosphorylierung des LIP-Peptides analysiert werden. **A)** Auswertung des durchgeführten Filter-Assays. Die Kinaseaktivität von MARKK WT allein wurde mit 100 % relativer Aktivität gleichgesetzt (entspricht Einbau von 0,025 mol Phosphat pro mol LIP-Peptid). Die Zugabe unterschiedlicher Mengen an Spred1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die MARKK-Aktivität. Im Diagramm sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. **B)** Zur Untersuchung der Phosphorylierungszustände von MARKK und Spred1 wurden die Proteine nach dem Aktivitäts-Assay mittels SDS-Page aufgetrennt und der Phosphorylierungsstatus analysiert.

Weiterhin wurde untersucht, ob Spred1 von MARKK phosphoryliert werden kann und ob Spred1 die Autophosphorylierung von MARKK verändert (Abb. 16 B). Doch auch hier zeigte sich, dass die beiden Proteine keinen Einfluss aufeinander ausüben. Die verwendete MARKK WT Kinase wies Autophosphorylierung auf, wobei sich der Phosphorylierungsstatus durch die Zugabe von Spred1 nicht änderte (Spur 1 im Vergleich zu 2-4). Bei der Betrachtung von Spred1 konnte festgestellt werden, dass dieses Protein allein keine Phosphorylierung zeigte (Spur 5). Auch die Inkubation mit MARKK WT führte unter den gewählten Bedingungen zu keiner Phosphorylierung (Spuren 2-4). Somit kann davon ausgegangen werden, dass Spred1 kein Substrat von MARKK ist.

Aus den vorliegenden Ergebnissen muss geschlossen werden, dass Spred1 zwar an MARKK WT binden kann, dass jedoch diese Bindung zu keiner Änderung der Kinaseaktivität führt.

## 6.2.5 Expressionsstudien von MARKK und Spred1

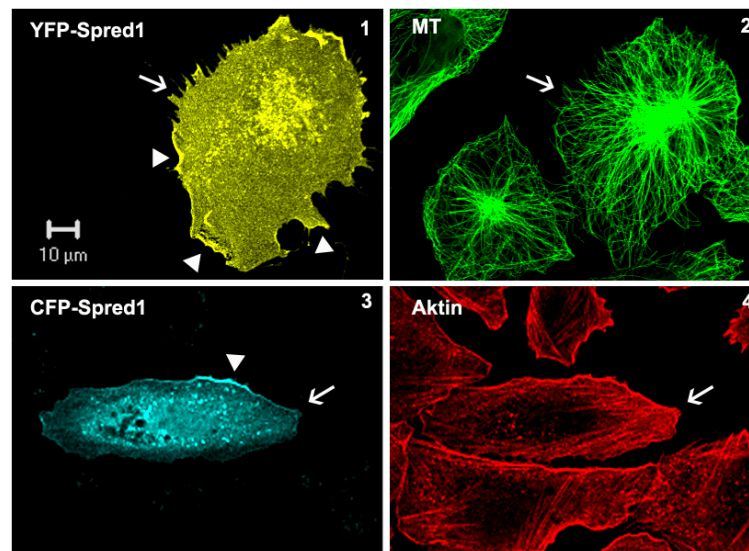
Im Folgenden sollte untersucht werden, ob und wie sich die neu identifizierten Interaktionspartner in Zellen gegenseitig beeinflussen. Auch wenn die Ergebnisse der *in vitro* Aktivitätstests keinen Einfluss von Spred1 auf MARKK vermuten lassen (6.2.4), ist eine Untersuchung des Proteinkomplexes in Zellen wichtig. Möglicherweise ist durch die Aufreinigung die Struktur der Proteine verändert, oder es fehlen Ko-Faktoren bzw. weitere Bindungspartner, die für eine funktionelle Wechselwirkung von Spred1 und MARKK erforderlich sind. Als Modell-Zellsystem dienten CHO Zellen (4.4.3).

### 6.2.5.1 Einzelexpression von Spred1 und MARKK in CHO Zellen

Zunächst sollte das Expressionsmuster von Spred1 und MARKK einzeln in Zellen untersucht werden. Die Analyse erfolgte durch konfokale Mikroskopie, wobei Spred1 zuerst in geeignete Vektoren umklontiert wurde, um fluoreszierende Fusionsproteine zu erhalten (4.8).

#### Expression von Spred1

Wurde Spred1 in CHO Zellen überexprimiert, zeigte es eine vorwiegend zytoplasmatische Verteilung (Abb. 17 1-4). In einigen Zellen konnte auch eine verstärkte Lokalisation an der Membran festgestellt werden, wie es von Miyoshi und Kollegen publiziert wurde (Miyoshi *et al.* 2004). Wurden gleichzeitig das Mikrotubuli- oder das Aktin-Netzwerk untersucht, ließen sich keinerlei Veränderungen im Vergleich zu nicht transfizierten Nachbarzellen feststellen (2 und 4). Somit scheint die Expression von Spred1 zumindest in den verwendeten CHO Zellen keinen Einfluss auf das Zytoskelett auszuüben.

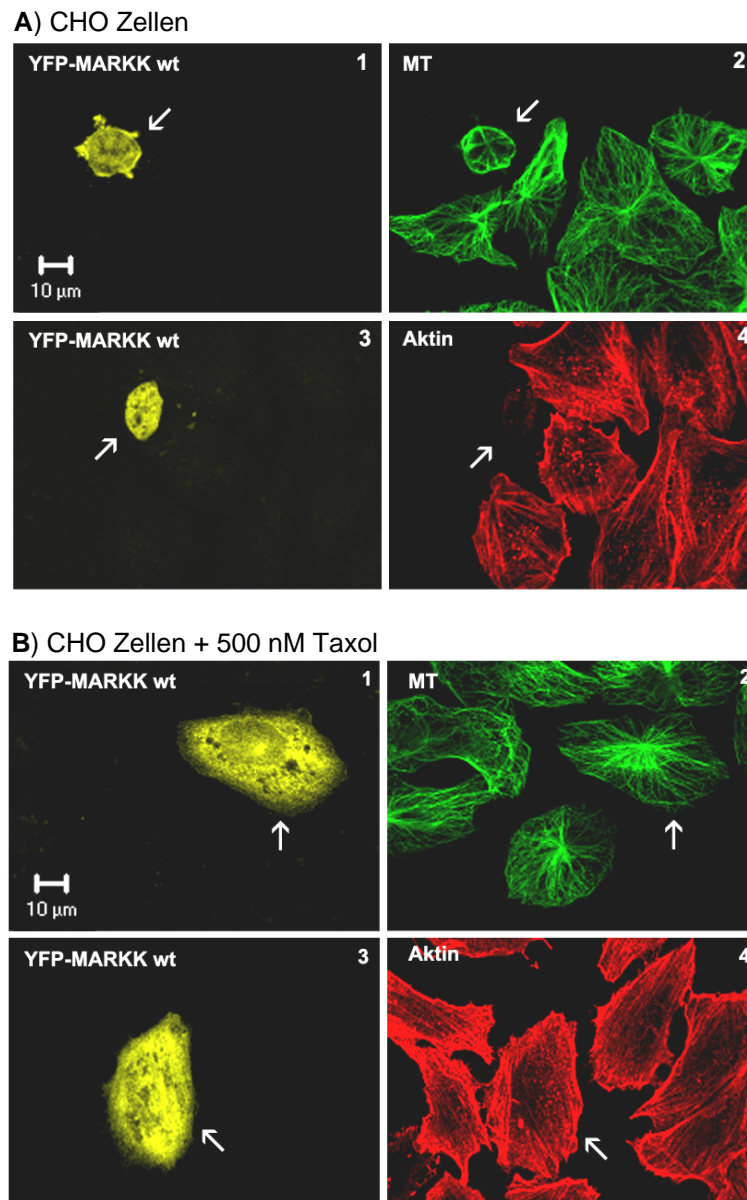


**Abbildung 17: Zelluläre Lokalisation von Spred1 in CHO Zellen**

CHO Zellen wurden mit CFP-Spred1 transfiziert, nach 17 h fixiert und das MT-Netzwerk (anti- $\alpha$ -Tubulin YL1/2, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) bzw. Aktin-Netzwerk (anti- $\beta$ -Aktin, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. Spred1 zeigte eine vorwiegend zytoplasmatische Verteilung in CHO Zellen. Teilweise konnte eine verstärkte Lokalisation an der Plasmamembran beobachtet werden (weiße Pfeilspitze in 1 und 3). Die Organisation des MT- und Aktin-Netzwerkes wurde durch die Expression von Spred1 nicht beeinflusst (2 bzw. 4). Transfizierte Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

### Expression von MARKK WT

Ein ganz anderes Bild bot sich, wurde MARKK WT in CHO Zellen überexprimiert. Diese Zellen zeigten einen sehr augenfälligen Phänotyp. Im Gegensatz zu untransfizierten Zellen, erschienen die MARKK exprimierenden Zellen klein und rund (Abb. 18A 1-4). Letztendlich führte die Expression zum Absterben der Zellen. Die Ursachen für diesen Effekt wurden in unserem Labor untersucht und sind in Timm *et al.* beschrieben (Timm *et al.* 2003). MARKK aktiviert die MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase MARK, welche die Mikrotubuli-stabilisierenden MAP Proteine phosphoryliert (siehe auch 3.2.1.2). Dies reduziert die Bindungsaffinität der MAPs an die Mikrotubuli und führt zum Zusammenbruch des Mikrotubuli Netzwerkes (Abb. 18 2). Als Folge wird auch das Aktin-Netzwerk gestört (Abb. 18 4). Um trotzdem Informationen über die zelluläre Verteilung von MARKK zu erhalten, kann das MT-Netzwerk mittels Taxol stabilisiert werden. Erfolgte die Expression von MARKK in Taxol-stabilisierten Zellen, wies auch MARKK eine zytoplasmatische Verteilung auf (Abb. 18B 1-4).



**Abbildung 18: Zelluläre Verteilung von MARKK in CHO Zellen**

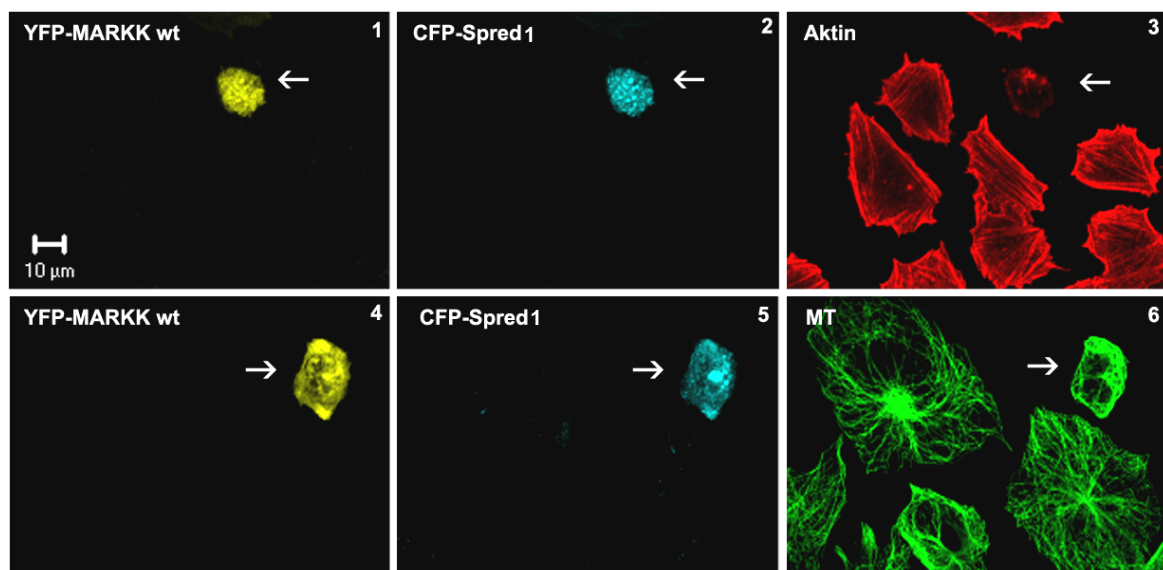
CHO Zellen wurden mit YFP-MARKK WT transfiziert, nach 17 h fixiert und das MT-Netzwerk (anti- $\alpha$ -Tubulin DM1 $\alpha$ , Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper), sowie das Aktin-Netzwerk (anti- $\beta$ -Aktin, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. **(A)** Wurden MARKK WT in CHO Zellen exprimiert, führte dies zu dramatischen Veränderungen der Zellmorphologie. Die Zellen rundeten sich ab und lösten sich vom Substrat (1-4). MT- und Aktin-Netzwerk brachen zusammen (2/4). **(B)** Wurde das MT-Netzwerk durch Behandlung der Zellen mit 500 nM Taxol stabilisiert, zeigten die Zellen einen normalen Phänotyp. MARKK befand sich im Zytoplasma (1/3). MT- und Aktin-Netzwerk zeigten keine Veränderungen (2/4). Transfizierte Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

### 6.2.5.2 Koexpressionsstudien von Spred1 und MARKK WT in CHO Zellen

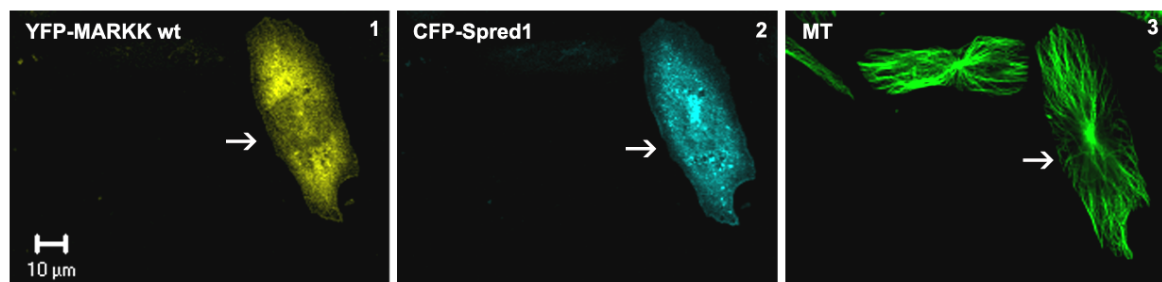
Die gleichzeitige Expression von MARKK und Spred1, sollte Aufschluss darüber geben, ob Spred1 in Zellen in der Lage ist MARKK zu beeinflussen.

Die Ergebnisse der Koexpressionsstudien gehen mit denen der *in vitro* Kinase Aktivitäts-Assays konform. Werden Spred1 und MARKK WT gemeinsam exprimiert, zeigen die Zellen den gleichen Phänotyp wie bei einer MARKK WT Einzeltransfektion. Die Zellen sind klein, rund und sterben ab (Abb. 19A). MT- und Aktin-Netzwerk sind völlig zerstört. Bei Stabilisierung des MT-Netzwerkes mittels Taxol wurde für beide Proteine eine zytoplasmatische Verteilung beobachtet (Abb. 19B).

#### A) CHO Zellen



#### B) CHO Zellen + 500 nM Taxol



#### Abbildung 19: Koexpression von MARKK WT und Spred1 in CHO Zellen

CHO Zellen wurden gleichzeitig mit YFP-MARKK WT und CFP-Spred1 transfiziert, nach 17 h fixiert und das MT-Netzwerk (anti- $\alpha$ -Tubulin DM1 $\alpha$ , Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) sowie das Aktin-Netzwerk (anti- $\beta$ -Aktin, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. (A) Die gemeinsame Expression von Spred1 und MARKK in CHO Zellen führte wie die MARKK WT Einzelexpression zum Abrunden und Ablösen der Zellen. MT- und Aktin-Netzwerk waren völlig zerstört. (B) Wurde das MT-Zytoskelett durch die zusätzliche Inkubation mit Taxol stabilisiert, zeigten Spred1 und MARKK eine zytoplasmatische Verteilung in der Zelle. MT zeigten keine Veränderungen. Transfizierte Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

Somit muss also abschließend festgestellt werden, dass die Interaktion von Spred1 mit MARKK WT keinen Einfluss auf die Aktivität der Kinase hat.

## 6.3 Untersuchungen zur Interaktion von TESK1 und Spred1

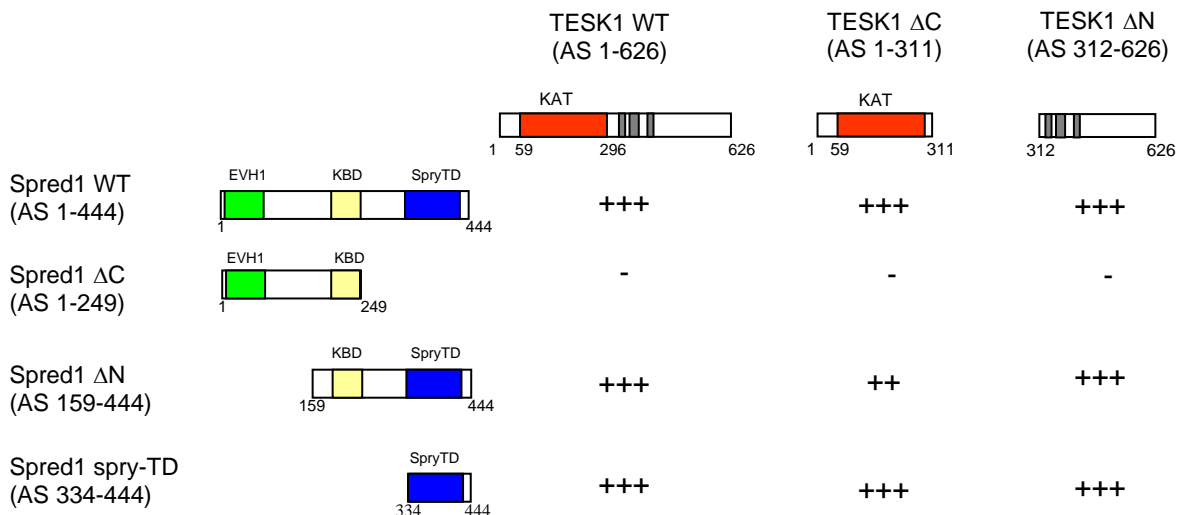
Das Interesse an der Aktin-regulierenden Kinase TESK1 wurde in unserem Labor geweckt, als TESK1 in einem genetischen Screen in *Drosophila* als Verstärker der Tau-Toxizität identifiziert wurde (Shulman und Feany 2003). TESK1 war bislang vor allem im Zusammenhang mit der Organisation des Aktin-Netzwerkes beschrieben worden (Toshima *et al.* 2001). Es ist in der Lage, das Aktin-depolymerisierende Protein Cofilin durch Phosphorylierung zu inaktivieren und führt so zu einem stabilen Aktin-Netzwerk mit verstärkten Stressfasern. Könnte TESK1 neben dieser Funktion auch auf das MT-stabilisierende Protein Tau wirken, wäre diese Kinase eine neue Schnittstelle in der Signalleitung zwischen Aktin und Mikrotubuli.

Eine Wechselwirkung der Kinase TESK1 mit dem neuen MARKK-Bindungspartner Spred1 wurde vermutet, da eine Interaktion zu *sprouty4* – einem mit Spred1 verwandten Protein – schon bekannt war (Leeksma *et al.* 2002, Tsumura *et al.* 2005).

### 6.3.1 Kartierung der Interaktionsdomänen von TESK1 und Spred1 mittels direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests

Zu Beginn sollte mit Hilfe direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests festgestellt werden, ob Spred1 und TESK1 wie vermutet aneinander binden können. Nachdem sich gezeigt hatte, dass dies tatsächlich der Fall war, sollten die Interaktionsdomänen in beiden Proteinen näher eingegrenzt werden. Hierzu wurden in einem ersten Schritt verschiedene Konstrukte von TESK1 in Hefevektoren kloniert (4.8). Die Resultate der anschließend durchgeführten direkten Zwei-Hybrid Tests sind in Abbildung 20 zusammengefasst.





**Abbildung 20: Charakterisierung der Interaktionsdomänen zwischen TESK1 und Spred1**

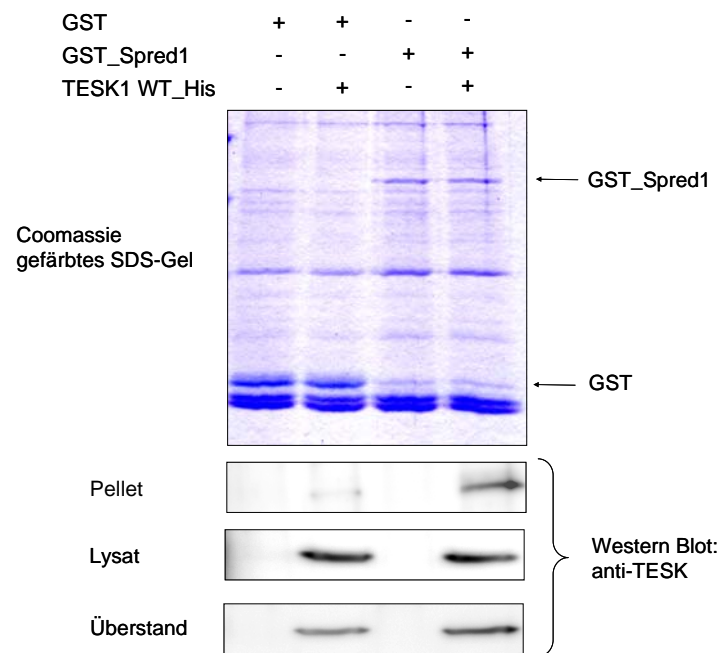
Schematische Darstellung der durch direkte Hefe Zwei-Hybrid Tests ermittelten Interaktionen zwischen verschiedenen TESK1- und Spred1-Konstrukten. Die Bindung von Spred1 an TESK1 erfolgt über die carboxyterminale sprouty-Translokationsdomäne (spr-TD). In TESK1 scheint es zwei Bindungsstellen zu geben. Eine Wechselwirkung mit Spred1 konnte sowohl mit der N-terminalen Kinasedomäne, als auch mit der C-terminalen regulatorischen Domäne nachgewiesen werden. Die einzelnen Domänen sind unterschiedlich farblich gekennzeichnet: Ena/VASP homologe Domäne (EVH-1, grün), c-Kit Bindungsdomäne (KBD, gelb), sprouty-Translokationsdomäne (spry-TD, blau), Kinasedomäne (KAT, rot) und konservierte Regionen (grau).

Bei der beobachteten Interaktion zwischen Spred1 und TESK1 in Hefen handelt es sich um eine sehr starke Bindung. Diese wird in Spred1 durch die sprouty-Translokationsdomäne am C-Terminus vermittelt. Für TESK1 kann die Interaktionsdomäne nicht eingegrenzt werden, da eine Bindung von Spred1 sowohl an das N-terminale, als auch an das C-terminale Fragment der TESK1 möglich ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Untersuchung der Interaktion zwischen sprouty4 und TESK1 erhalten (Tsumura *et al.* 2004).

### 6.3.2 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen TESK1 und Spred1

Die in Hefen identifizierte Interaktion von TESK1 und Spred1 sollte mittels GST-Pulldown überprüft werden (5.2.7). Hierzu wurde His\_TESK1 WT in Sf9-Zellen exprimiert. Das nach Zellaufschluss erhaltene Lysat wurde mit aufgereinigtem GST-fusionierten Spred1 inkubiert und anschließend über eine Glutathion Sepharose Matrix sedimentiert. Parallel mitgeführte Kontrollansätze enthielten entweder GST anstelle von GST\_Spred1 oder ein Sf9-Lysat ohne TESK1. Die Analyse des Sepharose-GST-Protein Präzipitats erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot (5.2.4 und 5.2.5). Die Abbildung

21 zeigt stellvertretend die Ergebnisse eines Experimentes. Die in Hefen beobachtete Bindung zwischen TESK1 und Spred1 konnte durch den Pulldown bestätigt werden. TESK1 konnte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers im Spred-GST-Sepharose-Komplex nachgewiesen werden. Dies war nicht der Fall, wenn GST anstelle von GST\_Spred verwendet wurde, was die Spezifität der Bindung belegt. Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt neben GST und GST\_Spred1 weitere Banden, was auf die Bindung weiterer Proteine schließen lässt. Da die Banden in allen vier Ansätzen vorhanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich größtenteils um unspezifische Wechselwirkungen handelt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige dieser Proteine einen fördernden bzw. hemmenden Einfluss auf die Bindung zwischen TESK1 und Spred1 ausüben.



