

**Reinigung und Charakterisierung einer
MARK-aktivierenden Kinase**

Dissertation

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

vorgelegt von
Thomas Timm
aus Buxtehude

Hamburg
2003

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 1997 bis Januar 2003 in der Max-Planck-Arbeitsgruppe für Strukturelle Molekularbiologie von Prof. Dr. E. Mandelkow durchgeführt.

Die Vertretung am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg erfolgte durch Prof. Dr. R. Bredehorst.

1. Gutachterin: Dr. E.-M. Mandelkow

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst

Tag der Disputation: 24. Oktober 2003

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	VI
Summary	VII
1 Einleitung	1
1.1 Proteinkinasen	1
1.2 Regulation von Proteinkinasen	3
1.3 Die Serin/Threoninkinasen der MARK/Par-1-Familie	5
1.4 Zielsetzung der Arbeit	9
2 Ergebnisse	11
2.1 Darstellung von MARK, MARK-Konstrukten und MARK-Punktmutanten	11
2.2 Identifizierung einer MARK-aktivierenden Kinase	16
2.2.1 Etablierung eines gekoppelten Assays zur Detektion eines MARK-aktivierenden Faktors	16
2.2.2 Anreicherung eines MARK-aktivierenden Faktors	17
2.2.3 Analyse des MARK-aktivierenden Faktors und Identifizierung einer MARK-Kinase	20
2.3 Klonierung und rekombinante Expression der MARKK	25
2.3.1 Klonierung der MARKK aus einer cDNA-Bibliothek aus Rattengehirn	25
2.3.2 Expression von MARKK in Insektenzellen	27
2.4 Untersuchung der Aktivierung von MARK mit MARKK <i>in vitro</i>	28
2.4.1 Aktivierung von MARK mit MARKK	28
2.4.2 Identifizierung der aktivierenden Phosphorylierungsstelle in MARK	30
2.4.3 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen MARK und MARKK	35

2.4.4	Versuch der zusätzlichen Aktivierung mit ausgewählten Kinasen	36
2.4.5	Aktivierung anderer MARK-Isoformen durch MARKK	37
2.4.6	Zielgerichtete Mutagenese von MARKK	38
3	Diskussion	39
3.1	Die Aktivität von MARK wird durch Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife kontrolliert	40
3.2	Eigenschaften der MARK-aktivierenden Kinase	47
4	Methoden	51
4.1	Molekularbiologische Methoden	51
4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	51
4.1.2	Darstellung der MARK2- und MARKK-Mutanten	52
4.1.3	Restriktion von DNA	52
4.1.4	Gelelektrophorese von DNA	53
4.1.5	Elution von DNA aus Agarosegelen	53
4.1.6	Ligation	53
4.1.7	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i>	53
4.1.8	Transformation	54
4.1.9	Plasmidpräparation im Mini- und Midimaßstab	54
4.1.10	Sequenzierung von DNA	54
4.2	Biochemische Methoden	55
4.2.1	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	55
4.2.2	Proteinbestimmungen	56
4.2.3	Präparation rekombinanter MARK aus <i>E.coli</i>	56
4.2.4	Präparation des MARK-aktivierenden Faktors (MAF) aus Schweinegehirn	58
4.2.5	Markierung von Proteinen mit FSBA	59
4.2.6	Kinase-Aktivitäts-Assay	60
4.2.7	Westernblot	60
4.2.8	Bestimmung des Phosphateinbaus	61
4.2.9	Phosphoaminosäureanalyse	62
4.2.10	Interaktionsuntersuchung durch Gelfiltration von rMARK2 und rMARKK	63

4.3	Zellbiologische Methoden	63
4.3.1	Rekombination virogener Partikel (Baculovirussystem)	63
4.3.2	Präparation rekombinanter MARKK, MKK3 und p38 aus Insektenzellen	63
4.3.3	Immunoprecipitation von rMARKK und rHA-MARK2 aus Zell-Extrakten	64
5	Materialien	65
5.1	Chemikalien	65
5.2	Antikörper und Enzyme	65
5.3	Expressionsstämme und Plasmide	65
5.4	Bildverarbeitung	66
5.5	Geräte	66
	Literaturverzeichnis	67
	Anhang	75
A.1	Abkürzungen	75
A.2	Identifikationsnummern der MARK-Isoformen und der MARKK	76
A.3	Proteinsequenz von MARK2 mit Kennzeichnung der Domänen und der Subdomänen	77
A.4	Sequenzen der verwendeten Peptide	
A.5	Sequenzen der verwendeten <i>primer</i>	78
A.6	Gefahrenhinweise	79

Verzeichnis der Abbildungen

1.1	Phylogenetischer Baum der eukaryotischen Proteinkinasen	2
1.2	Subdomänenmodell der eukaryotischen Proteinkinasen	3
1.3	Domänenstruktur der MARK-Isoformen	7
2.1	Expression und Reinigung rekombinanter MARK in E.coli	13
2.2	Balkendiagramm des Konstrukts MARK2Nt(T208A/S212A)	14
2.3	Schematische Darstellung des gekoppelten Detektionssystems	16
2.4	Chromatogramm und Aktivitätsprofil der Anionenaustauschchromatografie	18
2.5	Chromatogramm und Aktivitätsprofil der Kationenaustauschchromatografie	18
2.6	Chromatogramm und Aktivitätsprofil der Gelfiltration	19
2.7	Tabellarische Bilanzierung der Anreicherung eines MARK-aktivierenden Faktors (MAF) durch mehrere chromatografische Schritte	20
2.8	Effekt des MAF auf MARK	21
2.9	Autoradiografie der aktiven und inaktiven MARK, ohne und nach Behandlung mit MAF	22
2.10	Analyse des MAF	23
2.11	MARKK/TAO1	24
2.12	Kontrolle der amplifizierten und in pBluescript umgeschriebenen cDNA-Bibliothek	26
2.13	Kontrolle der PCR und der resultierenden Klone	26
2.14	Expression und Reinigung rekombinanter MARKK in E.coli	28
2.15	Effekt der rekombinanten MARKK auf MARK	29
2.16	Vergleich der Aktivierungsschleifen einiger ausgewählter S/T-Kinasen	30
2.17	Einfluß ausgewählter Punktmutationen in MARK2 auf die Basalaktivität und die Aktivierungsfähigkeit durch MARKK	32
2.18	Phosphorylierungsstatus von MARK2 und Alaninmutanten nach Autophosphorylierung und nach Aktivierung durch MARKK	33
2.19	Phosphoaminosäure-Analyse von phosphoryliertem Lip-Peptid, aktivierter und autophosphorylierter MARK2	34
2.20	Einfluss ausgewählter Kinasen auf die Aktivität von MARK und MARK(T208E)	37
2.21	MARKK aktiviert auch die Isoformen MARK1 und -3	37
2.22	Untersuchung der Aktivierungsfähigkeit der MARKK-Alanin-Mutanten	38

3.1	Regulationsmechanismus der Cdk2	41
3.2	Modell des katalytischen Zentrums von MARK2	44
3.3	Struktur der PKA mit gebundenem Inhibitor PKI	45
3.4	Partieller Sequenzvergleich bekannter MARK/Par-1-Substrate	46
A.1	Proteinsequenz von MARK2 mit Kennzeichnung der Domänen und der Subdomänen	77

Zusammenfassung

MARK, eine mit Par-1 aus *Drosophila* und *C.elegans* eng verwandte Kinasefamilie, ist in die Entwicklung und Erhaltung zellulärer Polarität involviert. Die Kinasen dieser Familie phosphorylieren Mikrotubuli-assoziierte Proteine (Tau, MAP2 und MAP4) an Stellen, die zur Ablösung der MAPs von den Mikrotubuli und deren Destabilisierung führen, daher der Name MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase (MARK). Die Hyperphosphorylierung dieser Stellen in den Mikrotubulibindungsdomänen ist charakteristisch für Tau-Protein, das aus neurofibrillären Bündeln ("neurofibrillary tangles, NFTs) - einem Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit - isoliert wird.

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus, durch den MARK mittels Phosphorylierung aktiviert wird, studiert und eine aktivierende Kinase identifiziert. Diese MARK-Kinase (MARKK) ist ein Mitglied der Ste20-Kinasefamilie, von denen viele eine wichtige Funktion in den MAP-Kinase-Signaltransduktionswegen übernehmen.

MARKK phosphoryliert und aktiviert MARKs über eine einzelne Stelle in der Aktivierungsschleife, dem Threonin₂₀₈ (Nummerierung nach MARK2). Autophosphorylierung von MARK und eine weitere durch MARKK phosphorylierte Stelle tragen nichts zu Aktivitätsregulation bei.

Ein Teil der aus Gehirn gereinigten MARK ist an Threonin₂₀₈ und Serin₂₁₂ äquivalenten Aminosäuren doppelt phosphoryliert, ähnlich den MAP-Kinasen, die durch doppelte Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife eingeschaltet werden. Studien mit Glutamaten als Platzhalter für Phosphothreonin und -serin sprechen bei MARK für eine desaktivierende Eigenschaft des Phosphoserins₂₁₂.

Summary

MARK, a kinase family related to Par-1 involved in establishing cell polarity in *D. melanogaster* and *C. elegans*, phosphorylates microtubule-associated proteins (tau, MAP2, MAP4) at sites that cause their detachment from microtubules and microtubule disassembly. These kinases are therefore termed MAP/microtubule affinity regulating kinases (MARKs). The sites phosphorylated by MARKs lie within the repeat domains of MAPs and are prominent in tau protein from the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.

This study addresses the mechanism through which MARK becomes activated by phosphorylation. The upstream kinase responsible for the activation of MARK was identified. This kinase - termed MARKK - is a member of the Ste20 family of kinases, many of which are involved in signalling through the MAP kinase pathway.

MARKK phosphorylates and activates MARKs at a single site within the activation loop (threonine₂₀₈ in MARK2). MARK also shows autophosphorylation activity, but this is not involved in the regulation of kinase activity. The same holds for additional residues phosphorylated by MARKK.

A fraction of MARK in brain tissue is found in a doubly phosphorylated form (at threonine₂₀₈ and serine₂₁₂), reminiscent of the dual activation of MAP kinase; however, the phosphorylation of the second site (serine₂₁₂) appears to be inhibitory.

1 Einleitung

1.1 Proteinkinasen

In eukaryotischen Zellen sind Proteinkinasen in nahezu jeden Aspekt der Signaltransduktion involviert. Sie regulieren in Zusammenarbeit mit ihren Gegenspielern, den Proteinphosphatasen, fast alle Prozesse in einer Zelle, angefangen von der Kommunikation der Zellen untereinander, über die Kontrolle der Transkription, Proliferation und Differenzierung, bis zur Koordination des Stoffwechsels (Hunter 1995).

Das menschliche Genom kodiert ungefähr 31000 Gene, wovon 531 zur Familie der Proteinkinasen gehören (Manning et al., 2002).

Die beiden größten Gruppen mit 478 Genen bzw. 491 daraus resultierenden Proteinen sind hier die Serin-/Threoninkinasen und die Tyrosinkinasen, das heißt, diese übertragen das γ -Phosphat eines Adenosin- oder Guanosintriphosphats auf die OH-Gruppe der Seitenketten von Serinen und Threoninen bzw. Tyrosinen.

Eine Klassifizierung in Gruppen und Familien erfolgt aufgrund der katalytischen Domäne der Proteinkinasen (Hanks und Hunter, 1995; Manning et al, 2002). Dieser enzymatisch funktionelle Teil ist in den meisten eukaryotischen Proteinkinasen (ePKs) konserviert. Die Abbildung 1.1 stellt einen phylogenetischen Baum der 491 eukaryotischen Proteinkinasedomänen dar, das kleine Fenster zeigt die atypischen Proteinkinasen (aPKs, 40 Mitglieder) und ihre verwandtschaftlichen Beziehungen untereinander (Manning et al., 2002). In der Gruppe der atypischen Proteinkinasen sind die Proteine zusammengefasst, die zwar enzymatische Aktivität besitzen, aber keine bzw. kaum Sequenzähnlichkeit zur katalytischen Domäne eukaryotischer Proteinkinasen aufweisen (Manning et al., 2002).

Die ePK-Domänen umfassen 250 - 270 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von ungefähr 30 kD entspricht, und lassen sich in elf Subdomänen unterteilen. Ein Strukturmodell der ePK-Domäne von MARK ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

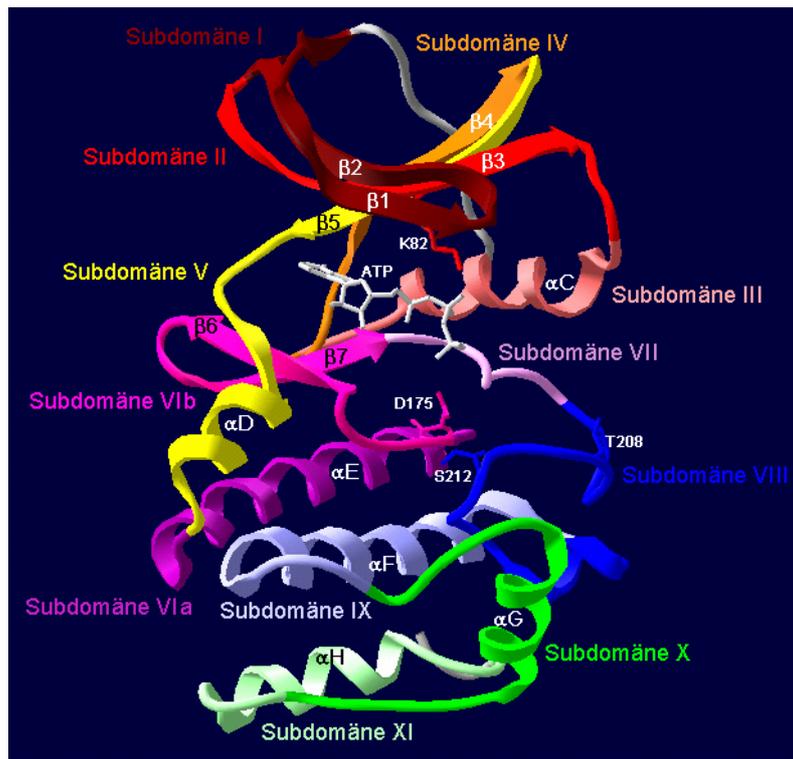


Abbildung 1.2: Subdomänenmodell der eukaryotischen Proteinkinasen. Strukturvorhersage für MARK2 auf Basis der Proteinkinase A. Die Subdomänen I - V und VIa - XI bilden zwei strukturelle Untereinheiten, zwischen denen sich die katalytische Tasche befindet. Sie sind über die kurze Helix αD verbunden. Der Zugang zu der katalytischen Tasche wird bei vielen Kinasen durch die Subdomäne VIII (blau) kontrolliert (siehe auch Abschnitt 1.2). Im inaktiven Zustand der Kinase schirmt diese auch Aktivierungsschleife genannte Subdomäne das katalytische Zentrum ab. In blau eingezeichnet sind die Seitenketten des Threonins₂₀₈ und des Serins₂₁₂. Diese beiden Aminosäuren haben eine wichtige Funktion bei der Regulation der Aktivität von MARK (siehe Abschnitt 2.4). Oberhalb des ATP-Moleküls (grau) befindet sich das Lysin₈₂ (rot). Diese invariante Aminosäure stabilisiert in ePKs das α - und β -Phosphat des ATPs. Bei der eigentlich katalytisch aktiven Aminosäure handelt es sich um ein Aspartat (D175, rosa), das in der katalytischen Schleife direkt unter dem γ -Phosphat des ATP-Moleküls, am Übergang von Subdomäne VIa (αE , violett) zu VIb ($\beta 6$, rosa) lokalisiert ist (Taylor et al., 1993). Das Substrat liegt bei der Phosphorylierung parallel zur katalytischen und zur Aktivierungsschleife. Das Aspartat stabilisiert dabei den Wasserstoff der OH-Gruppe des Substrats, so dass der Sauerstoff nukleophil am Phosphor des γ -Phosphat des ATP-Moleküls angreifen kann. Für die Primärstruktur von MARK2 und eine Übersicht über die Domänen und Subdomänen inklusive einiger ausgewählter Aminosäuren siehe Abbildung A.1

Im Durchschnitt besitzt jede Proteinkinase ungefähr 20 Substrate, wobei Kinasen eine hohe Spezifität und Selektivität zeigen können, wie z.B. die Phosphorylasekinase (neun bekannte Substratmotive; Kreegipuu et al., 1998), oder eine hohe Promiskuität aufweisen, wie z.B. die Proteinkinasen A und C (165 bzw. 181 Substratmotive; Kreegipuu et al., 1998).

1.2 Regulation von Proteinkinasen

Aufgrund der wichtigen und vielfältigen Aufgaben der Proteinkinasen ist eine strikte Regulation essentiell, sowohl zeitlich als auch lokal. Dies wird erreicht durch Kontrolle der

Transkription während des Zellzyklus, der Lokalisation der Kinasen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle und durch Modifikation der Aktivitäten der Kinasen.

Die Regulation der Aktivität einer Kinase ist meist mit der Stabilisierung der Aktivierungsschleife in einer offenen Konformation verbunden. Dies kann auf verschiedene Arten erfolgen:

- Kontrolle durch eine regulatorische Untereinheit oder Domäne, die im Zusammenspiel mit zusätzlichen Botenstoffen funktioniert. Beispiele hierfür sind zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und seine Bindung an die regulatorische Untereinheit (R) der Proteinkinase A (PKA), Calcium und Calmodulin (Bindung an Calmodulin-abhängige Kinase II, CaMKII) oder Calcium und Diacylglycerol (Bindung an den Aminoterminus der Proteinkinase C, PKC).
- Kontrolle durch eine regulatorische Untereinheit, deren Expressionslevel während des Zellzyklus variiert. Als Beispiel sei hier die Regulation der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDKs) durch Cycline genannt.
- Kontrolle durch zusätzliche Domänen, die eine Assoziation der Kinase an verschiedene Moleküle oder gar unterschiedliche subzelluläre Lokalisation vermitteln. Ein Beispiel hierfür sind die SH2- und SH3-Domänen der Src-Kinasen.
- Kontrolle durch zusätzliche Domänen, die die Kinase in einem autoinhibitorischen Prozess deaktivieren. Ein Vertreter dieses Prinzips ist die Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK).
- Kontrolle durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung. Hier gibt es die Möglichkeit der aktivierenden sowie der inhibierenden Modifikation. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) z.B. werden durch gleichzeitige Phosphorylierung eines Serin- und eines Tyrosinrestes in der Subdomäne VIII, der so genannten Aktivierungsschleife, aktiviert.

Oft wird eine Kontrolle der Kinaseaktivität durch die Kombination mehrerer Mechanismen erzielt. Zum Beispiel kann die Ablösung oder Bindung eines Kofaktors eine Konformationsänderung hervorrufen, so dass eine aktivierende (Auto)Phosphorylierung erfolgen kann (z.B. R/PKA; Steinberg et al., 1993). Dagegen wirkt die Phosphorylierung des Serin₉ der Glycogen-Synthase-Kinase 3 β inhibierend: Der Aminoterminus fungiert so als

Pseudosubstrat und blockiert das katalytische Zentrum (Dajani et al., 2001). Für eine Übersicht in Proteinkinase-Regulationsmechanismen siehe Johnson et al., 1996.

Proteinkinasen sind häufig in größere Proteinkomplexe eingebettet. Dies dient in erster Linie nicht allein der Verstärkung eines Signals, sondern gibt die Möglichkeit der Erhöhung der Spezifität der Signalkette, außerdem ist eine Feinregulation der Kinetik, der Dauer und der Amplitude des Signals möglich.

Ein Beispiel sind hier die MAPK-Kaskaden:

Ein extrazelluläres Signal stimuliert einen Rezeptor, der das Signal über G-Proteine an ein Kinasemodul im Inneren der Zelle weitergibt. Dieses Kinasemodul, auch Kernmodul genannt, besteht im Wesentlichen aus drei Kinasen, MAPKKK, MAPKK und MAPK, die nacheinander phosphoryliert und aktiviert werden. Von der Stufe der MAPK wird das Signal durch Phosphorylierung an zytoplasmatische oder kernständige Substrate weitergeben.

Je nach Zustand der Zelle wird dabei der Kernkomplex teilweise aufgelöst, die Komponenten führen die Signalkette nach Relokalisation fort oder bilden mit anderen Proteinen alternative Signaltransduktionswege. Für eine Übersicht über MAPK-Kaskaden siehe Cobb, 1999; English et al., 1999; Pearson et al., 2001.

1.3 Die Serin/Threoninkinasen der MARK/Par-1-Familie

Die Kinaseaktivität der MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierenden-Kinase (MARK) wurde ursprünglich aufgrund ihrer Fähigkeit entdeckt, das neuronale Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP) Tau zu phosphorylieren.

Die Phosphorylierung durch MARK führt zur Ablösung des Tau-Proteins von den Mikrotubuli, den Schienen des axonalen Transports, und damit zu deren Destabilisierung (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1995). Die anormale Hyperphosphorylierung und die Aggregation des Tau-Proteins zu Filamenten ("paired helical filaments", PHFs), die sich in intrazellulären neurofibrillären Bündeln ("neurofibrillary tangles", NFTs) ablagern, sind gemeinsam mit den Plaques aus aggregierten β -Amyloid die Kennzeichen der Alzheimerschen Krankheit (Hasegawa et al., 1992).

Neben dem hauptsächlich axonal vorkommenden Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau kann MARK auch andere strukturelle MAPs phosphorylieren: Das dendritische MAP2 und das ubiquitäre MAP4. Die Substratstellen liegen alle in der Mikrotubuli-Bindungs-Domäne der MAPs und haben die Konsensus-Sequenz KXGS, wobei S das phosphorylierte Serin und X ein hydrophober Rest ist (Illenberger et al., 1996).

Die MARKs gehören zur Familie der KIN1/Par-1/Snf1-Kinasen der CaM Kinase-Gruppe II (Hanks und Hunter, 1995; Manning et al., 2002) und weisen starke Homologien untereinander und zu den anderen Mitgliedern der Familie auf, wie EMK ("ELKL-motif kinase"; Inglis et al., 1993) und mPar ("mammalian Par-1"; Böhm et al., 1997) aus Mäusen.

Homologe Kinasen finden sich auch in evolutionär niederen Organismen, wie zum Beispiel Par-1 aus der Nematode *C. elegans* und aus der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* ("partition defective mutation" Guo und Kemphues, 1995) oder KIN1 und KIN2 aus *S. cerevisiae* und kin1+ aus *S. pombe* (Levin et al., 1990; Levin und Bishop., 1990).

Durch Klonierung aus Gehirn-cDNA-Bibliotheken wurden vier Isoformen von MARK gefunden ("Genbank"-Identifikationsnummern AF154845, BC008771, AF240782 bzw. AY057448; siehe auch Anhang A.2), wobei die Homologien der gleichen Isoform unterschiedlicher Organismen, wie Mensch, Ratte und Maus, größer sind, als die Homologien zwischen den verschiedenen Isoformen einer Spezies.

Diese Kinasen sind zwischen 722 und 793 Aminosäuren lang und haben ausgeprägte Homologien in der katalytischen Domäne (KAT), der Ubiquitin-assoziierten Domäne (UBA, Hoffmann und Bucher, 1996), einschließlich einer möglichen Membranlokalisierungssequenz ("membrane targeting motif", T; Matter et al., 1992) und dem carboxyterminalen Schwanz (C). Weniger Übereinstimmung ist in der aminoterminalen Kopfsequenz (N) zu finden. Der sehr basische so genannte "Spacer" ist der Teil mit der größten Variabilität zwischen den Kinasen (siehe Abbildung 1.3). Der carboxyterminale Schwanz (C) enthält neben der für diese Kinase-Familie typischen Kinase-assoziierten Domäne 1 (KA1; Hoffmann und Bucher, 1996) zwei amphipathische Helices, die Wechselwirkungen homologer oder heterologer Art vermitteln könnten (Segrest et al., 1990). Für MARK2 in Mäusen (mPar, "mammalian Par")

wird ein Zusammenwirken des "Spacers" und des carboxyterminale Schwanzes bei der Lokalisation postuliert (Böhm et al., 1997).

Bei den einzelnen Isoformen sind verschiedene Spleißvarianten möglich, die durch Insertion kleinerer Blöcke von 10 - 30 Aminosäuren in der "Spacer"-Domäne charakterisiert sind (Espinosa und Navarro, 1998).

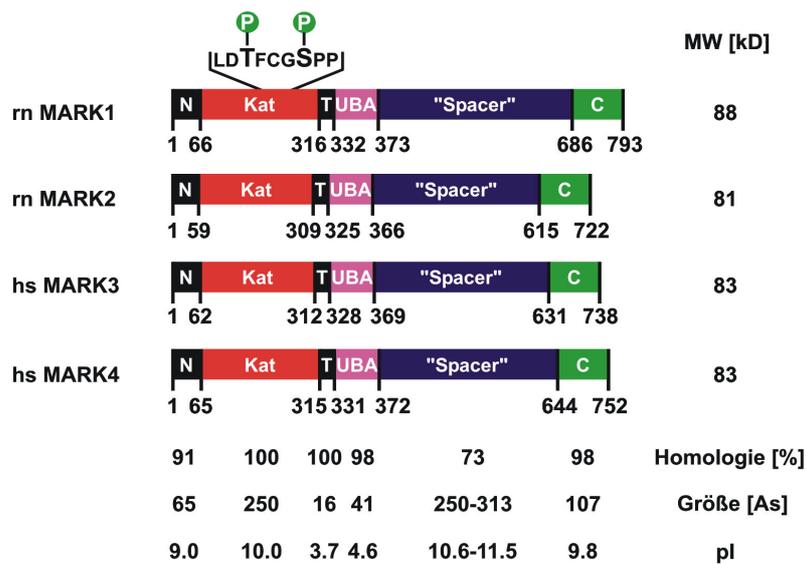


Abbildung 1.3: Domänenstruktur der MARK-Isoformen. Molekulargewichte, Größen und Homolgien der vier MARK-Isoformen. Die Proteine aus Mensch (*homo sapiens*, hs) und Ratte (*rattus norvegicus*, rn) unterscheiden sich nur in wenigen Aminosäuren. Bei MARK1 ist exemplarisch ein Ausschnitt der Sequenz der Aktivierungsschleife gezeigt. Die beiden Aminosäuren, die in der aus Gehirn gereinigten Kinase phosphoryliert gefunden wurden, sind hier mit Phosphaten (P, grün) dargestellt (siehe dazu auch die Abbildungen 1.2 und A.3).

Die Überexpression von MARK1 und MARK2 in Hamster-Ovarien-Zellen führt zur Zerstörung des Mikrotubuli-Netzwerkes und verursacht die Degeneration der Zellen (Drewes et al., 1997; Ebnet et al., 1999).

Allgemein sind die Kinasen der MARK/Par-1/KIN-Familie in die Entwicklung zellulärer Polarität involviert, z. B. bei der asymmetrischen Teilung knospender Hefen und der *C.elegans*-Zygoten oder bei der Bildung der Polaritätsachse in *D.melanogaster*-Embryonalzellen (Guo und Kemphues, 1996; Boyd et al., 1996; Nelson und Grindstaff, 1997; Shulmann et al., 2000; Tomancak et al., 2000).

In polarisierten Säugetierzellen, wie Epithelzellen oder Neuronen, wurde gezeigt, dass MARK/PAR-1 eine Rolle in der Errichtung und Erhaltung der asymmetrischen Organisation der Zelle spielt (Böhm et al., 1997; Cox et al., 2001; Biernat et al., 2002).

Mäuse, denen das Gen für MARK2 fehlt, zeigen schwere Störungen im Immunsystem (Hurov et al., 2001), die Aufgaben in der Polaritätsentwicklung können dabei vermutlich von den anderen Isoformen übernommen werden. Hier zeigen sich die teilweise redundanten Eigenschaften bzw. Funktionen innerhalb der MARK-Unterfamilie.

Folgende weitere Funktionen der Mitglieder der MARK-Unterfamilie sind bekannt:

S. Ogg und Mitarbeiter berichteten 1994 von einer Kinase, die bei Immunoprecipitation der Phosphatase Cdc25 aus Säugetierzellen an dieser haftend gefunden wurde. Wie sich später herausstellte, ist diese Kinase, C-TAK1 ("cdc-twentyfive-associated kinase 1") genannt, bis auf eine fehlende Insertion im "Spacer" identisch mit MARK3 (Peng et al., 1998). MARK3 vermittelt durch Phosphorylierung von Cdc25 dessen Bindung an ein Ankerprotein namens 14-3-3 und verhindert so die Lokalisation von Cdc25 im Kern, wo die Phosphatase sonst für eine Aktivierung der Cdc2 und ein Voranschreiten des Zellzyklus von G2 in die S-Phase sorgt.

Über eine Beteiligung von MARK3 an der Ras/Raf/MEK/ERK MAPK-Kaskade berichteten J. Müller und Mitarbeiter (Müller et al., 2001): MARK setzt hier eine Determinante für die Bindung des Gerüstproteins KSR1 an das Ankerprotein 14-3-3, das eine Stelle für Membranlokalisierung verdeckt, und verhindert so die Aktivierung von MEK1/2 durch Raf.

Weiterhin wird ein Mitwirken von MARK am Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg postuliert:

T. Kato und Mitarbeiter fanden erhöhte Expressionsraten von MARK4 (alias MARKL1, "MARK-like Kinase 1") bei Kernlokalisierung von β -Catenin, einem Aktivator des Transkriptionsfaktors Tcf/LEF. Dieser kontrolliert unter anderem die Genexpression von Cyclin D1 und c-Jun (Kato et al., 2001). Der Mechanismus beinhaltet vermutlich die Inaktivierung des GSK3/APC/Axin-Komplexes durch MARK/Par-1, der β -Catenin durch Phosphorylierung für die proteolytische Degradation markiert und so dessen Translokation in den Zellkern verhindert (Sun et al., 2001).

Diese Ergebnisse belegen, dass MARK eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen spielt. Es ist also von großen Interesse herauszufinden, wie und wodurch die Aktivierung von MARK gesteuert wird bzw. wie die Signaltransduktionsketten, in denen MARK sich befindet, beschaffen sind.

Jenkins et al. zeigten 2000, dass in menschlichen Neuroblastomazellen durch oxidativen Stress, hier durch Phenylarsenoxid, eine MARK-Aktivität induziert werden kann. Afti und Mitarbeiter konnten mit dem Transforming Growth Factor β (TGF- β) eine Kinase-Aktivität stimulieren (Afti et al., 1995), die später als MARK3/C-TAK1 identifiziert wurde (Beaulieu et al., 1999). Hinweise auf die direkt an der Aktivierung von MARK beteiligten Moleküle gibt es aber nicht.

In der aus Schweinegehirn gereinigten Kinase wurden in einem tryptischen Peptid der Aktivierungsschleife je ein phosphoryliertes Threonin und Serin gefunden (siehe Abbildung 1.2). Dephosphorylierung des Proteins mit einer Serin/Threonin-spezifischen Phosphatase führte zum Verlust der Kinaseaktivität, welche durch Inkubation mit ATP nicht wieder hergestellt werden konnte. Durch *in vitro*-Translation in Retikulozytenextrakten nach Austausch des Threonins und des Serins gegen Alanine wurde der Verlust der katalytischen Aktivität festgestellt. Dies führt zu der Vermutung, dass MARK über diese beiden Stellen reguliert wird. Mit einem spezifischen Antikörper wurde auch Phosphotyrosin nachgewiesen, eine selektive Dephosphorylierung reduzierte die Aktivität aber nur geringfügig (Drewes et al., 1997).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass es sich bei dem MARK-aktivierenden Faktor (MAF) um eine Serin/Threonin-Kinase handelt oder um einen Kofaktor, der eine aktivierende Autophosphorylierung induziert.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Als Startpunkt auf der Suche nach einem MARK-aktivierenden Faktor diente die Beobachtung, dass bei den ersten Schritten zur Präparation von MARK aus Schweinegehirn eine geringe Menge an MARK-stimulierender Aktivität mitgereinigt wurde (Drewes et al., 1997). Vor diesem Hintergrund wurde als Aufgabenstellung die biochemische Identifizierung eines MARK-aktivierenden Faktors formuliert.

Für die Erstellung eines geeigneten Detektionssystems sollte eine möglichst einfache Präparation rekombinanter MARK-Isoformen und -Konstrukte etabliert werden. Dabei sollte

auf eine hohe Ausbeute verbunden mit großer Reinheit geachtet werden, dies auch in Hinblick auf die Nutzung rekombinanter MARK als Ligand in einem Affinitäts-Reinigungsschritt. Ferner sollten Punktmutanten rekombinanter MARK produziert werden, die eine Aufklärung des Aktivierungsmechanismus unterstützen sollten.

Im Verlauf der Arbeit gelang die Anreicherung eines MARK-aktivierenden Faktors (MAF). Es konnte eine darin enthaltene Kinase identifiziert werden, die *in vitro* zu einer mehr als zehnfachen Aktivierung von MARK fähig ist. Diese MARK-Kinase sollte rekombinant exprimiert und ein effektives Reinigungsverfahren erarbeitet werden.

Unter Ausnutzung der Wildtyp-MARK und ausgewählter MARK-Mutanten sollten diejenigen Stellen in MARK bestimmt werden, die ursächlich für die MARKK-induzierte Aktivierung sind. Da MARKK nur das Threonin₂₀₈ (MARK2) in der Aktivierungsschleife phosphoryliert, sollte unter Verwendung ausgewählter Kinasen ermittelt werden, ob das ebenfalls in der Aktivierungsschleife befindliche Serin₂₁₂ zur Aktivierung beitragen kann. Dabei sollte der Einfluss einer vorherigen Phosphorylierung und Aktivierung durch MARKK berücksichtigt werden.

Schließlich sollte durch die Darstellung von Punktmutanten der MARKK ein Einblick in den Aktivierungsmechanismus dieser Kinase erhalten werden.

2. Ergebnisse

Ausgehend von der Erkenntnis, dass MARK durch Dephosphorylierung seiner Serin- und Threoninreste in der Aktivität gehemmt wird (Drewes et al., 1997), richtete sich die Suche nach einem Aktivator auf eine Serin/Threoninkinase oder einen Kofaktor, der eine aktivierende Autophosphorylierung bei MARK induziert.

Der Ergebnisteil ist in vier Abschnitte gegliedert: Im ersten Abschnitt wird die Expression und Reinigung rekombinanter MARK und MARK-Mutanten dargestellt, die für die Entwicklung eines Detektionssystems für einen aktivierenden Faktor notwendig sind, sowie für dessen Reinigung und der Aufklärung des Aktivierungsmechanismus. Der zweite Teil befasst sich mit der Anreicherung eines MARK-aktivierenden Faktors (MAF) aus Schweinegehirn und seiner Charakterisierung. Der dritte Abschnitt dokumentiert die Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung einer Kinase, die als Bestandteil des MARK-aktivierenden Faktors identifiziert werden konnte. Im vierten Teil wird die Untersuchung des Aktivierungsmechanismus beschrieben.

2.1 Darstellung von MARK, MARK-Konstrukten und MARK-Punktmutanten

Für ein Detektionssystem eines MARK-aktivierenden Faktors werden große Mengen an MARK gebraucht. Da die Gewinnung dieser Kinase aus Gewebe sehr aufwändig und mit relativ geringen Ausbeuten behaftet ist (ca. 50 µg aus 1 kg Schweinegehirn; Drewes et al., 1997), wurde MARK durch bakterielle Expression dargestellt. Dieses Verfahren bietet zusätzliche Vorteile: Es wird eine sehr homogene Präparation erhalten, da posttranslationale Modifikationen vernachlässigbar sind und zudem Heterogenität durch das Vorkommen verschiedener Isoformen vermieden wird. Außerdem lassen sich durch einfache genetische Modifikationen Funktionsmutanten der Kinase herstellen.

Zur Expression der Proteine wird der Vektor pNG2cHis verwendet (Schmidt-Ulms, 1998). Dieser Vektor kodiert für das jeweilige Kinase-Gen, fusioniert mit einem C-terminalen Polyhistidinschwanz und erlaubt eine einfache Reinigung der Proteine durch Affinitätschromatografie an immobilisiertem Nickel(II) (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC). Da MARK in *E.coli* in hohem Maße proteolytischer Degradation vom C-Terminus her unterliegt, wird durch die C-terminale Affinitätsmarkierung hauptsächlich vollständiges Protein erhalten, die Abbauprodukte werden hier nicht mitgereinigt. Die Expression erfolgt im *E.coli*-Stamm BL21(DE3)-pLys mit geringer Promotordurchlässigkeit im nicht induzierten Zustand. Hierdurch wird eine Ablagerung des Proteins in Einschlusskörpern in der *E.coli*-Zelle unterdrückt (G.Schmidt-Ulms, 1998).

Typische Ausbeuten sind 1-2 mg rekombinantes Protein pro Liter Kultur nach Chromatografie an einer Nickel-Chelat-Säule (NiNTA™, Qiagen), gefolgt von einem Kationenaustauscher. Die Ausbeute lässt sich durch Fermentation in größeren Gefäßen (10 L) nicht wie erwartet steigern. Im Gegenteil: Die bei dem größeren Volumen längere Dauer der Ernte der Zellen und deren Aufschluss schlägt sich in einer sehr viel geringeren Ausbeute pro Liter Kulturmedium nieder.

Die Abbildung 2.1A zeigt die Reinigung am Beispiel rekombinanter MARK2: die Spuren 1 und 2 beinhalten das Lysat nicht induzierter bzw. induzierter Zellen, in Spur 2 ist auf Höhe der Markierung eine deutliche Bande zu sehen. In Spur 3 ist das nach Affinitätschromatografie erhaltene Protein erkennbar. Die noch zahlreich enthaltenen Verunreinigungen sind nach Kationenaustauschchromatografie fast vollständig entfernt (Spur 4, siehe Pfeil). Die aus dem SDS-Gel geschätzte Reinheit liegt bei 90-95 % und ist für die Verwendung in Aktivitätsmessungen mit dem für MARK spezifischen Substratpeptid TR1 ("Tau Repeat 1", erste repetitive Sequenz der humanen Tau-Isoform hTau40: 255-NVKSKIGSTENLK-268) vollkommen ausreichend. Oft kann auf den zweiten zeitraubenden und verlustbehafteten Reinigungsschritt verzichtet werden, da die Reinheit bereits nach dem ersten Schritt ausreichend ist. Die Lagerung erfolgt nach Dialyse gegen einen Puffer, der 50 % Glycerol enthält, bei -20 °C. Unter diesen Bedingungen bleibt die Probe flüssig, ist sofort portionsweise entnehmbar und längere Zeit (ungefähr sechs Monate) ohne Aktivitätsverlust, Degradation oder Denaturierung des Proteins lagerbar.

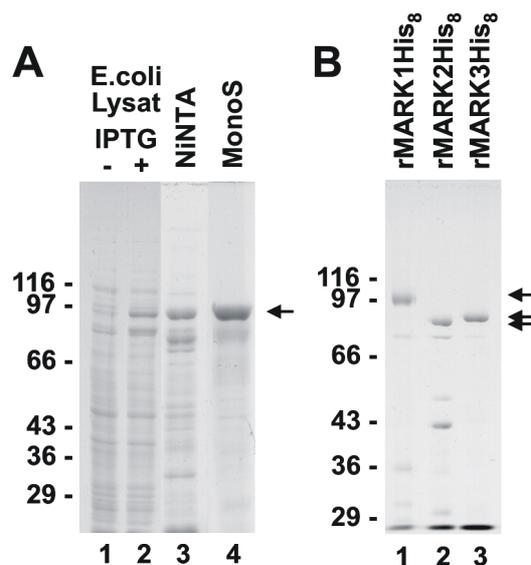


Abbildung 2.1: Expression und Reinigung rekombinanter MARK in E.coli. (A) Stationen der Reinigung von MARK2. (B) Gegenüberstellung rekombinanter MARK1, -2 und -3. An der unteren Kante des abgebildeten Gels sind in allen drei Spuren Verunreinigungen sichtbar, die vermutlich durch proteolytische Degradation entstanden sind. Die Spur 2 (MARK2) beinhaltet zusätzlich Abbauprodukte bei 40 und 50 kD.

In Abbildung 2.1B ist eine Gegenüberstellung der rekombinanten MARK1, -2 und -3 zu sehen, die apparenten Molekulargewichte (101, 88, 89 kD) sind etwas höher als die berechneten (90, 82, 84 kD, zu den Werten in Abb. 1.1 müssen 1,2 kD für den Polyhistidinschwanz addiert werden). Die MARK-Punktmutanten lassen sich auf die gleiche Weise darstellen, zum Teil mit etwas grösseren Ausbeuten: 3-4 mg/L Kultur bei MARK2(S212A), MARK2(T208A/S212A), MARK2(S212E) und MARK2(T208E/S212E). Anscheinend stören die aktiven Kinasen den Metabolismus der Bakterien, was zu einer geringeren Expression führt. Die Expression der vierten Isoform war unter diesen Bedingungen nicht erfolgreich und wurde zunächst zurückgestellt.

Für die Herstellung einer Affinitätsäule, bei der MARK als Ligand dient, werden sehr große Mengen rekombinanten Proteins benötigt; das Nickel-Chelat-Material hat eine Kapazität von mindesten 5 bis 10 mg Protein pro mL Säulenvolumen. Zusätzlich muss der Ligand längere Zeit bei 4-10 °C gegenüber Proteolyse und Denaturierung stabil sein. Des weiteren soll, da es sich bei dem MAF vermutlich um eine Kinase handelt, die Affinität zum Liganden erhöht werden, indem die Phosphorylierungsstelle(n) in der angenommenen Aktivierungsschleife gegen nicht phosphorylierbare Aminosäuren ausgetauscht werden. Vorbilder für diese Vorgehensweise finden sich zum Beispiel in Form der PKA, dessen Inhibitor PKI an der

Phosphorylierungsstelle ein Alanin besitzt statt eines Serins wie die Substrate der PKA. Das nicht phosphorylierbare Substrat bleibt somit in der Bindungstasche stecken.

Zu diesem Zweck wurde eine Deletionsmutante erstellt, bei der der "Spacer" und der C-Terminus fehlen und bei der das Threonin₂₀₈ und das Serin₂₁₂ in der Subdomäne VIII gegen Alanine ausgetauscht wurden (Abbildung 2.2). Die Expression erfolgt mittels des Vektor pET16nHis, welcher diese Mutante (MARK2Nt(T208A/S212A)) zur Kopplung an die Nickel-Chelat-Matrix mit einer N-terminalen poly-Histidin-Sequenz fusioniert.

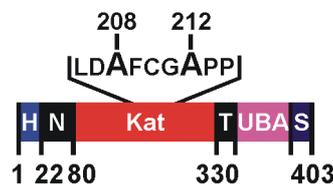


Abbildung 2.2: Balkendiagramm des Konstrukts MARK2Nt(T208A/S212A). Den MARK-Domänen ist eine Histidin-reiche Sequenz von insgesamt 21 Aminosäuren vorangestellt (MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRH; Timm,1997).

Als Wirtsorganismus wird der E.coli-Stamm BL21(DE3) benutzt, der Stamm mit geringerer Promotordurchlässigkeit (BL21(DE3)-pLys) ist hier nicht notwendig. Die Fermentation dieser Zellen führt in großem Maßstab (10 L Kulturmedium) zu einer Ausbeute von mehr als 7 mg pro Liter Kultur, bei leichter Überschreitung der Kapazität der Nickel-Chelat-Matrix (ungefähr 7 mg/mL für ein Protein dieser Größe) kann in einem einzelnen Chromatografieschritt eine Reinheit von mindestens 95 % erreicht werden.

Um Einblicke in den Aktivierungsmechanismus von MARK zu bekommen, wurden diverse Punktmutanten von MARK2 erstellt und exprimiert. Ein Objekt der gezielten Mutagenese ist das Lysin₈₂ (siehe Abbildung 1.2). Hierbei handelt es sich um eine Aminosäure, die vermutlich, wie das Lysin₇₂ in homologer Position in der PKA, eine stabilisierende Wechselwirkung mit den α - und β -Phosphaten des ATPs vermittelt. Ein Austausch dieser Aminosäure gegen ein Alanin oder das sehr viel raumfüllendere Arginin führt bei der PKA zu einem totalen Verlust der Kinaseaktivität (siehe Diskussion).

In der Aktivierungsschleife der MARK finden sich zwei potenziell phosphorylierbare Reste: das Threonin₂₀₈ und das Serin₂₁₂. Diese beiden Aminosäuren sind in der nativen Kinase

MARK aus Schweinegehirn in phosphorylierter Form gefunden worden (Drewes et al., 1997) und tragen vermutlich zur Regulation der MARK bei. Das Threonin₂₀₈ befindet sich in homologer Position zum Threonin₁₉₇ der PKA, die (Auto)Phosphorylierung dieses Restes führt zu einer Aktivierung der Kinase. Homolog zu dem Serin₂₁₂ in MARK gibt es in der PKA ein Threonin (T₂₀₁), das aber bisher nicht als phosphorylierter Rest beobachtet wurde. Wie bei MARK der Einfluss dieser Aminosäuren, ob unmodifiziert oder modifiziert, auf die Aktivität ist, sollte durch Mutagenese dieser Reste herausgefunden werden.

Der Einfluss der polaren Natur dieser Aminosäuren kann durch den Austausch gegen ein unpolares Alanin untersucht werden. Die Untersuchung der Wirkung einer Phosphorylierung dieser Reste erweist sich als problematisch, da Kinasen, die diese Reste phosphorylieren, bis jetzt nicht bekannt sind und sich die Umsetzung von MARK und ATP mit einem Katalysator wie z.B. Mangan (Schieven und Martin, 1988) bezüglich bestimmter Aminosäuren nicht steuerbar ist. In der Literatur ist jedoch beschrieben, dass der Austausch von Threonin oder Serin gegen Glutamat oder Aspartat - zumindest teilweise - den Status der Phosphorylierung vortäuschen kann: In der "Myosin I Heavy Chain Kinase" I (MIHCK) kann durch Mutagenese der dem Threonin₂₀₈ äquivalenten Aminosäure zu einem Glutamat die Aktivität gesteigert werden. Dagegen führt der Austausch des dem S₂₁₂ äquivalenten Restes gegen Aspartat und Glutamat zu Enzymen mit reduzierter Aktivität, bei einem Wechsel zu Alanin ist das Enzym inaktiv (Szczepanowska et al., 1998).

Die Plasmide der MARK-Alanin-Mutanten wurden freundlicherweise von Dr. G. Drewes (MPG-ASMB, Hamburg) zur Verfügung gestellt, und die Glutamat-Mutanten wurden durch gezielte Einführung von Punktmutationen erstellt. Die Expression und Reinigung aller Mutanten erfolgte analog zur Darstellung der Wildtyp-Kinase.

2.2 Identifizierung einer MARK-aktivierenden Kinase

2.2.1 Etablierung eines gekoppelten Assays zur Detektion eines MARK-aktivierenden Faktors

Um einen aktivierenden Faktor zu finden, wird ein spezifisches und sensitives Detektionssystem benötigt.

Experimente mit einem Peptid, das der Aktivierungsschleife von MARK nachgebildet ist (203-GNKLDTFCGSPPYAAPQLQGKK-224, Lip-Peptid; Nummerierung nach MARK2), führten zur Anreicherung einer Aktivität, die das Tyrosin₂₁₈ in MARK phosphoryliert. Eine Aktivierung von MARK ist damit nicht verbunden (Schmidt-Ulms, 1998). Außerdem war diese Aminosäure bei der Analyse der aus Gehirn gereinigten Kinase als nicht-phosphoryliert gefunden worden (Drewes et al., 1997).

Ein Detektionssystem mit aus Gehirn gereinigter, dephosphorylierter Kinase erwies sich als nicht praktikabel, da für diese Methode sehr große Mengen an Kinase und an teurer Phosphatase PP2a benötigt werden.

Die bereits unter 2.1 genannten Vorteile der Nutzung rekombinanter Proteine und das Vorhandensein eines sehr spezifischen Substratpeptids, das der ersten repetitiven Sequenz des Tauproteins nachempfunden TR1 (255-NVSKIGSTENLK-268), führten zur Erstellung eines auf rekombinanter MARK basierenden gekoppelten Detektionssystems.

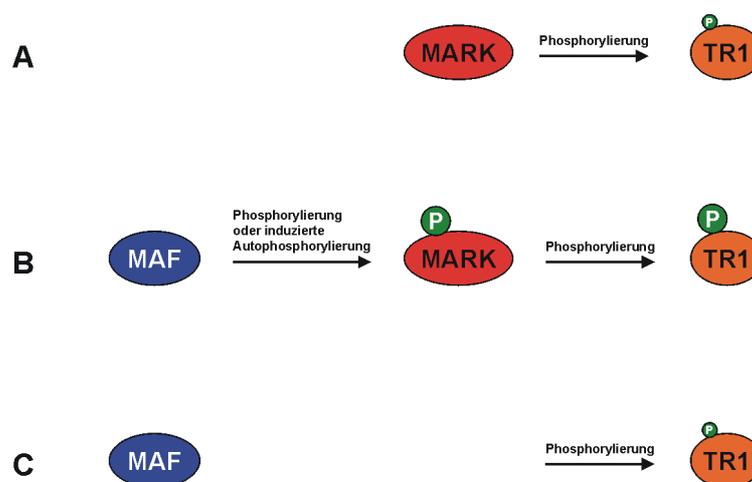


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des gekoppelten Detektionssystems. Der gemessene Phosphateinbau in das MARK-Substratpeptid TR1 ist das Resultat mehrerer Reaktionen: Ein geringer Beitrag durch die Basalaktivität der rekombinanten MARK (A), ein starker Einbau durch MAF-aktivierter rekombinanter MARK (B) und ein geringer Anteil durch in der Probe vorhandener endogener Kinasen (C). Die Differenz aus B, A und C ergibt die durch MAF induzierte Erhöhung der MARK-Aktivität.

Für die Ermittlung einer Aktivierung werden pro Probe drei Messungen benötigt (siehe Abbildung 2.3):

Rkt. A) Messung der Basalaktivität von MARK.

Rkt. B) Messung der MARK-Aktivität bei Einwirkung eines aktivierenden Faktors (MAF).

Rkt. C) Messung der MAF-enthaltenden Probe bezüglich des Substratpeptides TR1, um mit-gereinigte endogene MARK oder eine unspezifisch das Peptid phosphorylierende Kinase zu detektieren.

Durch Subtraktion der erhaltenen Aktivitäten A und C von B wird die durch MAF erzeugte Erhöhung der MARK-Aktivität erhalten. Dabei muss die eingesetzte Menge an rekombinanter MARK so hoch sein, dass in möglichst kurzer Inkubationszeit ein deutlich über dem Rauschgrund liegendes Signal erzeugt wird. Andererseits darf die Basalaktivität der rekombinanten Kinase, d.h. die eingesetzte Menge an Kinase, nicht so hoch sein, dass nur ein geringer Anteil der Kinase aktiviert wird und das Signal der aktivierten Kinase nicht aus dem Basalsignal heraussticht.

2.2.2 Anreicherung eines MARK-aktivierenden Faktors

Ein aktivierender Faktor sollte, wie zuvor die Proteinkinase MARK (Drewes et al., 1995 und 1997), mittels konventioneller Chromatografie aus Schweinegehirn isoliert werden, da dieses Gewebe relativ einfach, in großen Mengen und vor allem sehr frisch von einem Schlachthof in der Umgebung zugänglich ist. Im Gehirnrohextrakt ist noch keine Aktivität meßbar, erst nach Anreicherung der Aktivität an einem schwachen Kationenaustauscher (Phosphozellulose) kann ein Effekt eines MARK-aktivierenden Faktors gemessen werden.

Das in Abbildung 2.4 gezeigte Chromatogramm mit Aktivitätsprofil der nachgeschalteten Anionenaustauschchromatografie legt dar, dass der aktivierende Faktor sich auf dieser Stufe bereits fast vollständig von der endogenen MARK trennen lässt: Das orangefarbene Profil zeigt die Aktivität der Fraktionen bei Zugabe rekombinanter MARK. In grün ist das Aktivitätsprofil der Fraktionen bezüglich des TR1-Peptides allein zu sehen. Das Elutionsverhalten deckt sich mit dem der aus Gehirn gereinigten MARK (Drewes et al., 1995). Die Differenz dieser beiden Profile (hier in rot) gibt an, in welcher der Fraktionen sich

der aktivierende Faktor befindet. Die Aktivitätsprofile sind auf die Basalaktivität von 55 nmol/min/mg (= 1 U) der rekombinanten MARK2 normiert. Trotz der Reduktion der Gesamtproteinmenge auf ungefähr ein Sechstel, ist nur eine 1.3-fache Anreicherung der spezifischen Aktivität zu verzeichnen.