**Abbildung 21: Analyse der Interaktion von Spred1 und TESK1 mittels GST-Pulldown**

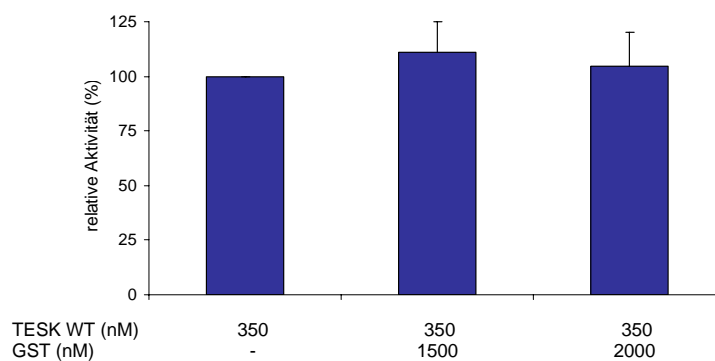
His\_TESK1 exprimierende und uninfizierte Sf9-Zellen wurden lysiert und 150  $\mu$ l des Überstandes mit GST (0,6  $\mu$ M) bzw. GST\_Spred1 (0,17  $\mu$ M) und 15  $\mu$ l Glutathion-Sepharose bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen, das Pellet gewaschen und anschließend in 30  $\mu$ l 2  $\times$  Proteinprobenpuffer aufgenommen. Zur Auswertung wurden Lysate (10  $\mu$ l), der Überstand (10  $\mu$ l) und die Pellets (5  $\mu$ l) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

### 6.3.3 *In vitro* Untersuchungen zur Aktivität der TESK1 in Gegenwart von Spred1

Die durchgeführten Kinase Aktivitäts-Assays sollten Aufschluss darüber geben, ob die Wechselwirkung mit Spred1 die Aktivität der Kinase TESK1 beeinflussen kann. Für das verwandte Protein sprouty4, welches auch an TESK1 bindet, konnte eine Hemmung der TESK1-Aktivität nachgewiesen werden (Tsumura *et al.* 2004). Zunächst wurde TESK1 in geeignete Expressionsvektoren subkloniert (4.8) und aus Sf9-Zellen aufgereinigt (5.2.2). Ähnlich wie bei Spred1 gestaltete sich die rekombinante Expression und Aufreinigung der Kinase TESK1 schwierig. Expressionsversuche in *E. coli* blieben erfolglos. Die Expressionsraten, welche in Sf9-Zellen mit dem Baculovirus-System erzielt wurden, waren zwar gering, doch ermöglichten die Aufreinigung der aktiven Kinase. Für die anschließenden Aktivitätsbestimmungen wurde TESK1 zusammen mit seinem Substrat Cofilin in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Über den Phosphorylierungszustand von Cofilin konnten Rückschlüsse auf die Aktivität der Kinase TESK1 gezogen werden (5.2.8).

Zunächst musste überprüft werden, ob das für die Aufreinigung an Spred1 fusionierte GST-Protein alleine einen Einfluss auf die Aktivität der TESK1 ausübt. Denn nur, wenn dies ausgeschlossen werden kann, können die durch GST\_Spred1 beobachteten Effekte eindeutig der Wechselwirkung mit Spred1 zugeschrieben werden.

TESK1 wurde zusammen mit dem Substrat Cofilin, GST und [<sup>32</sup>P]-ATP bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und die Auswertung der Substratphosphorylierung mit Hilfe der AIDA Software (5.2.4 und 5.2.8).



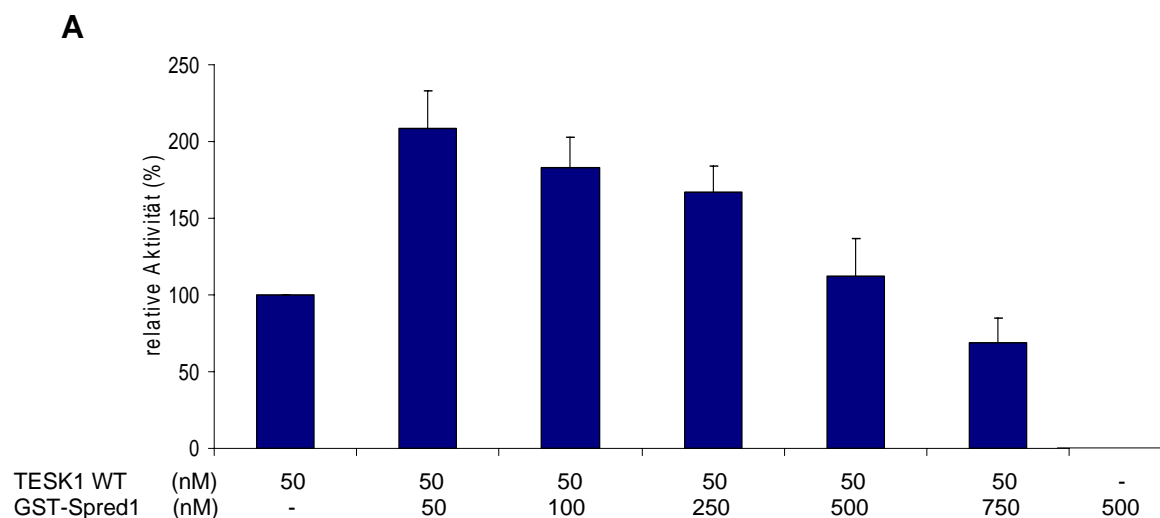
**Abbildung 22: GST hat keinen Einfluss auf die Aktivität von TESK1**

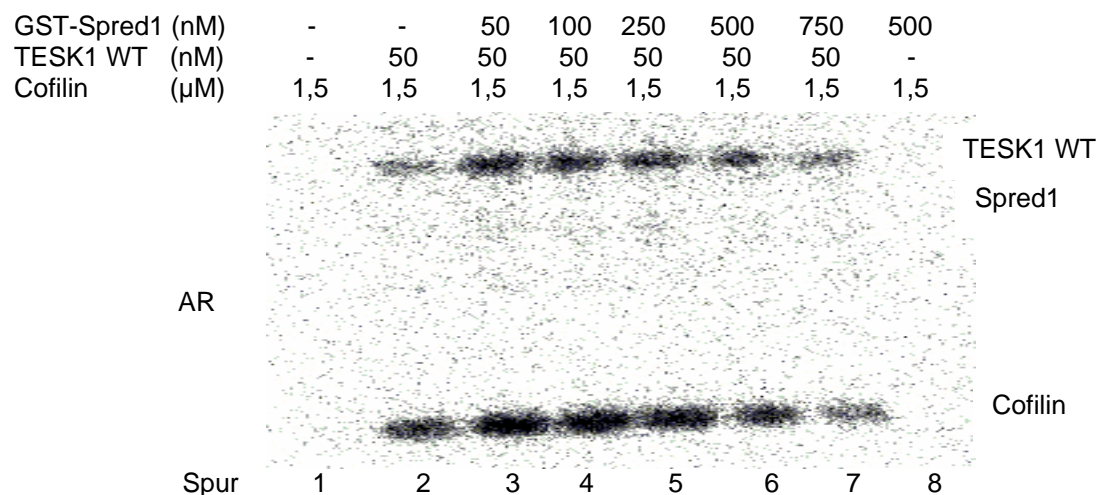
TESK1 WT und GST wurden zusammen mit Cofilin (1,4 µM) und radioaktivem ATP inkubiert, um den Einfluß von GST auf die TESK1-Kinaseaktivität zu überprüfen. Die Aktivität ließ sich anhand der

Phosphorylierung von Cofilin analysieren. Es ist eindeutig erkennbar, dass die TESK1-Aktivität nicht durch GST beeinflusst wird.

Die Aktivität von TESK1 allein wurde als 100 % relative Aktivität gesetzt und entspricht einem Einbau von 0,035 mol Phosphat pro mol Cofilin (Abb. 22). Die Zugabe von unterschiedlichen GST-Mengen führte zu keiner Veränderung der TESK1-Aktivität. Somit können alle Ergebnisse, die mit dem Fusionsprotein GST\_Spred1 erhalten werden, auf Spred1 zurückgeführt werden.

Anschließend sollte der Einfluss des Interaktionspartners Spred1 auf die Kinaseaktivität von TESK1 untersucht werden. Hierzu wurden die aufgereinigten Proteine (TESK1 WT, GST\_Spred1 und Cofilin) mit radioaktiv markiertem ATP für zwei Stunden bei 30°C inkubiert, anschließend in einem SDS-Gel aufgetrennt und der Phosphorylierungszustand des TESK-Substrates Cofilin analysiert (5.2.8). Die verwendete Kinase TESK1 WT war aktiv und führte unter den gewählten Bedingungen zu einem Einbau von 0,035 mol Phosphat pro mol Cofilin. Zur Auswertung wurde diese Aktivität als 100 % relative Aktivität gesetzt. Wird dem Reaktionsansatz Spred1 in einem äquimolarem Verhältnis zugefügt, steigt die Aktivität sprunghaft auf über 200 % an (Abb.23). Mit weiter steigender Spred1-Konzentration verringert sich allerdings der aktivierende Effekt. Bei einem ca. 15-fachem Überschuss an Spred1 ist die TESK1-Aktivität wieder auf ihr Ausgangsniveau abgesunken. Das gleiche Ergebnis wurde bei der Untersuchung der Aktivität der TESK1-Kinasedomäne (TESK1  $\Delta$ C) erhalten (nicht gezeigt).



**B****Abbildung 23: SPRED1 moduliert die Kinaseaktivität von TESK1**

TESK1 WT und Spred1 wurden zusammen mit Cofilin (1,4  $\mu$ M) und radioaktivem ATP inkubiert. Die Aktivität von TESK1 kann über die Phosphorylierung von Cofilin analysiert werden. **A)** Auswertung der Autoradiogramme mit Hilfe der AIDA Software. Die Kinaseaktivität von TESK1 allein wurde mit 100 % relativer Aktivität gleichgesetzt (entspricht Einbau von 0,035 mol Phosphat pro mol Cofilin für TESK1 WT). Die Zugabe der äquimolaren Menge an Spred1 führt zu einem starken Anstieg der TESK1 Aktivität, die allerdings bei höheren Spred1-Konzentrationen wieder abnahm. **B)** Zur Untersuchung der Phosphorylierungszustände von TESK1 und Spred1 wurden die Proteine nach dem Aktivitäts-Assay mittels SDS-Page aufgetrennt und der Phosphorylierungsstatus mittels Autoradiogramm analysiert.

Betrachtet man die Autophosphorylierungszustände von SPRED1 und TESK1 ergibt sich folgendes Bild: TESK1 WT allein wies Autophosphorylierung auf, welche für die Aktivität der Kinase notwendig ist (Toshima *et al.* 1999) (Abb. 23 B Spur 2). Spred1 hingegen war unphosphoryliert (Spur 8). Wurden beide Proteine nun zusammen inkubiert, veränderte sich der Autophosphorylierungsgrad von TESK1 im gleichen Maße, wie die Aktivität. Äquimolare Mengen an Spred1 führten zu einer verstärkten Autophosphorylierung von TESK1, die aber mit steigender Spred1-Konzentration wieder abnahm (Spur 2-7). Der Phosphorylierungszustand von Spred1 änderte sich nicht, was darauf schließen lässt, dass TESK1 nicht in der Lage ist Spred1 zu phosphorylieren (vergleiche Spur 8 mit 2-7).

**6.3.4 Koexpressionsstudien der Interaktionspartner Spred1 und TESK1**

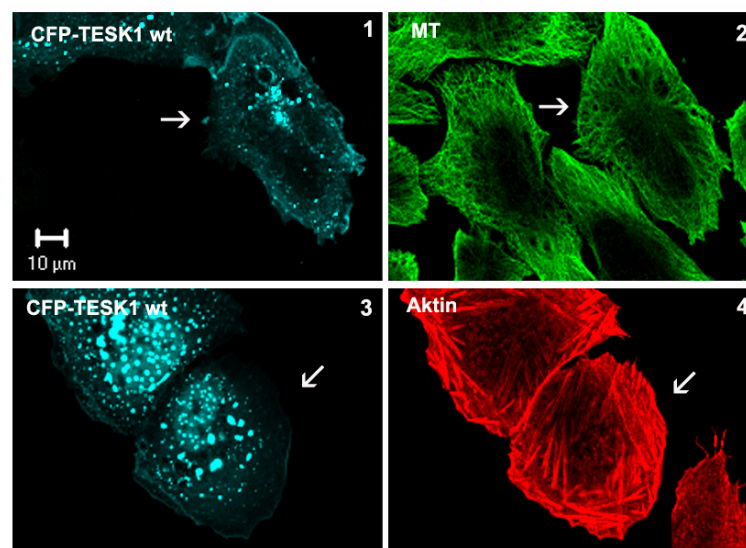
Nachdem ein Einfluss von Spred1 auf die TESK1-Aktivität in *in vitro* Assays beobachtet wurde, sollte untersucht werden, ob die identifizierte Interaktion zwischen TESK1 und Spred1 auch in Zellen stattfindet und welche funktionelle Bedeutung sie hat.

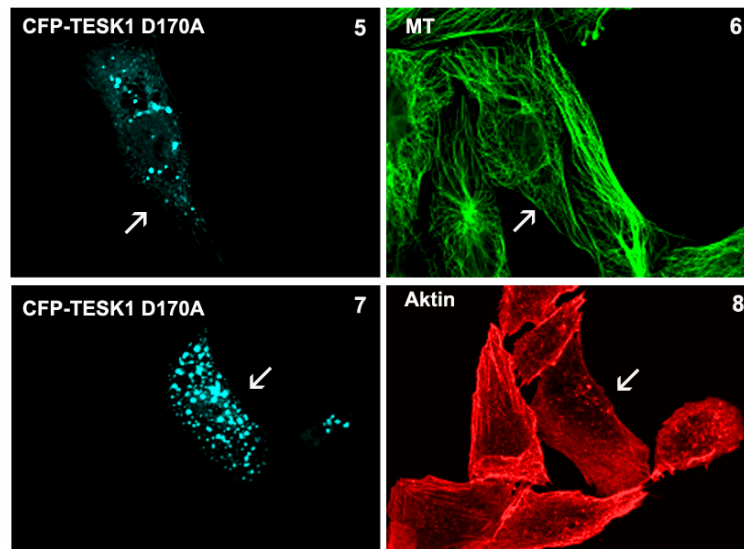
Für Spred1 konnte, wie in Abschnitt 6.2.5.1 beschrieben, eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation in der Zelle gezeigt werden. Die Expression von Spred1

hatte keinen sichtbaren Einfluss auf das Zytoskelett. Als nächstes wurden nun die zelluläre Verteilung und die Effekte der TESK1 auf das Zytoskelett untersucht.

#### 6.3.4.1 Einzelexpression von TESK1 in CHO Zellen

TESK1 ist an der Organisation des Aktin-Netzwerkes in der Zelle beteiligt. Diese Kinase kann durch Phosphorylierung den Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin inhibieren, was zu einer Stabilisierung des Aktins und zur verstärkten Ausbildung von Stressfasern führt (Toshima *et al.* 2001a). Dieser Effekt konnte auch in den verwendeten CHO Zellen beobachtet werden (Abb. 24 3-4). Auf das MT-Netzwerk hingegen hat die Expression von TESK1 WT größtenteils keinen Einfluss (1-2). In einigen Fällen führt die Expression allerdings dazu, dass die typische strahlenförmige Anordnung der Mikrotubuli gestört ist. Im Vergleich zu untransfizierten Zellen erscheinen die Mikrotubuli ungeordnet. Das die Effekte von TESK1 auf das Aktin-Zytoskelett von der Aktivität der Kinase abhängig sind, wird bei Verwendung der inaktiven Mutante TESK D170A deutlich. Die Expression dieser Mutante kann weder die Organisation des MT-Netzwerkes noch die des Aktin-Netzwerkes beeinflussen (Abb. 24 5-8).





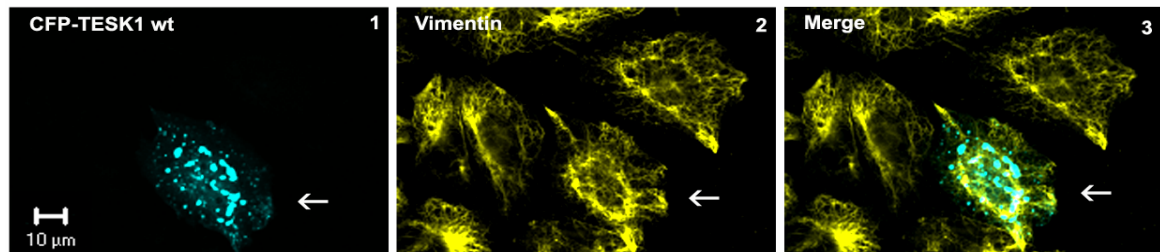
**Abbildung 24: Expression von TESK1 WT und TESK1 D170A (inaktiv) in CHO Zellen**

CHO Zellen wurden mit CFP-TESK1 WT oder CFP-TESK1 D170A transfiziert, nach 17 h fixiert und das MT-Netzwerk (anti- $\alpha$ -Tubulin DM1 $\alpha$ , Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper), sowie das Aktin-Netzwerk (anti- $\beta$ -Aktin, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. Auffällig ist die Lokalisation von TESK1 WT und der inaktiven Mutante TESK1 D170A in vesikulären Strukturen (1,3,5,7). Eine Expression von TESK1 WT führte zu einer erhöhten Stabilität des Aktin-Netzwerkes, was sich in einer Verstärkung der Aktin Stressfasern äußerte (3-4). Das MT-Netzwerk wurde weitgehend nicht beeinflusst (1-2). Die inaktive Mutante TESK1 D170A hatte keinen Einfluss auf das Zytoskelett. Aktin- und MT-Netzwerk blieben unverändert (5-8). Transfizierte Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

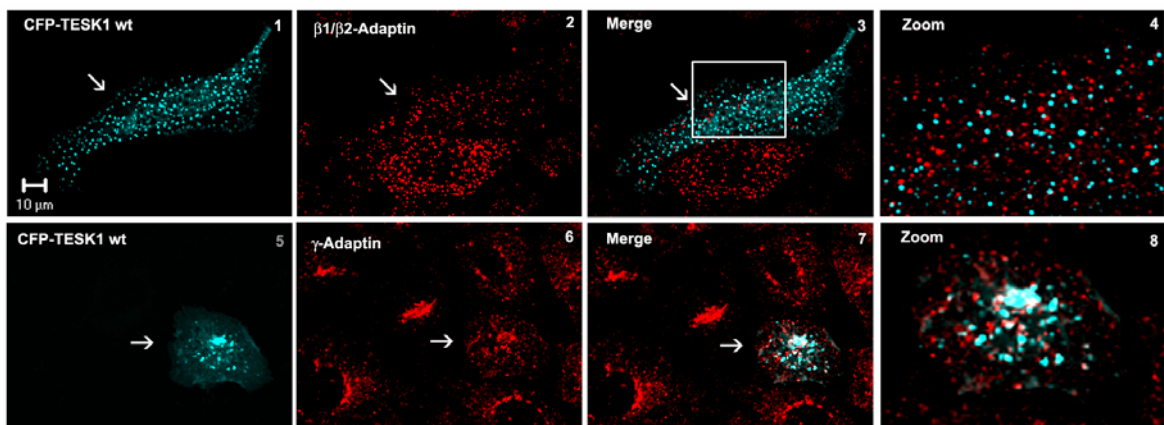
TESK1 WT wie auch die inaktive Mutante TESK1 D170A lokalisieren vorwiegend in vesikulären Strukturen (Abb. 24). Dies ist auch in der Literatur beschrieben (Tsumura *et al.* 2004, Toshima *et al.* 2001b). Doch es wurde bisher nicht genauer untersucht, um was für Vesikel es sich hierbei handelt. Zur Klärung dieser Frage, wurden in TESK1 WT transfizierten Zellen unterschiedliche Vesikeltypen mittels spezifischer Antikörper angefärbt. Außerdem wurde die Verteilung des Intermediärfilamentproteins Vimentin in der Zelle analysiert, um eine mögliche Aggresomenbildung auszuschließen. Bei Überexpression von exogenen Proteinen kann es zur Bildung von Aggresomen kommen, die sich am MTOC ablagern (Kopito 2000). Diese Proteinaggregate werden dann von einem so genannten Vimentin-Käfig (vimentin cage) umgeben. Doch die Ausbildung eines solchen Vimentin-Geflechts konnte in TESK1- exprimierenden Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 25A). Im Gegensatz zu Aggresomen, welche sich um den Zellkern anhäufen, sind die TESK1 Vesikel außerdem in der gesamten Zelle verteilt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den vesikulären Strukturen von TESK1 um Aggresomen handelt. Kolokalisationsstudien mit Adaptin-haltigen Vesikeln ( $\beta$ 1/2- und  $\gamma$ -Adaptin) waren negativ (Abb. 25B). Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den TESK1-Strukturen nicht um Vesikel des Trans-Golgi Netzwerkes oder um

Endosomen handelt. Auch die Untersuchungen zur Kolokalisation mit Golgi, Lysosomen und Mitochondria führten nicht zur Identifizierung der TESK1-Vesikel (Abb. 25C). Somit sind weitere Analysen zur Charakterisierung der TESK1-Vesikel notwendig.

### A) CHO Zellen



### B) CHO Zellen



### C) VERO Zellen

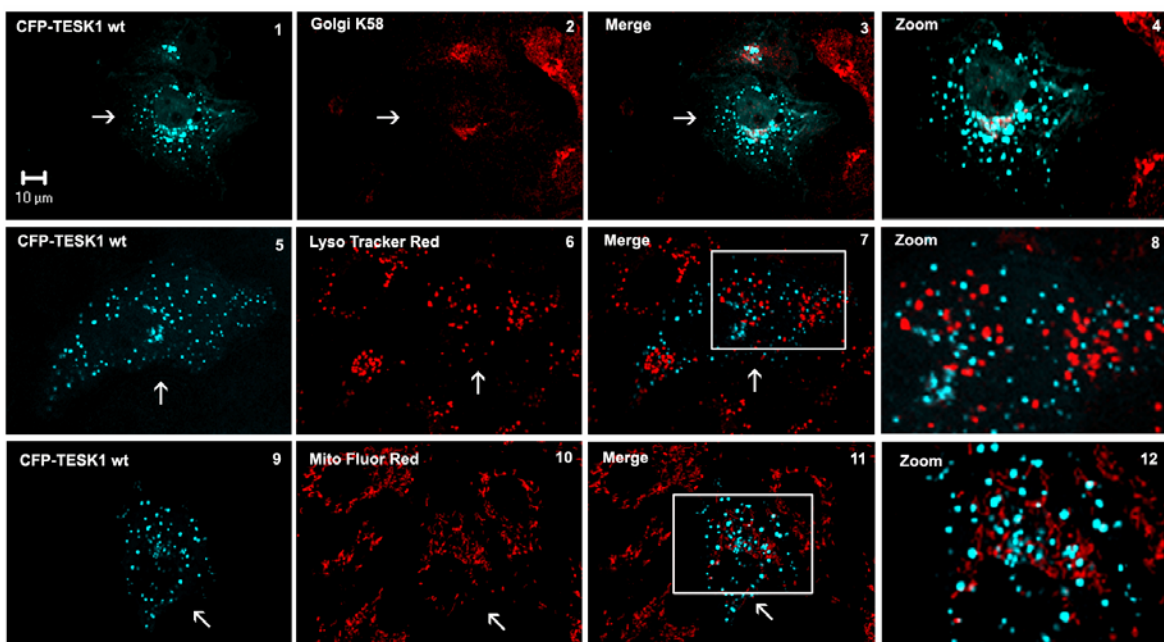


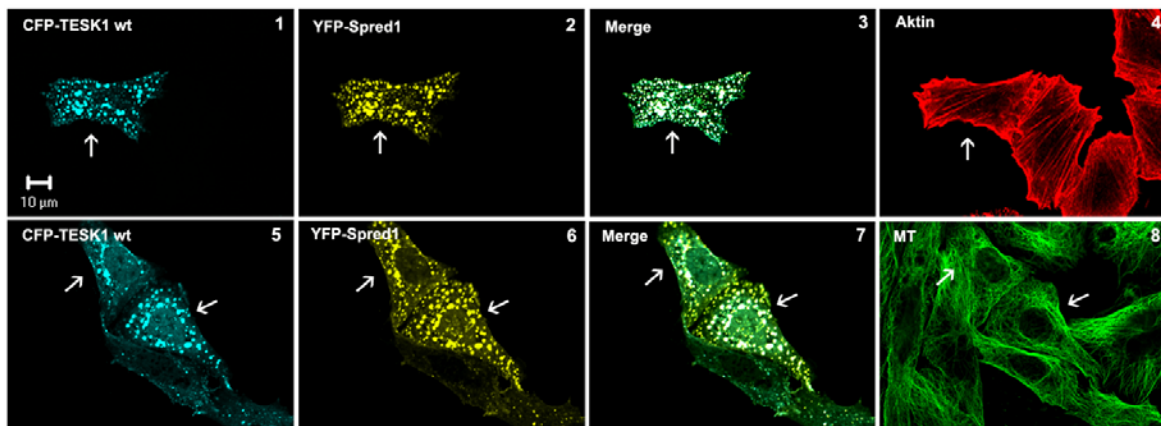
Abbildung 25: Untersuchung der TESK1-Vesikel



(A) CHO Zellen wurden mit CFP-TESK1 WT transfiziert und nach 17 h fixiert. Um auszuschließen, dass es sich bei den TESK1 Strukturen um Aggresomen handelt, wurde das Intermediärfilamentprotein Vimentin (anti-Vimentin V9, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. Die Ausbildung eines Vimentin-Käfigs konnte jedoch nicht beobachtet werden. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei den TESK1 Vesikeln nicht um Aggresomen handelt. (B) CHO Zellen wurden mit CFP-TESK1 WT transfiziert und nach 17 h fixiert. Zur weiteren Charakterisierung wurden Vesikel des Trans-Golgi Netzwerkes sowie Endosomen mittels verschiedener Adaptin Antikörper ( $\beta$ 1/ $\beta$ 2-Adaptin und  $\gamma$ -Adaptin, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. Doch es konnte keine Kolo­kalisierung zwischen TESK1 und  $\beta$ 1/ $\beta$ 2- bzw.  $\gamma$ -Adaptin beobachtet werden. (C) VERO Zellen wurden mit CFP-TESK1 WT transfiziert und für die Golgi-Färbung (anti Golgi 58K, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) nach 17 h fixiert. Für die Untersuchung von Lysosomen und Mitochondria wurden die lebenden Zellen mit den Farbstoffen (LysoTracker<sup>®</sup> Red DND-99, MitoFluor<sup>™</sup> Red 589) für 30 min bei 37°C inkubiert und die Verteilung anschließend beobachtet. Transfizierte Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

#### 6.3.4.2 Koexpressionsstudien von Spred1 und TESK1 in CHO Zellen

Durch Koexpression von Spred1 und TESK1 in CHO Zellen sollte überprüft werden, welche Wirkung Spred1 in Zellen auf die Aktivität von TESK1 ausüben kann. Da beide Proteine eine unterschiedliche Lokalisation in der Zelle aufweisen, war es fraglich, ob die in Hefe-Tests charakterisierte Wechselwirkung auch in der Zelle stattfindet. Hierzu wurden beide Proteine gleichzeitig in CHO Zellen transfiziert und anschließend die Auswirkungen auf das Zytoskelett analysiert (Abb. 26). Überraschender Weise konnte eine fast vollständige Kolo­kalisierung von Spred1 und TESK1 in Vesikeln beobachtet werden (Abb.26 3/7). Zusätzlich war in vielen Zellen auch eine diffuse zytosolische Lokalisation erkennbar. Spred1 ändert also seine zelluläre Verteilung und somit wird eine Wechselwirkung mit TESK1 möglich. Bei der Betrachtung des Aktins zeigte sich, dass Spred1 in Zellen in der Lage war, die Aktivität von TESK1 zu hemmen. Im Gegensatz zu TESK1 WT-überexprimierenden Zellen, die durch deutlich verstärkte Aktin Stressfasern gekennzeichnet waren (Abb. 24 3-4), unterschied sich das Aktin-Netzwerk in den doppelt transfizierten Zellen nicht von dem der untransfizierten (Abb. 26 1-4). Das gleiche galt für das MT-Netzwerk. Wurden TESK1 WT und Spred1 gleichzeitig exprimiert, erschienen Mikrotubuli in ihrer typischen Anordnung.