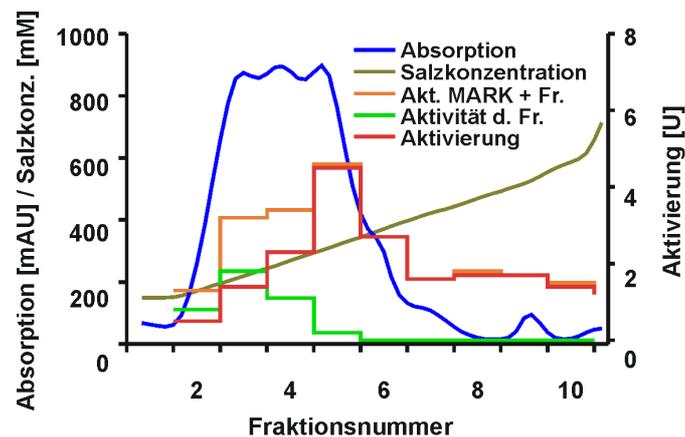


Abbildung 2.4: Chromatogramm und Aktivitätsprofil der Anionenaustauschchromatografie. Die blaue Kurve zeigt die UV-Absorption der Proteine bei 280 nm, in braun ist die ansteigende Salzkonzentration dargestellt. Der Großteil des MAF eluiert mit der zweiten Hälfte des Gesamtproteins in den Fraktionen 4, 5 und 6 (rotes Profil).

Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten werden nach Vereinigung an einem Kationaustauscher (SP-Sepharose) chromatografiert. Wie das Chromatogramm (Abb. 2.5) zeigt, läßt sich auf dieser Stufe der Reinigung die endogene MARK nahezu vollständig abtrennen.

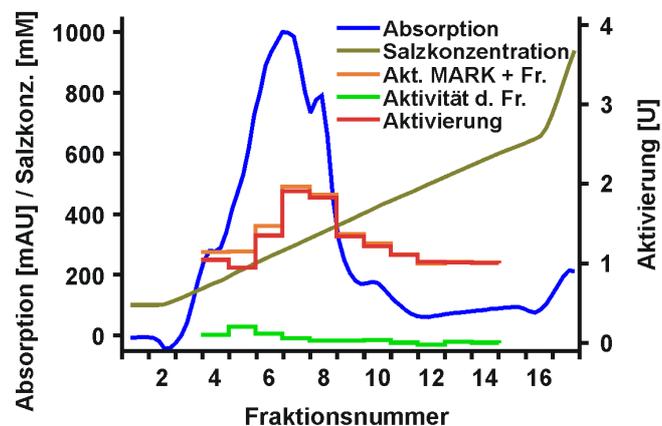


Abbildung 2.5: Chromatogramm und Aktivitätsprofil der Kationenaustauschchromatografie. UV-Absorption und Salzkonzentration wie in Abb. 2.4. Der Großteil des MAF eluiert auch hier mit der zweiten Hälfte des Gesamtproteins in den Fraktionen 7 und 8 (rotes Profil).

Auch hier nimmt die Gesamtaktivität der Präparation deutlich ab, so dass trotz Verringerung der Gesamtproteinmenge auf ein Sechzigstel der ursprünglichen Menge nur eine Anreicherung der spezifischen Aktivität um den Faktor vier erfolgt.

Es zeigt sich ferner, dass die Aktivität selbst beim Arbeiten auf Eis und bei massivem Einsatz von Protease- und Phosphataseinhibitoren sehr schnell (innerhalb weniger Stunden) abnimmt. Ob der Verlust der Aktivierungsfähigkeit durch Abschalten, d.h. Phosphorylierung, Dephosphorylierung oder Dissoziation zweier oder mehrerer Bestandteile des MAF, oder durch proteolytische Degradation erfolgt, ist nicht bekannt.

Um eine möglichst effektive und schnelle Anreicherung des MAF zu erreichen, wird an dieser Stelle ein Affinitätsschritt durchgeführt: Dabei wird eine Nickel-Chelat-Säule mit rekombinanter MARK2Nt(T208A/S212A) gesättigt und mit der aus der Kationenaustauschchromatografie erhaltenen aktiven Probe in Gegenwart von ATP inkubiert. Dieser Schritt ergibt eine Anreicherung der spezifischen Aktivität um den Faktor 300. Die nachfolgende Gelfiltration reduziert die Gesamtproteinmenge nochmals deutlich auf weniger als ein 50.000stel bei einer insgesamt 2200-fachen Anreicherung der spezifischen Aktivität bei einer Gesamtausbeute von 0.4 %.

Abbildung 2.6 zeigt, dass die Spitze des Aktivitätsprofils deutlich hinter der Hauptproteinmenge eluiert. Durch den Vergleich des Retentionsvolumens beim Aktivitätsmaximum mit den Retentionsvolumina von Proteinen bekannter Masse, lässt sich die Masse des MAF zu ungefähr 330 kD bestimmen.

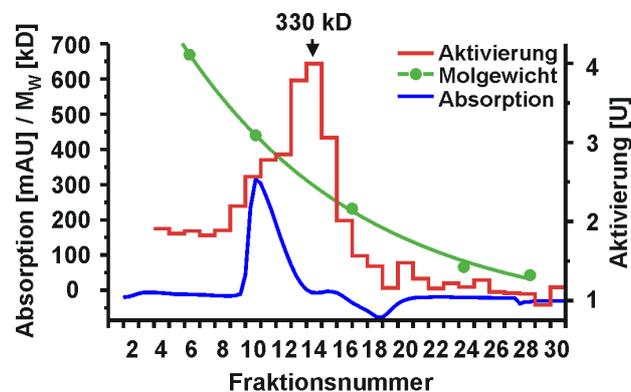


Abbildung 2.6: Chromatogramm und Aktivitätsprofil der Gelfiltration. Die blaue Kurve zeigt wiederum die Absorption bei 280 nm, die grüne Kurve stellt das Elutionsverhalten der Kalibrierungsproteine (Thyroglobulin: 669 kD, Ferritin: 440 kD, Catalase: 232 kD, Albumin: 67 kD, Ovalbumin: 43 kD; grüne Punkte) dar. Der Hauptanteil des MAF eluiert bei einem Retentionsvolumen, das einer Masse des MAF von ungefähr 330 kD entspricht.

In Abbildung 2.7 ist eine tabellarische Übersicht über die Aktivitäten, Anreicherungen und Ausbeuten der einzelnen chromatografischen Schritte dargestellt. Über diese Schritte hinaus wurde keine weitere Anreicherung mittels chromatografischer Methoden erzielt.

	Gesamt-Protein [mg]	Gesamt-Aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung [x-fach]
Gehirnextrakt	25000	n.d.	-	-	-
Phosphozellulose	2330	450	0,19	100	1
Q-Sepharose	376	90	0,24	20	1,3
MonoS	31	24	0,77	5,3	4
rMARK-Sepharose	0,35	20	57	4,4	300
G200	0,043	18	418	0,4	2200

Abbildung 2.7: Tabellarische Bilanzierung der Anreicherung eines MARK-aktivierenden Faktors (MAF) durch mehrere chromatografische Schritte.

2.2.3 Analyse des MARK-aktivierenden Faktors und Identifizierung einer MARK-Kinase

Für eine weitere Analyse des MAF ist es notwendig herauszufinden, ob und welchen Effekt die Inkubation des MAF mit MARK hat. Zu diesem Zweck wurde eine Zeitreihe der Aktivierung aufgenommen. Die Aktivierung selbst wurde mittels Phosphorylierung des Substratpeptids TR1 gemessen, der die Aktivierung begleitende Effekt auf MARK wurde mittels SDS-Gelelektroforese und Autoradiografie des Gels untersucht.

Wie in Abbildung 2.8A ersichtlich, wird bereits nach einer Stunde Inkubation eine ungefähr zehnfache Aktivierung erhalten, nach zwei Stunden ist ein Plateau bei zwölf-facher Aktivierung erreicht (rote Kurve). Dieses Plateau wird vermutlich durch Verknappung der Substrate ATP und TR1 verursacht. Es ist auch denkbar, dass der MAF durch die Inkubation bei 30 °C dissoziiert oder degradiert wird, MARK selbst zeigt eine konstante Aktivität (blaue Kurve), die durch Autophosphorylierung nicht verändert wird. Mittels auf einer Zellulosemembran immobilisierter MARK-Peptide konnten das Threonin₅₈ und das Serin₂₇₅ bzw. das Threonin₂₇₆ als Autophosphorylierungsstellen ermittelt werden (ohne Abbildung). Diese Aminosäuren befinden sich weit entfernt vom aktiven Zentrum in den Subdomänen I (Band β 1, siehe Abbildung 1.2) bzw. XI (Helix α H). Interessanterweise handelt es sich bei diesen Autophosphorylierungsstellen nicht um KXGS-Motive.

In Abbildung 2.8B ist die Änderung des elektroforetischen Verhaltens und der Einbau radioaktiven Phosphats während der Inkubation mit MAF bzw. ohne MAF dargestellt. Bereits nach zehn Minuten Inkubation mit MAF ist eine erhebliche Vergrößerung des apparenten Molekulargewichtes (M_{app}) und ein deutlicher Einbau von Radioaktivität zu verzeichnen (Spur 1, oben und unten).

Im Vergleich dazu zeigt der Ansatz ohne MAF keinen Unterschied im Laufverhalten und nur sehr wenig Radioaktivitätseinbau (Spur 4, oben und unten). Dieser Unterschied ist nach zwei Stunden Aktivierung noch verstärkt: das M_{app} von MARK2 steigt von 88 kD auf 97 kD (Spur 3, oben), Verbunden mit einem Einbau von mehr als 0.6 mol Phosphat pro mol Kinase (Spur 3, unten). Die Autophosphorylierung führt zu keiner Erhöhung des M_{app} und resultiert nur in einem Phosphateinbau von 0.02 mol pro mol Kinase (Spur 6, oben bzw. unten).

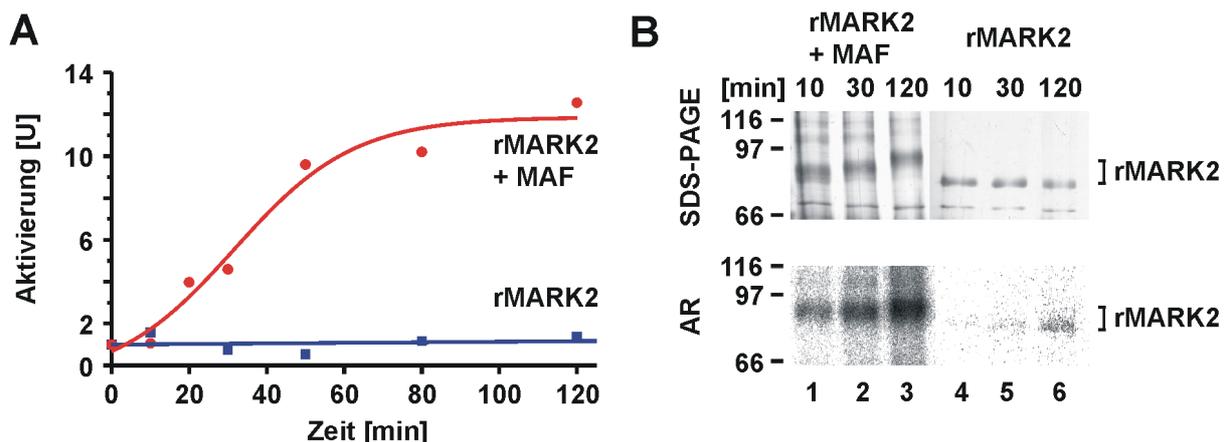


Abbildung 2.8: Effekt des MAF auf MARK. (A) Zeitreihe der Aktivierung: Nahezu zehnfache Aktivierung nach einer Stunde. (B) Das SDS-Gel (oben) und die Autoradiografie (unten) zeigen: die Aktivierung wird von einer Erhöhung des M_{app} von MARK und von einem deutlichen Phosphateinbau in MARK begleitet (Spuren 1 - 3), ohne MAF bleiben diese Merkmale aus (Spuren 4 - 6).

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob es sich bei dem MAF um eine Kinase bzw. um einen eine Kinase enthaltenden Komplex oder um einen Kofaktor handelt.

Dazu wurde eine Probe des MAF mit 5'-p-Fluorosulfonylbenzoyl-adenosin (FSBA) inkubiert. Dabei handelt es sich um ein Reagenz, das kovalent mit ATP-Bindungsstellen reagiert (Anostario et al., 1990; Lee und Edelmann, 1995). Die Blockierung der ATP-Bindungsstelle hat einen Aktivitätsverlust zur Folge. Dadurch lässt sich die Aktivierung durch die Phosphorylierung einer übergeordneten Kinase von einer durch einen Kofaktor induzierten Autophosphorylierung unterscheiden.

Wie in der Spur 2 der Autoradiografie (Abbildung 2.9A) zu sehen ist, wird die in Spur 1 dokumentierte Autophosphorylierung durch Reaktion von MARK mit FSBA ausgelöscht (die Intensitäten der Spuren 1 und 2 sind zur höheren Deutlichkeit angehoben). Werden MARK und MAF zusammengegeben, wird ein deutlicher Phosphateinbau in MARK erhalten (Spur 3). Die inaktivierte, da FSBA behandelte MARK wird im Beisein von MAF ebenfalls radioaktiv markiert, das heißt, MARK wird hier von einer anderen Kinase phosphoryliert. Zur Kontrolle ist die MAF-Präparation in Spur 5 aufgetragen, sie enthält kein Protein das in der Autoradiografie auf der Höhe von MARK zu sehen ist. Dieses Experiment lässt den Schluss zu, dass der hier angereicherte MARK-aktivierende Faktor eine Kinase enthält.

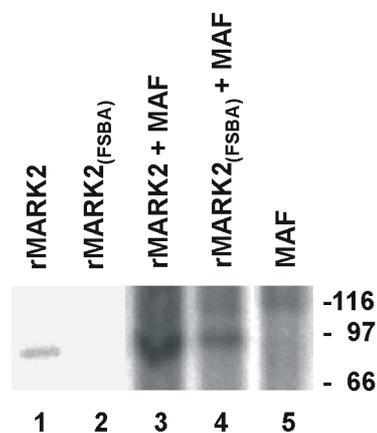


Abbildung 2.9: Autoradiografie der aktiven und inaktiven MARK, ohne und nach Behandlung mit MAF. Inaktive MARK (rMARK2_(FSBA)) zeigt trotzdem Phosphateinbau bei Behandlung mit MAF.

Um die Kinase zu identifizieren wurde der MAF ebenfalls mit dem oben erwähnten FSBA inkubiert. Dadurch werden alle eine ATP-Bindungsstelle enthaltenden Proteine, also auch Kinasen, markiert. Diese Markierung lässt sich in einem Westernblot mit einem spezifischen Antikörper gegen FSBA detektieren. Durch Markierung und Vergleich von Proben mit wenig bzw. keiner Aktivität und Proben mit hoher Aktivität, sollte sich die Auswahl an potentiellen Kandidaten einschränken lassen.

Abbildung 2.10A zeigt das Aktivitätsprofil einer Gelfiltration. Die markierten Fraktionen wurden ausgewählt: Die Fraktion 14 mit der höchsten Aktivität und die flankierenden Fraktionen 11 und 16 mit sehr geringer Aktivität.

Das in Abbildung 2.10B links abgebildete SDS-Gel stellt eine Silberfärbung der in diesen Fraktionen enthaltenen Proteine dar. In den Spuren 1 bis 3 sind die mit FSBA behandelten Fraktionen 11, 14 und 16 zu sehen, in der Spur 4 ist die Fraktion 14 parallel ohne FSBA prozessiert worden. Der Anti-FSBA-Antikörper (Westernblot, Mitte) detektiert nur in der Fraktion 14 zwei Banden: eine von 134 kD (Pfeil) und eine sehr schwache von 155 kD. Die Autoradiografie (rechts) eines mit radioaktiven ATP behandelten Aliquots der Fraktion 14 zeigt ausschließlich bei 134 kD eine Bande, so dass es sich hierbei vermutlich um die gesuchte Kinase handelt.

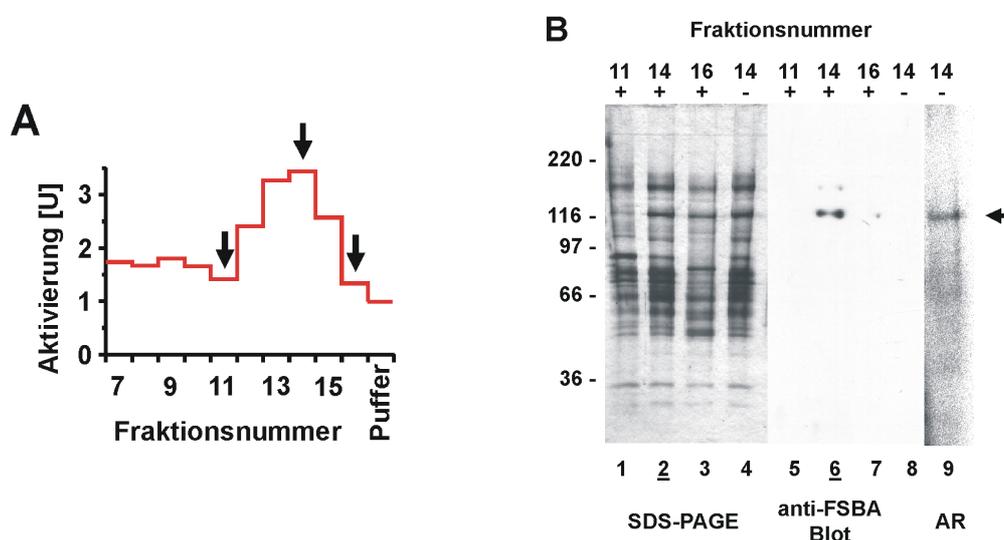


Abbildung 2.10: Analyse des MAF. (A) Aktivitätsprofil eines Gelfiltrationslaufs. Ausgewählte Fraktionen sind markiert. (B) Mittels eines Antikörpers wird in der FSBA-behandelten, aktivsten Fraktion 14 eine potenzielle Kinase mit einem M_{app} von 134 kD detektiert.

Aus einem Kilogramm Schweinegehirn konnten ungefähr zwei Mikrogramm dieses Proteins präpariert werden, das in dem Labor von Prof. Dr. J. Vandekerckhove (Ghent, Belgien) analysiert wurde. Die Aminosäuresequenzen von 16 tryptischen Peptiden konnten durch Massenspektrometrie und Peptidsequenzierung ermittelt werden (Gevaert et al., 2001).

Eine Datenbankrecherche ergab eine sehr hohe Übereinstimmung aller Peptidsequenzen mit einer Kinase aus Rattengehirn namens TAO1 ("Thousand-And-One aminoacids"; Genbank AF084205), über die bereits als aktivierende Kinase der MEK3 berichtet wurde (Hutchinson et al., 1998). Sie gehört zur Unterfamilie GCK VIII (Germinal Center Kinase) der Gruppe der

Ste20 Kinasen (siehe Diskussion). Diese Kinase wird im Weiteren als MARK-Kinase (MARKK) bezeichnet.

In Abbildung 2.11A ist die Aminosäuresequenz der MARKK/TAO1 dargestellt.

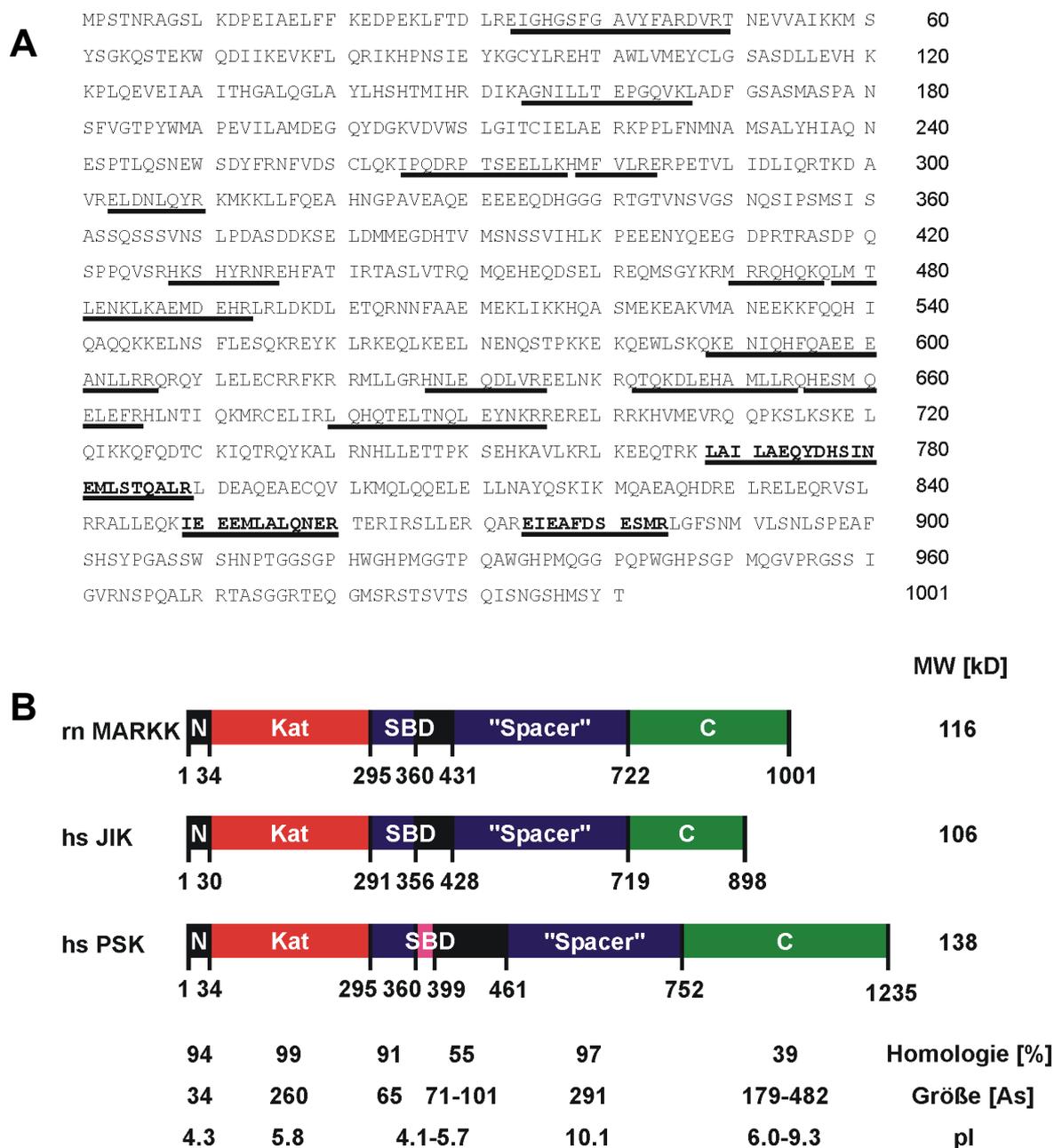


Abbildung 2.11: MARKK/TAO1. (A) Primärstruktur der MARKK/TAO1. Die Aminosäuren der ermittelten Peptide sind unterstrichen. Unterstrichene Sequenzen im Fettdruck sind einzigartig für dieses Mitglied der sonst sehr homologen GCK VIII-Kinasen und erlauben eine einwandfreie Identifizierung dieser Kinase als MAF. (B) Domänen-Struktur von MARKK/TAO1 im Vergleich zu anderen Mitgliedern der GCK VIII-Unterfamilie der Ste20-Kinasen. Die katalytische Domäne (KAT), sowie der Aminoterminus (N) und die sogenannte "Spacer"-Domäne sind hoch konserviert. Weniger Homologien finden sich in der Substrat-Bindungs-Domäne (SBD). Nur noch geringe Ähnlichkeit haben die Carboxytermini (C) der drei Kinasen.

Der allgemeine Aufbau der Kinasen der Unterfamilie GCK VIII ist ähnlich dem Aufbau der MARK: An eine kurze aminoternale Kopfsequenz (N) mit hoher Homologie schliesst sich eine stark konservierte katalytische Serin/Threonin-Kinase Domäne (ungefähr 260 Aminosäuren lang) an. Die darauf folgende Substrat-Bindungs-Domäne (SBD) mit partiell hoher und niedriger Homologie variiert in der Länge zwischen 71 und 101 Aminosäuren. Daran schließt sich der sogenannte "Spacer" an, der in allen Kinasen der GCK VIII Gruppe stark konserviert ist, gefolgt von einem carboxyterminalen Schwanz (C) unterschiedlicher Länge (179 bis 482 Aminosäuren) und mit sehr geringen Gemeinsamkeiten. Der "Spacer" und der Schwanz besitzen aufgrund amphipatischer Eigenschaften eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Dimeren (Segrest et al., 1990; Lupas et al., 1991).

2.3 Klonierung und rekombinante Expression der MARKK

2.3.1 Klonierung der MARKK aus einer cDNA-Bibliothek aus Rattengehirn

Da die DNA-Sequenz der MARKK/TAO1 bekannt ist, kann eine Klonierung sehr einfach mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung sequenzspezifischer *primer* erfolgen.

Dazu wurde eine cDNA-Bibliothek aus Rattengehirn amplifiziert und mittels Phagen in Plasmide umgeschrieben, die die cDNA-Bibliothek repräsentieren. Durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI lassen sich die inserierten cDNA-Sequenzen aus dem Vektor ausschneiden und die Verteilung der Größen analysieren.

Dies ist in Abbildung 2.12 dargestellt. In der Spur 1 sind die ungeschnittenen Plasmide enthalten, Spur 2 zeigt ein Aliquot der Plasmidbibliothek nach einem EcoRI-Verdau. Bei ungefähr 3000 Basenpaaren (Bp) ist der linearisierte Trägervektor pBluescript (s. Pfeil) zu sehen, die Größe der herausgeschnittenen Sequenzen reicht von 400 bis weit über 8400 Basenpaare, d.h. die cDNA der MARKK/TAO1 mit 3100 Bp kann darin enthalten sein.

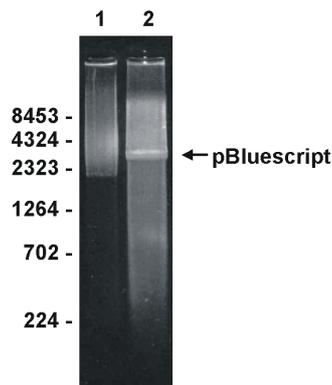


Abbildung 2.12: Kontrolle der amplifizierten und in pBluescript umgeschriebenen cDNA-Bibliothek. Spur 1: Ungeschnittene Plasmide. Spur 2: EcoRI-geschnittene Plasmide, der Vektor (s. Pfeil) ist bei ~3000 Bp zu sehen, die insertierten Sequenzen haben eine Größenverteilung von 400 bis über 8400 Bp.

Die für die Amplifizierung benötigten *primer* enthalten Punktmutationen, die dafür sorgen, dass das PCR-Produkt am 5'-Ende eine NdeI-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle erhält, welche für das Subklonieren in andere Vektoren benötigt werden (Sequenzen siehe Anhang). Die NdeI-Schnittstelle schließt das Startcodon ein, während sich die BamHI-Schnittstelle hinter dem Stopcodon befindet.

Das gewünschte PCR-Produkt von 3100 Bp ist, neben kleineren unspezifischen Produkten, in Abbildung 2.13A zu sehen (siehe Pfeil). Nach Insertion in einen Trägervektor und Transformation in Bakterien werden mehrere verschiedene Klone analysiert, um festzustellen, ob sie das richtige PCR-Produkt enthalten. Dazu wurden einige Zellen des jeweiligen Klons als Lieferant einer DNA-Matrize für eine PCR benutzt. Wie in Abbildung 2.13B zu sehen ist, enthalten drei der acht analysierten Klone ein Fragment der vorausgesagten Größe von 3100 Bp.

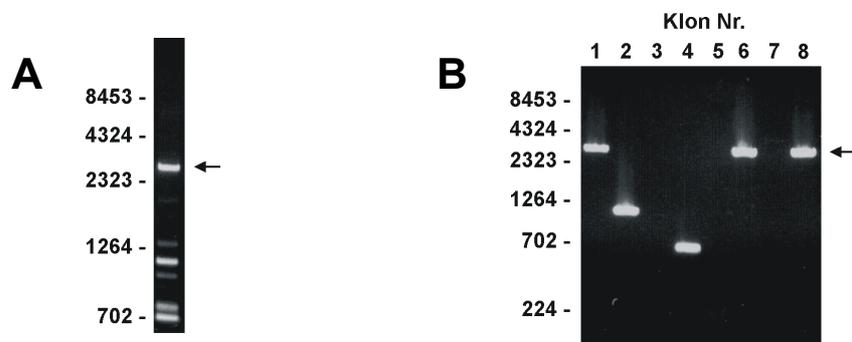


Abbildung 2.13: Kontrolle der PCR und der resultierenden Klone. (A) Die PCR ergab ein Produkt der erwarteten Größe (Pfeil). (B) Die Klone 1, 6 und 8 enthalten ein Fragment der vorausgesagten Größe (Pfeil). Die anderen Klone enthalten zu kleine (Klone 2 und 4) bzw. keine PCR-Produkte (Klone 3, 5 und 7).

Die Klone 1, 6 und 8 wurden durch DNA-Sequenzierung auf ihre Übereinstimmung mit der Datenbanksequenz überprüft. Dabei wurde eine Abweichung aller Klone und der einer zweiten, unabhängigen PCR bei Base 1253 festgestellt. Diese Punktmutation führt zu einem Austausch der Aminosäure 418 von Alanin zu Aspartat.

Interessanterweise kodiert das Gen der humanen homologen Kinase KIAA1361 (Genbank AB037782), die sich von der Rattensequenz nur in acht Aminosäuren unterscheidet, an dieser Stelle ebenfalls für ein Aspartat, so dass ein Fehler in der Datenbanksequenz der Ratten-TAO1 wahrscheinlich ist.

2.3.2 Expression von MARKK in Insektenzellen

Die Expression von MARKK in E.coli (mittels pET16N-Vektor) ergab hauptsächlich unlösliches Protein, bei gleichzeitig sehr niedrigem Expressionsniveau. Deshalb wurde das Gen, in Vorbereitung für die Expression in Insektenzellen, über die NdeI- und BamHI-Schnittstellen in den Baculovirus-Vektor pVL1392 umkloniert. Dieser kodiert dann für ein Fusionsprotein mit einem aminoterminalen Polyhistidinschwanz, so dass eine einfache Reinigung über IMAC möglich ist.

In Sf9-Insektenzellen befindet sich der eukaryotische Transkriptions- und Translations-Apparat, so dass eine bessere Expression in diesem System angenommen werden kann. Zusätzlich könnten in den Sf9-Zellen, im Gegensatz zur Expression in den Bakterien, eventuell erforderliche stabilisierende oder aktivierende posttranslationale Modifikationen erfolgen.

Die Abbildung 2.14A dokumentiert die Reinigung rekombinanter MARKK durch Nickel-Chelat-Chromatografie: In der Spur 1 ist der Überstand nach mechanischer Lyse der Insektenzellen gezeigt, die Bande der MARKK ist sehr schwach auf Höhe des Pfeils zu sehen. In Spur 2 dominiert die Bande der MARKK (siehe Pfeil) nach Affinitätsreinigung. Das rekombinante Protein hat das erwartete M_{app} von 134 kD, was etwas größer als das berechnete Molekulargewicht von ungefähr 118 kD ist.

Ein Vergleich der aus Schweinegehirn angereicherten Kinase (MAF, Spur 1) und der rekombinanten MARKK (Spur 2) ist in Abbildung 2.14B dargestellt.

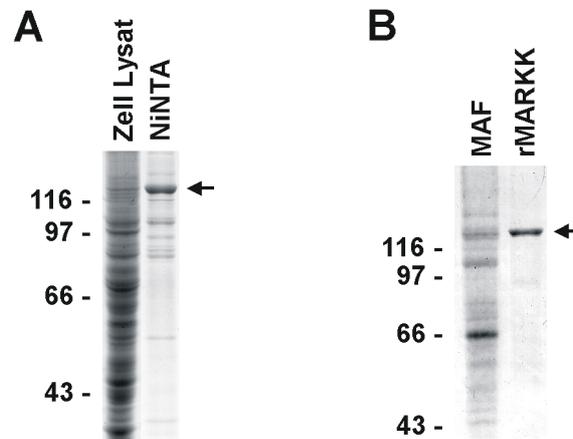


Abbildung 2.14: Expression und Reinigung rekombinanter MARKK in E.coli. (A) Stationen der Reinigung von MARKK (Pfeil). (B) Gegenüberstellung des aus Schweinegehirn isolierten Proteins (MAF) und der rekombinanten Kinase aus Sf9-Zellen (MARKK).

2.4 Untersuchung der Aktivierung von MARK mit MARKK *in vitro*

2.4.1 Aktivierung von MARK mit MARKK

Durch einen Kinase-Assay sollte verifiziert werden, dass diese Kinase tatsächlich in der Lage ist, MARK zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren. Dieses Experiment wurde analog zu Abschnitt 2.2.3 als Zeitreihe durchgeführt.

Wie aus Abbildung 2.15A ersichtlich, wird nach einer Stunde Inkubation eine ungefähr zehnfache Aktivierung erreicht (rote Kurve). Nach einer weiteren Stunde ist die Aktivität der MARK bereits mehr als vierzehnfach erhöht. Das Abflachen der Kurve wird auch hier vermutlich durch Verknappung der Substrate ATP und TR1 verursacht. Die Denaturierung der Kinasen durch die Inkubation bei 30 °C kann ebenfalls eine Ursache dafür sein. MARK selbst zeigt eine konstante Aktivität (blaue Kurve), die durch Autophosphorylierung nicht verändert wird.

Die aktivierende Kinase MARKK ist nicht in der Lage das Peptid TR1 zu phosphorylieren (ohne Abbildung).

In Abbildung 2.15B ist die Änderung des elektroforetischen Verhaltens und der Einbau radioaktiven Phosphats während der Inkubation mit MAF bzw. ohne MAF dargestellt. Bereits nach zehn Minuten Inkubation mit MARKK ist eine erhebliche Vergrößerung des apparenten Molekulargewichtes (M_{app}) und ein deutlicher Einbau von Radioaktivität zu verzeichnen (Spuren 1 - 3, oben und unten; Spur 3: 0.5 mol Phosphat pro mol MARK2).

Im Vergleich dazu zeigt der Ansatz ohne MARKK keinen Unterschied im Laufverhalten und nur sehr wenig Radioaktivitätseinbau (Spuren 4 - 6, oben und unten). Auch hier steigt das M_{app} von MARK2 von 88 kD auf 97 kD (Spur 3, oben; zum Vergleich siehe Abbildung 2.8B). Die sehr geringe Autophosphorylierung von MARK führt zu keiner Erhöhung des M_{app} (Spur 6, unten bzw. oben).

Die aktivierende Kinase MARKK zeigt ebenfalls Autophosphorylierung (Spuren 7 - 9, unten), das M_{app} bleibt, wie im silbergefärbten SDS-Gel (Spuren 7 - 9, oben) zu sehen, konstant. Gleichzeitig ist eine leichte Abnahme der Proteinmenge dieser Kinase von Spur 7 nach Spur 9 zu verzeichnen, hierin kann die Abflachung der Aktivierungskurve begründet sein. Diese Abnahme der Proteinmenge kann durch Degradation durch Proteasen, Aggregation und/oder Adsorption an die Wandungen des Reaktionsgefäßes hervorgerufen werden.

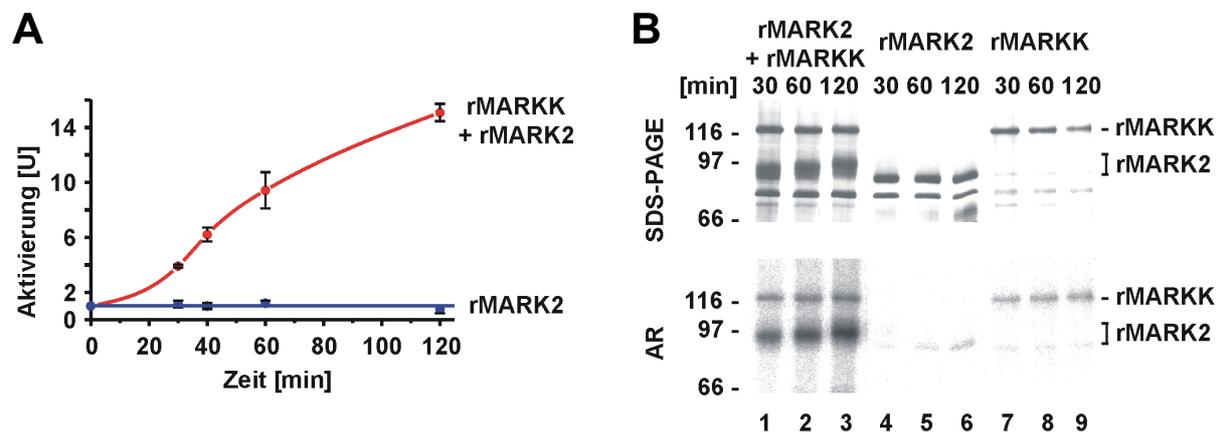


Abbildung 2.15: Effekt der rekombinanten MARKK auf MARK. (A) Zeitreihe der Aktivierung: Nahezu zehnfache Aktivierung nach einer Stunde. (B) Das SDS-Gel (oben) und die Autoradiografie (unten) zeigen: die Aktivierung wird von einer Erhöhung des M_{app} von MARK2 und von einem deutlichen Phosphateinbau in MARK2 begleitet.

2.4.2 Identifizierung der aktivierenden Phosphorylierungsstelle in MARK

Als nächstes sollte geklärt werden, welche Aminosäure(n) während der Aktivierung phosphoryliert werden und somit für die Regulation essentiell sind.

Bei einigen Serin/Threonin-Kinasen kann die Aktivierung direkt mit einer Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife in Verbindung gesetzt werden. Diese Aktivierungsschleife befindet sich in der Subdomäne VIII, wird von den konservierten DFG- und APE-Motiven eingerahmt und variiert in der Länge zwischen 18 und 28 Aminosäuren.

Der Vergleich der Sequenzen diverser Kinasen und MARK in diesem Bereich zeigt, dass in MARK zwei potentiell phosphorylierbare Reste in homologen Positionen zu den regulativ wirkenden Aminosäuren dieser Kinasen vorliegen. Diese beiden Reste wurden, wie schon zuvor berichtet, in der aus Schweinegehirn gereinigten MARK phosphoryliert gefunden (Drewes et al., 1997).

In Abbildung 2.16 sind die Aktivierungsschleifen einiger ausgewählter S/T-Kinasen, wie PKA, CDK2, ERK2, MKK3 und CKI, im Vergleich zu MARK dargestellt. Zusätzlich ist der korrespondierende Bereich der MARKK eingeschlossen. Serin- und Threoninreste, die mögliche regulierende Phosphorylierungsstellen darstellen, sind unterstrichen. Aminosäuren, bei denen bekannt ist, dass deren Phosphorylierung die Kinaseaktivität reguliert, sind zusätzlich fett gedruckt.

	T208	S212	
MARK	193-DFGFSNEFT-----FGNKLD <u>T</u> FCG- <u>S</u> PPYAAPE-219		(AF084205)
MARKK	169-DFGSASMA-----SPANS <u>F</u> VG- <u>T</u> PYWMAPE-192		(AF084205)
PKA	184-DFGFAKRVK-----GRTW <u>T</u> LCG- <u>T</u> PEYLAPE-208		(AF208004)
CDK2	145-DFGLARAFG-----VPVRTY <u>T</u> HEVV <u>T</u> LWYRAPE-172		(X62071)
ERK2	167-DFGLARVA----DPDHDHTGFL <u>T</u> E <u>Y</u> VATRWRAPPE-197		(M84489)
MKK3	197-DFGISGYLV-----DSVAK <u>T</u> MDAGCKPYMAPE-205		(L36719)
CKI	157-DFGLAKKY <u>R</u> DN <u>R</u> TRQHI <u>P</u> YREDKNL <u>T</u> GT <u>A</u> RYASIN-191		(X80693)

Abbildung 2.16: Vergleich der Aktivierungsschleifen einiger ausgewählter S/T-Kinasen. Die Abbildung zeigt die Aktivierungsschleifen in der Subdomäne VIII einiger ausgewählter Serin/Threonin-Kinasen. Mögliche regulierende Phosphorylierungsstellen sind unterstrichen, bereits bekannte regulativ wirkende Stellen sind zusätzlich fett gedruckt. Das APE-Motiv ist in der CKI nicht konserviert. Es ist jeweils der Anfang und das Ende der Aktivierungsschleife angegeben. Rechts sind die "Genbank"-Identifikationsnummern notiert (siehe Anhang A.2).

Um zu ergründen, ob die Aminosäuren Thr₂₀₈ und Ser₂₁₂ in MARK in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungszustandes ebenfalls regulierende Funktionen haben, wurden die Aktivitäten

der Alanin- und der Glutamat-Mutanten, jeweils ohne und mit Aktivierung durch MARKK, gemessen und mit der Wildtyp-Kinase verglichen (Abb. 2.17 oben; Balken 1 und 2). Hierbei zeigte sich, dass alle Mutanten, bei denen das Serin₂₁₂ ausgetauscht wurde, keine nennenswerte Aktivität besitzen und sich auch nicht aktivieren lassen. Dies ist unabhängig davon, ob das Serin gegen ein Alanin oder ein Glutamat getauscht wurde. Ferner hat die zusätzliche Mutation des Threonin₂₀₈ in Alanin oder Glutamat keinen Einfluß auf die Aktivität (Balken 7 - 10 und 13 - 16).

Wird dagegen nur das Threonin₂₀₈ gegen ein Alanin getauscht, bleibt die Basalaktivität von 55 nmol/min/mg (1 U) erhalten, lässt sich jedoch durch Inkubation mit MARKK nicht steigern (Balken 5 und 6). Die entsprechende Glutamat-Mutante hat eine vier- bis fünffach höhere Grundaktivität, die ebenfalls durch MARKK nicht verstärkt werden kann (Balken 11 und 12). Das Glutamat ist, zumindest teilweise, in der Lage ein Phosphothreonin darzustellen, die MARKK-induzierte zehnfache Aktivierung der Wildtyp-Kinase wird jedoch nicht erreicht (Balken 2). Dies belegt, dass das Threonin₂₀₈ diejenige Aminosäure ist, deren Phosphorylierung durch MARKK die Aktivität reguliert.

Weiterhin ist ersichtlich, dass auch das Serin₂₁₂ einen Anteil an der Regulation von MARK hat: Die Phosphorylierung des Threonin₂₀₈ erhöht die Aktivität der Kinase, während das Serin₂₁₂ als polarer, nicht geladener Rest vorliegen muss. Unter der Annahme, dass hier der Glutamatrest ein Phosphoserin imitiert, kann geschlussfolgert werden, dass die Phosphorylierung des Serin₂₁₂ die Kinase abschaltet (siehe Diskussion).

Die Lysin-Mutante (K82R) zeigt wie erwartet keine Aktivität, da bei dieser Mutante die ATP-Bindung beeinträchtigt ist. Eine Aktivierung findet ebenfalls nicht statt (Balken 3 und 4),.

Der mittlere und der untere Teil der Abbildung 2.17 dokumentieren das elektroforetische Verhalten der Proben im SDS-Gel und den Einbau von radioaktivem Phosphat (AR).

Dabei wird deutlich, dass die Verringerung der elektroforetischen Mobilität kein Indikator für Aktivierung ist, da alle, auch die nicht am Threonin phosphorylierbaren Proteine, dieses Verhalten zeigen. Eine Ausnahme bildet hier nur die T208E-Mutante, die bereits unphosphoryliert ein höheres M_{app} aufweist (Abb 2.17 Mitte; Spur 11, zum Vergleich Spur 12 und Spur 13).

In der Autoradiografie des Gels (unten) ist deutlich der Einbau von (radioaktivem) Phosphat durch MARKK zu sehen (Spuren mit gerader Nummer), auch bei nicht basal aktiven Proteinen. Dies bedeutet, dass MARKK mindestens noch eine weitere Stelle in MARK phosphoryliert, diese Stelle aber nichts zur Regulation beiträgt.

MARK-Autophosphorylierung ist dagegen nur bei der Wildtyp-Kinase (Spur 1) und bei den Threoninmutanten (Spuren 5 und 11) deutlich erkennbar.

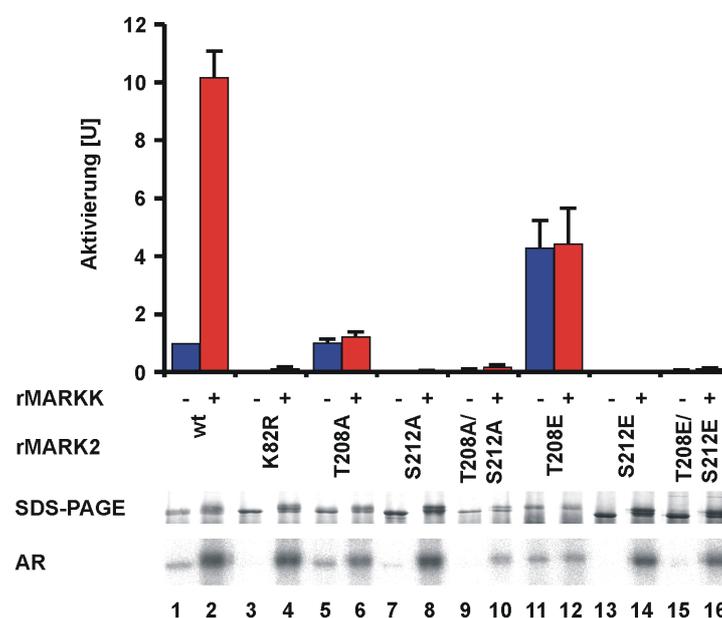


Abbildung 2.17: Einfluß ausgewählter Punktmutationen in MARK2 auf die Basalaktivität und die Aktivierungsfähigkeit durch MARKK. (Oben) Aktivitäten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Spur 1 und 2). Die T208A-Mutante zeigt nur Basalaktivität, während die T208E-Mutante eine erhöhte Grundaktivität aufweist. Beide Mutanten lassen sich durch MARKK nicht weiter aktivieren. Alle anderen Mutanten besitzen keine nennenswerte Aktivität, eine Aktivierung ist ebenfalls nicht möglich. (Mitte) SDS-PAGE: Alle Proteine zeigen nach Inkubation mit MARKK eine größeres M_{app} . (Unten) Die Autoradiografie bestätigt die Phosphorylierung der Wildtyp-Kinase und aller Mutanten durch MARKK (Spuren mit gerader Nummer), unabhängig von Aktivität und Aktivierung.

Der Umstand, dass die Serin-Mutanten sich nicht aktivieren lassen wirft die Frage auf, ob diese überhaupt am Threonin phosphoryliert werden. Es ist einerseits denkbar, dass die Mutation des Serins die Struktur der gesamten Aktivierungsschleife beeinträchtigt und so Substratbindung und Aktivierung verhindert, andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Modifikation am Serin nur die Substratbindung stört, eine Phosphorylierung am Threonin jedoch weiterhin möglich ist (siehe Diskussion).

Zu diesem Zweck wurden Proben aktivierter und nicht aktivierter MARK, MARK(T208A) und MARK(S212A) mittels Westernblot analysiert. Der dabei verwendete Antikörper wurde gegen ein Peptid generiert, das an der entsprechenden Position ein Phosphothreonin trägt. Aus Abbildung 2.18 ist ersichtlich, dass der Antikörper sehr spezifisch am Threonin₂₀₈ phosphoryliertes Protein erkennt und dass MARK trotz S212A-Mutation am Threonin phosphoryliert wird (unten; Spuren 2 und 6). Nicht oder nur autophosphorylierte MARK (Spuren 1, 3 und 5) wird ebenso wie MARKK (Spur 7) nicht erkannt. Ist das fragliche Threonin gegen ein Alanin ausgetauscht und kann somit nicht phosphoryliert werden, findet auch keine Bindung des Antikörpers an MARK statt (Spur 4). Die T208E-Mutante wird von diesem Antikörper nicht erkannt (ohne Abbildung).

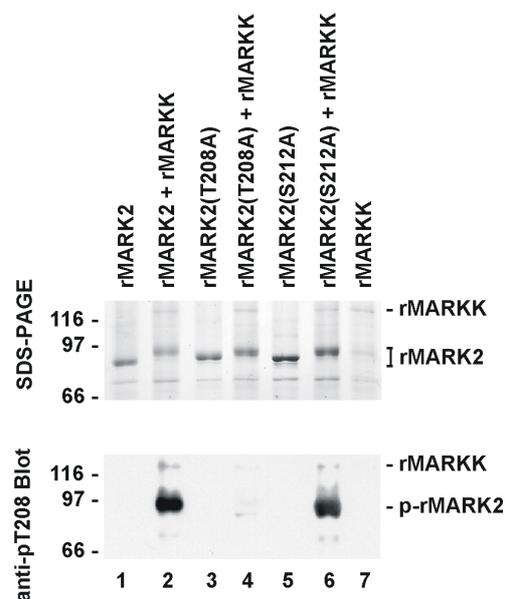


Abbildung 2.18: Phosphorylierungsstatus von MARK2 und Alaninmutanten nach Autophosphorylierung und nach Aktivierung durch MARKK. Das silbergefärbte SDS-Gel (oben) zeigt mit und ohne MARKK inkubierte MARK und MARK-Mutanten. Im Western-Blot (unten) werden von dem spezifischen pT208-Antikörper nur die Wildtyp-Kinase und die ebenfalls am Threonin₂₀₈ phosphorylierbare S212A-Mutante erkannt.

Ein Antikörper, der analog gegen phosphoryliertes Serin₂₁₂ generiert wurde, markiert keines dieser Proteine - einschließlich der S212E-Mutante, obwohl dieser Antikörper im Kontrollexperiment aus Gehirn gereinigte MARK erkennt (ohne Abbildung).

Mittels einer Phosphoaminosäure-Analyse kann verifiziert werden, dass in der Aktivierungsschleife nur das Threonin₂₀₈ von MARKK phosphoryliert wird. Zu diesem

Zweck wird ein der Aktivierungsschleife nachempfundenes Peptid (Lip-Peptid; Abbildung 2.19, oben) mit MARKK phosphoryliert und sauer partiell hydrolysiert. Die Proben werden dünnschichtelektroforetisch getrennt und autoradiografisch analysiert.

Durch der Probe zugesetzte und nach der Trennung mit Ninhydrin gefärbte Phosphoaminosäuren werden die Signale zugeordnet (Abbildung 2.19, unten).

Die Abbildung zeigt, dass das Lip-Peptid ausschließlich am Threonin phosphoryliert wird (AR, oberes Feld). Am Ursprung (links) ist unvollständig hydrolysiertes Peptid zurückgeblieben, abgespaltenes Phosphat ist ganz rechts zu sehen. Zum Vergleich sind parallel prozessierte Proben von MARK2, phosphoryliert durch MARKK, und von autophosphorylierter MARK2 dargestellt. Hier fällt auf, dass bei ersterer neben Phosphothreonin ein ungefähr gleich starkes Signal von Phosphoserin zu sehen ist. Die autophosphorylierte Kinase dagegen enthält nur Phosphoserin.