**Abbildung 26: Koexpression von Spred1 und TESK1 in CHO Zellen**

CHO Zellen wurden mit CFP-TESK1 WT und YFP-Spred1 transfiziert, nach 17 h fixiert und das MT-Netzwerk (anti- $\alpha$ -Tubulin DM1 $\alpha$ , Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper), sowie das Aktin-Netzwerk (anti- $\beta$ -Aktin, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. Spred1 und TESK1 WT kolokalisieren in vesikulären Strukturen. Das Aktin-Netzwerk unterscheidet sich nicht von dem der untransfizierten Zellen, was auf die Hemmung der TESK1-Aktivität durch Spred1 schließen lässt. Auch das MT-Netzwerk wird durch die Expression nicht beeinflusst. Transfizierte Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass Spred1, welches als neuer Interaktionspartner der MT-regulierenden Kinase MARKK identifiziert werden konnte, auch in der Lage ist, an die Aktin-regulierende Kinase TESK1 zu binden. Aber anders als bei der Interaktion mit MARKK führt die Wechselwirkung mit TESK1 zu einer Veränderung der TESK1-Kinaseaktivität. In Zellen ist Spred1 in der Lage die TESK1-Aktivität zu hemmen. Die Resultate der durchgeführten Untersuchungen führten zu der Hypothese, dass Spred1 möglicherweise eine Art Brückenfunktion einnimmt und als Vermittler zwischen den Signaltransduktionswegen des Aktin- und des Mikrotubuli-Netzwerkes fungiert.

## 6.4 Untersuchungen zur Interaktion von TESK1 und MARKK

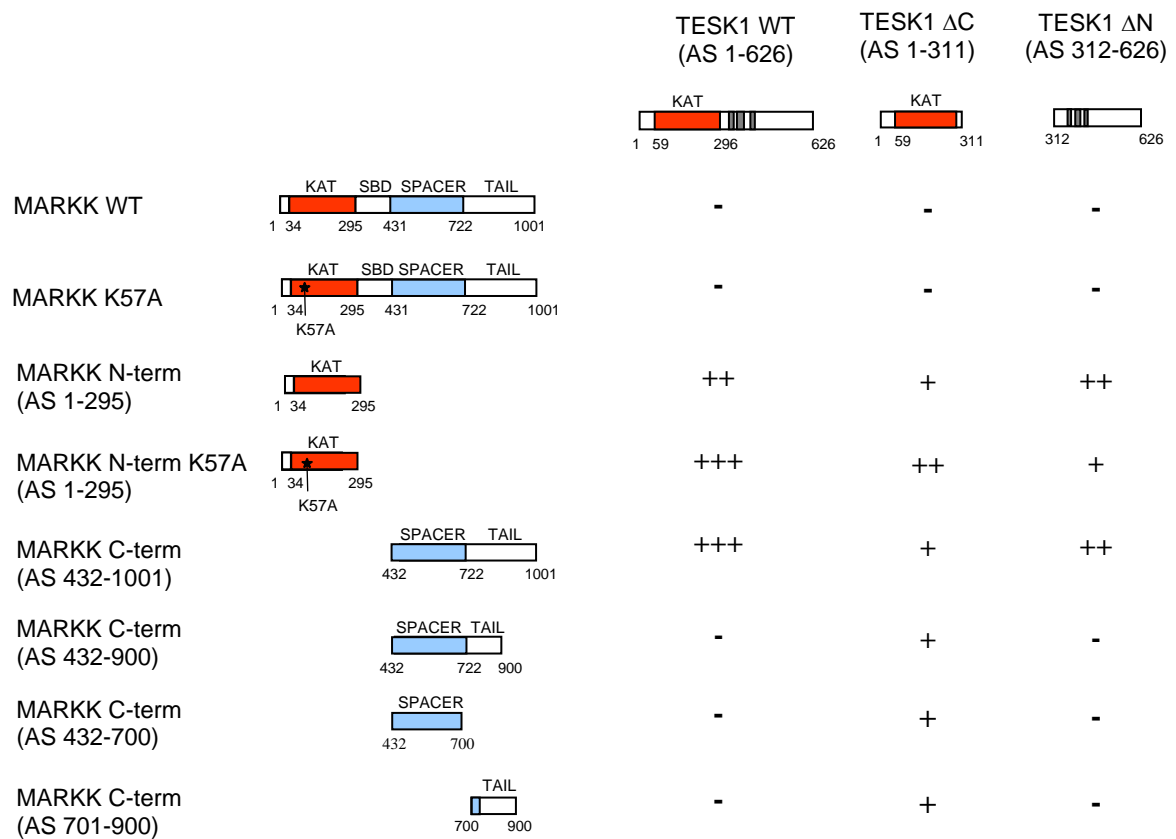
Für viele zelluläre Prozesse ist eine Dynamik des Zytoskeletts unerlässlich. Vorgänge wie Migration, Differenzierung und Zellteilung erfordern einen geordneten und regulierten Umbau aller Komponenten des Zytoskeletts. Darüber wie diese Koordination zwischen dem Aktin- und dem MT-Netzwerk funktioniert, ist bislang noch wenig bekannt. Die zwei Proteinkinasen MARKK und TESK1 regulieren die Dynamik des MT- bzw. Aktin-Netzwerkes. Im dritten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich die beiden Kinasen gegenseitig direkt beeinflussen können. Unter der Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse wurde vermutet, dass der gemeinsame Interaktionspartner Spred1

eine Vermittlerfunktion ausübt. Doch durchgeführte direkte Hefe Zwei-Hybrid Tests ergaben überraschender Weise, dass TESK1 und MARKK direkt aneinander binden können. Die Interaktion beider Kinasen sollte daraufhin näher untersucht werden.

#### **6.4.1 Interaktionstests von TESK1 und MARKK im Hefe Zwei-Hybrid System**

Mittels Interaktionstests im Hefe Zwei-Hybrid System sollte untersucht werden, ob und wie die Kinasen TESK1 und MARKK direkt aneinander binden können. Hierzu wurden verschiedene Konstrukte beider Proteine verwendet. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse aller Tests zusammengefasst. Eine Interaktion der vollständigen Kinasen miteinander konnte nicht beobachtet werden. Dagegen zeigte die vollständige TESK1 eine starke Bindung an jeweils den N- und den C-Terminus von MARKK. Dies lässt darauf schließen, dass es in MARKK mindestens zwei Interaktionsdomänen gibt. Auch für TESK1 kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. So kann die N-terminale Kinasedomäne von TESK1 sowohl mit der Kinasedomäne (N-terminal), als auch mit der C-terminalen Domäne von MARKK interagieren. Ein ähnliches Verhalten konnte für den C-terminalen regulatorischen Bereich von TESK1 beobachtet werden.

Versuche, die Interaktion von MARKK und TESK1 in Zellen durch Ko-Immunopräzipitationsexperimente nachzuweisen, verliefen bislang erfolglos. Dies ist vor allem auf schlechte Expressionsraten und unzureichende Antikörper zurückzuführen. Geplant ist die Klonierung einer GST-fusionierten TESK1, womit die Durchführung eines GST-Pulldown Bindungsassays möglich wird.



**Abbildung 27: Zusammenfassung der Interaktionstests zwischen MARKK und TESK1**

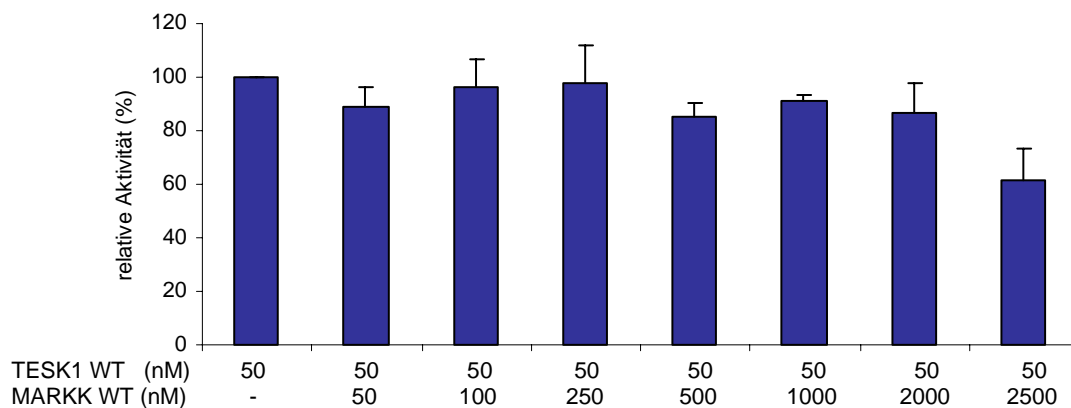
Schematische Darstellung der durch direkte Hefe Zwei-Hybrid Tests ermittelten Interaktionen zwischen verschiedenen TESK1 und MARKK Konstrukten. Die beiden vollständigen Kinasen sind nicht in der Lage aneinander zu binden. In MARKK existieren scheinbar zwei Interaktionsdomänen, da sowohl die N-terminale Kinasedomäne, als auch die C-terminale Domäne mit TESK1 WT interagieren kann. Auch in TESK1 scheint es keine einzelne Interaktionsdomäne zu geben. N- und C-terminale Bereiche können ähnlich stark an unterschiedliche MARKK Fragmente binden. Die einzelnen Domänen sind unterschiedlich farblich gekennzeichnet: Kinasedomäne (KAT, rot), konservierte Regionen (grau), Substratbindedomäne (SBD, weiß), Spacer (hellblau) und Schwanzsequenz (Tail, weiß).

#### 6.4.2 Einfluss der Interaktion zwischen MARKK und TESK1 auf deren Aktivitäten

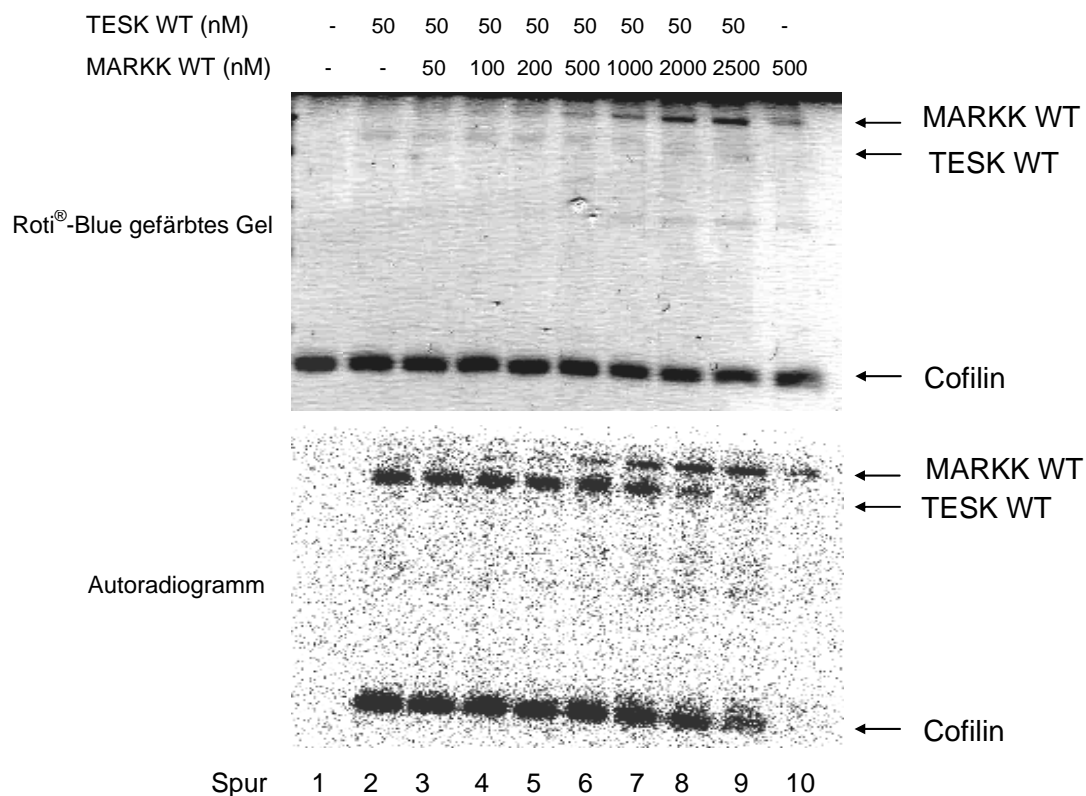
Nachdem eine direkte Bindung der beiden Kinasen TESK1 und MARKK aneinander gezeigt werden konnte, stellte sich natürlich die Frage, ob und welche Auswirkungen sich dadurch auf die jeweilige Kinaseaktivität ergeben. Um diese Frage zu beantworten, wurden *in vitro* Aktivitäts-Assays durchgeführt. Die hierfür verwendeten Proteine wurden in Sf9-Zellen exprimiert und anschließend aufgereinigt (5.2.1 und 5.2.2).

### 6.4.2.1 MARKK WT hat keinen Einfluss auf die Aktivität von TESK1

Zur Untersuchung des Einflusses von MARKK auf die Aktivität von TESK1 wurde die Veränderung des Phosphorylierungsgrades von Cofilin (TESK1-Substrat) in Gegenwart beider Kinasen mittels *in vitro* Aktivitäts-Assays analysiert (5.2.8). Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 28 zusammengefasst. Das Substrat Cofilin zeigt keine Autophosphorylierung und kann nicht durch die Kinase MARKK phosphoryliert werden (Abb. 28B Spur 1 bzw. 10). TESK1 WT ist in der Lage sein Substrat Cofilin zu phosphorylieren (Spur 2). Unter den gewählten Bedingungen kam es zu einem Einbau von 0,035 mol Phosphat pro mol Cofilin. Wurde dem Ansatz eine steigende Menge an MARKK WT zugegeben, hatte dies keinen signifikanten Einfluss auf die Cofilin-Phosphorylierung und somit auf die TESK1-Aktivität (Spur 2-8). Erst bei einer Inkubation mit einem 50-fachen Überschuss an MARKK konnte eine Verringerung der Cofilin-Phosphorylierung beobachtet werden (Spur 9).

**A**

## B

**Abbildung: 28: MARKK WT hat keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität von TSK1**

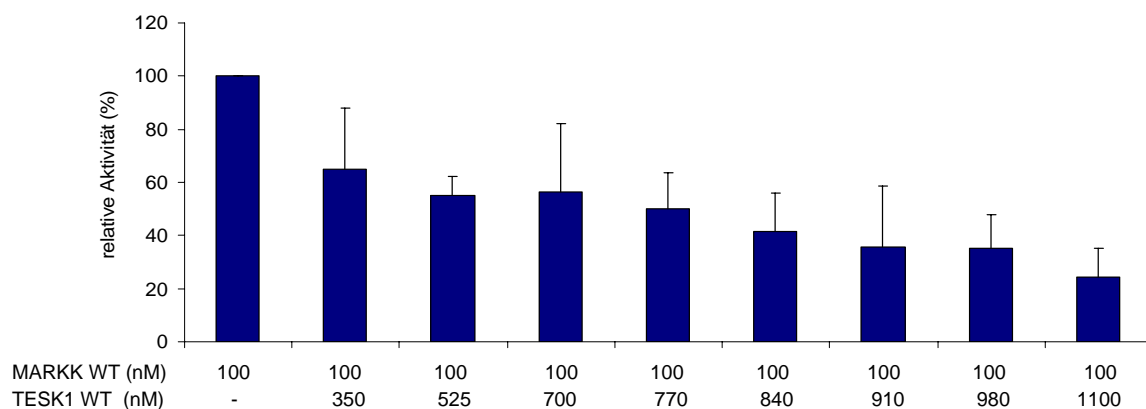
TESK1 WT und MARKK WT wurde zusammen mit dem Substrat Cofilin (1,4  $\mu$ M) und radioaktivem ATP für 2 h bei 30°C inkubiert. Die Aktivität von TSK1 wurde über die Phosphorylierung von Cofilin durch die Auswertung des Autoradiogrammes analysiert. **A)** Dargestellt ist eine Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten. Die Aktivität von TSK1 WT allein wurde für die Auswertung als 100% gesetzt und entsprach einem Einbau von 0,035 mol Phosphat pro mol Cofilin. Ein signifikanter Einfluss von MARKK WT auf die Aktivität von TSK1 konnte erst bei einem 50-fachen Überschuss an MARKK beobachtet werden. **B)** Gezeigt sind das gefärbte Gel und das Autoradiogramm eines Experimentes. Cofilin allein zeigt keine Autophosphorylierung (Spur 1) und kann nicht durch MARKK phosphoryliert werden (Spur 10). Die Inkubation mit TSK1 WT allein führt zur Phosphorylierung von Cofilin (Spur 2). MARKK WT und TSK1 WT zeigen Autophosphorylierung, wobei die TSK1-Autophosphorylierung mit steigender MARKK WT Konzentration abnimmt (vergleiche Spuren 8/9 mit 2).

Betrachtet man die Autophosphorylierungszustände von MARKK und TSK1 so kann festgestellt werden, dass die Autophosphorylierung von TSK1 WT bei steigender MARKK WT Konzentration abnimmt (Abb. 28B Spur 8/9). Hieraus kann geschlossen werden, dass TSK1 WT nicht als Substrat für MARKK WT fungiert und somit nicht phosphoryliert werden kann.

Aus den vorliegenden Ergebnissen muss geschlussfolgert werden, dass die Kinase MARKK keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von TSK1 WT ausübt.

### 6.4.2.2 TESK1 inhibiert die Aktivität von MARKK

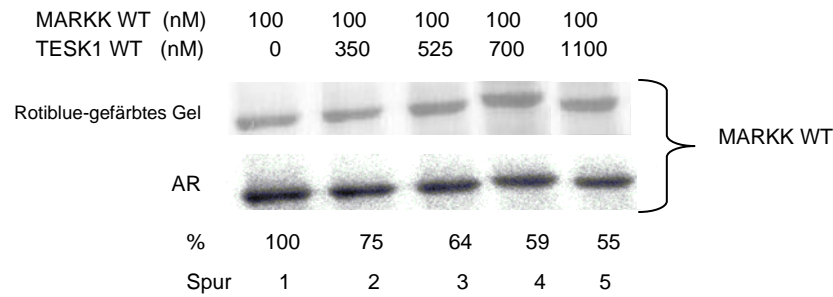
Nachdem gezeigt werden konnte, dass MARKK nicht in der Lage ist, die Aktivität der Kinase TESK1 zu hemmen, war es natürlich von Interesse zu untersuchen, ob umgekehrt die MARKK-Aktivität durch TESK1 beeinflusst werden kann. Hierzu wurde wie in 5.2.8 beschrieben die Phosphorylierung des LIP-Peptides durch MARKK in Anwesenheit von TESK1 untersucht. Wie aus Abbildung 29 ersichtlich, zeigt MARKK WT allein die höchste Aktivität (wurde zur Auswertung als 100 % gesetzt). Es wurde ein Einbau von 0,025 mol Phosphat pro mol Substratpeptid ermittelt. Nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an TESK1 WT konnte eine konzentrationsabhängige Verringerung der MARKK-Aktivität beobachtet werden. Somit scheint TESK1 WT die Aktivität der Kinase MARKK zu hemmen.



**Abbildung 29: TESK1 WT hemmt die Aktivität von MARKK WT**

Die Wirkung von TESK1 WT auf die MARKK WT-Aktivität wurde anhand der Phosphorylierung des LIP Peptids (100  $\mu$ M) analysiert. Die ermittelte Kinaseaktivität von MARKK WT allein wurde mit 100 % relativer Aktivität gleichgesetzt (entspricht einen Einbau von 0,025 mol Phosphat pro mol LIP-Peptid). Die Inkubation mit unterschiedlichen Mengen an TESK1 WT führte zu einer Verringerung der MARKK-Aktivität. Es wurden die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

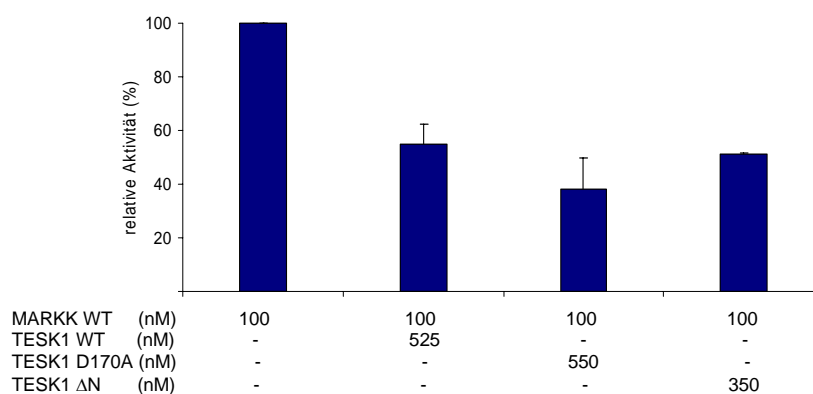
Es stellt sich natürlich die Frage, ob die Hemmung der MARKK-Aktivität möglicher Weise über eine Phosphorylierung durch TESK1 vermittelt wird. Hierzu wurde der Phosphorylierungszustand von MARKK analysiert (Abb. 30). MARKK allein zeigt den stärksten Grad an Autophosphorylierung (Spur 1). Wird TESK1 zum Reaktionsansatz hinzugefügt, nimmt die Autophosphorylierung konzentrationsabhängig ab (Spur 2-5). Somit muss davon ausgegangen werden, dass die inhibitorische Wirkung von TESK1 auf die MARKK-Aktivität nicht durch Phosphorylierung vermittelt wird.



### Abbildung 30: TESK1 verringert die Autophosphorylierung von MARKK

MARKK WT wurde mit unterschiedlichen Mengen an TESK1 WT in Anwesenheit von radioaktivem ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proteine gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und angefärbt. Die Auswertung des Autoradiogramms mittels AIDA Software ermöglichte Rückschlüsse über die Autophosphorylierung von MARKK. Die Zugabe von steigenden Mengen an TESK1 führt zu einem Rückgang der Autophosphorylierung von MARKK (vergleiche Spur 1 mit 2-5).

Da die Inhibition der MARKK wahrscheinlich durch deren Bindung an TESK1 vermittelt wird und nicht von der Aktivität der TESK1 abhängig ist, zeigen die Ergebnisse weiterer Experimente mit verschiedenen Mutanten in Abbildung 31. Es wurde der Einfluss der inaktiven TESK1-Mutante TESK1 D170A und der C-terminalen Domäne (TESK1  $\Delta$ N) auf die Aktivität von MARKK untersucht. Es ist deutlich erkennbar, dass alle verwendeten TESK1-Mutanten die Aktivität von MARKK reduzieren können. Da sowohl die inaktive Mutante, als auch die C-terminale regulatorische Domäne (TESK1  $\Delta$ N) allein in der Lage waren die MARKK-Aktivität zu hemmen, ist dies ein weiterer Beleg dafür, dass der Aktivitätszustand der TESK1 keinen Einfluss auf ihre inhibierende Wirkung gegenüber MARKK hat.