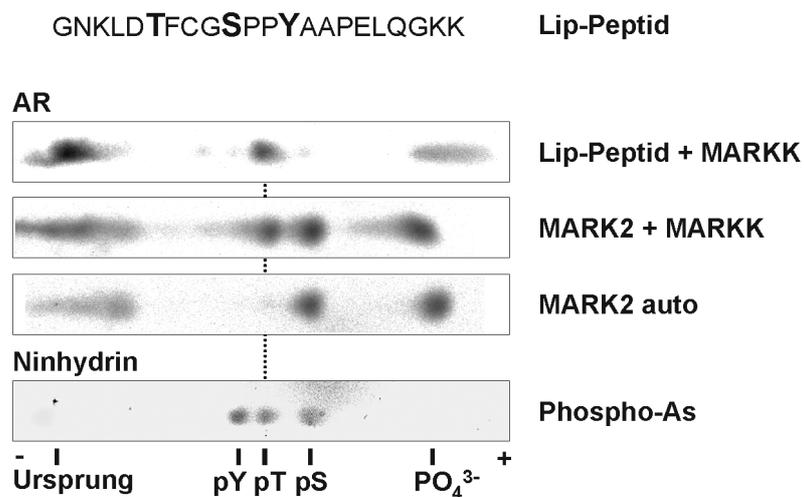


Abbildung 2.19: Phosphoaminosäure-Analyse von phosphoryliertem Lip-Peptid, aktivierter und autophosphorylierter MARK2.

(Oben) Sequenz des Peptids aus der Aktivierungsschleife. (Mitte) Autoradiografie mit phosphoryliertem Lip-Peptid (obere Spur), aktivierter MARK (mittlere Spur) und autophosphorylierter MARK (untere Spur). (Unten) Positionen des Ursprungs, der mit Ninhydrin gefärbten Phosphoaminosäuren und des abgespaltenen Phosphats nach dünnschichtelektroforetischer Trennung.

Das Vorkommen eines so großen Anteils an Phosphoserin in der aktivierten MARK kann zwei Ursachen haben: Zum einen wird vermutlich durch die Aktivierung die Autophosphorylierung verstärkt, zum anderen wurde oben gezeigt, dass bei der Aktivierung durch MARKK neben dem Threonin₂₀₈ mindestens noch eine weitere Phosphorylierungsstelle geben muss, die die Veränderung in der elektroforetischen Beweglichkeit verursacht. Im

Gegensatz zum Threonin₂₀₈ tragen diese Stellen jedoch nichts zu der hier untersuchten Aktivierung bei.

2.4.3 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen MARK und MARKK

Die erfolgreiche Verwendung von Affinitätschromatografie mit MARK als Ligand bei der Reinigung des MAF wirft die Frage auf, ob eine Wechselwirkung zwischen MARK und MARKK nur transient während der Phosphorylierung vorliegt. Es wäre ebenfalls möglich, dass die beiden Proteine dauerhaft aneinander binden oder die Wechselwirkung durch ein drittes Molekül vermittelt wird.

Um dies zu untersuchen, wurden in einem Gelfiltrationsexperiment die Retentionsvolumina der Kinasen in Einzelläufen mit denen im Doppellauf verglichen (ohne Abbildung). Dabei sollte die Bindung der Proteine aneinander durch gemeinsame Elution gekennzeichnet sein. Die Retentionsvolumina wurden mit denen von Proteinen bekannter Masse ins Verhältnis gesetzt. Das gelchromatografische Verhalten ergab für MARK2 eine Masse von 230 kD, dies würde bedeuten, dass MARK2 hier als Trimer vorlag. MARKK eluierte in einem weiten Bereich zwischen dem Ausschlussvolumen des Gelmaterials (entspricht einer Masse von ungefähr 2000 kD) und dem für MAF festgestellten Retentionsvolumen, welches einer Masse von ungefähr 330 kD entspricht (siehe Abbildung 2.6). Diese breite Massenverteilung wird vermutlich durch Aggregation des rekombinanten Proteins hervorgerufen. Eine gemeinsame Elution von MARK2 und MARKK konnte nicht festgestellt werden.

Als nächstes wurden MARKK und MARK2 in Insektenzellen koexprimiert. Da MARKK mit Polyhistidinschwanz vorliegt, kann das Protein mittels IMAC aus dem Zellextrakt isoliert werden. MARK2 ist mit einer Haemagglutinin-(HA)-Markierung versehen und kann durch Immunopräzipitation erhalten werden. Mit spezifischen Antikörpern gegen den Polyhistidinschwanz bzw. die Haemagglutinin-Markierung kann ermittelt werden, ob dabei das jeweils andere Protein mit angereichert wird. Auch in diesem Experiment konnte keine Bindung zwischen MARK2 und MARKK gezeigt werden.

2.4.4 Versuch der zusätzlichen Aktivierung mit ausgewählten Kinasen

Die aus Schweinegehirn isolierte MARK ist in der Aktivierungsschleife auch am Serin (entspricht dem Serin₂₁₂ in MARK2) phosphoryliert. Da MARKK hier aber nur das Threonin phosphoryliert, stellt sich die Frage, ob es eine Kinase gibt, die speziell dieses Serin phosphoryliert. Da das Serin von einem Prolin gefolgt wird, ist es naheliegend, dass eine so genannte Prolin-gerichtete Kinase hier ansetzt.

Bei diesen Kinasen determiniert ein Prolin carboxyterminal zur Phosphorylierungsstelle die Substraterkennung. Zu diesen Kinasen gehören die Stress-aktivierten Proteinkinasen (p38-SAPK) und die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (p44/ERK1 und p42/ERK2) aus der Familie der MAP-Kinasen, sowie die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDKs). Desweiteren ist die Glycogen-Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) in der Lage, von Prolin gefolgte Serine oder Threonine zu phosphorylieren. In die folgenden Aktivierungsexperimente wurde zusätzlich die Casein Kinase I (CKI) mit einbezogen. Aus Vergleichen bekannter Substrate dieser Kinase kann geschlossen werden, dass das Serin₂₁₂ in der Aktivierungsschleife von MARK eine Substratstelle für die CKI sein könnte, wenn das Threonin₂₀₈ schon phosphoryliert ist (Konsensussequenz: $p^S/p_T X_{2-3} S/TX$; Pinna und Ruzzene, 1996; Kreegipuu et al., 1999).

Getestet wurde die Aktivität von MARK2 nach Inkubation mit ausgewählten Kinasen: Den MAP-Kinasen p38, p42 und p44, den CDKs Cdc2 und Cdk5 sowie der GSK3 β und der CKI.

Wie in Abbildung 2.20A dargestellt, ist keine dieser Kinasen in der Lage die Basalaktivität von MARK zu verändern. Die Aktivität von MARK wird auch nach vorheriger Aktivierung durch MARKK durch keine der oben genannten Kinasen beeinflusst (Abbildung 2.20B). Wird die konstitutiv aktivierte T208E-Mutante statt der mit MARKK aktivierten MARK eingesetzt, kann ebenfalls keine der ausgewählten Kinasen deren Aktivität nennenswert erhöhen oder erniedrigen (Abbildung 2.20C).

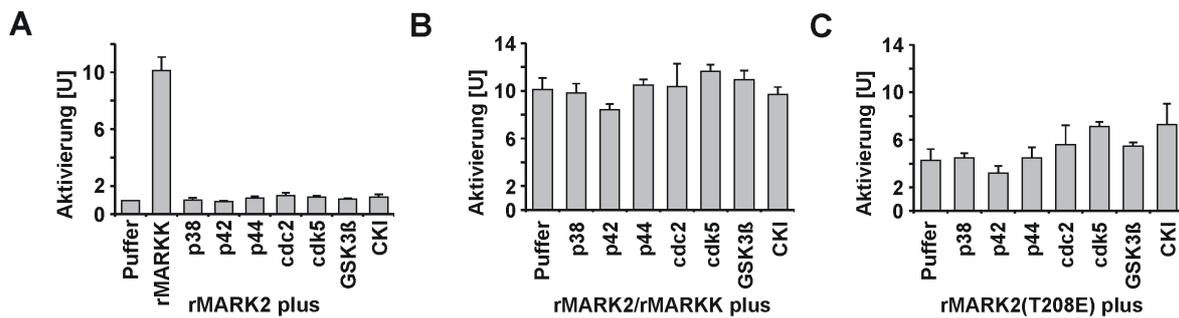


Abbildung 2.20: Einfluss ausgewählter Kinasen auf die Aktivität von MARK und MARK(T208E). (A) Nur MARKK ist in der Lage, die Basalaktivität von MARK zu erhöhen. (B) Kein Einfluss der ausgewählten Kinasen auf vorher aktivierte MARK. (C) Die Aktivität der konstitutiv aktivierten MARK wird nicht verändert.

2.4.5 Aktivierung anderer MARK-Isoformen durch MARKK

Von großem Interesse ist nun, ob MARKK nur MARK2 aktivieren kann oder auch in der Lage ist, die anderen Isoformen zu aktivieren.

Die Expression und Reinigung von MARK4 war noch nicht erfolgreich, so dass für dieses Experiment neben MARK2 nur die Isoformen 1 und 3 zur Verfügung stehen.

Die Abbildung 2.21 zeigt, dass neben MARK2 sowohl MARK1 als auch MARK3 durch MARKK aktiviert werden. Die Aktivitäten der Kinasen nach Inkubation mit MARKK (hier mit "+" gekennzeichnet) unterscheiden sich auch nach der relativ kurzen Inkubationszeit von einer Stunde deutlich von der mit "-" gekennzeichneten Basalaktivität der jeweiligen Isoform. Daraus folgt, dass MARKK *in vitro* nicht zwischen den MARK-Isoformen 1 bis 3 unterscheiden und alle drei Kinasen aktivieren kann.

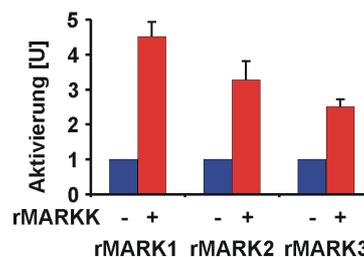


Abbildung 2.21: MARKK aktiviert auch die Isoformen MARK1 und -3. Aktivitäten der MARK-Isoformen 1, 2 und 3, jeweils ohne ("-") und mit ("+") Aktivierung durch MARKK.

2.4.6 Zielgerichtete Mutagenese von MARKK

Da die Aktivierungsschleife der MARKK der von MARK sehr homolog ist, sollte die gezielte Umwandlung der dem Threonin₂₀₈ und dem Serin₂₁₂ Äquivalenten Aminosäuren (Serin₁₈₁ bzw. Threonin₁₈₅; siehe Abbildung 2.16) in Alanine über den möglichen Einfluss auf die Regulation Aufschluss geben.

Wie die Abbildung 2.22 darstellt, können sowohl die Wildtyp-MARKK (Spur 2) als auch die Serin₁₈₁-Alanin-Mutante (Spur 3) die Aktivität von MARK2 (Spur 1) innerhalb einer Stunde auf den fünf- bis sechsfachen Wert steigern. Die Threonin₁₈₅-Alanin-Mutante (Spur 4) und die Doppelmutante (Spur 5) erhöhen die Aktivität von MARK2 nicht.

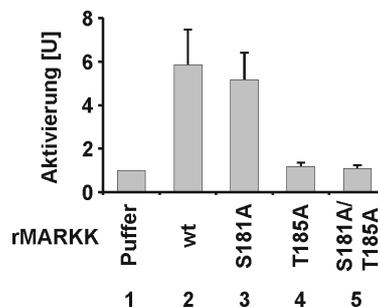


Abbildung 2.22: Untersuchung der Aktivierungsfähigkeit der MARKK-Alanin-Mutanten. Die MARKK(S181A)-Mutante (Spur 3) kann ebenso wie die Wildtyp-Kinase (Spur 2) die MARK aktivieren, während die MARKK(T185A)- und die MARKK(S181/T185)-Mutanten (Spur 4 und 5) die MARK-Basalaktivität nicht erhöhen (zum Vergleich Spur 1).

Dies legt einen ähnlichen Regulationsmechanismus wie bei MARK nahe. Weiterführende Experimente mit Glutamat-Punktmutanten könnten Aufschluss darüber geben, ob dem Serin₁₈₁ analog zum Threonin₂₀₈ in MARK, je nach Phosphorylierungszustand eine Schlüsselrolle in der Aktivierung zukommt.

3 Diskussion

Diese Studie ist ein Beitrag zur Aufklärung der Regulation der MAP-Mikrotubuli-Wechselwirkungen durch Phosphorylierung.

Strukturelle Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie Tau, MAP2 und MAP4 enthalten viele Phosphorylierungsstellen, wobei die meisten davon außerhalb der Mikrotubulibindungsdomänen liegen und von überwiegend Prolin-gerichteten Kinasen phosphoryliert werden. Die Mikrotubulibindungsdomänen bestehen aus drei bis vier Blöcken von ungefähr 31 Aminosäuren ähnlicher Sequenz. Sie enthalten die KXGS-Motive, deren Phosphorylierung die Bindung der MAPs an Mikrotubuli unterdrückt (Biernat et al., 1993; Biernat und Mandelkow, 1999) und die Aggregation des Tauproteins zu PHFs stört (Schneider et al., 1999), einem der Anzeichen der Alzheimerschen Krankheit. Gleichzeitig ist bei Alzheimer-Patienten ein erhöhter Phosphorylierungsgrad an diesen Stellen nachweisbar (Morishima-Kawashima et al., 1995).

Als dafür verantwortliche Kinase konnte die MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase (MARK) identifiziert werden (Drewes et al., 1995). Diese Kinase ist in der Lage, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Phosphorylierung die Bindung von Tau, MAP2 und MAP4 an Mikrotubuli aufzuheben und deren Stabilität zu beeinträchtigen (Illenberger et al., 1996; Drewes et al., 1997, Ebner et al., 1999).

Die Dynamik der Mikrotubuli ist entscheidend für ihre Funktion in der Polaritätsentwicklung und der Aufrechterhaltung der Polarität von Zellen (Drechsel et al., 1992), eine strikte Regulation der MARK/Par-1-Aktivität und -Lokalisation ist deshalb zwingend erforderlich (Wallenfang und Seydoux, 2000). Für eine vergleichende Übersicht über die Rolle von MARK/Par-1 in der Polaritätsentwicklung von *C. elegans* und *Drosophila* siehe Pellettieri und Seydoux, 2002.

Die Unterfamilie der MARKs zählt in Säugetieren vier Mitglieder in mehreren Spleißvarianten; in Datenbanken finden sich keine weiteren engen Verwandten dieser Kinasen (Drewes et al., 1998; Manning et al., 2002).

3.1 Die Aktivität von MARK wird durch Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife kontrolliert

Wie oben erwähnt, hat die Nutzung rekombinanter Proteine bei der Untersuchung ihrer Regulation entscheidende Vorteile: Hohe Proteinmenge und Reinheit bei weitgehend homogener und einfacher Präparation gehen einher mit Isomerenreinheit. Außerdem ist durch Mutagenese eine einfache Möglichkeit zur Darstellung von Funktionsmutanten gegeben, die eine gute Vergleichbarkeit mit der Wildtyp-Kinase erlauben.

Bei der Analyse von MARK aus Schweinegehirn wurden Peptide gefunden, die zu MARK1 und MARK2 passen. Nach Dephosphorylierung des im SDS-Gel bei 110 kD laufenden Proteins wurden zwei Banden bei 90 und 100 kD erhalten. Hierbei handelt es sich vermutlich um MARK1 und MARK2 (Drewes et al., 1997). Aufgrund der Tatsache, dass bereits einige Funktionsmutanten der MARK2 vorlagen, wurde bei Beginn der Arbeit MARK2 als Basis für den Aufbau eines Detektionssystems ausgewählt.

Eines der tryptischen Peptide der MARK enthält zwei phosphorylierte Seitenketten (Threonin₂₀₈ und Serin₂₁₂ in MARK2) und stammt aus der Subdomäne VIII, der so genannten Aktivierungsschleife. Die Mutagenese dieser beiden Aminosäuren zu Alaninen führt bei MARK1 und MARK2 zu inaktiven Kinasen (Drewes et al., 1997). Im Gegensatz dazu bleibt bei der in *E.coli* exprimierten MARK2(T208A)-Mutante eine Wildtyp-ähnliche Basalaktivität erhalten.

Bei vielen Kinasen befinden sich an homologer Stelle Aminosäuren, deren Einfluss auf die Regulation der Aktivität bekannt ist. Die flexible Aktivierungsschleife kontrolliert den Zugang zum katalytischen Zentrum. Oft wird durch Phosphorylierung eine offene Konformation dieser Schleife stabilisiert, die Kinase wird dadurch aktiviert (Johnson et al., 1996).

Die molekularen Mechanismen bei der Aktivierung von Proteinkinasen werden hier anhand der Cdk2 beschrieben (DeBonds et al., 1993; Jeffrey et al., 1995; Kim et al., 1996):

Für eine Aktivierung der Cdk2 ist die Assoziation mit einem Cyclin und die nachfolgende Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife nötig. Das Cyclin bindet an die Helix αC , die wegen der an der Bindung beteiligten Aminosäuren auch PSTAIRE-Helix genannt wird, und induziert eine Verschiebung der Helix nach innen (Abbildung 3.1, vergleiche A und B). Dabei wird ein in der Helix befindliches Glutamat (E51) in eine Position gebracht, in der es das an der ATP-Bindung beteiligte Lysin (K33) stützen kann. Gleichzeitig klappt die Aktivierungsschleife mit dem darin befindlichen Threonin₁₆₀ um und gibt so das katalytische Zentrum für das Substrat frei. Die Schleife wird durch Wechselwirkung mit dem Cyclin offen gehalten. Zusätzlich wird diese Konformation durch ionische Interaktion zwischen dem nachfolgend phosphorylierten Threonin₁₆₀ und dem darunter befindlichen Arginin₁₆₉ stabilisiert (Abbildung 3.1B).

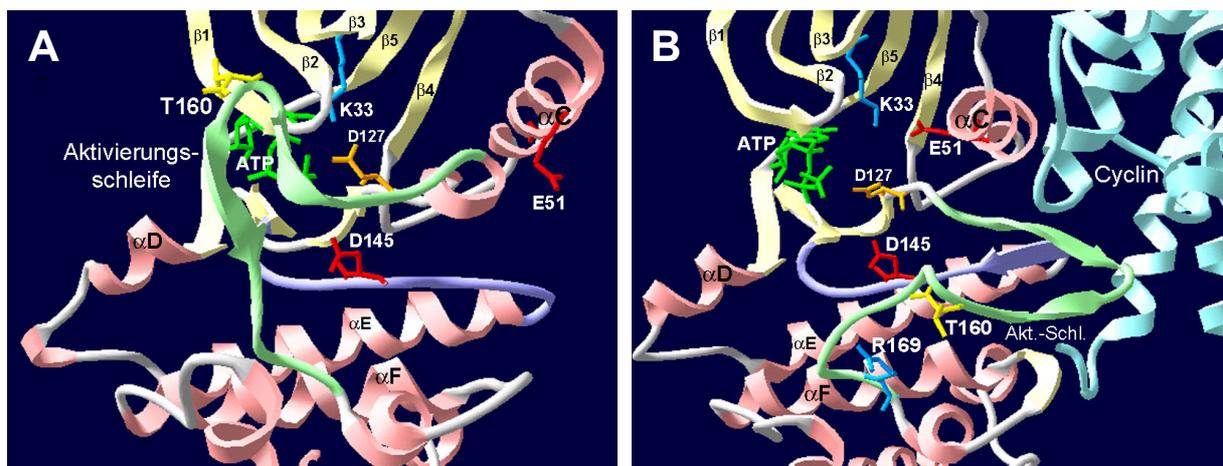


Abbildung 3.1: Regulationsmechanismus der Cdk2. Nach DeBonds et al., 1993 und Jeffrey et al., 1995. (A) Inaktive Cdk2 (PDB-Datensatz 1b38). Die Aktivierungsschleife (hellgrün) blockiert die katalytische Tasche und die αC -Helix ist nach aussen gedreht. (B) Cdk2 mit gebundenem Cyclin (PDB-Datensatz 1FIN). Durch Bindung des Cyclins (hellblau) werden zahlreiche Konformationsänderungen induziert. Am auffälligstem ist hier die Drehung der αC -Helix in Richtung des katalytischen Zentrums, so dass das E51 (rot) in direkte Nachbarschaft zum K33 (blau) gelangt, welches die α - und β -Phosphate des ATP-Moleküls (grün) stabilisiert. Weiterhin wird die Aktivierungsschleife zur Seite geklappt und durch Wechselwirkung mit dem Cyclin offen gehalten. Die vollständige Aktivierung erfolgt durch die Phosphorylierung des T160 (gelb, hier ohne Phosphat), das die Schleife durch ionische Interaktion mit dem R169 (blau) fixiert. Das Substrat kann nun in der offenen Tasche binden, die durch die Helix αD , die katalytische Schleife (violett) und die Aktivierungsschleife gebildet wird. Für eine Beschreibung der am Phosphotransfer beteiligten Seitenketten siehe Abbildungen 3.2 und 3.3.

Die Verschiebung der Helix αC ist essentiell, aber in den verschiedenen Familien eukaryotischer Proteinkinasen unterschiedlich stark ausgeprägt. In der PKA z.B., wird die richtige Orientierung der Helix durch eine geringfügige Drehung erzielt. Dies wird durch die

Wechselwirkung des Histidin₈₇ in der α C-Helix mit dem phosphorylierten Threonin₁₉₇ in der Aktivierungsschleife erreicht, die dadurch ebenfalls in der offenen Position fixiert wird (siehe Abbildung 3.3A). Eine Übersicht zur konformationellen Plastizität von Proteinkinasen beschreiben Huse und Kuriyan, 2002.

Gut untersuchte Beispiele sind neben der Cdk2 auch die MAPK und die PKA. Deren Kontrolle kann durch Einzel- oder Doppelposphorylierung erreicht werden. Aktivierung durch Einzelposphorylierung findet bei der PKA (T197; Adams et al, 1995) analog zur Cdk2 (T160; Kim et al., 1996) statt, diese Aminosäuren befinden sich in äquivalenter Position zum T208 in MARK2 (siehe auch Abbildung 2.16). Dagegen wird für die Aktivierung der MAP-Kinasen die Phosphorylierung zweier Stellen in der Aktivierungsschleife benötigt (Payne et al., 1991; Canagarajah et al., 1997): Das T183 (ERK2) entspricht dabei dem T208 in MARK2. Die zweite Stelle, das Y185 (ERK2), befindet sich in der Nähe des S212 der MARK2. Da im tryptischen Peptid der MARK aus Gewebe das Threonin und das Serin phosphoryliert sind, wird hier ein ähnlicher Mechanismus angenommen.

Die Beobachtung, dass Teile der Rohpräparationen von MARK in der Lage sind, deren Aktivität zu stimulieren, führte zu dem Entschluss, den aktivierenden Faktor ebenfalls biochemisch aus Gewebe zu isolieren. Da Kinasen meist Teil eines Signalkomplexes sind, sollte ein aktivierender Faktor in ausreichender - eventuell sogar in äquimolarer - Menge vorhanden sein. Durch Veränderung der Bedingungen konnte hier die endogen vorhandene MARK bereits auf einer frühen Stufe der Reinigung abgetrennt werden.

Für einen Affinitäts-Anreicherungs-schritt bei der Präparation eines MARK-aktivierenden Faktors (MAF) wurde das verkürzte Konstrukt MARK2Nt(T208A/S212A) (siehe Abbildung 2.2) mit höherer Stabilität benutzt, gleichzeitig war eine sehr viel höhere Ausbeute möglich. Zusätzlich wurden das Threonin und das Serin in der Aktivierungsschleife gegen Alanine ausgetauscht. Dies geschah unter der Annahme, dass die Aktivität durch Phosphorylierung dieser beiden Aminosäuren reguliert wird. Eine aktivierende Kinase sollte die Aktivierungsschleife von MARK in ihrer Substratbindungsstelle aufnehmen, dabei sollte deren Verweildauer durch den Austausch gegen nicht phosphorylierbare Reste in der Schleife von MARK erhöht werden.

In einem ähnlichen Ansatz konnte die Bindung von C-TAK1 (MARK3) an die Phosphatase Cdc25 verstärkt werden, so dass eine Immunopräzipitation möglich wurde (Peng et al., 1998). Eine stärkere Ausprägung dieses Mechanismus findet sich bei der GSK3 β , deren Aminoterminus als Inhibitor fungiert (Dajani et al., 2001), ebenso ist ein nicht phosphorylierbares Pseudosubstrat der PKA als Inhibitor bekannt (PKI; Wen and Taylor, 1994).

Aus dem Gelfiltrationsexperiment als letzten Reinigungsschritt ergibt sich für den aktivierenden Faktor eine Größe von ungefähr 330 kD, was auf einen Komplex aus mehreren Untereinheiten hindeutet. Als Teil dieses Komplexes konnte eine Serin/Threoninkinase bestimmt werden, diese wurde MARKK (MARK-Kinase) genannt. Die Identifizierung eventueller Partner gelang jedoch noch nicht. Es ist ebenfalls möglich, dass es sich bei dieser funktionellen Einheit um ein oligomeren Komplex von MARKK allein handelt.

Die Analyse tryptischer Peptide der gereinigten Kinase ergab sechzehn Sequenzen, die nahezu identisch mit der TAO-1 ("Thousand-And-One Aminoacids", Genbank-Identifikationsnummer AF084205; Hutchinson et al., 1998) sind. Die gefundenen Peptide lassen eine eindeutige Unterscheidung zwischen dieser und anderen Kinasen ihrer Unterfamilie zu. Im Zuge der Klonierung wurden keine Spleißvarianten dieser Kinase erhalten.

Mit dieser rekombinant exprimierten Kinase gelang *in vitro* die Aktivierung von MARK2, wie bei der Inkubation mit MAF begleitet von einer Verringerung der elektroforetischen Mobilität und dem Einbau von Phosphat.

Somit ist diese Kinase, zusammen mit den verschiedenen Funktionsmutanten der MARK, ein ideales Werkzeug, um den Mechanismus der MARK-Regulation zu entschlüsseln.

Die Ergebnisse zeigen, dass die katalytischen Domänen von MARK und PKA starke Ähnlichkeiten aufweisen: Aminosäuren, die in der PKA wichtig für die Bindung des ATPs und der Substrate sind, und Aminosäuren, die vermutlich die Kinase im aktiven Zustand stabilisieren, sind in MARK in äquivalenter Position zu finden.

Bei der K82R-Mutante ist das dem K72 der PKA äquivalente Lysin zu einem Arginin umgewandelt. Dieses Lysin ist in der PKA an der Bindung der α - und β -Phosphate des ATPs beteiligt, durch den Austausch gegen das deutlich größere Arginin wird ein Teil der ATP-Bindungstasche blockiert (Adams et al., 1995). Dies führt im Fall der PKA wie auch bei MARK zu einer inaktiven Kinase.