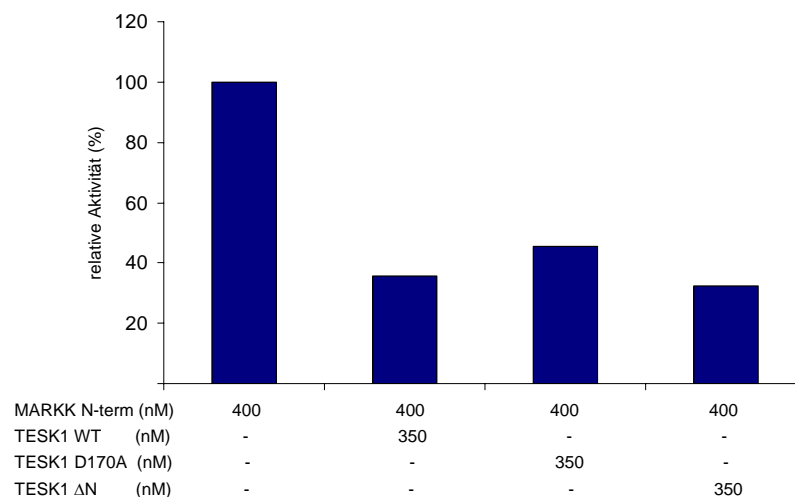


### Abbildung 31: Einfluss verschiedener TESK1-Mutanten auf die Aktivität von MARKK WT

Der Einfluss unterschiedlicher TESK1-Mutanten auf die Aktivität von MARKK wurde über die Phosphorylierung des LIP Peptids (100  $\mu$ M) analysiert. Hierzu wurden MARKK und die verschiedenen TESK-Mutanten zusammen inkubiert und die anschließend gemessenen Aktivitäten miteinander verglichen. Die Kinaseaktivität von MARKK allein wurde für die Auswertung mit 100 % relative Aktivität gleichgesetzt (entspricht einem Einbau von 0,025 mol Phosphat pro mol Peptid).



Die Hefe Zwei-Hybrid Tests haben gezeigt, dass MARKK über zwei Interaktionsbereiche für die Bindung an TESK1 verfügt (6.4.1). So konnte eine Wechselwirkung zu TESK1 mit der Kinasedomäne (N-Terminus) allein, sowie auch mit dem C-terminalen Spacer und der Schwanzregion nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob die C-terminalen Bereiche der MARKK für die Hemmung durch TESK1 nötig sind, wurden erste Aktivitäts-Assays mit der Kinasedomäne von MARKK durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 zusammengefasst. Die katalytische Domäne der MARKK allein zeigte die höchste Aktivität, während die Zugabe von TESK1 WT, der inaktiven TESK1-Mutante und TESK1  $\Delta N$  zu einer Erniedrigung der MARKK-Aktivität führten. Diese ersten Ergebnisse lassen vermuten, dass der C-Terminus von MARKK für die Bindung und Inhibition durch TESK1 keine essentielle Rolle spielt.



**Abbildung 32: TESK1 WT und Mutanten inhibieren die Aktivität der Kinasedomäne von MARKK**

Der Einfluss von TESK1 WT und unterschiedlicher TESK1-Mutanten auf die Aktivität der MARKK-Kinasedomäne (MARKK N-term, AS 1-295) wurde über die Phosphorylierung des LIP Peptids analysiert. Hierzu wurden MARKK N-term und die verschiedenen TESK-Mutanten zusammen inkubiert und die anschließend gemessenen Aktivitäten miteinander verglichen. Die Aktivität der MARKK-Kinasedomäne allein wurde für die Auswertung mit 100 % relativer Aktivität gleichgesetzt (entspricht dem Einbau von 0,015 mol Phosphat pro mol LIP-Peptid).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Interaktion von MARKK und TESK1 nur einen Einfluss auf die Aktivität von MARKK hat. Diese ist in Gegenwart von TESK1 verringert. Die Hemmung erfolgt dabei über die Proteininteraktion und nicht durch Phosphorylierung.

### 6.4.3 Koexpressionstudien von MARKK und TESK1

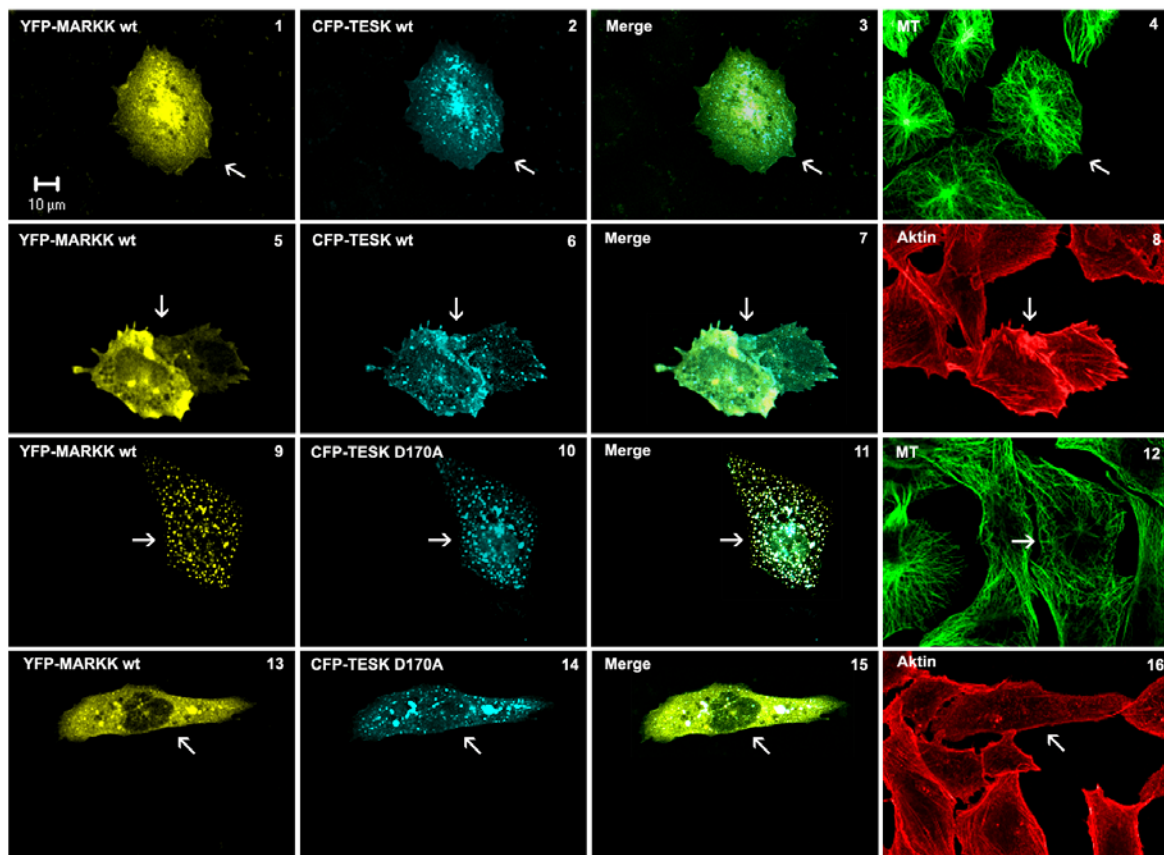
Die Ergebnisse der vorangegangenen Studien wurden abschließend in einen zellulären Kontext übertragen. Hierdurch sollte geprüft werden, ob die erhaltenen *in vitro* Daten in Zellen eine funktionelle Relevanz haben. Zuerst wurden Expressionstudien in den bislang verwendeten CHO Zellen durchgeführt. Anschließend wurden weiterführende Untersuchungen in CHO htau40 und PC12 Zellen vorgenommen (4.6.4). Bei den CHO htau40 Zellen handelt es sich um CHO Zellen, die stabil mit der längsten humanen Tau-Isoform (htau40) transfiziert sind (Ebnet *et al.* 1998). PC12 Zellen sind Phäochromocytomzellen aus der Ratte. Werden diese Zellen mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) behandelt, kann die Differenzierung zu einem Neuron-ähnlichen Phänotyp stimuliert werden.

#### 6.4.3.1 Expression von MARKK und TESK1 in CHO Zellen

Bei den beiden untersuchten Proteinen TESK1 und MARKK handelt es sich um Kinasen, deren Überexpression zu jeweils drastischen Veränderungen des Zytoskeletts führt. Die Aktin-regulierende Kinase TESK1 inhibiert Cofilin, was die Ausbildung von verstärkten Aktin-Stressfasern zur Folge hat (siehe Abb. 24 3-4). Dahingegen bewirkt die Expression von MARKK in CHO Zellen den völligen Zusammenbruch des MT-Netzwerkes und führt letztendlich zum Absterben der Zellen (siehe Abb. 18A 1-2). Die Koexpression beider Proteine sollte nun Aufschluss darüber geben, ob die Kinasen in Zellen in der Lage sind ihre Aktivitäten zu beeinflussen und welche Effekte dies auf das Zytoskelett hat.

Abbildung 33 zeigt Beispiele von CHO Zellen, die gleichzeitig MARKK WT und TESK1 WT exprimieren. Es wird deutlich, dass sich die transfizierten Zellen nicht wesentlich von untransfizierten unterscheiden. Das Mikrotubuli-Netzwerk erscheint im Vergleich zu Nachbarzellen unverändert, was auf die Hemmung der MARKK-Aktivität schließen lässt. Dahingegen können beim Aktin-Netzwerk verstärkte Stressfasern beobachtet werden, die auf eine erhöhte TESK1-Aktivität schließen lassen. TESK1 zeigt auch in Anwesenheit von MARKK eine überwiegend vesikuläre Verteilung in den Zellen (Abb. 33 2, 6, 10, 14). Die Verteilung der MARKK ist sehr variabel – von größtenteils zytosolisch bis komplett vesikulär (1, 5, 9, 13). Eine zumindest partielle Kolokalisation von TESK1 und MARKK

WT kann in den meisten Zellen beobachtet werden (im Merge ergeben cyan und gelb weiß).



**Abbildung 33: Koexpression von TESK1 und MARKK in CHO Zellen**

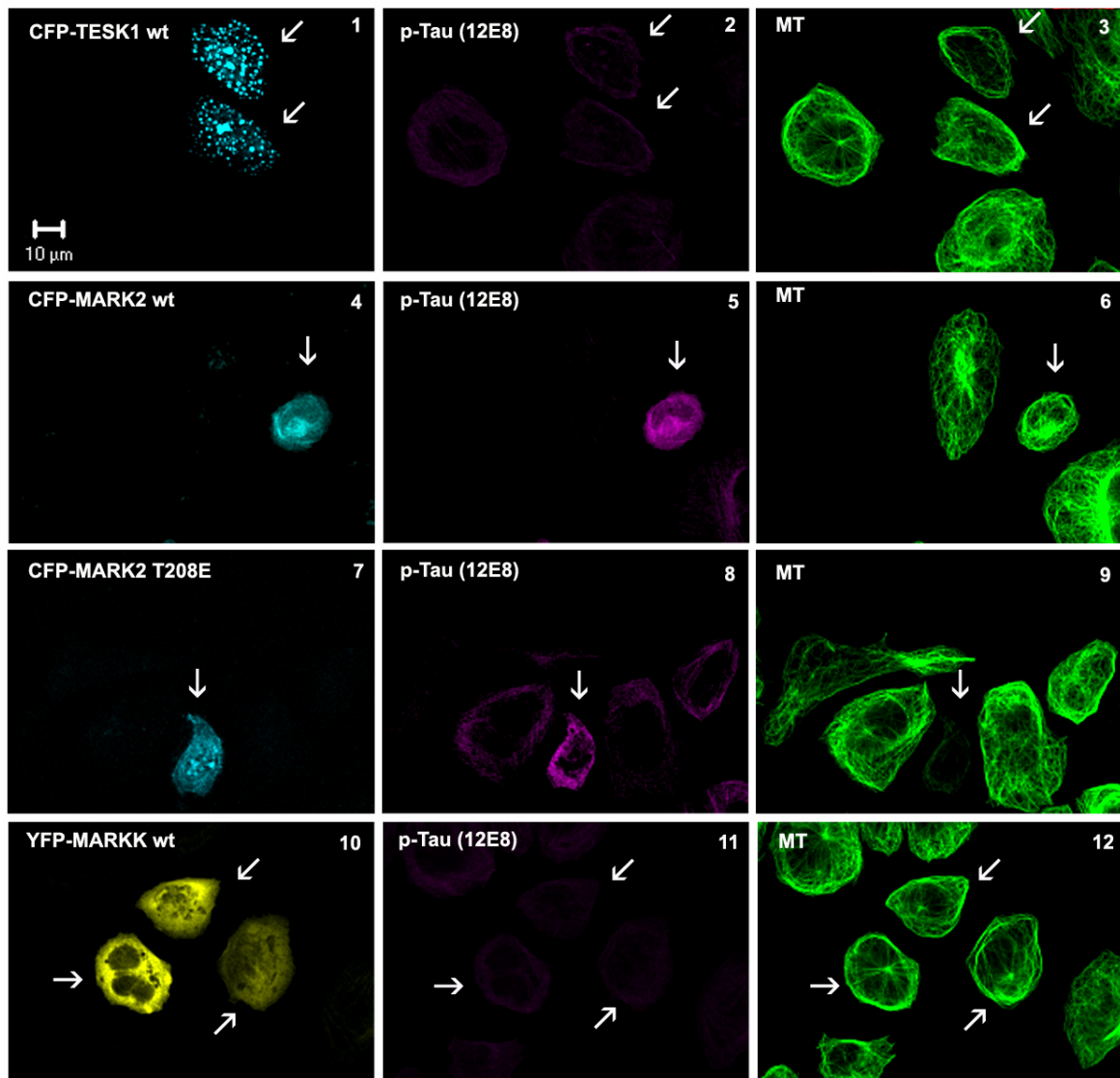
CHO Zellen wurden mit YFP-MARKK WT und CFP-tesk1 WT oder CFP-tesk1 D170A (inaktiv) transfiziert, nach 17 h fixiert und das MT-Netzwerk (anti- $\alpha$ -Tubulin DM1 $\alpha$ , Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper), sowie das Aktin-Netzwerk (anti- $\beta$ -Aktin, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. TESK1 WT und TESK1 D170A zeigten eine vorwiegend vesikuläre Verteilung in den Zellen (2, 6, 10, 14). Die Lokalisation von MARKK WT hingegen war sehr unterschiedlich (1, 5, 9, 13). Eine eher zytoplasmatische oder vesikuläre Verteilung konnte unabhängig davon beobachtet werden, ob die Koexpression mit TESK1 WT oder TESK1 D170A erfolgte. Es konnte eine partielle Kollokalisierung der beiden Kinasen beobachtet werden. Wurden TESK1 WT und MARKK WT gemeinsam in einer Zelle exprimiert, wiesen diese Zellen keine Veränderungen des MT-Zytoskeletts auf (1-4), wohingegen beim Aktin verstärkte Stressfasern sichtbar waren (5-8). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Koexpression von MARKK WT und der inaktiven Mutante von TESK1 WT (9-16). Diese Zellen weisen aber weder Veränderungen des MT- noch des Aktin-Netzwerkes auf. Transduzierte Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

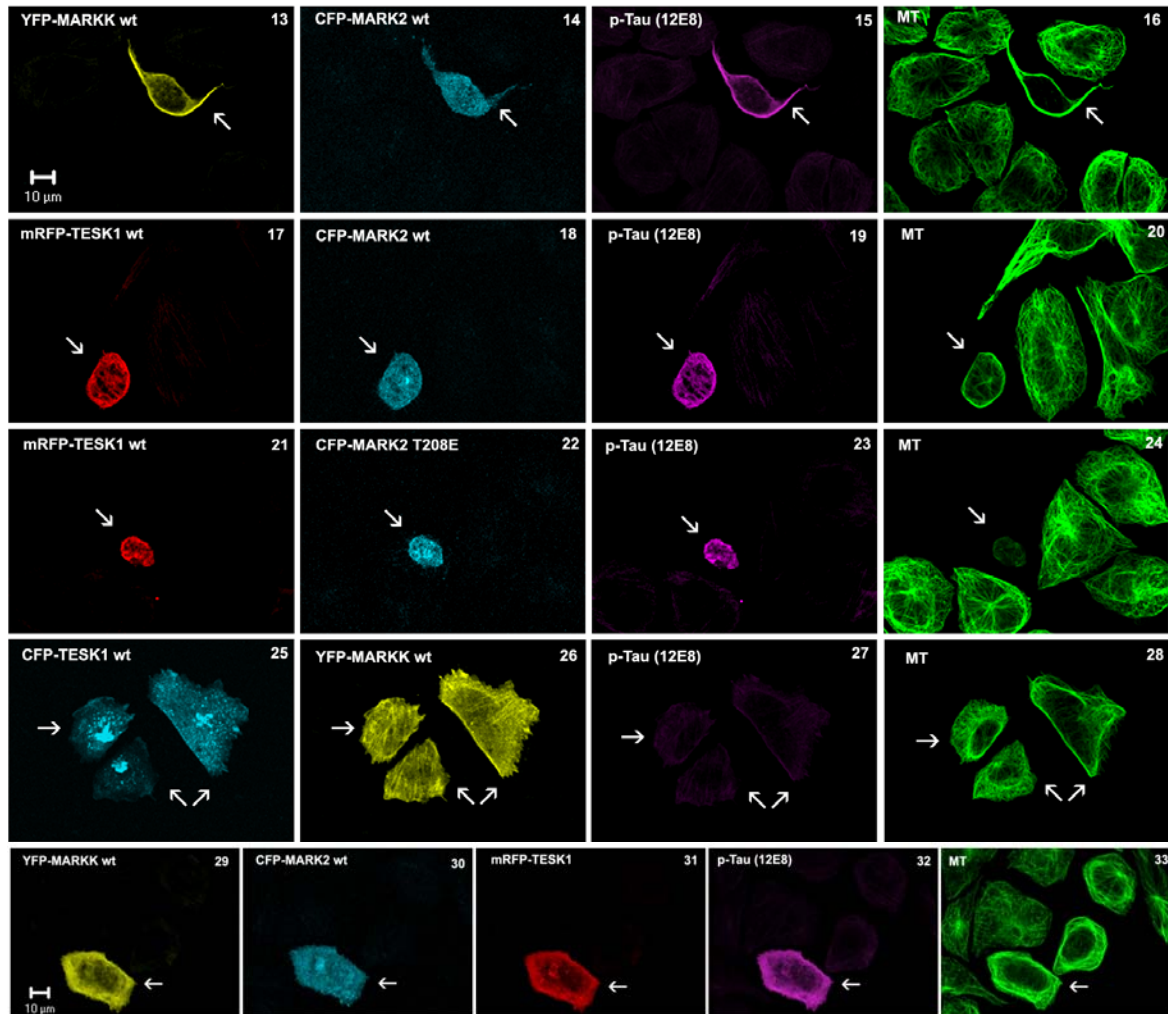
Aus den *in vitro* Daten konnte vermutet werden, dass die Hemmung der MARKK-Aktivität durch TESK1 unabhängig vom Aktivitätszustand der TESK1 erfolgt. Diese Annahme konnte durch die Ergebnisse der Expressionsstudien noch untermauert werden. Wenn MARKK WT zusammen mit der katalytisch inaktiven TESK1-Mutante (D170A) exprimiert wurde, war MARKK nicht in der Lage, die Stabilität der Mikrotubuli zu beeinflussen. MT- und Aktin-Netzwerk unterschieden sich nicht von denen der untransfizierten Zellen (Abb. 33 9-16).

#### 6.4.3.2 Expression von MARKK, MARK2 und TESK1 in CHO htau40 Zellen

Die Kinase MARKK phosphoryliert und aktiviert auf diesem Wege die verschiedenen Isoformen der MARK. Die aktive MARK Kinase wiederum kann unter anderem das MT-assoziierte Tau-Protein phosphorylieren, was dessen Ablösen von den MT bewirkt. Eine verstärkte Abdissoziation erhöht die Instabilität des MT-Netzwerkes und führt so zu dessen Zusammenbruch. Um zu überprüfen, ob TESK1 in der Lage ist, diese Signaltransduktionskaskade in Zellen zu beeinflussen und ob die Wechselwirkung spezifisch über MARKK erfolgt, wurden Expressionsstudien in CHO htau40 Zellen durchgeführt. Diese Zellen sind mit der längsten Isoform des humanen Tau (htau40) stabil transfiziert (Quelle: MP-ASMB, Ebnet *et al.* 1998). Unterschiedliche Niveaus an Tau-Phosphorylierung können durch Anfärbung der Zellen mit dem spezifischen Phospho-Tau Antikörper 12E8 (pS262 und pS356) dargestellt werden. Erfolgte eine Expression von TESK1 WT in diesen Zellen, konnte wie erwartet keine Veränderung der Tau Phosphorylierung gegenüber untransfizierten Zellen beobachtet werden (Abb. 34 1-3). Dies galt auch für die Einzelexpression von MARKK WT (10-12). Erklären lässt sich dieses Ergebnis damit, dass CHO Zellen nur wenig endogene MARK exprimieren und die MT zusätzlich durch das rekombinante Tau stabilisiert werden. Somit wird der Effekt, der Signalübertragung von MARKK über MARK2 (aktiviert) zu MAP4 durch das rekombinante Tau kompensiert. Wurde nun MARK2 WT exprimiert, konnte ein Anstieg der Tau-Phosphorylierung beobachtet werden (4-6). Die Überexpression von humanem Tau verhinderte aber, dass das MT-Netzwerk völlig zusammenbrach und die Zelle abstarb. Auch die konstitutiv aktive Mutante von MARK2 (MARK2 T208E) verursachte erwartungsgemäß eine verstärkte Tau-Phosphorylierung (7-9). Da diese Mutante völlig unkontrolliert aktiv war, führte die Expression zum Zusammenbruch des MT-Netzwerkes. Ein ähnliches Bild erhielt man bei der gleichzeitigen Expression von MARKK und MARK2 (13-16). In diesem Fall konnte die oben beschriebene Signalleitung (MARKK – MARK – Tau) stattfinden. Trotz des überschüssigen Taus konnte die kontinuierliche MARK2-Aktivität nicht mehr kompensiert werden. Die fehlende MT-Stabilisierung durch Tau bewirkte den Zerfall der MT und so das Absterben der Zelle. Wurde nun zusätzlich neben MARKK und MARK2 auch TESK1 exprimiert, werden diese Zellen vor dem Absterben bewahrt (29-33). Die Zellen zeigten allerdings ähnlich der MARK2 WT-Einzeltransfektion eine erhöhte Tau-Phosphorylierung. Um auszuschließen, dass TESK1 WT auch auf der Ebene von MARK2 die Signalübertragung beeinflussen kann, wurden

Zellen auch gleichzeitig mit MARK2 WT bzw. MARK2 T208E und TESK1 transfiziert (17-24). Doch die Expression von TESK1 schien keinen Einfluß auf die jeweilige Aktivität der MARK2 auszuüben. Die Tau-Phosphorylierung in diesen Zellen war vergleichbar mit der, in mit MARK2 einzeln transfizierten Zellen. Diese Beobachtungen passen auch zu Ergebnissen direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests, bei denen keine Interaktion zwischen MARK2 und TESK1 ermittelt werden konnte.





**Abbildung 34: Expression von MARKK, MARK2 und TESK1 in CHO ht40 Zellen**

CHO ht40 Zellen wurden wie angegeben mit YFP-MARKK WT, CFP-MARK2 WT, CFP-MARK2 T208E, mRFP-TESK1 WT und CFP-TESK1 WT transfiziert, nach 17 h fixiert und das MT-Netzwerk (anti- $\alpha$ -Tubulin YL1/2, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper), sowie Phospho-Tau (12E8-Antikörper gegen pS262 und pS356, TRITC-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. Die Expression von MARKK WT und TESK1 WT hatte keinen Einfluss auf die Tau-Phosphorylierung (1-3 und 10-12). Auch das MT-Netzwerk war unverändert im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Eine deutlich verstärkte Tau-Phosphorylierung konnte dahingegen in MARK2 WT und MARK2 T208E (aktiv) transfizierten Zellen beobachtet werden (4-9). Doch während bei der Expression von MARK2 WT das erhöhte Niveau an Phospho-Tau kompensiert wurde, war dies bei der konstitutiv aktiven Mutante nicht mehr möglich. In diesen Zellen kam es zum Zusammenbruch des MT-Netzwerkes. Ein ähnliches Bild erhielt man bei der Koexpression von MARKK und MARK2 WT (13-16). Das TESK1 nicht in der Lage war die MARK2-Aktivität zu beeinflussen zeigte sich bei der Koexpression von TESK1 WT mit MARK2 WT bzw. MARK2 T208E (17-24). Diese Zellen wiesen ein erhöhtes Niveau an Tau-Phosphorylierung auf. Das MT-Netzwerk war gestört. Bei der gemeinsamen Expression von MARKK WT, MARK2 WT und TESK1 konnte auch eine starke Tau-Phosphorylierung beobachtet werden, doch das MT-Netzwerk war intakt. Transfizierten Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

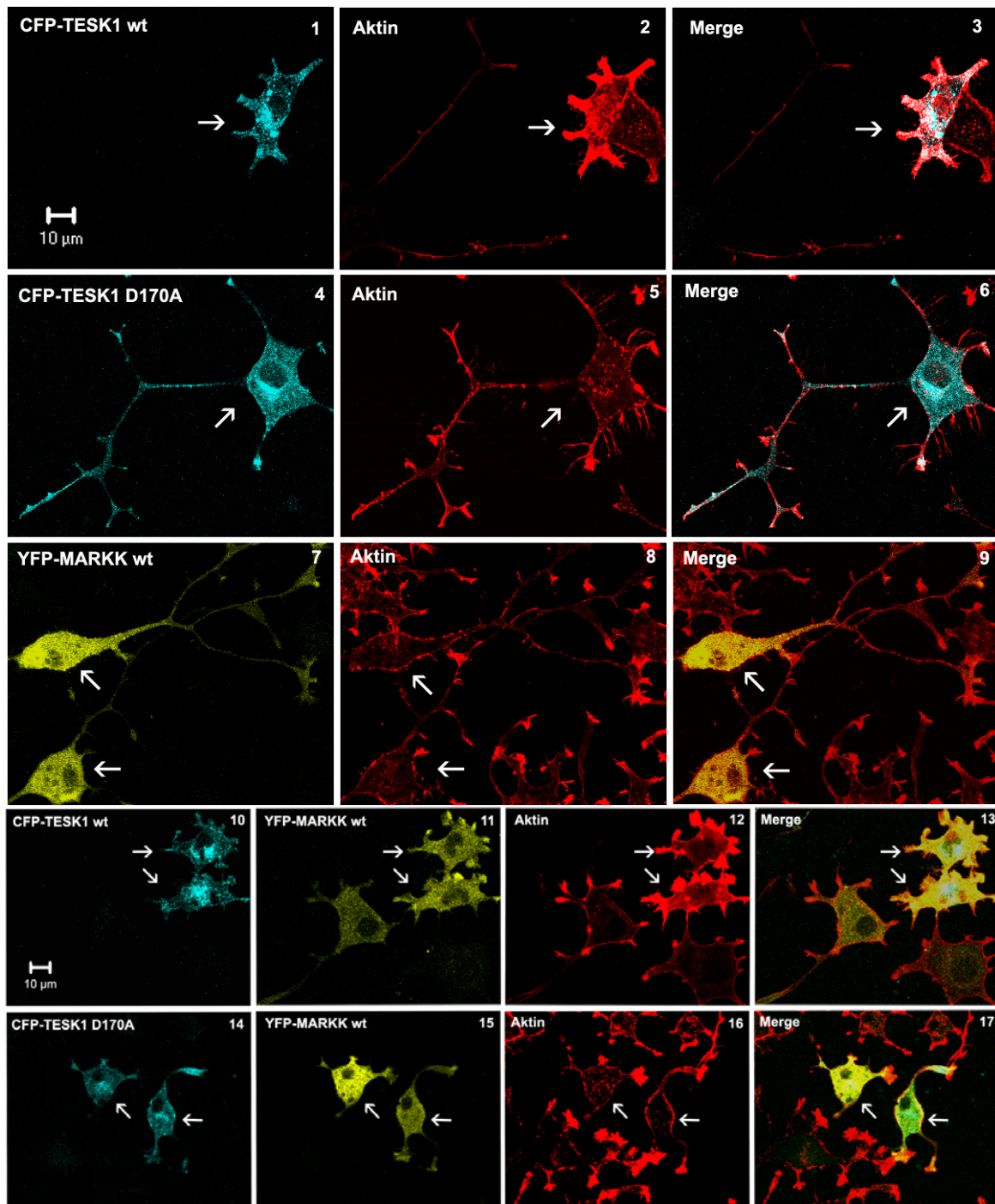
Die Ergebnisse belegen sehr deutlich, dass TESK1 in der Lage ist, die Aktivität von MARKK zu inhibieren und dass dies einen direkten Einfluss auf den Signalfluss in der MARKK – MARK – Tau Signaltransduktionskaskade hat. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TESK1 keinen Einfluss auf die Aktivität der MARK2 Kinase ausübt.

### 6.4.3.3 Expressionsstudien in PC12 Zellen

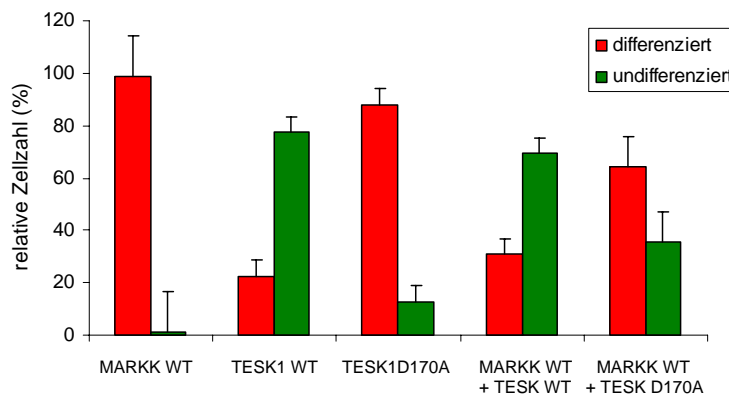
Untersuchungen zur Funktion von MARKK haben gezeigt, dass diese Kinase nicht nur die Mikrotubuli-Dynamik beeinflusst, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Differenzierung spielt (Timm *et al.* 2003). Um zu prüfen, inwieweit der neue Interaktionspartner der MARKK, TESK1, einen Einfluss auf diese Prozesse hat, wurden Expressionsstudien in PC12 Zellen durchgeführt. Bei den verwendeten PC12 Zellen handelt es sich um Phäochromocytomzellen aus der Ratte. Durch die Behandlung mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) kann die Differenzierung zu einem Neuron-ähnlichen Phänotyp stimuliert werden. Somit stellen diese Zellen ein geeignetes Modell-Zellsystem zum Studium von Differenzierungsvorgängen dar.

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die Einzelexpression von MARKK WT, TESK1 WT und TESK1 D170A auf die Differenzierung von PC12 Zellen ausüben kann. Hierzu wurden die transfizierten Zellen jeweils für mindestens 60 Stunden mit 100 ng/ml NGF inkubiert. MARKK WT exprimierende Zellen differenzieren wie untransfizierte Nachbarzellen (Abb. 35 7-9). Somit scheint die rekombinante Überexpression dieser Kinase für die Differenzierung weder förderlich noch hemmend zu sein. Doch ein Ausschalten des MARKK Gens in PC12 Zellen durch Verwendung von siRNA führte dazu, dass diese Zellen nicht mehr differenziert werden können (Timm *et al.* 2003). Daher kann angenommen werden, dass MARKK bei diesem Vorgang eine essentielle Rolle spielt. Wird die Aktin-beeinflussende Kinase TESK1 WT in PC12 Zellen exprimiert, können diese Zellen größtenteils nicht mehr differenziert werden (Abb. 35 1-3). Ein Blick auf das Aktin-Netzwerk zeigt deutliche Veränderungen in Vergleich zu untransfizierten Nachbarzellen. TESK1 exprimierende Zellen bilden Aktin-Anhäufungen (actin cluster) an der Zellperipherie aus, vor allem in den fingerartigen Ausstülpungen. Die Bilder vermitteln den Eindruck, dass die Zelle versucht, neuritenähnliche Zellausläufer zu bilden, denn die Zellmorphologie ist gegenüber undifferenzierten Zellen verändert. Allerdings scheint die durch TESK1 verursachte Aktin-Verstärkung eine normale Differenzierung zu verhindern. Dahingegen hat die Expression der inaktiven TESK1-Mutante (TESK D170A) weder einen Einfluss auf das Aktin-Netzwerk, noch auf die Differenzierung der Zellen. (Abb. 35 4-6). Diese Zellen verhalten sich ähnlich wie die untransfizierten bzw. MARKK WT exprimierenden Zellen.

## A) PC12 Zellen





**B**

**Abbildung 35: Einfluss der Expression von MARKK WT und TESK1 WT bzw. TESK1 D170A (inaktiv) auf die Differenzierung von PC12 Zellen**

(A) PC12 Zellen wurden mit YFP-MARKK WT und CFP-*TESK1* WT oder CFP-*TESK1* D170A (inaktiv) transfiziert, nach 24 h für mindestens 60 h mit 100 ng/ml NGF behandelt und anschließend fixiert. Zur Untersuchung der Differenzierung in einen Neuron-ähnlichen Phänotyp wurde das Aktin-Netzwerk (anti- $\beta$ -Aktin, Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper) angefärbt. Während die Einzeltransfektionen mit MARKK WT und *TESK1* D170A (inaktiv) scheinbar keinen Einfluss auf die Differenzierung ausüben (4-9), unterbindet die Expression von *TESK1* WT die Differenzierung (1-3). Auch die Doppeltransfektion von MARKK WT mit *TESK1* WT führte dazu, dass weniger Zellen differenzierten (10-13). Ähnlich wie bei der *TESK1* WT-Einzeltransfektion war das Aktin-Netzwerk verstärkt (vergleiche 2 und 12). Die gleichzeitige Expression von MARKK WT und *TESK1* D170A (inaktiv) hingegen führte nicht zu Veränderungen des Aktins und die meisten Zellen zeigten einen differenzierten Phänotyp (14-17). Transfizierte Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. (B) Die unter 35 A beobachteten Differenzierungsvorgänge wurden quantitativ ausgewertet. Hierzu wurde der Differenzierungszustand von jeweils mindestens 50 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten analysiert. Als Vergleich dienten Zellen, die mit dem pYFP-C1 Leervektor transfiziert worden waren. Das Fluoreszenzprotein YFP sollte hierbei keinen Einfluss auf die Differenzierung haben. 70 % der YFP exprimierenden Zellen wiesen nach der Behandlung mit 100 ng/ml NGF für 72 h einen eindeutig differenzierten Phänotyp auf. Alle weiteren quantitativen Analysen wurden auf dieses Ergebnis bezogen (d. h. 70 % differenzierte Zellen wurde für die weitere Analyse als 100 % gesetzt).

Um nun zu untersuchen, welchen Einfluss die beiden Kinasen MARKK und *TESK1* zusammen auf die Differenzierung der PC12 Zellen haben, wurden beide Kinasen gleichzeitig exprimiert. In diesen Zellen kann ein deutlicher Rückgang der Differenzierbarkeit beobachtet werden (Abb. 35A 10-13 und 35B). Zellmorphologie und Aktin ähneln *TESK1* WT einzeln transfizierten Zellen. Bei der Koexpression von MARKK WT mit der inaktiven Mutante von *TESK1* (D170A) nimmt die Anzahl der differenzierten Zellen im Vergleich zur MARKK-Einzeltransfektion nur leicht ab (Abb. 35A 14-17 und 35B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Wechselwirkung von MARKK und TESK1 die Organisation des Zytoskeletts der Zelle beeinflusst. Allerdings erfolgt nur eine Einflussnahme auf die Dynamik der Mikrotubuli (Abb. 36).

Betrachtet man zunächst die Effekte der untersuchten Kinasen auf das Zytoskelett getrennt, so zeigt sich, dass MARKK auf das MT-Netzwerk wirkt. Die Expression der aktiven Kinase führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von Tau bzw. MAPs. Dies bewirkt, dass Tau nicht mehr an die Mikrotubuli binden kann. Das MT-Netzwerk wird instabil, was zum Zusammenbruch und zum Absterben der Zelle führen kann. Die Kinase TESK1 hingegen wirkt auf das Aktin-Netzwerk. Die aktive Kinase inaktiviert den Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin und fördert auf diesem Wege die verstärkte Ausbildung von Aktin-Stressfasern.

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Interaktion zwischen MARKK und TESK1 führt zu einer Erhöhung der MT-Stabilität, da TESK1 die MARKK Aktivität hemmen kann. Umgekehrt erfolgt aber keine Beeinflussung der TESK1 Aktivität durch MARKK, so dass die durch TESK1 induzierte Stabilität des Aktins nicht beeinträchtigt wird.

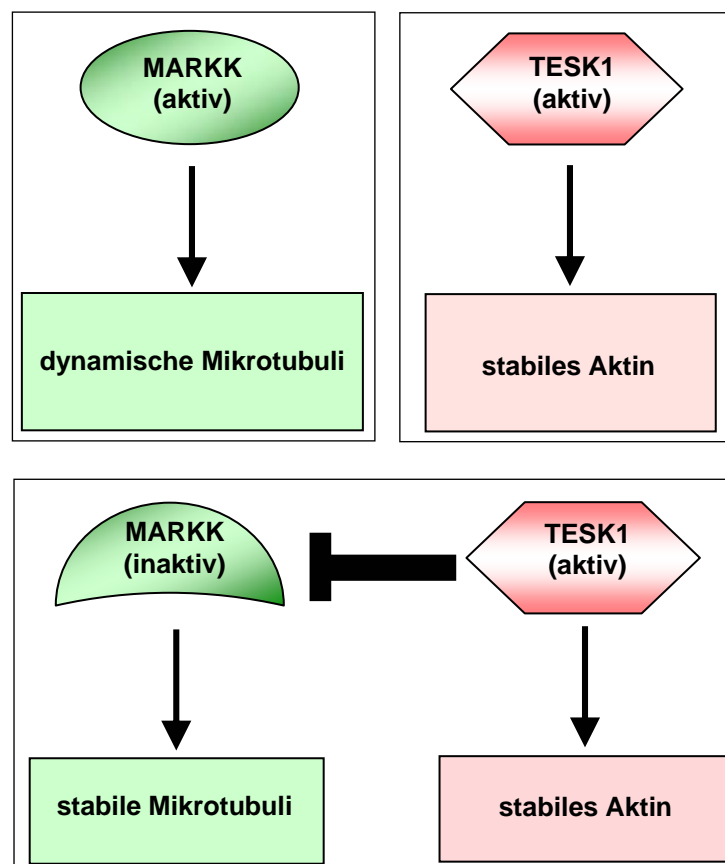


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Effekte auf das MT- und Aktin-Netzwerk durch die Wechselwirkung zwischen MARKK und TESK1

## 7. Diskussion

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau ist bei der Ausbildung einer Reihe neurodegenerativer Krankheiten involviert. So findet man hyperphosphorylierte Tau-Aggregate nicht nur in Gehirnen von Alzheimer Patienten, sondern auch bei Frontotemporalen Demenzen und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (FTDP-17) und weiteren Krankheiten, die unter dem Begriff „Tauopathien“ zusammengefasst werden. All diesen Erkrankungen ist eine anormale Aggregation des Tau-Proteins zu intrazellulären NFT gemeinsam, welche wahrscheinlich das Absterben der betroffenen Nervenzellen bewirkt (Spillantini und Goedert 1998).

Die physiologische Funktion von Tau, die Stabilisierung der MT, wird durch Phosphorylierung reguliert. Dabei spielt die Phosphorylierung der KXGS-Motive (insbesondere Serin 262) in der MT-bindenden Domäne durch die Kinase MARK eine Schlüsselrolle (Biernat *et al.* 1993, Trinczek *et al.* 1995, Nishimura *et al.* 2004). Wird Tau durch MARK phosphoryliert, löst sich dieses von den MT ab, was zur Instabilität des gesamten MT-Netzwerkes in der Zelle führt. Die Aktivierung der Kinase MARK erfolgt unter anderem durch die Ste-20 Kinase MARKK (Timm *et al.* 2003). MARKK ist nicht nur an der Regulation des MT-Netzwerkes beteiligt, sondern ist auch bei der Signalleitung in der MAPK-Kaskade involviert (Hutchison *et al.* 1998; Yustein *et al.* 2003). Über die Regulation der Kinase MARKK ist bislang nur wenig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Interaktionspartner zu identifizieren, die Rückschlüsse auf die Regulation der Kinase ermöglichen sollten.

### 7.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner der MARKK

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von MARKK wurde ein Hefe Zwei-Hybrid Screen durchgeführt mit dessen Hilfe die Klone einer menschlichen fötalen Gehirn cDNA-Bank durchmustert wurden. Die Auswertung ergab ein weites Spektrum an möglichen neuen Bindungspartnern der MARKK (Tabl. 1). Überraschend war dabei besonders die Vielfältigkeit der Funktionen der so gefischten Interaktionspartner. Allerdings muss natürlich davon ausgegangen werden, dass nicht jedes identifizierte Protein auch in Zellen

eine funktionelle Interaktion mit MARKK eingeht. Nur eine Einzelanalyse von jedem Protein kann Aufschluss darüber geben, ob die ermittelte Interaktion in Zellen wirklich stattfindet.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Interaktion zu dem Protein Spred1 näher untersucht. Beide Proteine – MARKK und Spred1 – sind bei der Regulation von MAPK-Signaltransduktionswegen involviert (Hutchison *et al.* 1998, Bundschu *et al.* 2006). Spred1 fungiert hierbei als Regulatorprotein, welches die Signalleitung zwischen Ras und Raf unterbricht und somit die ERK-Signaltransduktionskaskade inhibiert (Wakioka *et al.* 2001). Da die Bindung von Spred1 auch die Aktivität anderer Proteine, wie zum Beispiel RhoA, moduliert, konnte bei der neu identifizierten Interaktion mit der Kinase MARKK erwartet werden, dass deren Aktivität ebenfalls durch Spred1 beeinflusst wird.

## 7.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen MARKK und Spred1

Mit Hilfe direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen MARKK und Spred1 über die jeweiligen carboxyterminalen Bereiche vermittelt wird. Bei Spred1 scheint hierfür die spry-TD Domäne essentiell zu sein, welche auch für die Wechselwirkung mit anderen Bindungspartnern verantwortlich ist (Bundschu *et al.* 2006). Weiterhin ist bekannt, dass dieser Bereich für die Membranlokalisation wichtig ist (Wakioka *et al.* 2001; Nonami *et al.* 2005). Wie kürzlich durch King und Kollegen gezeigt werden konnte, erfolgt auch die Ausbildung von Heterodimeren über diese Domäne (King *et al.* 2005). Übereinstimmend mit den dort gezeigten Daten konnte in dieser Arbeit eine starke Interaktion der Spred1 spry-TD Domänen untereinander ermittelt werden, was daraufhin deutet, dass Spred1 auch Homodimere bilden kann.

Für den C-Terminus von MARKK (AS 432-1001) konnte der Interaktionsbereich nicht enger eingegrenzt werden, da alle getesteten Fragmente zur Bindung fähig waren. Sehr deutlich hingegen waren die Resultate der Zwei-Hybrid Tests mit der aminoterminalen Kinasedomäne, welche keine Bindung zu den verschiedenen Spred1 Mutanten einging. Durch einen *in vitro* GST\_Pulldown Assay konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Spred1 an MARKK direkt erfolgt und es sich zumindest *in vitro* um eine sehr starke Bindung handelt. Die durchgeführten Untersuchungen zur Aktivitätsveränderung der MARKK durch die Wechselwirkung mit Spred1 zeigten entgegen den Erwartungen, dass

Spred1 nicht in der Lage ist, die Aktivität der MARKK signifikant zu beeinflussen. Sowohl in den *in vitro* Aktivitäts-Assays, als auch in den Expressionsanalysen in CHO Zellen konnte keine Veränderung der MARKK Aktivität in Gegenwart von Spred1 ermittelt werden. Die durchgeführten Expressionsanalysen in Zellen sollten Aufschluss darüber geben, ob SPRED1 die Aktivität der MARKK im Hinblick auf die Stabilität des MT-Netzwerkes modulieren kann. Die Koexpressionsstudien in CHO Zellen zeigen aber, dass Spred1 die dramatischen Effekte von MARKK auf die Zellmorphologie nicht unterbinden kann (Abb. 19).

Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass dennoch eine funktionelle Relevanz der Interaktion in Zellen besteht. Beide Proteine sind an der Regulation der MAPK-Signalübertragungswege involviert. Während MARKK/TAO1 durch direkte Phosphorylierung von MKK3 in die p38-Signaltransduktionskaskade eingreifen kann und diese aktiviert, moduliert Spred1 den ERK-Signaltransduktionsweg (Hutchison *et al.* 1998, Wakioka *et al.* 2001). Denkbar wäre, dass die neu identifizierte Interaktion zwischen MARKK und Spred1 die beiden MAPK-Signaltransduktionswege miteinander verbindet und die unterschiedlichen Aktivitäten und Effekte koordiniert (crosstalk). Interessant sind in diesem Zusammenhang die Daten über die Lokalisation von Spred1 an bestimmte Bereiche der Plasmamembran, welche als Caveolae oder „lipid rafts“ bezeichnet werden (Nonami *et al.* 2005). Diese Cholesterin-reichen Mikrodomänen der Zellmembran spielen nicht nur bei der Endozytose eine wichtige Rolle, sondern sind scheinbar auch an Signaltransduktionsvorgängen involviert (Harris *et al.* 2002, Cohen *et al.* 2004, Shaul und Anderson 1998). Es wurde eine erhöhte Konzentration an unterschiedlichen Komponenten der Signalübertragung an diesen Membranbereichen festgestellt. Spred1 interagiert mit Caveolin-1, ein Brückenprotein (scaffold), welches für die Caveolae Ausbildung essentiell ist (Nonami *et al.* 2005, Lisanti *et al.* 1995). Somit könnte die Bindung von Spred1 an MARKK eine Translokationsfunktion haben, die der Lokalisation von MARKK an Caveolae dient.

Aus den vorliegenden Ergebnissen, wird offensichtlich, dass Spred1 zwar an MARKK binden kann, doch dass diese Interaktion keinen Einfluss auf die Aktivität der Kinase im Hinblick auf die Regulation der MT-Stabilität ausübt.

Ein weiterer Aspekt, für die Entscheidung, die Wechselwirkung zwischen MARKK und Spred1 genauer zu untersuchen, war die vermutete Interaktion von Spred1 mit TESK1.

TESK1 ist eine Kinase, welche die Organisation des Aktin-Netzwerkes beeinflusst. Eine Bindung von Spred1 an TESK1 konnte aus Daten über die Interaktion zwischen dem Spred1 verwandtem Protein sprouty4 und TESK1 vermutet werden (Leeksma *et al.* 2002, Tsumura *et al.* 2004). In einer sich daraus ableitenden Arbeitshypothese nahm Spred1 eine zentrale Position zwischen MARKK und TESK1 ein und wäre so eine Art Brückenprotein, welches die Regulation der MT- und Aktin-Organisation über die beiden Kinasen miteinander verbindet.

### 7.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen TESK1 und Spred1

Die Kinase TESK1 kann durch ihre direkte Wirkung auf den Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin die Organisation des Aktin-Zytoskeletts beeinflussen. Ähnlich wie die verwandte LIM-Kinase phosphoryliert TESK1 Cofilin und fördert auf diesem Wege die verstärkte Ausbildung von Aktin Stressfasern (Toshima *et al.* 2001a). Doch möglicherweise beschränken sich die Funktionen von TESK1 nicht nur auf die Modulation des Aktin-Netzwerkes, sondern beeinflussen auch das MT-Netzwerk. Diese Vermutung leitet sich aus Ergebnissen einer Studie zur Tau-Toxizität ab, in welcher das Drosophila-Homolog von TESK1 cdi (center divider) als ein Verstärker der Toxizität identifiziert wurde (Shulman und Feany 2003). Die neu charakterisierte Bindung des Regulatorproteins Spred1 an MARKK eröffnete eine neue mögliche Verbindung zwischen der MT-Regulation über MARKK – MARK – Tau und der Aktin-Organisation über TESK1 und Cofilin. Es konnte angenommen werden, dass Spred1 eine direkte Bindung mit TESK1 eingehen kann, da sprouty4 mit TESK1 interagiert und die Kinase inhibiert (Leeksma *et al.* 2002, Tsumura *et al.* 2004). Die Proteine der sprouty- und der Spred-Familie üben ähnliche Funktionen bei der Regulation des MAPK-Signaltransduktionsweges aus (Guy *et al.* 2003, Dikic und Giordano 2003). Neben dieser funktionellen Ähnlichkeit gibt es auch strukturelle Gemeinsamkeiten. So zeichnen sich die Mitglieder beider Familien durch eine Cystein-reiche Domäne am Carboxyterminus aus (spry-TD, sprouty Translokationsdomäne), welche unter anderem für die Membranlokalisation und Dimerisierung verantwortlich ist (King *et al.* 2005, Bundschu *et al.* 2006, Impagnatiello *et al.* 2001). Spred verfügt neben der spry-TD Domäne über zwei weitere Domänen: die N-terminale EVH-1 Domäne und die zentrale KBD (siehe 3.3.1 und Bundschu *et al.* 2006).

Für beide Domänen konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, welche Aufgabe sie besitzen und welchen Einfluss sie auf die Funktion von Spred haben.

Mittels direkter Hefe Zwei-Hybrid Tests wurden die Interaktionsdomänen in TESK1 und Spred1 ermittelt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse weisen starke Parallelen zu den bekannten Daten über die Wechselwirkung zwischen sprouty4 und TESK1 auf (Tsumura *et al.* 2004). Es konnte eine Bindung der beiden vollständigen Proteine Spred1 und TESK1 aneinander beobachtet werden. Für die Interaktion in Spred1 ist, analog zu sprouty4, die carboxyterminale spry-TD Domäne verantwortlich. Die N-terminalen Bereiche (EVH-1 und c-Kit) zeigen keinerlei Wechselwirkung zu den verwendeten TESK1-Konstrukten. Bei der Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf TESK1, ist es nicht möglich eine eindeutige Interaktionsdomäne zu benennen. Sowohl die N-terminale Kinasedomäne, als auch die C-terminalen regulatorischen Bereiche sind in der Lage, an Spred1 zu binden. Somit scheint es in TESK1 sowohl für sprouty4, als auch für Spred1 zwei Interaktionsbereiche zu geben.