In der PKA ist für die Aktivierung die Phosphorylierung des Threonin₁₉₇ nötig. Das Phosphat stabilisiert durch zahlreiche Wechselwirkungen mit Aminosäuren der Aktivierungsschleife, der katalytischen Schleife und der α C-Helix die flexible Aktivierungsschleife, während das DFG-Motiv und das Threonin₂₀₁ deren Enden fixieren (Madhusudan et al., 1994).

Diese Aufgaben können beim äquivalenten phospho-Threonin₂₀₈ der MARK von den Aminosäuren Glutamat₁₉₉, Arginin₁₇₄ und Lysin₉₆ übernommen werden (siehe Abbildung 3.2). Ein Glutamat kann an hier diese Funktion trotz ungefähr gleicher Größe wie ein Phosphothreonin nicht gleichwertig erfüllen, vermutlich wegen der Ladungsdifferenz.

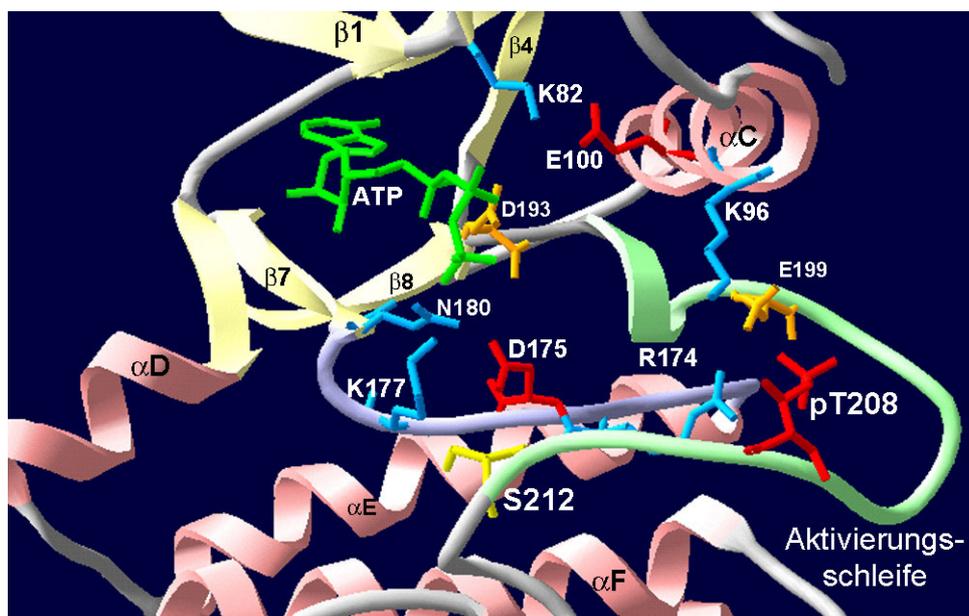


Abbildung 3.2: Modell des katalytischen Zentrums von MARK2. Aufgrund großer Ähnlichkeiten der Primär- und der vorhergesagten Sekundärstruktur mit der PKA kann ein wahrscheinliches Modell der katalytischen Domäne der MARK unter Benutzung der PKA-Koordinaten erstellt werden (Taylor et al., 1993). Das D193 (orange) fixiert ein Mg^{2+} -Ion (nicht gezeigt), das zusammen mit dem durch das E100 (rot) gehaltene K82 (blau) die α - und β -Phosphate des ATPs (grün) stabilisiert. Das pT208 (rot) fixiert durch Interaktionen mit K96, R174 und E199 die Aktivierungsschleife (hellgrün). Ein Glutamat kann die stützende Funktion des Phosphothreonins übernehmen, während ein Alanin in dieser Position keinerlei Stabilisierung zuließe. Das S212 (gelb) kann eventuell über eine Wasserstoffbrücke mit dem K177 (blau) wechselwirken. Eine solche Festigung der Struktur wäre mit einem Alanin an dieser Stelle nicht gegeben. Der Abstand zwischen katalytischer und Aktivierungsschleife ist für die große Glutamat-Seitenkette zu gering, so dass diese vermutlich die Aktivierungsschleife destabilisieren oder durch eine Umorientierung nach oben in die Substratbindungstasche ragen würde. Die katalytisch aktive Seitenkette des D175 (rot) wird durch das N180 (blau) am Ende der katalytische Schleife gestützt.

Das Serin₂₁₂ kann - analog zum Threonin₂₀₁ der PKA - durch eine Wasserstoffbrücke mit dem Lysin₁₇₇ am Ende der katalytischen Schleife eine weitere Stabilisierung der Aktivierungsschleife bewirken (Madhusudan et al., 1994), d.h. die OH-Gruppe des Serins wäre für eine Wasserstoffbrücke wichtig. Ein Austausch dieser Aminosäure gegen ein Alanin könnte hier zu einer Destabilisierung führen. Dies würde erklären, warum die S212A- und die T208A/S212A-Mutanten inaktiv sind, unabhängig vom Phosphorylierungszustand des Threonins₂₀₈.

Auch der Wechsel zu einem Glutamat, was näherungsweise einer Phosphorylierung des Serin₂₁₂ entspricht, könnte die stabilisierende Funktion beeinträchtigen. Eine andere Erklärung für den Verlust der Kinaseaktivität aller die S212E-Mutation enthaltenen Proteine wäre, dass die große geladene Seitenkette mit der Substratbindung interferiert.

Die PKA besitzt drei Glutamate in der Substratbindungstasche, die ionische Wechselwirkungen mit den Asparaginen (in den Positionen -6, -3 bzw. -2 zur Phosphorylierungsstelle) mit dem Inhibitor PKI eingehen (Taylor et al., 1993).

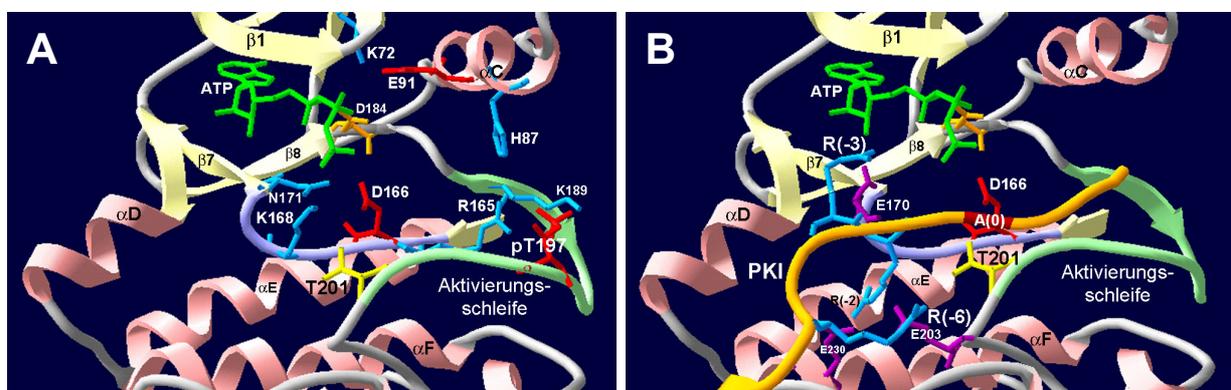


Abbildung 3.3: Struktur der PKA. Nach Taylor und Radzio-Andzelm, 1994. (A) Darstellung des katalytischen Zentrums der PKA (Pdb-Datensatz 1fmo) mit den zu Abbildung 3.1 äquivalenten Seitenketten. (B) Interaktionen zwischen PKA und PKI: Die Glutamate E170, E203 und E230 (violett) treten in ionische Wechselwirkung mit den Argininen R(-3), R(-6) und R(-2) (blau) des Inhibitors. Statt eines phosphorylierbaren Serins oder Threonins liegt im Pseudosubstrat PKI ein Alanin (A(0), rotbraun) vor.

MARK zeigt eine der PKA ähnliche Präferenz zu positiv geladenen Seitenkette aminoterminal zur Phosphorylierungsstelle:

Die Konsensussequenz der bisher bekannten und in Abbildung 3.4 dargestellten Substrate lautet $R/KXXS$. Zum Vergleich: Die Konsensussequenz der Substrate der PKA ist: R^R/KXS (Kreepuu et al., 1999).

Die erste repetitive Sequenz des Tau-Proteins steht hier stellvertretend für die Substratmotive der MARK in Tau, MAP2 und MAP4 (Drewes et al., 1995; Illenberger et al., 1996).

Weitere *in vivo*-Substrate von MARK/Par-1 sind "Dishevelled" (Dsh), ein Regulator des Wnt-Signaltransduktionsweges (Sun et al., 2001), "Oskar", einer Determinante des posterioren Poles in *Drosophila*-Eiern (Riechmann et al., 2002) und dem "Kinase suppressor of Ras (KSR-1), einem Gerüstprotein des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkomplexes (Müller et al., 2001). Eine Phosphorylierung der Serin/Threoninphosphatase Cdc25, der Tyrosinphosphatase PTPH1 und der Serin/Threoninkinase Raf1 durch MARK wurde bisher nur *in vitro* gezeigt (Peng et al., 1998; Zhang et al., 1997; Thorson et al., 1998).

Die Phosphorylierung durch MARK erzeugt bei mehreren dieser Proteine (Cdc25, KSR-1, PTPH1 und Raf-1) eine Bindungsstelle für das Ankerprotein 14-3-3.

Tau (TR1)	NVKS K IGSTENLK	(a)
Cdc25	GLYRSP S MPENL	(b)
Dsh	RQADRASS F SSIT	(c)
Oskar	QLRDKLQ S SGSFR	(d)
KSR-1	RRTESV P SDI	(e)
PTPH1	RRSL S VEHLE	(f)
Raf1	PKINRS A SEPSLH	(g)
Konsensus	xxxx R xx S xxxxx K	

Abbildung 3.4: Partieller Sequenzvergleich bekannter MARK/Par-1-Substrate. (a) TR1, stellvertretend für TAU, MAP2 und MAP4, Drewes et al., 1995; Illenberger et al., 1996. (b) Peng et al., 1998. (c) Sun et al., 2001. (d) Riechmann et al., 2002. (e) Müller et al., 2001. (f) Zhang et al., 1997. (g) Thorson et al., 1998.

Ein Glutamat an der Stelle des Serins in der Aktivierungsschleife der MARK könnte alternativ zur Blockierung der Substratbindungsstelle auch durch ionische Wechselwirkung mit dem Arginin oder Lysin in Position P-2 die Affinität zum Substrat drastisch erhöhen und so die Kinase inhibieren.

Die Mutation des zu S212 äquivalente Restes in der JNK/SAPK inhibierenden Kinase (JIK; Tassi et al., 1999) führt ebenfalls zu einer dramatisch verringerten Aktivität. Die Regulation der "Myosin I Heavy Chain Kinase" I (MIHCK) folgt ähnlichen Prinzipien: Umwandlung der zum T208 homologen Aminosäure in ein Aspartat oder Glutamat ergab Proteine mit höherer Aktivität als im unphosphorylierten aber geringerer als im phosphorylierten Zustand. Dagegen führte der Austausch des dem S212 äquivalenten Restes gegen Aspartat und Glutamat zu Enzymen mit deutlich verminderter Basalaktivität, bei einem Alanin in dieser Position konnte keine Kinaseaktivität gemessen werden (Szczepanowska et al., 1998).

Ähnliche Ergebnisse wurden für die MKK6 (Han et al., 1996), die Ste20p aus Hefe (Wu et al., 1995) und die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK; Scott et al., 2002) publiziert.

Unter der Voraussetzung, dass an dieser Stelle die Nachahmung einer Phosphoaminosäure erfolgreich ist, muss angenommen werden, dass das doppeltphosphorylierte Peptid der aus Gehirn präparierten MARK von einem Anteil inaktiver Kinase stammt.

Der Vergleich der Aktivitäten von MARK und aktivierter rekombinanter MARK ist aus mehreren Gründen schwierig: Einerseits ist die Abschätzung der Reinheit der aus Gewebe präparierten Kinase fehlerbehaftet, andererseits zeigen rekombinante MARK und MARKK die Neigung zur Aggregation, so dass in der Reaktionsmischung die effektive Konzentration beider Reaktanden stetig abnimmt. Diese Aggregationstendenz manifestiert sich auch in der frühen Elution von der Gelfiltrationssäule. Weiterhin kann angenommen werden, dass *in vivo* beide Kinasen als Teil eines Signalkomplexes für die Phase der Aktivierung durch Gerüstproteine aneinander lokalisiert sind, während bei *in vitro*-Reaktionen die Umsatzgeschwindigkeit auch durch Diffusion limitiert wird.

Diese Umstände erschweren die Bestimmung der maximalen Aktivierung, es konnte nur eine ungefähr sechzehnfache Aktivierung erzielt werden, begleitet von dem Einbau von ungefähr 0.5 mol Phosphat pro mol Kinase.

Aus der Phosphoaminosäureanalyse ergibt sich ein Verhältnis von ungefähr 1:1 zwischen Phosphothreonin und Phosphoserin. Da nur die Threoninphosphorylierung zur Aktivierung beiträgt, lässt sich hieraus - Annahme einer quantitativen T208-Phosphorylierung - eine 64-fache maximale Aktivierung abschätzen. Dies bedeutet bei einer Basalaktivität von 55 nmol/min/mg eine maximale Aktivität von 3520 nmol/min/mg. Das aus Gewebe isolierte Enzym hat im Vergleich dazu eine Aktivität von 1500 nmol/min/mg (Drewes et al., 1997).

3.2 Eigenschaften der MARK-aktivierenden Kinase

MARKK (alias TAO-1) gehört zur Gruppe der Ste20-Kinasen. Diese Gruppe ist verwandt mit den "sterile 20 protein kinases" aus Hefe (Ste20p) und kann in zwei Familien unterteilt werden: Den p21-aktivierten Proteinkinasen (PAKs, mit aminoterminaler p21-

Bindungsdomäne und carboxyterminaler Kinasedomäne) und den "germinal center kinases" (GCKs, aminoterminaler Kinasedomäne, keine p21-Bindungsdomäne).

In Säugetieren sind ungefähr dreißig Ste20-verwandte Kinasen bekannt, zusätzlich gibt es Homologe in *Drosophila*, *C.elegans* und anderen Organismen, wobei sie sich in zwei PAK-Unterfamilien und acht GCK-Unterfamilien aufteilen (Manning et al., 2002; siehe auch Abbildung 1.1; Mitte rechts). Diese Kinasen sind in viele zelluläre Prozesse involviert, wie z.B. der Regulation der Apoptose und der Organisation des Zytoskeletts bei Formgebung und Bewegung von Zellen.

Die Kinasen der Ste20-Gruppe werden durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert: Durch GTPasen der Ras-Familie, durch übergeordnete Proteinkinasen, durch an Zytokinrezeptoren gebundene Adapterproteine, sowie durch Dimerisation oder Assoziation mit Inhibitoren und Autophosphorylierung nach Stimulation. Für eine Übersicht siehe Dan et al., 2001.

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

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

Mit 1001 Aminosäuren ist die MARK-Kinase ungewöhnlich groß. Ihre Kinasedomäne ist wie gewöhnlich nur 250 Aminosäuren lang, die anderen Domänen übernehmen vermutlich regulatorische und/oder Gerüstfunktionen. Die bei der Reinigung ermittelte Masse von ungefähr 330 kD entspricht 2 – 3 MARKK-Molekülen und lässt vermuten, dass die Kinase hier in einem Komplex mit Gerüstproteinen oder Kofaktoren vorliegt.

Ein gut untersuchtes Beispiel für die Architektur eines solchen Signalkomplexes ist das Ste20-Signaltransduktionsmodul: Hier werden die Ste20p und die nachfolgenden Kinasen der

MAP-Kinasekaskade (Ste11p, Ste7p und Fus3p) durch das Gerüstprotein Ste5p zusammengebracht (Marcus et al., 1994). Die MAP-Kinasen zeichnen sich auch durch so genannte Andockstellen ("docking sites") aus, welche unabhängig von der eigentlichen Substratstelle und deren Phosphorylierungszustand für eine Bindung zwischen dem Enzym und seinem Substrat sorgen (Jacobs et al., 1998; Holland und Cooper, 1999).

In ihrer Domänenstruktur ähnelt die MARKK sehr der MARK. Sie enthält, wie viele Kinasen der GCK-Unterfamilie, ausgedehnte Bereiche amphipathischer Helices, welche vermutlich der Interaktion mit anderen Proteinen dienen (Lupas et al., 1991). MARK enthält ebenfalls solche Bereiche, scheint aber, abgesehen von der transienten Anlagerung während der Phosphorylierung, nicht direkt mit MARKK zu interagieren.

MARKK/TAO-1 und PSK/TAO-2 sind *in vitro* als Aktivatoren der MKK3 und MKK6 des Stress-aktivierten Signaltransduktionsweges bekannt. Diese wiederum aktivieren die p38-MAPK. Es wurde gezeigt, dass endogene MKK3 in transfizierten Sf9-Zellen mit TAO-1 bzw. TAO-2 koimmunoprecipitiert werden kann (Hutchinson et al., 1998; Chen et al., 1999). Hierbei konnte eine Bindung zwischen dem Aminoterminus der MKK3 und der konservierten Substratbindungsdomäne (SBD; siehe Abbildung 2.11B) der TAO-2 nachgewiesen werden. Zwischen dem Aminoterminus der MKK3 und den MARKs sind keine Homologien erkennbar, eventuell wird eine Interaktion zwischen MARK und MARKK über Adapterproteine vermittelt.

Für TAO-2 konnte eine Funktion als Effektor der MKK3/p38- und MKK6/JNK-Stress-aktivierten Signalwege auch *in vivo* verifiziert werden (Chen und Cobb, 2001). Die Bestätigung der Rolle von MARKK/TAO-1 als physiologischer Aktivator der MARK und MKK3 stehen noch aus.

Momentan ist der Zusammenhang zwischen Stress-induzierter MAP-Kinase-Signaltransduktion und den Signalwegen der MARK unklar.

Interessanterweise führt zellulärer Stress durch Phenylarsenoxid nicht nur zu einer Stimulation der Stress-aktivierten Kinasen, sondern auch zur Phosphorylierung der KXGS-Motive im Tauprotein, wahrscheinlich durch die Aktivierung von MARK. Dies kann nicht in allgemeinen oxidativen Prozessen begründet sein, da der Effekt von Phenylarsenoxid durch

Addition von H₂O₂ oder durch Verdrängung von Glutathion aufgehoben wird (Jenkins und Johnson, 2000). Tatsächlich führt oxidativer Stress für gewöhnlich zur Dephosphorylierung des Tauproteins (Ko et al., 1997).

Weiterhin ist interessant, dass bei NGF-induzierter Differenzierung neuronaler Zellen die Transkripte von MKK3 und MARK1 hochreguliert werden. Dabei erzeugen NGF und FGF eine lang anhaltene Erhöhung der Genexpression, der nicht zur Differenzierung führende FGF dagegen nur eine kurzzeitige Anhebung (Brown et al., 1999).

Ein direkter Effektor der MARKK/TAO-1 ist nicht bekannt, die hier dargestellten Experimente mit Alaninmutanten der MARKK lassen aber schließen, dass diese - ähnlich wie MARK - mittels Phosphorylierung durch eine übergeordnete Kinase reguliert wird.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die kodierende Sequenz der MARKK wurde mit spezifischen *primern* (für die Sequenzen: Siehe Anhang) aus einer cDNA-Bibliothek aus Rattengehirn ("Lambda Zap Library", Stratagene) amplifiziert.

Die gesamte cDNA-Bibliothek wurde nach Angaben des Herstellers amplifiziert und mit Hilfe des "ExAssist"-Phagen als pBluescript Vektor aus dem ZAP-Vektor ausgeschnitten. Aus 2.1 ng einer Präparation dieser pBluescript cDNA Bibliothek wurde MARKK mit spezifischen *primern* (200 μ M dNTPs, 0.5 U "TaqPlus Precision" (Stratagene) und je 500 nM *primer* 1001 und 1002, siehe Anhang) amplifiziert, gleichzeitig wurden durch die *primer* direkt am Startcodon eine NdeI-Schnittstelle und in 3'-Position zum Stopcodon eine BamHI-Schnittstellen eingeführt.

Reaktionsbedingungen: 2 min Denaturierung bei 95 °C, 35 Zyklen aus 1 min Denaturierung bei 95 °C, 1 min *annealing* bei 55 °C und 3 min. Verlängerung bei 72 °C, anschließend eine Verlängerung von 10 min bei 72 °C. Das Produkt dieser PCR wurde in den pCR2.1-Vektor ligiert und in 'One Shot'-Zellen transformiert ("TOPO TA Cloning Kit", Invitrogen. Durchführung: Siehe Angaben des Herstellers).

Es wurden mehrere Klone durch Restriktionsverdau mit NdeI und BamHI auf die richtige Größe der inserierten Sequenz untersucht. Ausgewählte Klone wurden durch Sequenzierung der gesamten inserierten Sequenz kontrolliert.

Die kodierende Sequenz der MARKK wurde dann über die NdeI- und BamHI-Schnittstellen in eine Modifikation des Vektors pVL1392 umkloniert, in dem die MARKK als Fusionsprotein mit einem aminoterminalen Polyhistidinpeptid (His₁₀) zur Reinigung über Affinitätschromatographie in Sf9-Insektenzellen exprimiert wurde.

4.1.2 Darstellung der MARK2- und MARKK-Mutanten

Als Expressionsvektor der MARK-Isoformen und -Mutanten wurde der Vektor pNG2cHis benutzt (Schmidt-Ulms, 1998). Auf Basis der in diesen Vektor klonierten MARK2-Isoform wurden die MARK2-Glutamat-Mutanten mit Hilfe des "Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) nach Angaben des Herstellers generiert.

Die MARKK-Mutanten wurden nach der gleichen Methode auf Basis des Vektors pVL1392 hergestellt (für die Sequenzen der *primer*: Siehe Anhang).

Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Restriktion neu eingeführter bzw. deletierter Schnittstellen kontrolliert, endgültig verifiziert wurden ausgewählte Klone der Mutanten durch Sequenzierung.

Die Expressionsvektoren der Lysin- und Alaninmutanten von MARK2 wurden freundlicherweise von Dr. G. Drewes (MPG-ASMB, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Darstellung des Konstrukts pET16bHisMARK2Nt, bestehend aus der aminoterminalen Kopfdomäne, der katalytischen und der UBA-Domäne, ist beschrieben in Timm, 1997. Durch Ersatz des Fragments zwischen der NdeI- und der SacI durch die analoge Sequenz aus dem Plasmid pNG2cHisMARK2(T208A/S212A) wurde das Plasmid für die Expression der rekombinaten HisMARK2Nt(T208A/S212A) erhalten.

4.1.3 Restriktion von DNA

Für analytische Schnitte wurden ca. 50 ng DNA mit 1 U Restriktionsendonuklease (NEB) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Schnitte wurden unter identischen Bedingungen mit ca. 1 µg DNA und 5 bis 10 U Enzym durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 Volumen 6 x Probenpuffer (15% Ficoll in TAE, 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylenxyanol FF) gestoppt und die Fragmente gelelektroforetisch aufgetrennt.

4.1.4 Gelelektrophorese von DNA (Sambrook et al.,1989)

Die DNA-Fragmente wurden in 0.5-1%igen horizontalen Agarosegelen bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt (0.5 %ig bei Fragmenten > 2 kbp, sonst 1 %ig). Als Laufpuffer diente 1x TAE (40 mM Tris-Acetat pH 8.0, 2 mM EDTA). Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 15 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung gefärbt und ebenso lange in Wasser entfärbt. Anschließend wurden die Gele mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die DNA mit dem interkalierten Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografiert werden konnte.

Im Fall einer präparativen Elektrophorese wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde *BstEII*-restringierte λ -Phagen-DNA als Standard aufgetragen.

4.1.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" von Qiagen nach Angaben des Herstellers aus den Gelstückchen isoliert.

4.1.6 Ligation

50-100 ng Vektor wurde mit einem 2-3fachen molaren Überschuß an DNA-Fragment in 1 x Ligase-Puffer (66 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP) und 0.5 U T4-Ligase über Nacht bei 16 °C inkubiert.

4.1.7 Herstellung kompetenter *E.coli* (Chung et al., 1989)

15 mL steriles Luria-Bertani-(LB)-Medium (1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Caseinhydrolysat, 0.5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 50 µg/µL Chloramphenicol) wurden mit 150 µL einer Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes BL21(DE3)pLys angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 - 0.5 bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 2 min bei 1.000 x g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 1 mL eiskaltem TSS-Medium (LB-Medium mit 10 % (w/v) Polyethylenglykol 3350, 5 % (v/v)

DMSO, 20 mM MgCl₂) resuspendiert. Die Zellen wurden in diesem Zustand in 50 µL-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

4.1.8 Transformation

0.5 bis 0.7 µL eines Ligationsansatzes wurden mit einem 15 µL-Aliquot ultrakompetenter Zellen XL2blue (Stratagene) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (30 s, 42 °C) wurden die Zellen nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Nach Aufnahme der Zellen in warmem LB-Medium (400 µL, 37 °C) wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Für die Transformation von Plasmiden in den Expressionsstamm BL21(DE3)pLys wurde 1 µL einer Plasmid-Midi-Präparation (ca. 0,5 µg DNA) mit 50 µL kompetenten Zellen wie vorher beschrieben behandelt, hier enthielt das LB-Medium schon 50 µg/µL Chloramphenicol.

Jeweils die Hälfte eines Transformationansatzes wurde auf einer LB-Agar-Platte mit 50 µg/mL Carbenicillin (zusätzlich 50 µg/µL Chloramphenicol bei BL21(DE3)pLys-Zellen) ausgestrichen und für 16 - 20 h bei 37 °C inkubiert.