Dieses Verhalten ließ vermuten, dass Spred1 einen ähnlichen Einfluss wie sprouty4 auf die TESK1-Aktivität ausüben würde, welches eine hemmende Wirkung besitzt. Die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro* Aktivitätsassays ergaben allerdings ein komplexeres Bild (Abb. 23). Wurde TESK1 zusammen mit äquimolaren Mengen an Spred1 inkubiert, führte dies zu einem sprunghaften Anstieg der TESK1-Aktivität. Die Inkubation mit größeren Mengen an Spred1 führte aber zu dem erwarteten Rückgang der Kinaseaktivität. Die Ursache für die beobachtete verstärkte Cofilin-Phosphorylierung bei einem TESK1-Spred1 Verhältnis von 1:1 ist unklar. Denkbar wäre, dass Spred1 über die zwei Interaktionsdomänen auch zwei unterschiedliche Wirkungen (aktivierend und inhibierend) auf TESK1 haben kann. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die für den Assay verwendete GST\_Spred1-Präparation neben Spred1 weitere Proteine enthält. Die Ergebnisse des Aktivitätsassays deuten auf einen aktivierenden Faktor hin, welcher den sprunghaften Anstieg der TESK1 Aktivität bei niedrigen Spred1-Konzentrationen verursachen könnte. Möglich ist aber auch, dass Spred1 zusätzlich einen Einfluss auf das Substrat Cofilin hat. Die Zugabe von geringen Mengen an Spred1 könnte eine Konformationsänderung bewirken, die die Zugänglichkeit des Substrates für die Kinase TESK1 verbessert, was die erhöhte Aktivität erklären würde. Wird dem Ansatz Spred1 in höheren Konzentrationen zugegeben, käme zusätzlich zu dem Effekt auf Cofilin die hemmende Wirkung auf TESK1.

Solch eine inhibierende Wirkung von Spred1 auf TESK1 kann deutlich beobachtet werden, wenn die Effekte von TESK1 auf das Aktin-Netzwerk in der Zelle betrachtet werden. Es

ist bekannt, dass TESK1 die Ausbildung von Aktin-Stressfasern fördert, indem es Cofilin inaktiviert (Toshima *et al.* 2001a). Diese Veränderung konnte auch in den verwendeten CHO Zellen beobachtet werden (Abb. 24). Wurde TESK1 zusammen mit Spred1 exprimiert, konnten zwei augenfällige Effekte festgestellt werden (Abb. 26). Zum einen wies das Aktin-Netzwerk gegenüber den untransfizierten Zellen keinerlei Veränderungen auf, was als ein Beleg für die hemmende Wirkung von Spred1 angesehen werden kann. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass beide Proteine fast ausschließlich in vesikulären Strukturen kolokalisieren. Eine ähnliche Lokalisation wurde auch für TESK1 und sprouty4 beschrieben (Tsumura *et al.* 2004). TESK1 weist diese Verteilung in der Zelle auch bei einer Einzeltransfektion auf. Bislang ist nicht bekannt, um was für Vesikel es sich hierbei handelt. Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen lassen die Frage nach der Identität dieser vesikulären Strukturen leider unbeantwortet. Doch kann aus den Expressionsstudien, in denen verschiedene Vesikeltypen durch spezifische Antikörper Fluoreszenz-markiert wurden, abgeleitet werden, dass es sich nicht um eines der folgenden Kompartimente handelt: Mitochondria, Lysosomen, Golgi und Endosomen. Die vesikuläre Lokalisation von Spred1 bei der Koexpression mit TESK1 war überraschend, da für Spred1 bislang eine vorwiegend zytoplasmatische Verteilung bekannt war. Scheinbar kann TESK1 diese dramatische Veränderung der Verteilung von Spred1 hervorrufen. Umso interessanter wäre es zu wissen, um welche Art von Vesikel es sich hierbei handelt. Für Spred1 ist neben der zytosolischen Verteilung in der Zelle auch eine teilweise verstärkte Lokalisation an der Plasmamembran, insbesondere an Caveolae bekannt (Nonami *et al.* 2005). Diese Membranbereiche sind unter anderem in der Endozytose involviert (Shaul und Anderson 1998). Möglicherweise handelt es sich daher bei den beobachteten vesikulären Strukturen um endozytotische Vesikel. Weitere Analysen zur detaillierten Charakterisierung der Vesikel sind geplant.

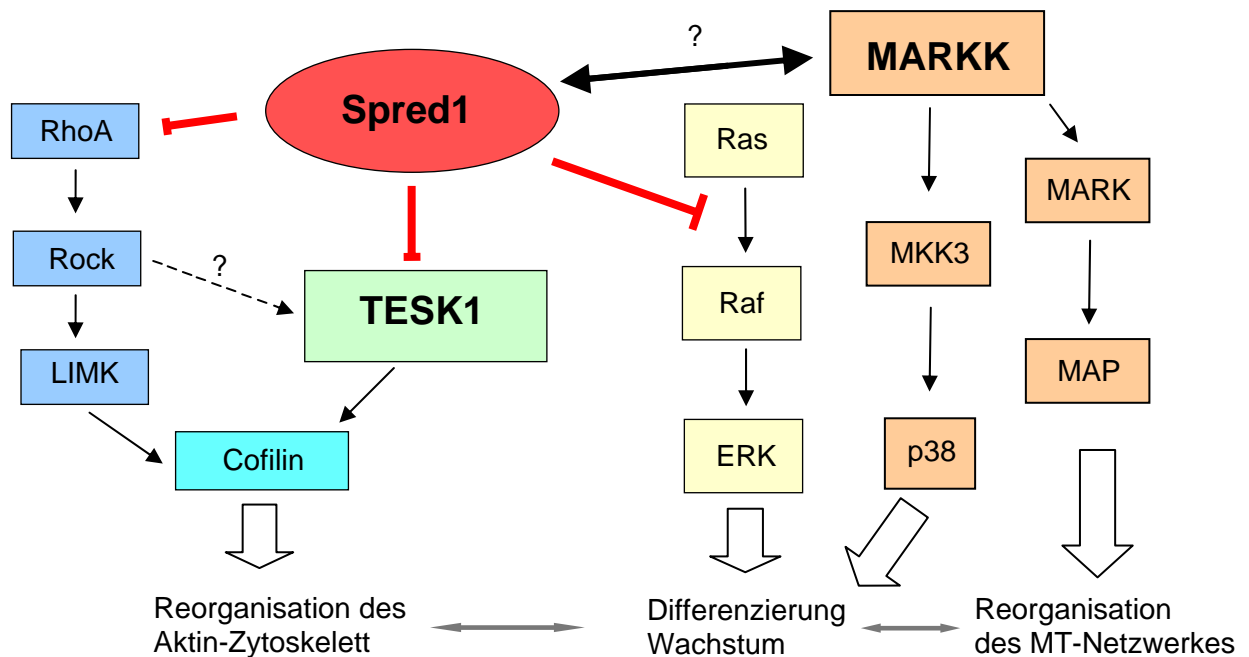
Es hat sich gezeigt, dass das Regulatorprotein Spred1 in einer Reihe von zellulären Prozessen eingreifen kann. So verhindert die Überexpression von Spred1 Differenzierung und Zellmigration (Wakioka *et al.* 2001, Miyoshi *et al.* 2004, Yoshida *et al.* 2006). Beide Prozesse sind an den Umbau des Zytoskeletts und somit auch des Aktin-Netzwerkes gekoppelt. Die Organisation des Aktin-Netzwerkes wird durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen beeinflusst und der Umbau einzelner Komponenten erfolgt streng reguliert (siehe auch 3.2.2). Miyoshi und Kollegen wiesen nach, dass Spred1 auf direktem Wege die Aktin-Organisation in der Zelle beeinflussen kann. Sie stellten eine direkte Interaktion von Spred1 mit der GTPase RhoA fest. Die Interaktion verhindert die



Aktivierung der ROCK-Kinase durch RhoA (Miyoshi *et al.* 2004). ROCK nimmt eine zentrale Position bei der Regulation der Aktindynamik ein, indem es unter anderem durch Phosphorylierung der LIMK (LIM Kinase) vor allem die Ausbildung von Aktin-Stressfasern fördert (Riento und Ridley 2003). Für Prozesse wie Differenzierung und Zellmigration ist das Vorhandensein von Stressfasern essentiell. Diese kontraktile Aktinfaserbündel sind vor allem für die Ausbildung von Adhäsionspunkten (focal adhesion) von großer Bedeutung, mittels welcher sich die Zelle an dem darunter liegendem Substrat anhaftet (Kaibuchi *et al.* 1999, Kaverina *et al.* 2002). Wie für die meisten Prozesse ist auch hier die richtige Balance zwischen Ausbildung und Abbau der Adhäsionspunkte, sowie deren zeitliche und räumliche Verteilung von entscheidender Bedeutung. Eine zu starke Adhäsion, als auch eine zu schwache Anheftung der Zelle verhindern Migration und Differenzierung (Riento und Ridley 2003, Raftopoulou und Hall 2004, Ridley 2001).

Die neu identifizierte Wechselwirkung zwischen Spred1 und TESK1 scheint eine ähnliche funktionelle Bedeutung zu haben, da auch TESK1 die Bildung von Stressfasern beeinflusst. TESK1 wirkt analog zum ROCK-Effektor LIMK auf Cofilin. Die aktiven Kinasen phosphorylieren Cofilin am Serin 3, was zu dessen Inaktivierung führt. Somit kommt es zu einer verminderten Aktin-Depolymerisation bzw. Fragmentierung und stabile Aktin-Stressfasern, sowie Adhäsionspunkte können gebildet werden (Bailly und Jones 2003, Bamburg und Wiggan 2002). Dies kann auch als Ursache angesehen werden, warum die Expression von TESK1 die Zellausdehnung und Anhaftung (cell spreading) fördert, ein Prozess, der den ersten Schritt in Richtung Differenzierung und Migration darstellt (Tsumura *et al.* 2004). Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass eine ungebremste TESK1-Aktivität im weiteren Verlauf eher hinderlich ist. So verhindert die Überexpression aktiver LIMK die Polarisierung von motilen Zellen und führt stattdessen zur Ausbildung multipler nicht polarisierter Lamellipodia (Dawe *et al.* 2003, Bally und Jones 2003). Weiterhin hemmt eine zu starke Adhäsion der Zelle an das Substrat die Zellmigration (Cox *et al.* 2001).

Die neu identifizierte Wechselwirkung zwischen Spred1 und TESK1 kann somit als ein weiterer Regulationsmechanismus zur räumlichen und zeitlichen Begrenzung der Aktin-Stabilität und Adhäsion und somit von Polarisation und Fortbewegung der Zelle angesehen werden (Abb. 37).



**Abbildung 37: Einfluss von Spred1 auf die Organisation des Aktin-Netzwerkes und die Differenzierung von Zellen**

Spred1 ist ein Regulatorprotein, welches durch seine Bindung an verschiedene Interaktionspartner diese in ihrer Funktion hemmen kann. Durch die Wechselwirkung mit RhoA und TESK1 kann Spred1 Einfluss auf die Organisation des Aktin-Netzwerkes nehmen. Weiterhin ist Spred1 in der ERK/MAPK-Signaltransduktionskaskade involviert, wo es die Aktivierung von Raf verhindert. Eine Interaktion mit der Kinase MARKK konnte nachgewiesen werden, doch die funktionelle Relevanz in Zellen ist nicht geklärt.

## 7.4 Charakterisierung der Interaktion von MARKK und TESK1

Für viele zelluläre Prozesse ist die Dynamik des Zytoskeletts und die Fähigkeit zur Umstrukturierung von entscheidender Bedeutung. Darüber, wie die Koordination zwischen den einzelnen Komponenten erfolgt, ist wenig bekannt. Umso interessanter waren die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, die Spred1 als einen gemeinsamen Bindungspartner von MARKK und TESK1 identifizierten. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit, die Signaltransduktionswege der beiden Kinasen miteinander zu verbinden. Spred1 würde in diesem Fall als Brückenprotein fungieren. Doch überraschender Weise konnte in Bindungstests mittels Hefe Zwei-Hybrid Systems eine direkte Interaktion zwischen MARKK und TESK1 festgestellt werden. Somit war eine viel direktere Wechselwirkung zwischen MT- und Aktin-Netzwerk denkbar.

Die Analyse der bei der Interaktion involvierten Domänen ergab ein komplexes Bild. Zunächst konnte in den durchgeführten Hefe Zwei-Hybrid Tests keine Interaktion der beiden vollständigen Kinasen festgestellt werden. Ein solches Verhalten kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen muss berücksichtigt werden, dass es sich bei MARKK und TESK1 um rekombinante Proteine (Sequenzen von *Rattus norvegicus*) handelt, die in den Hefen exprimiert werden. Es besteht die Gefahr, dass essentielle posttranslationale Modifikationen fehlen, oder die Proteine falsch gefaltet sind. Außerdem ist es möglich, dass weitere Kofaktoren, welche die Interaktion beeinflussen, in den Hefen nicht vorhanden sind. Dies könnte ein Hinweis auf Spred1 und dessen Funktion als Brückenprotein sein. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion in Abhängigkeit bestimmter Konformationen der beiden Kinasen stattfindet. Die durchgeführten Untersuchungen zum Bindungsverhalten einzelner Domänen deuten darauf hin, dass in beiden Proteinen mindestens zwei Interaktionsbereiche vorhanden sind.

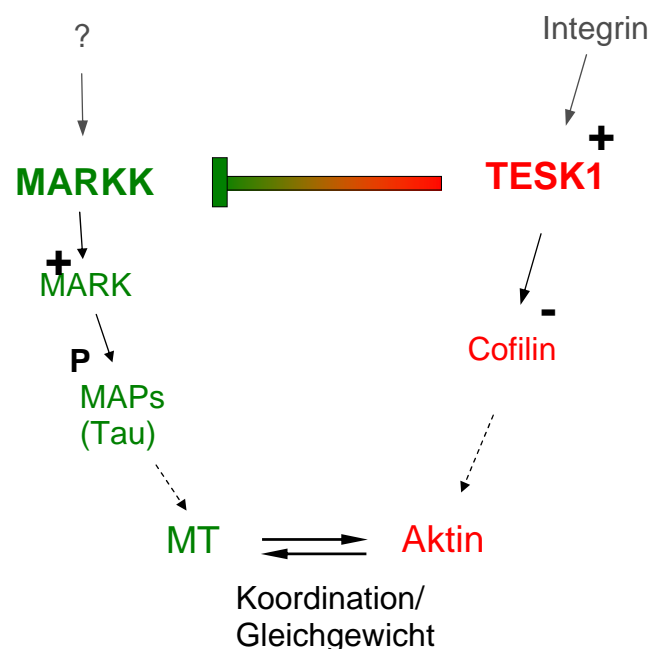
Da es sich bei TESK1 und MARKK um Kinasen handelt, stellte sich natürlich die Frage, ob durch die Wechselwirkung die Aktivitäten beeinflusst werden. Die Untersuchungen zeigen, dass eine Beeinflussung der Aktivität nur einseitig erfolgt. So wird MARKK durch TESK1 gehemmt, während die TESK1-Aktivität nicht beeinflusst wird (Abb. 38). Diese unidirektionale Wechselwirkung hat demnach nur Konsequenzen auf die Stabilität des MT-Netzwerkes. Eine Hemmung der MARKK-Aktivität konnte auch durch die inaktive TESK1-Mutante (TESK D170A), sowie den carboxyterminalen regulatorischen Bereich von TESK1 (TESK1  $\Delta$ N, ohne katalytische Domäne) erzielt werden. Die weiterhin vorgenommene Analyse des Phosphorylierungszustandes von MARKK zeigte, dass die Autophosphorylierung in Gegenwart von TESK1 verringert war. Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass die Hemmung von MARKK über die Bindung an TESK1 erfolgt und nicht durch Phosphorylierung verursacht wird.

Die Ergebnisse der Bindungsassays und der *in vitro* Untersuchungen konnten in Expressionsstudien in CHO Zellen bestätigt werden. Die Einzeltransfektion der Kinasen hat auf Grund der unterschiedlichen Funktionen sehr verschiedene Effekte auf das Zytoskelett: MARKK destabilisiert MT und Aktin, während TESK1 zu verstärkten Aktin-Stressfasern führt und das MT-Netzwerk weitgehend nicht beeinflusst (Abb. 18 und Abb. 24).

Im Falle einer Koexpression von MARKK und TESK1 in CHO Zellen ist MARKK nicht mehr in der Lage, die MT zu destabilisieren, während TESK1 nach wie vor die Ausbildung

von Stressfasern fördert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der *in vitro* Aktivitäts-Assays wird der MT-stabilisierende (MARKK-inhibierende) Effekt auch durch die inaktive TESK1-Mutante erzielt. Diese Beobachtung ist ein weiterer Beleg dafür, dass die Hemmung der MARKK durch die Bindung an TESK1 und nicht über Phosphorylierung vermittelt wird.

Die Effekte, die sich aus der Interaktion von MARKK und TESK1 ergeben, sind in Abbildung 38 zusammengefasst. Bemerkenswert ist dabei, dass durch die Bildung des Interaktionskomplexes nur die Aktivität einer Komponente – die von MARKK – beeinflusst wird. Durch die Wechselwirkung zwischen MARKK und TESK1 erfolgt neben der Stabilisierung von Aktin auch die Stabilisierung des MT-Netzwerkes.



**Abbildung 38: Die Hemmung von MARKK durch TESK1 führt zu einer erhöhten MT-Stabilität**

TESK1 und MARKK sind zwei Kinasen, die unterschiedliche Effekte auf das Zytoskelett der Zelle ausüben. Während MARKK die MAP-Phosphorylierung modulieren kann und auf diesem Wege die MT-Stabilität beeinflusst, wirkt TESK1 auf die Stabilität des Aktin-Netzwerkes. Die identifizierte Wechselwirkung dieser beiden Kinasen führt zu einer Inhibition der MARKK-Aktivität und ist ein möglicher neuer Weg, die Organisation der beiden Zytoskelett-Komponenten Mikrotubuli und Aktin zu koordinieren.

Die Ergebnisse der Aktivitätstests ziehen die Frage zur Wirkungsweise der Interaktion auf struktureller Ebene nach sich. Bei den untersuchten Proteinen MARKK und TESK1 handelt es sich um Serin/Threonin Kinasen. Die katalytische Aktivität aller Kinasen unterliegt einer strengen Regulation, welche durch unterschiedliche Mechanismen erreicht wird. So erfolgt zum Beispiel die Regulation der Zellzyklus-abhängigen cdk-Kinasen

durch die Interaktion mit Cyclinen (Jeffrey *et al.* 1995). Weiterhin sind mehrere Kinasen bekannt, die durch die Bindung an das kleine Regulatorprotein 14-3-3 in ihrer Aktivität beeinflusst werden (Bridges und Moorhead 2004). Unter anderem konnte eine solche Wechselwirkung auch für PAR-1B (*D. melanogaster* Homolog von MARK2) und TESK1 nachgewiesen werden (Hurov *et al.* 2004, Toshima *et al.* 2001b). Einige Kinasen besitzen regulatorische Sequenzen, die außerhalb der katalytischen Domäne liegen und Einfluss auf die Aktivität nehmen können. Hierzu zählen unter anderem Pseudosubstratdomänen wie z. B. bei GSK3 $\beta$  und autoinhibitorische Domänen wie z. B. bei PAK1 (Dajani *et al.* 2001, Parrini *et al.* 2001). Bei der Mehrzahl, der in der Literatur beschriebenen Beispiele von Kinase-Inhibitor-Komplexen, handelt es sich um die Wechselwirkung zwischen der Kinase und einem katalytisch nicht aktivem Regulatorprotein bzw. einer Regulatorsequenz. Die für MARKK und TESK1 charakterisierte Wechselwirkung zweier Kinasen, bei denen der Effekt auf die Aktivität lediglich durch deren Bindung und nicht durch Phosphorylierungsereignisse vermittelt wird, ist sehr ungewöhnlich. Wie beschrieben fungiert TESK1 in diesem Fall als Inhibitor von MARKK. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die Interaktion der carboxyterminalen Domäne von TESK1 mit der aminoterminalen katalytischen Domäne von MARKK zur Hemmung der Kinaseaktivität führt (Abb. 32).

Ein ähnlicher Wirkungsmechanismus ist für die Interaktion der beiden Kinasen MARK2 und PAK5 durch Mitarbeiter in unserem Labor identifiziert worden (Matenia *et al.* 2005). Hierbei ist PAK5 in der Lage die Aktivität von MARK2 allein durch Bindung zu hemmen (siehe auch 3.2.3). Die Interaktion dieser beiden Kinasen erfolgt jeweils über deren katalytische Domänen. Interessant ist der Vergleich zwischen der Wechselwirkung von MARKK-TESK1 und MARK2-PAK5 auch im Hinblick auf deren zelluläre Effekte. In beiden Fällen handelt es sich um die Interaktion zweier Kinasen, wobei die eine einen Einfluss auf das MT-Netzwerk hat (MARKK bzw. MARK2) und die andere die Organisation des Aktins reguliert (TESK1 bzw. PAK5). Bemerkenswert ist, dass in beiden Interaktionskomplexen jeweils die Aktin-regulierende Kinase die Aktivität der MT-regulierenden Kinase hemmt, aber umgekehrt die Aktivität der Aktin-regulierenden Kinase nicht beeinflusst wird. Somit wirken TESK1 und PAK5 beide inhibierend auf den Signaltransduktionsweg MARKK  $\rightarrow$  MARK  $\rightarrow$  MAP/Tau  $\rightarrow$  MT-Stabilität, wenn auch auf unterschiedlichen Ebenen. Die Kinasen TESK1 und PAK5 beeinflussen die Organisation von Aktin in der Zelle. Allerdings üben sie entgegengesetzte Effekte aus. Während PAK5 Aktin- Stressfasern auflöst und die Ausbildung von Filopodien fördert, führt die

Expression von TESK1 zu einer Verstärkung von Stressfasern (Dan *et al.* 2002, Toshima *et al.* 2001a). Möglicherweise, wirken PAK5 und TESK1 nicht nur auf MARK2 bzw. MARKK, sondern können auch ihre eigene Aktivität gegenseitig beeinflussen. Erste Hinweise darauf liefern Ergebnisse aus Untersuchungen zur TESK1 Regulation. Toshima und Kollegen fanden dabei heraus, dass TESK1 durch PAK3 phosphoryliert wird. Allerdings konnte nicht geklärt werden, welche Funktion diese Phosphorylierung hat (Toshima *et al.* 2001a).

Denkbar wäre die Bildung eines multiplen Komplexes aus allen vier Kinasen: MARKK, MARK, PAK5 und TESK1. Ein solcher Komplex würde eine genaue und fein abgestimmte Regulation der einzelnen Komponenten ermöglichen.

Wie bereits erwähnt, sind MARKK und TESK1 in verschiedenen Signalübertragungswegen an der Organisation des Zytoskelettes involviert. Die direkte Interaktion dieser beiden Proteine ist ein weiteres Beispiel für die Verzweigung und Koordination zwischen verschiedenen Signaltransduktionskaskaden. So sind Kinasen häufig nicht nur innerhalb eines Signalübertragungsweges involviert, sondern können in verschiedenen Kaskaden unterschiedliche Effektoren beeinflussen. Dies trifft auch auf MARKK zu, welche neben ihrer Funktion im MARKK – MARK – MAP Signaltransduktionsweg auch den p38/MAPK Signaltransduktionsweg beeinflusst.

Die Beteiligung einer Kinase in unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden ermöglicht die notwendige Koordination zwischen den verschiedenen Signaltransduktionswegen (crosstalk). Für die Interaktion von MARKK und TESK1 bedeutet dies, dass TESK1 neben seiner Funktion bei der Regulation des Aktin-Netzwerkes auch auf das MT-Netzwerk, über die Hemmung der MARKK, wirken kann.

Es wird vermutet, dass sich die Komponenten vieler Signalübertragungswege zumindest zeitweilig zu funktionellen Komplexen zusammenlagern. Gut untersucht ist dieses Verhalten z. B. bei den MAPK Signaltransduktionskaskaden. So ist unter anderem bekannt, dass die Kinasen des JNK-Signalübertragungsweges (MLK3, MKK7 und JNK) an das Gerüstprotein JIP-1 binden, wobei auf diese Weise die Spezifität der Signalweiterleitung aufrechterhalten wird (Whitmarsh 2006).

Für die untersuchten Proteine MARKK, TESK1 und SPRED1 ist ebenfalls eine Komplexbildung denkbar. Es hat sich gezeigt, dass diese Proteine jeweils direkt aneinander binden können, was aber nicht ausschließt, dass alle drei zusammen einen funktionellen Komplex in Zellen bilden. Eine solche Komplexbildung könnte die

Signaltransduktion unterstützen bzw. fördern. Weiterhin ist vorstellbar, dass die zelluläre Lokalisation der einzelnen Komponenten beeinflusst wird, was Auswirkungen auf den Signalfluss haben kann. Eine solche Komplexbildung könnte auch für die Integration unterschiedlicher Signale und für die Feinregulation der Signalweiterleitung von Bedeutung sein.

#### **7.4.1 TESK1 - ein Modulator der Tau Toxizität?**

Ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen der Aktin-regulierenden Kinase TESK1 und dem MT-stabilisierenden Protein Tau wurde aus den Ergebnissen von Untersuchungen zur Tau-Toxizität in *D. melanogaster* abgeleitet und war ein Ausgangspunkt für die durchgeführten Experimente. Cdi, das *D. melanogaster* TESK1-Homolog, war in einem genetischen Screen als ein Verstärker der Tau-Toxizität identifiziert worden (Shulman und Feany 2003). Zahlreiche Studien zum Mechanismus der Tau-Toxizität in Neuronen haben gezeigt, dass eine abnormal erhöhte Phosphorylierung von Tau zu den Hauptmerkmalen zählt (Lee *et al.* 1991, Iqbal und Grundke-Iqbal 1996). Eine der Kinasen, welche in der Lage ist Tau zu phosphorylieren, ist die MARK-Kinase. Diese wird unter anderem durch die vorgeschaltete Kinase MARKK aktiviert, welche Gegenstand dieser Arbeit ist (Timm *et al.* 2006). Beide Kinasen wurden ebenfalls als Modulatoren der Tau-Toxizität (MARK/Par1 als Unterdrücker und MARKK/TAO-1 als Verstärker) in dem bereits erwähnten genetischen Screen von Shulman und Feany identifiziert (Shulman und Feany 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen auf eine direkte Verbindung zwischen der Aktin-regulierenden Kinase TESK1 und dem MARKK – MARK – Tau Signaltransduktionsweg schließen. Die Wechselwirkung erfolgt auf der Ebene von MARKK und führt zu einer Inhibition der MARKK-Kinaseaktivität. Eine verminderte MARKK-Aktivität führt zu einer geringeren Tau-Phosphorylierung durch MARK, da MARK nicht durch die inhibierte MARKK aktiviert werden kann (Abb. 34). Dies würde allerdings bedeuten, dass TESK1 nicht wie bei Shulman und Feany beschrieben die Tau-Toxizität verstärkt, sondern reduziert. Da aber die Tau-Phosphorylierung in Neuronen auch durch andere Kinasen und Phosphatasen reguliert wird, kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass TESK1 direkt oder indirekt auch die Aktivität anderer (auf Tau wirkende) Signalproteine beeinflusst.

## 7.4.2 Einfluss von TESK1 und MARKK auf die Differenzierung

Bei der Differenzierung von Zellen müssen eine Vielzahl von Signalen und unterschiedlichste Prozesse koordiniert werden. Auch die räumliche und zeitliche Regulation der Stabilität bzw. Dynamik der Zytoskelett-Komponenten innerhalb einer Zelle ist von großer Bedeutung. So weist das Mikrotubuli-Netzwerk differenzierter Zellen, wie z. B. Neuronen, in verschiedenen Bereichen eine unterschiedliche Dynamik auf. Besonders deutlich wird dieses Phänomen im Axon, wo Soma-nahe Bereiche stabil und distale Regionen sehr dynamisch sind (Ahmad *et al.* 1993, Tanaka *et al.* 1995). Bei der Regulation der MT-Dynamik spielt das MT-stabilisierende Protein Tau eine wichtige Rolle (Caceres und Kosik 1990, Leger *et al.* 1994, Panda *et al.* 1999). Es hat sich gezeigt, dass eine Phosphorylierung von Tau in den KXGS-Motiven durch die MARK-Kinase für die neuronale Differenzierung notwendig ist (Biernat und Mandelkow 1999, Biernat *et al.* 2002). Weiterhin ist bekannt, dass auch MARKK für das Neuritenwachstum essentiell ist, da in PC12 Zellen nach einem Ausschalten von MARKK keine Polarisation erfolgen kann (Timm *et al.* 2003). Im Wachstumskegel (growth cone) sich bildender Neuriten, wo Mikrotubuli besonders dynamisch sind, kolokalisieren Tau, MARK und MARKK mit Aktin (Timm *et al.* 2003).

Auch die Dynamik des Aktin-Netzwerkes in differenzierenden Neuronen wird streng räumlich und zeitlich reguliert (Bradke und Dotti 2000, Da Silva und Dotti 2002, Luo 2000). So befinden sich im Wachstumskegel von Axonen gleichzeitig verschiedene Aktin-Strukturen, wie Filopodia und Lamellipodia, welche sich in einem ständigen Umbau befinden. Diese Dynamik, die eine gezielte Reaktion auf verschiedene Wachstumsstimuli möglich macht, wird unter anderem durch den Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin vermittelt (Kuhn *et al.* 2000, Sarmiere und Bamberg 2004). Die Aktivität von Cofilin wird durch die Kinasen LIMK und TESK, sowie die Phosphatase Slingshot reguliert (Arber *et al.* 1998; Toshima *et al.* 2001a, Soosairajah *et al.* 2005, Huang *et al.* 2005).

Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien in den letzten Jahren machen deutlich, dass die Kooperation zwischen MT und Aktin auf unterschiedlichen Ebenen abläuft und für Prozesse wie die Polarisation essentiell ist (Waterman-Storer und Salmon 1999, Goode *et al.* 2000, Dehmelt und Halpain 2003, Rodriguez *et al.* 2003). Die durchgeführten Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARKK und TESK1 können weitere Informationen über das Wechselspiel zwischen Aktin und Mikrotubuli im Hinblick auf die Differenzierung von Zellen liefern. Die Ergebnisse der Differenzierungsstudien in PC12



Zellen zeigen, dass die Expression von MARKK WT auf die Ausbildung eines Neuron-ähnlichen Zellfortsatzes weder eine fördernde noch eine hemmende Wirkung besitzt (Abb. 35 B, relative Zellzahl an differenzierten Zellen entspricht der, mit YFP als Kontrolle transfizierten). Es ist aber bekannt, dass ein Verlust an MARKK durch Verwendung von siRNA die Differenzierung verhindert (Timm *et al.* 2003). Somit ist das Vorhandensein dieser Kinase für die Polarisation der Zelle entscheidend. Auch die Expression der TESK1 inaktiven Mutante (TESK1 D170A), welche zwar die MARKK-Aktivität hemmen, aber nicht auf das Aktin-Netzwerk wirken kann, hat in den durchgeführten Studien keinen Einfluss auf die Differenzierung (Abb. 35). Anscheinend kann die überexprimierte inaktive TESK D170A die endogene MARKK nicht hemmen, da die Polarisation der Zelle nicht beeinflusst wird. Untersucht wurde auch die Wirkung der Aktin-regulierenden Kinase TESK1 auf die Differenzierung von PC12 Zellen (Abb. 35). Die Expression von TESK1 WT führt zur Ausbildung von multiplen, fingerartigen und Aktin-reichen Ausstülpungen. Diese Zellen sind nicht in der Lage, den durch NGF-induzierten Neuron-ähnlichen Phänotyp auszubilden. Hierbei scheint TESK1 über eine ähnliche Wirkungsweise wie die LIMK zu verfügen. In ihren Studien zum Einfluss von Cofilin auf die Migration von Fibroblasten konnten Dawe und Mitarbeiter zeigen, dass die Überexpression von aktiver LIMK in diesen Zellen zum Verlust der Zellpolarität und zur Ausbildung von multiplen Lamellipodien führte (Dawe *et al.* 2003). Da auch die Expression einer pseudophosphorylierten Mutante von Cofilin (inaktiv) den gleichen Effekt hatte, schlussfolgern die Autoren, dass ein Reservoir an aktivem Cofilin für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität nötig ist.

Eine gleichzeitige Expression von MARKK und TESK1 WT in PC12 Zellen führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Differenzierbarkeit im Vergleich zur TESK1-Einzeltransfektion. Somit ist MARKK auch in diesem Zellmodell nicht in der Lage, die Aktivität von TESK1 zu beeinflussen und so auf die Ausbildung des verstärkten Aktin-Netzwerkes einzuwirken.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert die Wechselwirkung zwischen MARKK und zwei neu identifizierten Interaktionspartnern: SPRED1 bzw. TESK1. Während für SPRED1 kein Einfluss auf die MARKK-Aktivität ermittelt werden konnte, hat sich gezeigt, dass TESK1 in der Lage ist MARKK zu hemmen. Diese Ergebnisse sind nicht nur für die Regulation der MARKK-Aktivität von Bedeutung, sondern auch im Hinblick auf die Zytoskelett-Organisation in der Zelle. Während TESK1 das Aktin-Netzwerk stabilisiert, bewirkt MARKK die Aktivierung der MARK Kinase, was zu einer erhöhten Phosphorylierung von MAPs und letztendlich zur Destabilisierung des MT-Netzwerkes führt. Als Folge der ermittelten Inhibition von MARKK durch die Interaktion mit TESK1 sind sowohl Aktin- als auch MT-Netzwerk stabil.

Die vorliegenden Daten zur Regulation der MARKK sind auch im Zusammenhang mit der möglichen Rolle von MARKK bei der Alzheimer Krankheit interessant, da eine erhöhte Phosphorylierung des Hirn-spezifischen MAPs Tau und die damit verbundene Bildung von Tau-Aggregaten Kennzeichen dieser Krankheit sind.

## 8. Literatur

- Ahmad F.J., Pienkowski T.P., Baas P. (1993) Regional differences in microtubule dynamics in axon. *J. Neurosci.* **13**(2): 856-866
- Akhmanova A. and Hoogenraad C.C. (2005) Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 47-54
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1997) Das Cytoskelett. In: Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland. 3. Auflage: 931-1018.
- Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatric* **64**: 146-148.
- Arber S., Barbayannis F.A., Hanser H., Schneider C., Stanyon C.A., Bernard O., Caroni P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-Kinase. *Nature* **393**: 805-809
- Bailly M. and Jones G.E. (2003) Polarised migration: cofilin holds the front. *Curr. Biol.* **13**: R128-R130
- Ball L.J., Jarauch T., Oschkinat H., Walter U. (2002) EVH1 domains: structure, function and interactions. *FEBS Lett.* **513**: 45-52
- Bamburg J.R. (1999) Proteins of the ADF/Cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Biol.* **15**: 185-230
- Bamburg J.R. and Wiggan O.P. (2002) ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* **12**: 598-605
- Biernat J., Gustke N., Drewes G., Mandelkow E.M., Mandelkow E. (1993) Phosphorylation of serine 262 strongly reduces the binding of tau protein to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *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., 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
- Binder L.I., Frankfurter A., Rebhun L.I. (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell. Biol.* **101**(4): 1371-1378

- Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H. (2006) Alzheimers disease. *Lancet*. **368**(9533): 387-403
- Braak H. and Braak E. (1991) Neuropathological stages of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82**: 239-259
- Braak E., Braak H. Mandelkow E.M. (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol.* **87**(6): 554-567
- Bradke F. and Dotti C.G. (2000) Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**(5): 574-581
- Brandt R., Hundelt M., Shahani N. (2005) Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim. Biophys. Acta* **1739**(2-3): 331-354
- Bridges D. and Moorhead G.B (2004). 14-3-3 proteins: a number of functions for a number of proteins. *Sci. STKE* **242**(re10): 1-8
- Bryan B., Kumar V., Stafford L.J., Cai Y., Wu G., Liu M. (2004) GEFT, a Rho family guanine nucleotide exchange factor, regulates neurite outgrowth and dendritic spine formation. *J. Biol. Chem.* **279**(44): 45824-45832
- Bundschu K., Gattenlöhner S., Knobloch K.P., Walter U., Schuh K. (2005) Tissue-specific Spred-2 promoter activity characterized by a gene trap approach. *Gene Expr. Patterns.* **6**(3): 247-255
- Bundschu K., Walter U., Schuh K. (2006) The VASP\_SPRED\_SPROUTY domain puzzle. *J. Biol. Chem.* **281**(48): 36477-36481
- Caceres A. and Kosik K.S. (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotide in primary cerebellar neurons. *Nature* **343**: 461-463
- Carlier M.F. (1982) Guanosine-5-triphosphate hydrolysis and tubulin polymerization. *Mol. Cell Biochem.* **47**(2): 97-113
- Chen H., Bernstein B.W., Bamberg J.R. (2000) Regulating actin-filament dynamics *in vivo*. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 19-23
- Chen Z., Hutchison M., Cobbs 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**(40): 28803-28807
- Christofori G. (2003) Split personalities: the agonistic antagonist sprouty. *Nature Cell Biol.* **5**: 377-379
- Clarke D.M., Brown M.C., LaLonde D.P., Turner C.E. (2004) Phosphorylation of actopaxin regulates cell spreading and migration. *J. Cell Biol.* **166**(6): 901-912

- Cohen A.W., Hnasko R., Schubert W., Lisanti M.P. (2004) Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol. Rev.* **84**(4): 1341-1379
- Cooper J.A. and Schafer D.A. (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 97-103
- Cox E.A., Sastry S.K., Huttenlocher A. (2001) Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol. Biol. Cell* **12**(2): 265-277
- Dajani R., Fraser E., Roe S.M., Young N., Good V., Dale T.C., Pearl L.H. (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **105**(6): 721-732
- Dan I., Watanabe N.M., Kusumi A. (2001) The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascade. *Trends Cell Biol.* **11**(5): 220-230
- Dan C., Kelly A., Bernard O., Minden A. (2002) PAK5, a new brain-specific kinase, promotes neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Mol. Cell Biol.* **22**(2): 567-577
- Da Silva J.S. and Dotti C. (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis *Nat. Rev. Neurosci.* **3**(9): 694-704
- Dawe H.R., Minamide L.S., Bamburg J.R., Cramer L.P. (2003) ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr. Biol.* **13**: 252-257
- Dehmelt L. and Halpain S. (2003) Actin and microtubules in neurite initiation: Are MAPs the missing link? *J. Neurobiol.* **58**(1): 18-33
- Desai A. and Mitchison T.J. (1997) Microtubule polymerisation dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 83-117
- de Vrij F.M., Fischer D.F., van Leeuwen F.W., Hol E.M. (2004) Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog. Neurobiol.* **74**: 249-270
- Dikic I. and Giordano S. (2003) Negative receptor signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**: 128-135
- Drewes G., Trinczek B., Illenberger S., Biernat J., Schmitt-Ulms G., Meyer H.E., Mandelkow E.M., 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 Alzheimer-specific site serine 262. *J. Biol. Chem.* **270**(13): 7679-7688
- Drewes G., Ebner A., Preuss U., Mandelkow E.M., Mandelkow E. (1997) MARK, a novel protein kinase that phosphorylates microtubule-associated proteins and triggers microtubule disruption. *Cell* **89**: 297-308

- Drewes G., Ebnet A., 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**(10): 548-555
- Ebnet A., Godemann R., Stamer K., Illenberger S., Trinczek B., Mandelkow E.M., Mandelkow E. (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implication for Alzheimers disease. *J. Cell Biol.* **143**(3): 777-794
- Engelhardt C.M., Bundschu K., Messerschmitt M., Renne T., Walter U., Reinhard M., Schuh K. (2004) Expression and subcellular localisation of Spred proteins in mouse and human tissues. *Histochem. Cell Biol.* **122**(6): 527-538
- Ferri C.P., Prince M., Brayne C. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**: 2112-2117
- Field S. and Song O.K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246
- Friedhoff P., von Bergen M., Mandelkow E.M., Mandelkow E. (2000) Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim. Biophys. Acta* **1502**: 122-132
- Galjart N. and Perez F. (2003) A plus-end raft to control microtubule dynamics and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**: 48-53
- Garrington T.P. and Johnson G.L. (1999) Organisation and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 211-218
- Gilleard C.J., Kellet J.M., Coles J.A., Millard P.M., Honavar M., Lantos P.L. (1993) The St. George's dementia bed investigation study: cardiovascular, neurological and neuropsychological correlates. *Acta Psychiatr. Scand.* **87**(4): 273-278.
- Goode B.L., Drubin D.G., Barnes G. (2000) Functional cooperation between microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 63-71
- 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**(4): 611-620
- Gustke N., Steiner B., Mandelkow E.M., Biernat J., Meyer H.E., Goedert M., Mandelkow E. (1992) The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett.* **307**(2):9511-9522
- Gustke N., Trinczek B., Biernat J., Mandelkow E.M., Mandelkow E. (1994) Domains of tau protein and interaction with microtubules. *Biochemistry* **33**: 9511-9522

- Guy G.R., Wong E.S., Yusoff P., Chandramouli S., Ling Lo T., Lim J., Wai Fong C. (2003) Sprouty: how does the branch manager work? *J. Cell Sci.* **116**: 3061-3068
- Hanafusa H., Torii S., Yasunaga T., Nishida E. (2002) Sprouty1 and sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* **4**(11): 850-858
- Hanks S.K. and Hunter T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**(8): 576-596
- Harmer N.J., Sivak J.M., Amaya E., Blundell T.L. (2005) 1.15 Å crystal structure of the *X. tropicalis* SPRED1 EVH1 domain suggest a fourth distinct peptide-binding mechanism within the EVH1 family. *FEBS Lett.* **579**:1161-1166
- Harris J., Werling D., Hope J.C., Taylor G., Howard C.J. (2002) Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. *Trends Immunol.* **23**(3): 158-164
- Haupt M., Kurz A., Pollman S., Romero B., Lauter H. (1991) Symptom progression in Alzheimer's disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* **39**(6):639
- Helmuth L. (2003) Detangling Alzheimer's disease. New insights into the biological bases of the most common causes of dementia are pointing to better diagnostics and possible therapeutics. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **43**:oa2.
- Hendrie H.C. (1997) Epidemiology of Alzheimer's disease. *Geriatrics.* **52** (Suppl.2): 4-6.
- Howard J. and Hyman A. (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature.* **17**:753-758
- Huang T.Y., DerMardirossian C., Bokoch G.M (2005) Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 1-6
- Hurov J.B., Watkins J.L., Piwnica-Worms H. (2004) Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinase to regulate localisation and activity. *Curr. Biol.* **14**: 736-741
- Hutchison M., Berman K.S., Cobbs M.H. (1998) Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **273**(44): 28625-28632
- Impagnatiello M.A., Weitzer S., Gannon G., Compagni A., Cotten M., Christofori G. (2001) Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signalling in endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **152**: 1087-1098
- Iqbal K. and Grundke-Iqbal I. (1996) Molecular mechanism of Alzheimer's neurofibrillary degeneration and therapeutic intervention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **777**: 132-138
- Jeffrey P.D., Russo A.A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Plavetich N. P. (1995) Mechanism of cdk activation revealed by the structure of CyclinA-cdk2 complex. *Nature* **376**: 313-320

- Johnson G.V.W. and Hartigan J. A. (1998) Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: an update. *J. Alzheimers Dis.* **3**: 125-141
- Johnson G.V.W. and Stoothoff W.H. (2004) Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J. Cell Sci.* **117**: 5721-5729
- Kaibuchi K., Kuroda S., Amano M. (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 459-486
- Kato R., Nonami A., Taketomi T., Wakioka T., Kuroiwa A., Matsuda Y., Yoshimura A. (2003) Molecular cloning of mammalian Spred-3 which suppresses tyrosine kinase-mediated Erk activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**: 767-772
- Kaverina I., Krylyshkina O., Small J.V. (2002) Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 746-761
- Kim H. J. and Bar-Sagi D. (2004) Modulation of signalling by sprouty: a developing story. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**(6): 441-450
- King J.A., Straffon A.F., D'Abaco G.M., Poon C.L., I S., Smith C.M., Buchert M., Corcoran N.M., Hall N.E., Callus B.A., Sarcevic B., Martin D., Lock P., Hovens C.M. (2005) Distinct requirements for the sprouty domain for functional activity of Spred proteins. *Biochem. J.* **388**(Pt2): 445-454
- Kopito R.R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Tren. Cell Biol.* **10**: 524-530.
- Kosik K.S., Joachim C.L., Selkoe D.L. (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**(11): 4044-4048
- Kuhn T.B., Meberg P.J., Brown M.D., Bernstein B.W., Minamide L.S., Jensen J.R., Okada K., Soda E.A., Bamburg J.R. (2000) Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and Rho family GTPases. *J. Neurobiol.* **44**(2): 126-144
- Kurz A. (1997) Klinische Diagnose der Alzheimer-Krankheit. In: *Handbuch Morbus Alzheimer. Psychologie Verlags Union, Weinheim, Deutschland.* 1. Auflage: 617-644
- LaLonde D.P., Brown M.C., Bouverat B.P., Turner C.E. (2005) Actopaxin interacts with TESK1 to regulate cell spreading on fibronectin. *J. Biol. Chem.* **280**(22): 21680-21688
- Laurent V., Loisel T.P., Harbeck B., Wehmann A., Grobe L., Jockusch B.M., Wehland J., Gertler F.B., Carlier M.F. (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **144**: 1245-1258
- Lee V.M., Balin B.J., Otvos L., Trojanowski J.Q. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* **251**: 675-678



- Leeksa O.C., van Achterberg T.A.E., Tsumura Y., Toshima J., Eldering E., Kroes W.G., Mellink C., Spaargaren M., Mizuno K., Pannekoek H., de Vries C.J. (2002) Human sprouty4, a new Ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. *Eur. J. Biochem.* **269**(10): 2546-2556
- Leger J.G., Brandt R., Lee G. (1994) Identification of tau protein regions required for process formation in PC12 cells. *J. Cell Sci.* **107**: 3403-3412
- Lei M., Robinson M.A., Harrison S.C. (2000) The active conformation of the PAK1 kinase domain. *Structure* **13**(5): 769-778
- 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. U.S.A.* **87**(2): 8272-8279
- Lisanti M.P., Tang Z., Scherer P.E., Kubler E., Koleske A.J., Sargiacomo M. (1995) Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. *Mol Membr. Biol.* **12**(1):121-4
- Lizcano J.M., Göransson O., Toth R., Deak M., Morrice N.A., Boudeau J., Hawley S.A., Udd L., Mäkelä T.P., Grahame Hardie D., 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
- Lopes M.A. and Bottino C.M. (2002) Prevalence of dementia in several regions of the world: analysis of epidemiologic studies from 1994-2000. *Arg. Neuropsiquiatr.* **60**(1):61-9
- Luo L. (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**(3): 173-80
- Lupas A., Van Dyke A., Stock J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**: 1162-1164
- Macheski L.M., Mullins R.D., Higgs H.N., Kaiser A.D., Blanchoin L., May R.C., Hall M.E., Pollard T.D. (1999) Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**: 3739-3744
- Maekawa M., Ishizaki T., Boku S., Watanabe N., Fujita A., Iwamatsu A., Obinata T., Ohashi K., Mizuno K., Namuriya S. (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinase ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**: 895-898
- Mandelkow E.M., Mandelkow E., Milligan R.A. (1991) Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.* **114**(5):977-991
- Mandelkow E. and Mandelkow E.M. (1995) Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Biol.* **7**: 72-81
- Mandelkow E.M. and Mandelkow E. (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell. Biol.* **8**: 425-427

- Mandelkow E.M.; Thies E., Trinczek B., Biernat J., Mandelkow E. (2004) MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J. Cell. Biol.* **167**(1): 99-110
- Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 19912-1934
- Matenia D., Griesshaber B., Li X., Thiessen A., Johne C., Jiao J., Mandelkow E., 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
- Matthew B.B. and Crews S.T. (1999) *Drosophila* center divider gene is expressed in CNS midline cells and encodes a developmentally regulated protein kinase orthologous to human TESK1. *DNA Cell Biol.* **18**(6): 435-448
- Mitchison T., Kirschner M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**:237-242
- Mitsopoulos C., Zihni C., Garg R., Ridley A.J., Morris J.D. (2003) The prostate-derived sterile 20-like kinase (PSK) regulates microtubule organisation and stability. *J. Biol. Chem.* **278**(20): 18085-18091
- Miyoshi K., Wakioka T., Nishinakamura H., Kamio M., Yang L., Inoue M., Hasegawa M., Yonemitsu Y., Komiya S., Yoshimura A. (2004) The sprouty-related protein, Spred, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganisation. *Oncogene* **23**(33): 5567-76
- Moore T.M., Garg R., Johnson C., Coptcoat M.J., Ridley A.J., 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 organisation. *J. Biol. Chem.* **275**(6): 4311-4322
- Morishima-Kawashima M. and Ihara Y. (2002) Alzheimer's disease:  $\beta$ -amyloid protein and tau. *J. Neurosci. Res.* **70**: 392-401
- Mullins R.D., Heuser J.A., Pollard T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**: 6181-6186
- Mutter J., Naumann J., Sadaghiani C., Schneider R., Walach H. (2005) Die Alzheimer-Krankheit: Quecksilber als pathogener Faktor and Apolipoprotein E als Moderator. *Toxikologie* **18**(4): 294-301
- Nikolopoulos S.N. and Turner C.E. (2000) Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J. Cell Biol.* **151**(7): 1435-1447
- Nishimura I., Yang Y., Lu B. (2004) PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell* **116**(5): 671-682