4.1.9 Plasmidpräparation im Mini- und Midimaßstab

DNA für Kontrollschnitte wurde aus 5 mL Übernachtskulturen mit dem "Wizard™ Miniprep Kit" (Promega) nach Vorschrift des Herstellers präpariert. Für präparative Schnitte und Sequenzierungen wurde DNA aus 100 mL Übernachtskulturen mit dem "Plasmid Midi Kit" der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

4.1.10 Sequenzierung von DNA

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

Der Reaktionsansatz (20 μ L) enthielt 1 – 1.5 μ g Plasmid-DNA als Matrize, 3 μ L PCR-Reaktionsgemisch ("BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix", Applied Biosystems), 5 μ L Reaktionspuffer ("Half Term", Applied Biosystems) und 5 bis 7.5 μ mol Sequenzier-Oligonukleotide. Reaktionsbedingungen: 25 Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s *annealing* bei 40 °C und 4 min Verlängerung bei 60 °C.

Die Sequenzierungsprodukte wurden von den nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Terminatoren) durch Zentrifugation durch Entsalzungssäulen ("DyeEx", Qiagen) getrennt. Die anschließende Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) nach dem Protokoll des Herstellers.

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte im Laemmli-System (Laemmli, 1970) in 0.75 mm dicken SDS-Polyacrylamidgelen. Die Proben wurden in einem 4 %igen Sammelgel fokussiert und auf einem linearen Gradienten von 7 - 15 % Acrylamid getrennt.

Die Proteine wurden in 5 x Protein-Probenpuffer (500 mM Tris pH 6.8, 20 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0.03 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Als Molekulargewichtsstandards wurden β -Galactosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), β -Lactoglobulin (18 kDa) und Lysozym (14.3 kDa) eingesetzt.

Die Elektrophorese erfolgte bei RT für 30 min bei 120 V (Fokussierung der Proben) mit anschließender 45 minütiger Trennung bei 240 V .

Die Färbung der Gele erfolgte durch zwanzigminütiges Schwenken in einer Lösung aus 0.1 % (w/v) Coomassie Blau R-250, 45 % Methanol und 9 % Essigsäure. Entfärbt wurde in 20 min in einer Lösung aus 50 % Methanol und 10 % Essigsäure.

Die Silberfärbung von Gelen wurde wie folgt durchgeführt: 1. Fixierung der Proteine (20 min) in einer Lösung aus 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure. 2. Vernetzung (30 min oder

über Nacht) in 30 % Ethanol, 0.5 M Natriumacetat, 2 % Glutaraldehyd-Lösung (25 %ig) und 0.2 % Natriumthiosulfat. 3. Viermaliges Waschen (5 min) in Aqua_{dest.} 4. Färbung (15 min) in 0.1 %iger Silbernitrat-Lösung (plus 0.02 % Formaldehyd-Lösung (35 %ig)). 5. Kurzes (1 min) Waschen in Aqua_{dest.} 6. Entwicklung (nach Bedarf) in 2.5 %iger Natriumcarbonat-Lösung (plus 0.01 % Formaldehyd-Lösung (35 %ig)). 7. Stoppen (15 min) der Reaktion erfolgt in 0.05 M EDTA.

Die gefärbten Gele wurden über Nacht in Aqua_{dest.} gewaschen und zwischen zwei Zellophan-Folien gespannt getrocknet.

Zur Ermittlung der apparenten Molekulargewichte wurden Bilder der getrockneten Gele (im TIF-Format) mit dem Programm "TINA" (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) ausgewertet.

4.2.2 Proteinbestimmungen

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Reagenz des Herstellers Sigma ("BCA Protein Kit") nach Angaben der zugehörigen Standardvorschrift oder durch Abschätzung der Proteinmenge in Relation zu den Proteinen des Molekulargewichtstandards im Coomassie-gefärbten Gel.

4.2.3 Präparation rekombinanter MARK aus *E.coli*

Zur Gewinnung der rekombinanten MARK Proteine wurde eine Kolonie der auf Platte ausgestrichenen, transformierten *E. coli* in 100 mL LB-Medium (50 µg/mL Carbenicillin, 50 µg/µL Chloramphenicol, für rMARK2Nt(T208A/S212A) nur Carbenicillin) über Nacht bei 37 °C herangezogen. 50 mL dieser Vorkultur wurden in 1 L steriles, entsprechende Antibiotika enthaltendes LB-Medium überführt und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0.6 erreicht war. Die Kultur wurde auf 30 °C heruntergekühlt und die Expression wurde mit 0.4 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde dann für 5 h bei 30 °C und 160 rpm inkubiert.

Zum Vergleich der Bandenmuster vor und nach der Induktion wurden 500 μL der entsprechenden Kulturen zentrifugiert (10000 x g, 2 min bei 4 °C) und in 1 x Probenpuffer aufgenommen (Volumen[μL] = $\text{OD}_{600} \times 100$). Die Proben wurden dann 3 min auf 90 °C erhitzt. Von den Proben wurden 3 μL auf das Gel aufgetragen.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (12000 x g, 7 min, 4 °C) geerntet. Der Aufschluß der Zellen in der French-Press erfolgte nach dem Resuspendieren im Puffer R (50 mM Tris-HCl $\text{pH}_{4^\circ\text{C}}$ 7.4, 200 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 5 mM CHAPS, 2 mM Benzamidin, 1 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF). Das Lysat wurde durch Zentrifugation geklärt (75000 x g, 45 min, 4 °C). Der Überstand wurde auf eine 1 mL Säule mit NiNTA™-Material (Qiagen), die vorher mit Puffer A (wie Puffer R, aber ohne CHAPS und mit 5 % Glycerol) äquilibriert wurde, aufgebracht. Die Säule wurde bei einer Flußrate von 0.5 mL/min mit 15 mL Puffer A gewaschen, die Elution erfolgte mit einem 7-mL-Gradienten von 50 bis 500 mM Imidazol, gefolgt von einem 8-mL-Plateau bei 500 mM Imidazol (Puffer B). Das Protein eluierte zwischen zwischen 130 und 450 mM Imidazol (Fraktionen 4 bis 10, 1 ml-Fraktionen). Die MARK enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt.

Bei ausreichender Reinheit (>95 %) wurde direkt gegen den Lagerpuffer dialysiert (50 mM Tris-HCl $\text{pH}_{4^\circ\text{C}}$ 8.5, 200 mM NaCl, 50 % (v/v) Glycerol, 1 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Die Proben wurde dann bei -20 °C (flüssig) oder bei -80 °C (in flüssigem Stickstoff schockgefroren) gelagert.

Optional wurde die Proteinlösung nach dreistündiger Dialyse gegen Puffer C (50 mM Pipes $\text{pH}_{4^\circ\text{C}}$ 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 % (v/v) Glycerol) an einem Kationenaustauscher ("UNO™S1", Biorad) chromatografiert. Bei einer Flußrate von 0.5 mL/min wurde nach dem Auftragen mit 10 mL Puffer C gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem 10-mL-Gradienten von 0.1 bis 0.6 M NaCl, gefolgt von einem 1-mL-Gradienten von 0.6 bis 1 M NaCl. Das Protein eluierte zwischen 0.2 und 0.6 M NaCl. Die MARK enthaltenden Fraktionen (4 bis 9, je 1 mL) wurden wie oben beschrieben gegen den Lagerpuffer dialysiert.

Typischerweise wurden 1 bis 2 mg rekombinante Kinase aus einem Liter Kultur erhalten.

4.2.4 Präparation des MARK-aktivierenden Faktors (MAF) aus Schweinegehirn

Frische Schweinegehirne wurden vom Schlachthof Thomsen (Kellinghusen) erworben und auf Eis innerhalb von 45 min in das Labor gebracht. Ungefähr 20 Hälften (1 kg) wurden in 3 L Puffer A (50 mM Tris-HCl pH_{4°C} 8.5, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 4 mM CHAPS, 5 mM MgCl₂, 3 mM EGTA, 2 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 1 mM Na₂ATP, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 µM Pepstatin A, 0.1 % Nonidet P40) homogenisiert und für 1.5 h bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde über Glaswolle filtriert, mit 0.5 M MES-Lösung auf pH_{4°C} 6.5 eingestellt und auf eine in Puffer B (25 mM MES pH_{4°C} 6.5, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 2 mM EGTA, 2 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 µM Pepstatin A, 5 % Glycerol 0.1 % Nonidet P40) äquilibrierte Säule mit Phosphozellulose (Whatman P11, 50 x 125 mm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 2 L Puffer B gewaschen und mit 300 mL Puffer B mit 750 mM NaCl eluiert. Das Eluat wurde über Nacht gegen Puffer C (50 mM Tris-HCl pH_{4°C} 8.2, 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 5 mM EGTA, 1 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1 % Nonidet P40, 10 µM Pepstatin A) dialysiert.

Das Dialysat wurde auf einen Anionenaustauscher (Q-Sepharose 26 x 50 mm) aufgebracht und in einem linearen Gradienten von 100 bis 600 mM NaCl eluiert (Flußrate 5 mL/min, Fraktionsgröße 8 mL). Aktive Fraktionen wurden vereinigt (Fraktionen 3 bis 7, insgesamt 40 mL) und über Sephadex G25 (26 x 400 mm) in Puffer D (25 mM MES pH_{4°C} 6.5, 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 2 mM EGTA, 1 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 0.5 mM PMSF, 5 % Glycerol 0.1 % Nonidet P40) überführt und auf einen Kationenaustauscher (MonoS™ 10 x 100 mm) aufgetragen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 100 nach 600 mM NaCl (Flußrate 3 mL/min, Fraktionsgröße 2 mL).

Nach Umpufferung der aktiven Fraktionen (Fraktionen 6 bis 10, 10 mL) über Sephadex G25 (26 x 300 mm) in Puffer E (40 mM HEPES pH_{4°C} 7.3, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM Na₂ATP, 1 mM Benzamidin, 1 mM β-Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF, 5 % Glycerol, 0.1 % Nonidet P40) wurde auf eine mit 7.5 mg rekombinanter MARK2N(T208A/S212A) gesättigten NiNTA-Säule (1 mL) aufgetragen. Die Elution erfolgte in einer Stufe von 0.1 nach 1 M NaCl (Flußrate 0.1 mL/min, Fraktionsgröße 0.5 mL).

Die aktiven Fraktionen (3 mL) wurden durch Zentrifugation in einem Molekularfilter (Ausschlußgrenze 10 kDa, Amicon) auf 1.5 mL eingengt. Die Proteine und Proteinkomplexe wurden dann mittels Gelfiltration (Superdex™ G200 16 x 600 mm) nach Größe getrennt (Flußrate 0.15 mL/min, Fraktionsgröße 1.5 mL). Die Fraktionen 8 bis 17 wurden über Nacht gegen Lagerpuffer dialysiert (s. 4.2.3) und für die weitere Analyse bei -20 °C gelagert.

Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Proteinen des "High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit" (Thyroglobulin: 669 kD, Ferritin: 440 kD, Catalase: 232 kD, Aldolase: 158 kD) und des "Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit" (Albumin: 67 kD, Ovalbumin: 43 kD, Chymotrypsinogen A: 25 kD, Ribonuklease A: 13.7 kD; beides Amersham Pharmacia Biotech).

Alternativ wurden die Proteine der aktiven Fraktionen (12 bis 15, insgesamt 6 mL) durch Zugabe des neunfachen Volumens an eiskaltem Aceton und einstündige Inkubation bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 12000 x g bei 4 °C) wurde das Proteinpellet mit eiskaltem Ethanol (70 vol-%) gewaschen, an der Luft getrocknet und in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen. Es erfolgte eine Auftrennung der Probe auf einem 8 %igen SDS-Gel mit anschließender Färbung mit "Colloidal Coomassie G250" (Roth). Die Kinase-Bande (ca. 1.5 bis 2 µg) wurde ausgeschnitten und mit Hilfe von Massenspektrometrie und Peptidsequenzierung im Labor von Prof. Dr. J. Vandekerckhove (Ghent) analysiert (siehe dazu Gevaert, 2001).

4.2.5 Markierung von Proteinen mit FSBA

Die Proteine (100 bis 200 µL) wurden an der HPLC in PBS (1.8 mM KH₂PO₄, 10.0 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH_{4°C} 7.4) umgepuffert (Fast Desalting Column™ 3.2 x 100 mm, "Smart" HPLC-System) und über Nacht mit 1 mM FSBA (5'-p-Fluorosulfonylbenzoyladenosen, "ATP-Binding Protein Detection Kit", Boehringer Mannheim) inkubiert. Die Reaktion wurde durch einstündige Inkubation mit 5 mM β-Mercaptoethanol gestoppt und die Proben gegen Lagerpuffer dialysiert.

4.2.6 Kinase-Aktivitäts-Assay

Als Aktivitätstest für die rekombinante MARK wurde die Fähigkeit zur Phosphorylierung des Peptids TR1 (255-NVKSKIGSTENLK-268, in Anlehnung an die erste repetitive Sequenz des Tau-Proteins) gemessen. Die Aktivierung wurde während der Präparation durch differentielle Messung der Aktivität der Fraktionen gegenüber dem Peptid TR1 mit und ohne rekombinanter MARK2 bestimmt, d.h. es wurde die Fähigkeit der Fraktionen ermittelt, die Basalaktivität der rekombinanten MARK2 zu erhöhen.

Die Reaktion wurde in Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH_{RT} 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM Benzamidin, 2 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF) mit 150 µM ATP (dotiert mit γ -[³²P]ATP, 7.4 MBq/mol, Amersham Pharmacia Biotech) und 150 µM Peptid TR1 durchgeführt. Die Reaktionsansätze für die Detektion während der Präparation enthielten ca. 50 ng (0.55 pmol) rekombinante MARK2 auf 10 µL. Für die Analyse der Aktivierung wurden ca. 50 ng (0.55 pmol) rekombinante MARK und MARK-Mutanten und ca. 25 ng (0.21 pmol) MARKK pro Ansatz (10 µL) eingesetzt.

Die Inkubation bei 30 °C wurde nach 30 min (während der Präparation aus Schweinegehirn) bzw. nach 2 h (Analyse der Aktivierung) durch Zugabe des gleichen Volumens 20 %iger (w/v) TCA gestoppt. Es wurde 30 min auf Eis inkubiert, die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (15 min bei RT, 14000 x g) sedimentiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde auf Phosphozellulosefilter (Gibco) aufgetragen. Nach mehrmaligem Waschen in 0.1 M Phosphorsäure wurden die Filter Luft-getrocknet und die Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (Packard Canberra Ltd) gemessen (Casnellie, 1990).

4.2.7 Westernblot

Die Auftrennung der Proben im SDS-Gel erfolgte entsprechend 4.2.1. Um die Effizienz des Transfers zu kontrollieren und um einem Größenstandard direkt auf der Membran zu erhalten, wurden farbige Proteine als Molekulargewichtsstandard verwendet ("Rainbow coloured protein molecular weight markers", Amersham Pharmacia Biotech, enthält: Myosin (200 kDa, blau), Phosphorylase b (97 kDa, braun), BSA (66 kDa, rot), Ovalbumin (45 kDa, gelb),

Carboanhydrase (30 kDa, orange), Trypsin-Inhibitor (18 kDa, blau) und Lysozym (14.3 kDa, magenta)).

Das ungefärbte Gel wurde in Blotting-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 5 % Methanol, 0.0375 % (w/v) SDS, pH_{RT} 8.2) äquilibriert. Im Semi-Dry-Verfahren ("Novablot Semi Dry Transfer Kit", Novagene, Stromstärke 0.8 A/cm²/h) wurden die Proteine aus dem Gel auf eine durch Methanol aktivierte und in Blotting-Puffer äquilibrierte PVDF-Membran ("Immobilon", Millipore) transferiert. Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden durch dreißigminütiges Schwenken in entfetteter Milch (5 % (w/v) in TBS-tween: 10 mM Tris-HCl pH_{RT} 7.2, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween20) abgesättigt.

Die Membran wurde 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Anti-Polyhis-AK: 1:500, Anti-HA-AK: 1:2500, Anti-pT208-AK und Anti-pS212: 1:5000, Anti-FSBA-AK: 1:500) inkubiert. Nach gründlichem Waschen in TBS-tween wurde die Membran 30 bis 45 min bei 37 °C mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Maus AK bzw. Anti-Kaninchen AK, je 1:2500 in TBS-tween) behandelt. Die Rettich-Peroxidase der gebundenen Antikörper wurde nach gründlichem Waschen der Membran in TBS-tween mit "SuperSignal™" (Pierce) nach Vorschrift des Herstellers auf ECL-Filmen ("Hyperfilm", Amersham/Buchler) detektiert.

4.2.8 Bestimmung des Phosphateinbaus

Zur Quantifizierung des Phosphateinbaus wurde das Dotierungsverhältnis der Ansätze bestimmt (typischerweise $3.7 \cdot 10^7$ MBq / mol ATP). Dies erfolgte durch Messung der gesamten Phosphorylierungsansätze (Phosphoaminosäureanalyse) oder eines Aliquots desselben (Aktivitätsmessungen). Durch Zählung der gefällten und mehrfach gewaschenen Proteine bzw. der Phosphozellulosefilter wurde die Menge an eingebautem [³²P]-Phosphat gemessen, und über das Dotierungsverhältnis die Menge an eingebautem Phosphat insgesamt bestimmt. Alternativ wurde die Reaktionsmischung über SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel gefärbt und getrocknet und die Banden von Interesse ausgeschnitten und gezählt.

Qualitative Daten über den Phosphateinbau wurden durch Detektion der Radioaktivität mit ECL-Hyperfilm (Amersham/Buchler) bzw. mit dem "BAS3000 Phospho-Imager" und dem Auswertungs-Programm "TINA" (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) erhalten.

4.2.9 Phosphoaminosäureanalyse (nach Boyle et al., 1991)

Das radioaktiv markierte Protein wurde aus dem getrockneten SDS-Gel ausgeschnitten, das Gelstück zerkleinert und mit 100 µL H₂O rehydratisiert. Nach zwölfstündiger Elution bei RT wurde das Protein mit 20 %iger TCA gefällt und mehrmals mit Ethanol_{absol} gewaschen. Nach Aufnahme des Pellets in 500 µL 6 M Salzsäure wurde die Lösung zur partiellen Hydrolyse 55 min bei 110 °C inkubiert.

Für die Analyse des radioaktiv markierten "Lip"-Peptids (203-GNKLDTFCGSPPYAAPELQGKK-224) wurde der Reaktionsansatz wie unter "Kinase-Aktivitäts-Assay" (4.2.6) beschrieben angesäuert, auf ein Phosphozellulosefilter aufgebracht und gewaschen. Das Filter mit dem darauf befindlichen Peptid wurde wie oben beschrieben hydrolysiert. Nach Zugabe von 300 µL Aqua_{dest} wurde der Reaktionsansatz in der Speed-Vac lyophilisiert. Die Probe wurde in 2 µL pH_{RT} 2.9 Puffer (Ameisensäure, Pyridin, Essigsäure und Wasser im Mischungsverhältnis 59:1:194:2357) aufgenommen.

Die elektroforetische Auftrennung der Probe (0.5 µL, ca. 300 Bq) erfolgte in diesem Puffer gemeinsam mit 0.5 µL Standard-Phosphoaminosäuren (1 mg/mL) auf Dünnschicht-Zelluloseplatten (Macherey & Nagel) bei 1200 V für 35 min in einem Flachbett-Dünnschicht-Elektrophorese-System (HTLE 7000, CBS Scientific, Inc.).

Die Radioaktivität der an der Luft getrockneten Platten wurde mittels "BAS2000" (BAS Reader V. 2.9 (1994), Fuji) detektiert und mit dem Programm "TINA" (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) ausgewertet.

4.2.10 Interaktionsuntersuchung durch Gelfiltration von rMARK2 und rMARKK

Die Proteine (20 μ L, je 20 μ g) wurden an der HPLC in PBS gelfiltrierte (50 μ L/min, Superose12™ 3.2 x 300 mm, "Smart" HPLC-System). Die Retentionszeiten der Proteine wurden durch Westenblot-Analyse der Fraktionen bestimmt und mit den Proteinen des "High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) verglichen.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Rekombination virogener Partikel (Baculovirussystem)

Für die Expression rekombinanter MARKK wurde das Baculovirussystem "BaculoGold" von PharMingen gewählt. Virogene Partikel wurden durch gemeinsame Calciumphosphat-Präzipitation von 1 μ g des Plasmids pVLHisMARKK mit 0,25 μ g linearisierter "BV BaculoGold DNA" auf $2 \cdot 10^6$ *Spodoptera frugiperda*- (Sf9-) Zellen und anschließender Inkubation bei 27 °C in TNM-FH Medium (PharMingen) erzeugt (Durchführung siehe Angaben des Herstellers).

Nach fünf Tagen wurde der Viren enthaltende Zellüberstand auf $5 \cdot 10^6$ frische Zellen (in 5 mL TNM-FH Medium) gegeben und für weitere drei Tage bei 27 °C kultiviert. Im Lysat dieser Zellen konnte das Protein mittels Western-Immunoblot mit einem Antikörper gegen den aminoterminalen Polyhistidinrest nachgewiesen werden. Der Überstand der Zellen, d.h. das Medium mit den Viren, wurde durch eine Membran mit 0.45 μ m Porengröße filtriert und als Arbeitslösung bei 4 °C gelagert.

4.3.2 Präparation rekombinanter MARKK, MKK3 und p38 aus Insektenzellen

Zur Präparation der rekombinanten MARKK wurden 0.5 mL der Arbeitslösung aus 4.3.1 auf 15 mL Sf9-Zellen (10^6 Zellen pro mL TNM-FH Medium) gegeben und für drei Tage bei 27 °C kultiviert.

Virenlösungen für die Präparation von MKK3 und p38 MAPK wurden freundlicherweise von Dr. J. Biernat (Max-Planck-Arbeitsgruppen, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Die infizierten Sf9-Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst, durch Zentrifugation (10 min bei 1000 x g) vom Medium getrennt und in 0,5 mL Lysispuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH_{RT} 8.5, 100 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 1 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Benzamidin, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Pepstatin A, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Leupeptin, 5 mM CHAPS und 1 mM PMSF) pro 15 mL Kulturvolumen aufgenommen.

Die Zellen wurden mit der French Press aufgeschlossen und die löslichen Proteine durch Zentrifugation (14000 x g, 10 min bei 4 °C) von den Zelltrümmern getrennt. Der Überstand wurde 1 h bei 4°C mit 50 μL NiNTA pro mL inkubiert. Das Affinitätsmaterial wurde durch mehrmaliges Zentrifugieren (2000 x g, 5 min bei 4 °C) und Aufnehmen in gleichem Volumen Lysispuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch zweimalige Inkubation mit je gleichem Volumen Elutionspuffer (Lysispuffer mit 500 mM Imidazol). Das Eluat wurde über Nacht gegen den unter 4.2.3 beschriebenen Lagerpuffer dialysiert.

4.3.3 Immunopräzipitation von rMARKK und rHA-MARK2 aus Zell-Extrakten

Zur Darstellung der rekombinanten Kinasen wurden 0.5 mL der Virenlösungen auf 15 mL Sf9-Zellen (10^6 Zellen pro mL TNM-FH Medium) gegeben und für drei Tage bei 27 °C kultiviert. Die Virenlösung für die Präparation von HA-MARK2 wurde freundlicherweise von Dr. J. Biernat (MaxPlanck-Arbeitsgruppen, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden wie in 4.3.2 von der Nährlösung getrennt und in PBS aufgearbeitet. Aliquots (250 μL) der Zellextrakte wurden vier Stunden bei 4 °C mit NiNTA (20 μL) oder an Agarose immobilisierten HA-Antikörper (Santa Cruz Biotech) inkubiert.

Die Agarose-Trägerkügelchen wurden durch Zentrifugation (1000 x g, 5 min bei 4 °C) von der Lösung getrennt und dreimal mit PBS (je 50 μL) gewaschen. Die an die Nickel-Ionen bzw. HA-Antikörper gebundenen Proteine wurde mit Protein-Probenpuffer (20 μL) abgelöst und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

5 Materialien

5.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in höchster Reinheitsstufe bei Sigma-Aldrich, Fluka und Merck bezogen. Das radioaktiv markierte ATP (370 MBq/mL) stammt von Amersham Life Science.

5.2 Antikörper und Enzyme

Restriktionsendonukleasen und Ligasen wurden von New England Biolabs bezogen. Die DNA-Polymerase stammt von Clontech. Die λ -ZAP-cDNA-Bibliothek wurde von Stratagene erhalten. Einige der Proteinkinasen wurden freundlicher Weise von Dr. G. Drewes (MPG-ASMB, Hamburg) zur Verfügung gestellt (Cdk2, Cdk5 und p42/ERK2), die GSK3 β und p44/ERK1 wurden bei Upstate Biotechnology erworben. Die CKI ist eine Gabe von Prof. Dr. L. A. Pinna (Dipartimento di Chimica Biologica, Padova, Italien).

Die Antikörper gegen phosphorylierte Aminosäuren in der Aktivierungsschleife wurden von Eurogentec gegen die jeweiligen Phosphopeptide generiert. Weiter käuflich erworbene Antikörper: "His-Tag Monoclonal Antibody" (Novagen); an Harzkügelchen gekoppelter monoklonaler HA-Antikörper (Santa Cruz Biotech).

Aus Schweinegehirn gereinigte MARK wurde mir freundlicherweise von Dr. G. Drewes (MPG-ASMB, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

5.3 Expressionsstämme und Plasmide

Der E.coli-Stamm B121(DE3) stammt von Dr. F. Studier (Brookhaven National Laboratory, USA). Das Baculovirus-Expressionssystem wurde bei Pharmingen bezogen.

Die pNG2-Vektoren mit MARK1, -2 und -3 und den MARK2-Alaninmutanten wurden mir freundlicherweise von Dr. G. Drewes (MPG-ASMB, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Die pVL-Vektoren mit MKK3 und MARK2 habe ich dankenswerterweise von Dr. J. Biernat (MPG-ASMB, Hamburg) erhalten.

5.4 Bildverarbeitung

Die Detektion der Chemielumineszenzsignale im Westernblot erfolgte mit ECL-Hyperfilm (Amersham). Die Filme und die Gele wurden mit einem Flachbettscanner (Scan Jet 4C; Hewlett Packard) in elektronische Form gebracht, die Weiterverarbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.). Autoradiografien der Gele wurden mit denBAS2000- und BAS3000-Systemen erstellt und mit dem dazugehörigen Programm TINA (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) ausgewertet. Dieses Bildanalyseprogramm wurde auch für die Bestimmung der apparenten Molekulargewichte benutzt. Die Strukturmodelle von PKA und MARK wurden mit dem "PDB-Viewer v3.7b2" (Glaxo Wellcome Experimental Research) erstellt, als Vorlage diente der Strukturdatensatz "1fmo" der PKA mit Inhibitor PKI (Narayana et al., 1997).