- Nobes C.D. and Hall A. (1995) Rho, Rac and cdc42 GTPase regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62
- Nogales E. (2001) Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**: 397-420
- Nonami A., Taketomi T., Kimura A., Saeki K., Takaki H., Sanada T., Taniguchi K., Harada M., Kato R., Yoshimura A. (2005) The sprouty-related protein, Spred1, localizes in lipid raft/caveola and inhibits ERK activation in collaboration with caveolin-1. *Genes Cells* **10**: 887-895
- Panda D., Miller H.P., Wilson L. (1999) Rapid treadmilling of brain microtubules free of microtubule-associated proteins in vitro and its suppression by tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12459-12464
- Parrini M.C., Lei M., Harrison S.C., Mayer B.J. (2002) PAK1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by cdc42 and Rac1. *Mol. Cell.* **9**:73-83
- Raftopoulou M., Hall A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* **265**(1):23-32
- Renfranz P.J. and Beckerle M.C. (2002) Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 88-103
- Ridley J.A. (2001) Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* **114**: 2713-2733
- Riento K. and Ridley A.J. (2003) ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**(6): 446-456
- Robinson M.J. and Cobb M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:180-186
- Rodriguez O.C., Schaefer A.W, Mandato C.A., Forscher P., Bement W.M. Waterman-Storer C.M (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **5**(7): 599-609
- Rosok O., Pedeutour F., Ree A.H., Aasheim H.-C. (1999) Identification and characterisation of TESK2, a novel member of the LIMK/TESK family of protein kinases, predominantly expressed in testis. *Genomics* **61**: 44-54
- Rottner K., Behrendt B., Small J.V., Wehland J. (1999) VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat. Cell Biol.* **1**: 321-322
- Sarmiere P.D. and Bamberg J.R. (2004) Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J. Neurobiol.* **58**(1):103-17
- Scheijen B. and Griffin J.D. (2002) Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* **21**: 3314-3333

- Schneider A., Biernat J., von Bergen M., Mandelkow E., 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**(12): 3549-3558
- Selkoe D.J. (1998) The cell biology of  $\beta$ -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**: 447-453
- Shaul P.W. and Anderson R.G. (1998) Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol.* **275**(5 Pt 1): L843-51
- Shoji M., Golde T.E., Ghiso J., Cheung T.T., Estus S., Shaffer L.M., Cai X.D., McKay D.M., Tintner R., Frangione B. (1992) Production of Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. **258**: 126-129
- Shulman J.M. and Feany M.B. (2003) Genetic modifiers of tauopathy in *Drosophila*. *Genetics* **165**(3): 1233-1245
- Small J.V., Stradal T., Vignat E., Rottner K. (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* **12**(3): 112-120
- Soosairajah J., Maiti S., Wiggan O., Samiere P., Moussi N., Sarcevic B., Sampath R., Bamburg J.R., Bernard O. (2005) Interplay between components of the novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J.* **24**: 473-486
- Spillantini M.G. and Goedert M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **10**: 428-433
- Stoothoff W.H. and Johnson G.V.W. (2005) Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim. Biophys. Acta* **1739**: 280-297
- Tassi E., Biesova Z., Di Fiore P.P., Gutkind J.S., 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**(47): 33287-33295
- Timm T., Li X., Biernat J., Jiao J., Mandelkow E., Vandekerckhove J., Mandelkow E.M. (2003) MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/Par1. *EMBO J.* **22**(19): 5090-5101
- Timm T., Matenia D., Li X.-Y., Griesshaber B., Mandelkow E.M. (2006) Signaling from MARK to Tau: regulation, cytoskeletal crosstalk and pathological phosphorylation. *Neurodegener. Dis.* **3**(4-5): 207-217
- Torii S., Nakayama K., Yamamoto T., Nishida E. (2004) Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinase. *J. Biochem.* **136**: 557-561

- Toshima J., Ohashi K., Okano I., Nunoue K., Kishioka M., Kuma K., Miyata T., Hirai M., Baba T., Mizuno K. (1995) Identification and characterisation of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells. *J. Biol. Chem.* **270**(52): 31331-31337
- Toshima J., Tanaka T., Mizuno K. (1999) Dual specificity protein kinase activity of testis-specific protein kinase1 and its regulation by autophosphorylation of serine-215 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* **274**(17): 1271-1276
- Toshima J., Toshima J.Y., Amano T., Yang N., Narumiya S., Mizuno K. (2001a) Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in the integrin-mediated actin reorganisation and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell* **12**: 1131-1145
- Toshima Y.J., Toshima J., Watanabe T., Mizuno K. (2001b) Binding of 14-3-3 $\beta$  regulates the kinase activity and subcellular localization of testicular protein kinase 1. *J. Biol. Chem.* **276**(46): 43471-43481
- Toshima J., Toshima Y.J., Suzuki M., Noda T., Mizuno K. (2001c) Cell-type specific expression of a TESK1 promoter-linked lacZ gene in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**(3): 566-573
- Toshima J., Toshima J.Y., Takeuchi K., Mori R., Mizuno K. (2001d) Cofilin phosphorylation and actin reorganisation activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular sertoli cells. *J. Biol. Chem.* **276**(33): 31449-31458
- Trinczek B., Biernat J., Baumann K., Mandelkow E.M., Mandelkow E. (1995) Domains of Tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell* **6**: 1887-1902
- Trojanowski J.Q. and Lee V.M.Y. (1995) Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focus on phosphatases. *FASEB J.* **9**(15): 1570-1576
- Tsumura Y., Toshima J., Leeksa O.C., Ohashi K., Mizuno K. (2005) Sprouty-4 negatively regulates cell spreading by inhibiting the kinase activity of testicular protein kinase. *Biochem. J.* **387**(Pt3): 627-637
- Wakioka T., Sasaki A., Kato R., Shouda T., Matsumoto A., Miyoshi K., Tsuneoka M., Komiya S., Baron R., Yoshimura A. (2001) Spred is a sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* **412**: 647-651
- Walker R.A., O'Brien E.T., Pryer N.K., Soboeiro M.F., Voter W.A., Erikson H.P., Salmon E.D. (1988) Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell. Biol.* **107**: 1437-1448
- Waterman-Storer C.M. and Salmon E.D. (1999) Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 61-67

- Wegener A. (1982) Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *J. Mol. Biol.* **161**(4): 607-615
- Weingarten M.D., Lockwood A.H., Hwo S.Y., Kirschner M.W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**(5): 1858-1862
- Weis S. (1997) Neuropathologie des Morbus Alzheimer. In: Handbuch Morbus Alzheimer. Psychologie Verlags Union, Weinheim, Deutschland. 1. Auflage: 617-644
- Whitmarsh A.J. (2006) The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **34** (Pt 5)828-832
- Wittmann T. and Watermann-Storer C.M. (2001) Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.* **114**: 3795-3803
- Yang N., Higuchi O., Ohashi K., Nagata K., Wada A., Kangawa K., Nishida E., Mizuno K. (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated reorganisation. *Nature* **393**: 809-812
- Yarar D., To W., Abo A., Welch M.D. (1999) The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **9**: 555-558
- Yoneda T., Imaizumi K., Oono K., Yui D., Gomi F., Katayama T., Tohyama M. (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* **276**(17): 13935-13940
- Yoshida T., Hisamoto T., Akiba J., Koga H., Nakamura K., Tokunaga Y., Hanada S., Kumemura H., Maeyama M., Harada M., Ogata H., Yano H., Kojiro M., Ueno T., Yoshimura A., Sata M. (2006) Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene* **25**(45): 6056-6066
- Yustein J.T., Xia L., Kahlenburg J.M., Robinson D., Templeton D., Kung H.-J. (2003) Comparative studies of a new subfamily of human Ste20-like kinases: homodimerisation, subcellular localisation, and selective activation of MKK3 and p38. *Oncogene* **22**: 6129-6141
- Yustein J.T., Li D., Robinson D., Kung H.-J. (2000) KFC, a Ste20-like kinase with mitogenic potential and capability to activate the SAPK/JNK pathway. *Oncogene* **19**: 710-718
- Zhang W., Chen T., Wan T., He L., Li N., Yuan Z., Cao X. (2000) Cloning of DPK, a novel dendritic cell-derived protein kinase activating the ERK1/ERK2 and JNK/SAPK pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**(3): 872-879

Zihni C., Mitsopoulos C., Tavares I.A., Ridley A.J., Morris J.D.H. (2006) Prostate-derived sterile 20-like kinase 2 (PSK2) regulates apoptotic morphology via c-Jun N-terminal kinase and Rho kinase-1. *J. Biol.Chem.* **281**(11): 7317-7323

## 9. Anhang

### 9.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Autoradiogramm
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (Bicinchoninic acid)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
DB	DNA-Bindedomäne
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FKS	Fötale Kälberserum
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
His	Histidin
HS	Pferdeserum (horse serum)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
LiAC	Lithiumacetat
LIMK	<u>L</u> in-11, <u>I</u> sl-1, <u>M</u> e-3 Kinase
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MARK	MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase
MARKK	MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase Kinase
min	Minute
MP-ASMB	Max Planck Arbeitsgruppe für Strukturelle Molekularbiologie
mRFP	Mono-Rot fluoreszierendes Protein
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli Organisationszentrum (microtubule organizing center)
NGF	Nervenwachstumsfaktor ( <u>n</u> erv <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)



NFT	neurofibrilläre Bündel (neurofibrillary tangles)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Para-Formaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
Spred	sprouty-verwandtes Protein mit EVH-1 Domäne (sprouty related EVH-1 domain containing protein)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethy-ethylendiamin
TESK	Hoden spezifische Kinase (testis specific kinase)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminoethan
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -galactosid
YFP	Gelb (yellow) fluoreszierendes Protein
z. B.	zum Beispiel

## 9.2 Proteinsequenzen

### MARKK (*Rattus norvegicus*)

1	MPSTNRAGSL	KDPEIAELFF	KEDPEKLFDT	LREIGHGSFG	AVYFARDVRT	NEVVAIKKMS
61	YSGKQSTEKW	QDIIKEVKFL	QRIKHPNSIE	YKGCYLREHT	AWLVMEYCLG	SASDLLLEVHK
121	KPLQEVEIAA	ITHGALQGLA	YLHSHTMIHR	DIKAGNILLT	EPGQVKLADF	GSASMASPAN
181	SFVGTPYWMA	PEVILAMDEG	QYDGKVDVWS	LGITCIELAE	RKPPLFMNA	MSALYHIAQN
241	ESPTLQSNEW	SDYFRNFVDS	CLQKIPQDRP	TSEELLKHMV	VLRRERPETVL	IDLIQRTKDA
301	VRELDNLQYR	KMKKLLFQEA	HNGPAVEAQE	EEEEQDHGGG	RTGTVNSVGS	NQSIPSMSIS
361	ASSQSSSVNS	LPDASDDKSE	LDMMEGDHTV	MSNSSVIHLK	PEEENYQEEG	DPRTTRASAPQ
421	SPPQVSRHKS	HYRNREHFAT	IRTASLVTRQ	MQEHEQDSEL	REQMSGYKRM	RRQHQQQLMT
481	LENKKAEMD	EHRLRLDKDL	ETQRNNFAAE	MEKLIKKHQA	SMEKEAKVMA	NEEKKFQQHI

541 QAQQKKELNS FLESQKREYK LRKEQLKEEL NENQSTPKKE KQEWLSKQKE NIQHFQAEED

601 ANLLRRQRQY LELECRRFKR RMLLGRHNLE QDLVREELNK RQTQKDLEHA MLLRQHESMQ

661 ELEFRHLNTI QKMRCELIRL QHQTELTNQL EYNKRREREL RRRKRVMEVRQ QPKSLKSKEL

721 QIKKQFQDTC KIQTRQYKAL RNHLLLETPK SEHKAVLKRL KEEQTRKLAI LAEQYDHSIN

781 EMLSTQALRL DEAQEAECQV LKMQLQOQLE LLNAYQSKIK MQAEAQHDRE LRELEQRVSL

841 RRALLEQKIE EEMLALQNER TERIRSLER QAREIEAFDS ESMRLGFSNM VLSNLSPEAF

901 SHSYPGASSW SHNPTGGSGP HWGHPMGGTP QAWGHPMQGG PQPWGHPSPG MQGVPRGSSI

961 GVRNSPQALR RTASGGRTAQ GMSRSTSVTS QISNGSHMSY T

**Abbildung 39: Proteinsequenz von MARKK aus *R. norvegicus* (GenBank NP\_775449)**

Die unterschiedlichen Domänen sind verschiedenfarbig gekennzeichnet: N-terminale Kopfsequenz – schwarz, katalytische Domäne – rot, Substratbindungsdomäne – grau, Spacer-Domäne – blau und C-terminale Schwanzdomäne – grün.

### TESK1 (*Rattus norvegicus*)

1 MAGERPPLRG PPGGETPVEG PGGAGGGPGR GRPSSYRALR SAVSSLARVD DFDCAEKIGA

61 GFFSEVYKVR HRQSGQVMVL KMNKLPSNRS NTLREVQLMN RLRHPNILRF MGVCVHQGQL

121 HALTEYMNGG TLEQLLSSPE PLSWPVRLHL ALDIAQGLRY LHAKGVFHRD LTSKNCLVRR

181 EDGGFTAUVG DFGLAEKIPV YREGARKEPL AVVGSPLYMA PEVLRGELYD EKADVFAFGI

241 VLCELIARVP ADPDYLPRTA DFGLDVPAFR TLVGNDCPLP FLLLAIHCCS MEPSARAPFT

301 EITQHLEQIL EQLPEPTPLA KMPLAKAPLT YNQGSPVPRG PSATLPRSDP RLSRSRSDLF

361 LPPSPESPPS WGNLTRVNP FSLREDLRGG KIKLLDTPCK PATPLPLVPP SPLTSTQLPL

421 VASPESLVQP ETPVRRCRSL PSSPELPRRM ETALPGPGPS PVGPSTEERM DCEGSSPEP

481 PPGPAPQLPL AVATDNFIST CSSASQPWSA RGPSSLNPNP PAVVVNSPQG WAREPWNRAQ

541 HSLPRAAALE RTEPSPPPSA PREQEGLPC PGCCCLSPFSF GFLSMCPRPT PAVARYRNLN

601 CEAGSLLCHR GHAKPPTPS LQLPGARS

**Abbildung 40: Proteinsequenz von TESK1 aus *R. norvegicus* (GenBank NP\_113766)**

Die unterschiedlichen Domänen sind verschiedenfarbig gekennzeichnet: N-terminale Kopfsequenz – schwarz, katalytische Domäne – rot, konservierte Regionen – grün.

**Spred1 (*Homo sapiens*)**

```

1  MSEETATSDN  DNSYARVRAV  VMTRDDSSGG  WLPLGGSGLS  SVTVFKVPHQ  EENGCAFFFI
61  RGERLRDKMV  VLECMLKKDL  IYNKVTPTFH  HWKIDDKKFG  LTFQSPADAR  AFDRGIRRAI
121 EDISQGCPEP  KNEAEGADDL  QANEEDSSSS  LVKDHLFQQE  TVVTSEPYRS  SNIRPSPFED
181 LNARRVYMQS  QANQITFGQP  GLDIQSRSM  YVQRQISKEC  GSLKSQNRVP  LKSIRHVSFQ
241 DEDEIVRINP  RDILIRRYAD  YRHPDMWKND  LERDDADSSI  QFSKPSKKS  DYLYSCGDET
301 KLSSPKDSVV  FKTQPSSLKI  KSKRRKEDG  ERSRCVYCQE  RFNHEENVRG  KCQDAPDPIK
361 RCIYQVSCML  CAESMLYHCM  SDSEGDFSDP  CSCDTSDDKF  CLRWLALVAL  SFIVPCMCCY
421 VPLRMCHRCG  EACGCCGGKH  KAAG

```

**Abbildung 41: Proteinsequenz von SPRED1 aus *H. sapiens* (GenBank NP\_689807)**

Die unterschiedlichen Domänen sind verschiedenfarbig gekennzeichnet: EVH-1 Domäne – braun; c-Kit Bindungsdomäne – grün, sprouty Translokationsdomäne – hellblau.

**Proteinsequenzvergleich zwischen der spry-TD Domäne von Spred1 und sprouty4**

```

Spred1      334  --RCVYQCQERFNHEENVRGK----QDAPDPKRCIYQVSCMLCAESMLYHCMS-DSEG
sprouty4    182  CEACGKCKCKECASPRITLPSCWVCNQECCLCSAQLVNYGTCLVQGIYHCTNEDDEG

Spred1      388  DFD-PCSDTSDDKFLRWLALVALSFIVPCMCCYVPLRMCHRCGEA-----
sprouty4    243  SCADHPCSCSRN----ARWSFMGALSIVLPCLLCYLPATGCVKLAQRGYDRLRRPGCR
Spred1      452  -----CGCCGGKHKAAG-----
sprouty4    302  CKHTNSVICKAASGDAKTSRPDKPF

```

**Abbildung 42: Proteinsequenzvergleich der spry-TD Domänen in humanem Spred1 und humanem sprouty4**

Identische (rot) und konservierte (stark: grün, schwach: blau) Aminosäuren sind farblich gekennzeichnet. Für den Vergleich mit Hilfe der ClustalW Software (Expasy) wurden die folgenden Sequenzen verwendet: Spred1 - NP\_689807 und sprouty4 - AAS46253.

### 9.3 Oligonucleotide

TESK_N_Nde_For:	5'– ATT CCA TAT GGC CGG GGA AC –3'
TESK_N_Bam_Rev:	5'– CGG GAT CCT CAC TCC AGG ATT TGT TC –3'
TESK_C_Nde_For:	5'– ATT CCA TAT GGC CGG GGA AC –3'
TESK_C_Bam_Rev:	5'– CGG GAT CCC TAA GAG CGT GCC CCA GG –3'
TESK_F_Xho_For:	5'– CCG CTC GAG GCA TGG CCG GGG AAC –3'
TESK_F_Nhe_Rev:	5'– CTA GCT AGC CTA AGA GCG TGC CCC AGG –3'
TESK_D170A_For:	5'– GGT GTG TTT CAC CGA GCC CTC ACA TCC AAG AAC TGT CTG G –3'
TESK_D170A_Rev:	5'– CCA GAC AGT TCT TGG ATG TGA GGG CTC GGT GAA ACA CAC C –3'
SP_1:	5'– ATC ATA TGA GCG AGG AGA CGG CGA C –3'
SP_2:	5'– ATG CTA GCT CAT CCA GCA GCT TTA TG –3'
SP_5:	5'– CAA GGA ATG TGG AAG CCT AAA GTC C –3'
SP_6:	5'– GTC AGG ATG TCT GTA GTC TGCATA GC –3'
SP_10:	5'– CTC AGA GGA GGG TCG ACA TAT GAG CGA GGA GAC G –3'
SP_13:	5'– CGC GAA TTC CGC TGC GTA TAC TGC CAG –3'
SP_14:	5'– GGA GAC CCT CTA GAC ATA ATG GAG CAG –3'
T7:	5'– CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CC –3'

### 9.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Dynamische Instabilität der Mikrotubuli	11
Abbildung 2	Der MARKK – MARK – MAP Signaltransduktionsweg	13
Abbildung 3	Domänenstruktur von MARKK	15
Abbildung 4	Dynamisches Gleichgewicht der Aktin-Polymerisation (Tretmühlen Mechanismus)	17
Abbildung 5	Tretmühlen-Model der Aktinmaschinerie an der Bewegungsfront (leading edge) motiler Zellen	18
Abbildung 6	Domänenstruktur von TESK1 und TESK2 im Vergleich zu LIMK1 und LIMK2	21
Abbildung 7	Regulation von TESK1	23
Abbildung 8	Koordination von MT- und Aktin-Organisation	24

Abbildung 9	Domänenstruktur von Spred1	27
Abbildung 10	Prinzip des Hefe Zwei-Hybrid Systems	54
Abbildung 11	Ablauf eines Hefe Zwei-Hybrid Screens	56
Abbildung 12	Kartierung der Interaktionsdomänen zwischen MARKK und Spred1 mittels Hefe Zwei-Hybrid System	68
Abbildung 13	Interaktion von Spred1 im Hefe Zwei-Hybrid System	79
Abbildung 14	Analyse der Interaktion von Spred1 und MARKK mittels GST-Pulldown	71
Abbildung 15	<i>in vitro</i> Kinase Aktivitäts-Assay zur Kontrolle des Einflusses von GST auf MARKK WT	72
Abbildung 16	Spred1 übt keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von MARKK aus	73
Abbildung 17	Zelluläre Lokalisation von Spred1 in CHO Zellen	75
Abbildung 18	Zelluläre Verteilung von MARKK in CHO Zellen	76
Abbildung 19	Koexpression von MARKK WT und Spred1 in CHO Zellen	77
Abbildung 20	Charakterisierung der Interaktionsdomänen zwischen TESK1 und Spred1	79
Abbildung 21	Analyse der Interaktion von Spred1 und TESK1 mittels GST-Pulldown	80
Abbildung 22	GST hat keinen Einfluss auf die Aktivität von TESK1	81
Abbildung 23	Spred1 moduliert die Kinaseaktivität von TESK1	83
Abbildung 24	Expression von TESK1 WT und TESK1 D170A in CHO Zellen	85
Abbildung 25	Untersuchung der TESK1-Vesikel	86
Abbildung 26	Koexpression von Spred1 und TESK1 in CHO Zellen	88
Abbildung 27	Zusammenfassung der Interaktionstests zwischen MARKK und TESK1	90
Abbildung 28	MARKK WT hat keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität von TESK1	92
Abbildung 29	TESK1 hemmt die Aktivität von MARKK WT	93
Abbildung 30	TESK1 verringert die Autophosphorylierung von MARKK	94
Abbildung 31	Einfluss verschiedener TESK1-Mutanten auf die Aktivität von MARKK WT	94
Abbildung 32	TESK1 WT und Mutanten inhibieren die Aktivität der Kinasedomäne von MARKK	95
Abbildung 33	Koexpression von TESK1 und MARKK in CHO Zellen	97
Abbildung 34	Expression von MARKK, MARK2 und TESK1 in CHO htau40 Zellen	100
Abbildung 35	Einfluss der Expression von MARKK WT und TESK1 WT bzw. TESK1 D170A(inaktiv) auf die Differenzierung von PC12 Zellen	103
Abbildung 36	Schematische Darstellung der Effekte auf das MT- und Aktin-Netzwerk durch die Wechselwirkung zwischen MARKK und TESK1	104
Abbildung 37	Einfluss von Spred1 auf die Organisation des Aktin-Netzwerkes und die Differenzierung von Zellen	112
Abbildung 38	Die Hemmung von MARKK durch TESK1 führt zu einer erhöhten MT-Stabilität	114
Abbildung 39	Proteinsequenz von MARKK aus <i>R. norvegicus</i> (GenBank NP_775449)	135

---

Abbildung 40	Proteinsequenz von TESK1 aus <i>R. norvegicus</i> (GenBank NP_113766)	136
Abbildung 41	Proteinsequenz von Spred1 aus <i>H. sapiens</i> (GenBank NP_689807)	137
Abbildung 42	Proteinsequenzvergleich der sry-TD Domänen in humanem Spred1 und humanem sprouty4	137

## 9.5 Wissenschaftlicher Werdegang

### Hochschulausbildung:

1997-1999	Grundstudium im Fach Biochemie an der Universität Potsdam Abschluss des Vordiploms
1999-2002	Hauptstudium im Fach Biochemie an der Universität Leipzig Februar 2002 Diplomprüfung März – September 2002 Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. Kurt Engeland an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig mit dem Thema: „Zellzyklusabhängige Expression von Cyclin M“

### Dissertation:

2003-2007	ab Februar 2003 Promotion im Labor von Prof. Dr. Eckhard Mandelkow in der Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie mit dem Thema: Identifizierung neuer Interaktionspartner der Kinase MARKK aus <i>Rattus norvegicus</i>
-----------	--

### Veröffentlichungen:

Matenia D., Griesshaber B., Li X.Y., Thiessen A., Johne C., Jiao J., Mandelkow E., 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**(9): 4410-4422

Rother K., Johne C., Spiesbach K., Haugwitz U., Tschöp K., Wasner M., Klein-Hitpass L., Moroy T., Mössner J., Engeland K. (2004) Identification of TCF-4 as a transcriptional target of p53 signalling. *Oncogene* **23**(19): 3376-3384

Wasner M., Tschöp K., Spiesbach K., Haugwitz U., Johne C., Mössner J., Mantovani R., Engeland K. (2003) Cyclin B1 transcription is enhanced by the p300 coactivator and regulated during the cell cycle by a CHR-dependent repression mechanism *FEBS Lett.* **536**(1-3): 66-70

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Eva-Maria Mandelkow und Herrn Prof. Dr. Eckhard Mandelkow für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Vergabe der interessanten Themenstellung. Darüber hinaus bedanke ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen hilfreichen Anregungen.

Bei Herrn PD Dr. H. Quader bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Dorthe Matenia für ihre große Hilfsbereitschaft und ihr Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Thomas Timm und Herrn Dr. Jacek Biernat für die Einführung in die Thematik und die fruchtbaren Diskussionen zu aufgetretenen Problemen, die immer zu neuen Lösungsansätzen beitrugen.

Weiterhin möchte ich mich bei Bettina, Annika und Anja für ihre Unterstützung im Labor und die vielen Ratschläge bedanken.

Alice, Kirthi, Xiaoyu, Jian und allen hier nicht namentlich erwähnten Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, das ausgezeichnete Arbeitsklima und die netten Stunden in privater Runde.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie für ihre unermüdliche Unterstützung.

Ganz besonders bedanken möchte ich bei meinem Freund Marco Zehm (Señor), dessen starke Schulter mir immer Halt gab.