5.5 Geräte

DC-Chromatografie: HTLE 7000 (CBS Scientific Inc.); Szintillationszähler: Tricarb 1900 CA (Packard Canberra Ltd); DNA-Sequenziergerät: ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer); FPCL, HPCL und die verwendeten Chromatografie-Medien (soweit nicht anders beschrieben): "ÄKTA"- und "SMART"-Systeme (Amersham Pharmacia Biotech); French Press (Aminco); Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT2 (Leybold-Heraeus); Gelelektroforese-System (Höfer / Amersham Pharmacia Biotech); Novablot Elektrophoretic Transfer Kit 2117-250 (LKB-Bromma); Plattenspieler: Phonosophie No.3; PCR-Gerät: "Mastercycler personal" (Eppendorf); Spektrometer BU64 (Beckmann); Zentrifugen : Minifuge A (Heraeus), J2-21M/E und L8-70M (Beckmann); 5414S und 5415C (Eppendorf).

6 Literaturverzeichnis

- Adams,J.A., McGlone,M.L., Gibson,R. and Taylor,S.S. (1995) Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, **34**, 2447-2454.
- Afti,A., Lepage,K., Allard,P., Chapdelaine,A. and Chevalier,S. (1995) Activation of a serine/threonine kinase signaling pathway by transforming growth factor type β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12110-12114.
- Anostario,M., Harrison,M.L. and Geahlen,R.L. (1990) Immunochemical detection of adenine nucleotide-binding proteins with antibodies to 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenine. *Analyt. Biochem.*, **190**, 60-65.
- Beaulieu,P., Hamel,L. and Chevalier,S. (1999) C-TAK1/Kp78 β : A serin/threonine kinase linked to prostate epithelial cell proliferation and activated by TGF β 1. *FASEB J.*, **7**, Suppl. S, A1488.
- Berman,K.S., Hutchison,M., Avery,L. and Cobb,M.H. (2001) Kin-18, a *C. elegans* protein kinase involved in feeding. *Gene*, **279**, 137-147.
- Biernat,J., Gustke,N., Drewes,G., Mandelkow,E.-M. and Mandelkow,E. (1993) Phosphorylation of Ser 262 strongly reduces the binding of tau protein to microtubules. *Neuron*, **11**, 153-163.
- Biernat,J. and Mandelkow,E.-M. (1999) The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell*, **10**, 727-740.
- Biernat,J., Wu,Y.Z., Timm,T., Zheng-Fischhöfer,Q., Mandelkow,E., Meijer,L. and Mandelkow,E.-M. (2002) Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 4013-4028.
- Böhm,H., Brinkmann,V., Drab,M., Henske,A. and Kurzchalia,T.V. (1997) Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. *Curr. Biol.*, **7**, 603-606.
- Boyd,L., Guo,S., Levitan,D., Stinchcomb,D.T. and Kemphues,K.J. (1996) PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development*, **122**, 3075-84.

- Boyle,W.J., van der Geer,P. and Hunter,T. (1991) Phosphopeptide mapping and phosphoamino-acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol.*, **201**, 110 - 149.
- Brown,A.J., Hutchings,C., Burke,J.F. and Mayne,L.V. (1999) Application of a rapid method (targeted display) for the identification of differentially expressed mRNAs following NGF-induced neuronal differentiation in PC12 cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, **13**, 119-130.
- Canagarajah,B.J., Khokhlatchev,A., Cobb,M.H. and Goldsmith,E.J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*, **90**, 859-869.
- Carter,T.G., Benton,B., Fruhling,D., Monks,C.R.F., Windmiller,D., Kupfer,A., Manfredi,J., Johnson,G.L. and Pleiman,C.M (2000). KDS and TAO1, two related proteins with kinase domain homology to STE20, differentially relocate in mitogen stimulated T lymphocytes. Unpublished; accession number: AAF25817.
- Chen,Z., Hutchison,M. and Cobb,M.H. (1999) Isolation of the protein kinase TAO2 and identification of its mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase binding domain. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28803-28807.
- Chen,Z. and Cobb,M.H. (2001) Regulation of stress-responsive mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways by TAO2. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16070-16075.
- Chung,C.T., Niemela,S.L. and Miller,R.H. (1989) One step preparation of competent *E. coli* cells: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2172-2175.
- Cobb,M.H. (1999) MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **71**, 479-500.
- Cox,D.N., Lu,B., Sun,T.Q., Williams,L.T. and Jan,Y.N. (2001) Drosophila par-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Curr. Biol.*, **11**, 75-87.
- Dajani,R., Fraser,E., Roe,S.M., Young,N., Good,V., Dale,T.C. and Pearl,L.H (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*, **105**, 721-732.
- Dan,I., Watanabe,N.M. and Kusumi,A. (2001) The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell. Biol.*, **11**, 220-230.
- DeBodt,H.L., Rosenblatt,J., Jancarik,J., Jones,H.D., Morgan,D.O. and Kim,S.-H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **363**, 595-602.
- Drechsel,D.N., Hyman,A.A., Cobb,M.H. and Kirschner,M.W. (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell*, **3**, 1141-1154.

- Drewes,G., Trinczek,B., Illenberger,S., Biernat,J., Schmitt-Ulms,G., Meyer,H.E., Mandelkow,E.M. and Mandelkow,E. (1995) MAP/Microtubule Affinity Regulating Kinase (p110mark): A novel protein kinase that regulates tau- microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site Serine 262. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7679-7688.
- Drewes,G., Ebnet,A., Preuss,U., Mandelkow,E.-M. and Mandelkow,E. (1997) MARK - a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*, **89**, 297-308.
- Drewes,G., Ebnet,A. and Mandelkow,E.-M. (1998) MAPs, MARKs, and microtubule dynamics. *Trends in Biochem. Sci.*, **23**, 307-311.
- Ebnet,A., Drewes,G., Mandelkow,E.-M. and Mandelkow,E. (1999) Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil. Cytoskel.*, **44**, 209-224.
- Espinosa,L. and Navarro,E. (1998) Human serine/threonine protein kinase EMK1: genomic structure and cDNA cloning of isoforms produced by alternative splicing. *Cytogenet Cell Genet.*, **81**, 278-282.
- Gevaert,K., Demol,H., Martens,L., Hoorelbeke,B., Puype,M., Goethals,M., Van Damme,J., De Boeck,S. and Vandekerckhove,J. (2001) Protein identification based on matrix assisted laser desorption/ionization-post source decay-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **22**, 1645-1651.
- Guo,S. and Kemphues,K.J. (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, **81**, 611-620.
- Guo,S. and Kemphues,K.J. (1996) Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Curr. Opin. Genet.*, **6**, 408-415.
- Han,J., Lee,J.D., Jiang,Y., Li,Z., Feng,L. and Ulevitch,R.J. (1996) Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J. Biol. Chem.*, **271**, 2886-91.
- Hanks,S.K. and Hunter,T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase catalytic domain structure and classification. *FASEB J.*, **9**, 576-596.
- Hasegawa,M., Morishima-Kawashima,M., Takio,K., Suzuki,M., Titani,K. and Ihara,Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analysis of tau in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17047-17054.
- Holland,P.M. and Cooper,J.A. (1999) Protein modification: Docking sites for kinases. *Curr. Biol.*, **9**, R329-R331.
- Hofmann,K. and Bucher,P. (1996) The UBA-domain: A sequence motif found in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 172-173.

- Hunter,T. (1995). Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.
- Hurov,J.B., Stappenbeck,T.S., Zmasek,C.M., White,L.S., Ranganath,S.H., Russell,J.H., Chan,A.C., Murphy,K.M. and Piwnica-Worms,H. (2001) Immune system dysfunction and autoimmune disease in mice lacking Emk (Par-1) protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3206-3219.
- Huse,M. and Kuriyan,J. (2002) The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell*, **109**, 275-282.
- Hutchison,M., Berman,K.S. and Cobb,M.H. (1998) Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28625-28632.
- Illenberger,S., Drewes,G., Trinczek,B., Biernat,J., Meyer,H.E., Olmstedt,J.B., Mandelkow,E.M. and Mandelkow,E. (1996) Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110mark. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10834-10843.
- Inglis,J.D., Lee,M. and Hill,R.E. (1993) Emk, a protein kinase with homologs in yeast maps to mouse chromosome 19. *Mammalian Genome*, **4**, 401-403.
- Jacobs,D., Glossip,D., Xing,H., Muslin,A.J. and Kornfeld,K. (1998) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK/MAP kinase. *Genes and Development*, **13**, 163-175.
- Jeffrey,P.D., Russo,A.A., Polyak,K. Gibbs,E., Hurwitz,J., Massagué,J. and Pavletich,N.P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, **376**, 313-320.
- Jenkins,S.M. and Johnson,G.V. (2000) Microtubule/MAP-affinity regulating kinase (MARK) is activated by phenylarsine oxide in situ and phosphorylates tau within its microtubule-binding domain. *J. Neurochem.*, **74**, 1463-1468.
- Jenkins,S.M., Zinnerman,M., Garner,C. and Johnson,G.V. (2000) Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J.*, **345**, 263-270.
- Johnson,L.N., Noble,M.E.M. and Owen, D.J. (1996) Active and inactive protein kinases: Structural basis for regulation. *Cell*, **85**, 149-158.
- Kato,T., Satoh,S., Okabe,H., Kitahara,O., Ono,K., Kihara,C., Tanaka,T., Tsunoda,T., Yamaoka,Y., Nakamura,Y. and Furukawa,Y. (2001) Isolation of a novel human gene, MARKL1, homologous to MARK3 and its involvement in hepatocellular carcinogenesis. *Neoplasia*, **3**, 4-9.
- Kim,S.H., Schulze-Gahmen,U., Brandsen, J., de Azevedo Junior,W.F. (1996) Structural basis for chemical inhibition of CDK2. *Prog Cell Cycle Res*, 137-145.

- Kreegipuu,A., Blom,N. and Brunak,S. (1999) PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Res*, **27**, 237-239.
- Ko,L., Odawara,T. and Yen,S.H. (1997) Menadione-induced tau dephosphorylation in cultured human neuroblastoma cells. *Brain Res.*, **760**, 118-128.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature* 1970 **227**, 680-685.
- Lee,L.C. and Edelman,A.M. (1995) Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase Ia is due to direct phosphorylation by its activator. *Bioch. Bioph. Res. Communications*, **210**, 631-637.
- Levin,D.E. and Bishop,M.J. (1990) A putative protein kinase gene (kin1+) is important for growth polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8272-8276.
- Levin,D.E., Hammond,C.I., Ralston,R.O. and Bishop,M.J. (1987) Two Yeast Genes That Encode Unusual Protein Kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6035-6039.
- Lupas,A., Van Dyke,A. and Stock,J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**, 1162-1164.
- Madhusudan,E., Trafny,A., Xuong,N.H., Adams,J.A., Ten Eyck,L.F, Taylor,S.S. and Sowadski, J.M. (1994) cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer. *Protein Science*, **3**, 176-187.
- Manning,G., Whyte,D.B., Martinez,R., Hunter,T., and Sudarsanam,S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-1934.
- Marcus,S., Polverino,A., Barr,M. and Wigler,M. (1994) Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7762-7766.
- Matter,K., Hunziker,W. and Mellman,I. (1992) Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants *Cell*, **71**, 741-753.
- Moore,T.M., Garg,R., Johnson,C., Coptcoat,M.J., Ridley,A.J. and Morris,J.D. (2000) PSK, a novel STE20-like kinase derived from prostatic carcinoma that activates the c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway and regulates actin cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4311-4322.
- Morishima-Kawashima,M., Hasegawa,M., Takio,K., Suzuki,M., Yoshida,H., Titani,K. and Ihara,Y. (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.*, **270**, 823-829.

- Müller,J., Ory,S., Copeland,T., Piwnica-Worms,H. and Morrison,D.K. (2001) C-TAK1/MARK3 Regulates Ras Signaling by Phosphorylating the MAPK Scaffold, KSR1. *Mol. Cell.*, **8**, 983-993.
- Narayana,N., Cox,S., Shaltiel,S., Taylor,S.S. and Xuong,N. (1997) Crystal structure of a polyhistidine-tagged recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein complexed with the peptide inhibitor PKI(5-24) and adenosine. *Biochemistry*, **36**, 4438-4448.
- Nelson,W.J. and Grindstaff,K.K. (1997) Cell polarity: par for the polar course. *Curr. Biol.*, **7**, R562-564.
- Ogg,S., Gabrielli,B. and Piwnica-Worms,H. (1994) Purification of a serine kinase that associates with and phosphorylates human Cdc25C on serine 216. *J. Biol. Chem.*, **269**, 30461-30469.
- Payne,D.M., Rossomando,A.J., Martino,P., Erickson,A.K., Her,J.H., Shabanowitz,J., Hunt,D.F., Weber,M.J. and Sturgill,T.W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.*, **10**, 885-892.
- Pearson,G., Robinson,F., Beers Gibson,T., Xu,B.E., Karandikar,M., Berman,K. and Cobb,M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.*, **22**, 153-183.
- Pellettieri,J. and Seydoux,G. (2002) Anterior-Posterior Polarity in *C. elegans* and *Drosophila* - PARallels and Differences. *Science*, **298**, 1946-1950.
- Peng,C.Y., Graves,P.R., Ogg,S., Thoma,R.S., Byrnes,M.J.3rd, Wu,Z., Stephenson,M.T. and Piwnica-Worms,H. (1998) C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ.*, **9**, 197-208.
- Pinna,L.A. and Ruzzene, M. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta*, **1314**, 191-225.
- Riechmann,V., Gutierrez,G.J., Filardo,P., Nebreda,A.R. and Ephrussi,A. (2002) Par-1 regulates stability of the posterior determinant Oskar by phosphorylation. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 337-342.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F. and Maniatis,T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York.
- Schieven,G. and Martin,G.S. (1988) Nonenzymatic phosphorylation of tyrosine and serine by ATP is catalyzed by manganese but not magnesium. *J. Biol. Chem.*, **263**, 15590-15593.
- Schmitt-Ulms, G. (1998) Studien zur Expression, Interaktion und Funktion der Proteinkinase MARK. Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

- 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**, 3549-3558.
- Scott,J.W., Norman,D.G., Hawley,S.A., Kontogiannis,L. and Hardie,D.G. (2002) Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *J. Mol. Biol.*, **317**, 309-323.
- Segrest,J.P., De Loof,H., Dohlman,J.H., Brouillette,C.G. and Anantharamaiah,G.M. (1990) Amphipathic helix motif: Classes and properties. *Proteins*, **8**, 103-117.
- Shulman,J.M., Benton,R. and St Johnston,D. (2000) The Drosophila homolog of C. elegans PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell*, **101**, 377-388.
- Steinberg,R.A., Cauthron,R.D., Symcox,M.M. and Shuntoh H. (1993) Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2332-2341.
- Sun,T.Q., Lu,B., Feng,J.J., Reinhard,C., Jan,Y.N., Fantl,W.J. and Williams,L.T. (2001) PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 628-636.
- Szczepanowska,J., Ramachandran, U., Herring,C.J., Gruschus,J.M., Qin,J., Korn,E.D. and Brzeska,H (1998) Effect of mutating the regulatory phosphoserine and conserved threonine on the activity of the expressed catalytic domain of Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4146-4151.
- Tassi,E., Biesova,Z., Di Fiore,P.P., Gutkind,J.S. and Wong,W.T. (1999) Human JIK, a novel member of the STE20 kinase family that inhibits JNK and is negatively regulated by epidermal growth factor. *J Biol Chem.*, **274**, 33287-33295.
- Taylor,S.S.und Radzio-Andzelm,E. (1994) Cyclic AMP-dependent protein kinase. *Protein Kinases* (Editor: Woodgett, J. R.), Oxford University Press, 1-20.
- Taylor,S.S., Knighton,D.R., Zheng,J., Sowadski,J.M., Gibbs,C.S. and Zoller,M.J. (1993) A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 84-89.
- Thorson,J.A., Yu,L.W., Hsu,A.L., Shih,N.Y., Graves,P.R., Tanner,J.W., Allen,P.M., Piwnicka-Worms,H. and Shaw,A.S. (1998) 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5229-5238.
- Timm,T. (1997) Untersuchungen zur Struktur und Funktion der MAP/Mikrotubuli-Affinität regulierenden Kinase MARK. *Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg*.

- Tomancak,P., Piano,F., Riechmann,V., Gunsalus,K.C., Kempfues,K.J. and Ephrussi,A. (2000) A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat Cell Biol.*, **2**, 458-460.
- Wallenfang,M.R. and Seydoux,G. (2000) Polarization of the anterior-posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature*, **408**, 89-92.
- Wen,W. and Taylor,S.S. (1994) High affinity binding of the heat-stable protein kinase inhibitor to the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase is selectively abolished by mutation of Arg133. *J. Biol. Chem.*, **269**, 8423-8430.
- Wu,C., Whiteway,M., Thomas,D.Y. and Leberer,E. (1995) Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 15984-92.
- Yustein,J.T., Li,D., Robinson,D. and 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,S.H., Kobayashi,R., Graves,P.R., Piwnica-Worms,H. and Tonks,N.K. (1997) Serine phosphorylation-dependent association of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1 with 14-3-3beta protein. *J Biol Chem.*, **272**, 27281-27287.
- Zhang,W., Chen,T., Wan,T., He,L., Li,N., Yuan,Z. and 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**, 872-879.

A Anhang

A.1 Abkürzungen

AK	Antikörper
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
Cdc2	"Cell-division cycle gene product 2"
Cdk2/5	Cyclin-abhängige Kinase, Typ 2/5
Chaps	Cholamidopropyldimethylaminopropansulfonat
CKI	Caseinkinase, Typ I
(c-)DNA	(komplementäre) Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPK	"Dendritic-cell-derived protein kinase"
DTT	Dithio-DL-threit
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK1/2	"Extracellular signal-regulated kinase"
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FPCL	"Fast protein liquid chromatography"
FSBA	5'-p-Fluorosulfonylbenzoyladenosen
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3, β -Form
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPCL	"High performance liquid chromatography"
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
JIK	JNK/SAPK inhibierende Kinase
JNK	"cJun N-terminal kinase"
kb(p)	Kilobasen(paare)
kD	Kilodalton
KDS	"Kinase Domain with homology to Ste20p"
KFC	"Kinase from chicken"
Kin1	"Kinase gene product"
KSR-1	"Kinase suppressor of ras 1"
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M _{app}	apparentes Molekulargewicht
MARK	"MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase"

MARKK	"MAP/ Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase Kinase"
Bq	Bequerel [s^{-1}]
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MKK3/6	"MAP Kinase Kinase, type 3/6"
NFTs	"Neurofibrillary tangles", Neurofibrilläre Bündel
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor
Nonidet P40	Nonylphenylpolyethylenglykol
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei eine Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektroforese
PAK	p21-aktivierte Kinase
Par-1	"Partitioning defective"
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHFs	"Paired helical filaments"
P _i	anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP-2a	Protein Phosphatase, Typ 2a
PSK	"Prostate-derived ste20-like kinase"
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S, Ser	Serin
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Snf1	"Sucrose nonfermenting gene product 1"
Ste20p	"Sterile 20 protein"
T, Thr	Threonin
TAO-1/2	"Thousand and one aminoacids"
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyethylenglykol-sorbitan-monolaurat
U	Enzymeinheiten, "units"
v/v bzw. w/v	Volumen pro Volumen bzw. Gewicht pro Volumen
Wnt	"wingless-type MMTV integration site family, member 1"
Y, Tyr	Tyrosin

A.2 Identifikationsnummern der MARK-Isoformen und der MARKK

Die Sequenzen der Kinasen sind in der Datenbank "Genbank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sitemap/index.html#GenBank>) unter nachfolgenden Nummern eingetragen:

MARK1: *h. sapiens* AF154845, *r.norvegicus* Z83868; MARK2: *h. sapiens* BC008771, *r.norvegicus* Z83869; MARK3 *h. sapiens* AF240782, *r.norvegicus* NM130749; MARK4: *h. sapiens* AY057448; MARKK/TAO-1: *h. sapiens* AB037782, *r.norvegicus* AF084205.

A.3 Proteinsequenz von MARK2 mit Kennzeichnung der Domänen und der Subdomänen

MSSARTPLPT LNERDTEQPT LGHLDSKPSS	N	KSNMLRGRNS ATSADEQPHI GNYRLLK <u>T</u> IG	60
KGNFAKVKLA RHILTGKEVA <u>V</u> KIIDKTQLN	82 II	SSSLQKLFRE VRIMKVLNHP NIVKLFEVIE	120
TEKTLYLUME YASGGEVFDY LVAHGRMKEK	KAT	EARAKFRQIV SAVQYCHQKF IVHRDLKAEN	180
LLLDADMNIK IADFGFSNEF TFGNKLD <u>T</u> FC	208 VII	212 VIII GSPPYAAPEL FQGKKYDGPE VDVWSLGVIL	240
YTLVSGSLPF DGQNLKELRE RVLRGKYRIP	X	<u>F</u> YMS <u>T</u> DCENL LKKFLILNPS KRGTLQIMK	300
DRWMNVGHED DELKPYVEPL T PDYKDP	PRRTE	LMVSMGYTRE EIQDSL <u>V</u> GQR YNEVMATYLL	360
LGYKSSSELEG DTITLKRPRS ADLTNSSAPS		PSHKVQRSVS ANPKQRRSSD QAVPAIPTSN	420
SYSKKTQSNN AENKRPEEET GRKASSTAKV	"Spacer"	<u>P</u> ASPLPGLDR KKTTPTPSTN SVLSTSTNRS	480
RNSPLDRAS LGQASIQNGK DSTAPQRPV		ASPSAHNISS SSGAPDRTNF PRGVSSRSTF	540
HAGQLRQVRD QQNLPGVTP ASPSGHSQGR		RGASGSIFSK FTSKFVRRNL NEPEKDRVE	600
TLRPHVVGGG GTDKEKEEFR EAKPRSLRFT		WSMKTSSME C PNEMMREIRK VLDANSCQSE	660
LHERYMMLCV HGTPGHENFV QWEMEVCKLP		RLSLNGVRFK RISGTSMAFK NIASKIANEL	720
KL			722

Abbildung A.1: Proteinsequenz von MARK2 mit Kennzeichnung der Domänen und der Subdomänen. Bezeichnungen und Farben der Domänen nach Abbildung 1.3. Die Subdomänen sind mit römischen Ziffern eingetragen. In Fettdruck mit Nummern sind die Aminosäuren aufgezeigt, die in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität bzw. Aktivierung untersucht wurden. Der eigentlich katalytisch aktive Rest, das Aspartat₁₇₅, ist unterstrichen und mit "Katalyse" markiert. Das für die Aktivierung durch MARKK relevante Threonin₂₀₈ ist zusätzlich unterstrichen. Die durch Autophosphorylierung modifizierte Aminosäuren sind unterstrichen und mit "autoph." gekennzeichnet.

A.4 Sequenzen der verwendeten Peptide

Tau-Peptid (TR1), die von MARK phosphorylierbare Aminosäure ist unterstrichen:

255-NVKSKIGSTENLK-268

Aktivierungsschleifen-Peptid (Lip-Peptid) von MARK, die von MARKK phosphorylierbare Aminosäure ist unterstrichen:

203-GNKLDTFCGSPPYAAPELQGKK-224

A.5 Sequenzen der verwendeten *primer*

Sequenzen der *primer* für die Darstellung der MARK2- und MARKK-Punktmutanten sowie für die Klonierung der MARKK. Die Nukleotide, die zum beabsichtigten Austausch von Aminosäuren führen, sind fettgedruckt. Die in Kursivdruck angegebenen Nukleotide wurden zusätzlich zur Erzeugung neuer Schnittstellen eingeführt, es resultiert daraus keine Veränderung der Polypeptidsequenz. Die Erkennungssequenz der neu entstandenen Restriktionsstelle ist unterstrichen, das schneidende Enzym ist rechts angegeben.

MARK2(T208E)

5' -AAC AAG CTG GAT **GAG** TTC TGT GGT AGT CCT CCA TAT GCT GCC CCA-3' NdeI
 3' -TTG TTC GAC CTA **CTC** AAG ACA CCA TCA GGA GGT ATA CGA CGG GGT-5'

MARK2(S212E)

5' -GAT ACT TTC TGT GGT **GAG** CCT CCA TAT GCT GCC CCA GAA-3' NdeI
 3' -CTA TGA AAG ACA CCA **CTC** GGA GGT ATA CGA CGG GGT CTT-5'

MARK2(T208E/S212E)

5' -AAC AAG CTG GAT **GAG** TTC TGT GGT **GAG** CCT CCA TAT GCT GCC CCA-3' NdeI
 3' -TTG TTC GAC CTA **CTC** AAG ACA CCA **CTC** GGA GGT ATA CGA CGG GGT-5'

MARKK-PCR-5'

5' -TGA CTG CTC AGC CAT ATG CCA TCA ACT AAC-3' NdeI
 nicht-kodierender Bereich Startcodon

MARKK-PCR-3'

5' -CAG CTC CAG CGG ATC CGC CAC TTT CAA TTA TTA-3' BamHI
 nicht-kodierender Bereich Stoppcodon (invertiert komplementär)

MARKK(K57A)

5' -GAA GTG GTG GCG ATC GCG AAA ATG TCT TA-3' PvuI
 3' -CTT CAC CAC CGC TAG CGC TTT TAC AGA AT-5'

MARKK(S181A)

5' -GCC TCC CCT GCC AAT GCA TTT GTG GGA ACA CCA-3' NsiI
 3' -CGG AGG GGA CGG TTA CGT AAA CAC CCT TGT GGT-5'

MARKK(T185A)

5' -AAT TCT TTT GTG GGC GCG CCA TAT TGG ATG GCC-3' BssHIII
 3' -TTA AGA AAA CAC CCG CGC GGT ATA ACC TAC CGG-5'

MARKK(S181A/T185)

5'-GCC TCC CCT GCC AAT GCA TTT GTG GGA GCA CCA TAT TGG ATG G-3' NsiI
 3'-CGG AGG GGA CGG TTA CGT AAA CAC CCT CGT GGT ATA ACC TAC C-5'

A.6 Gefahrenhinweise

	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbol
Acrylamid	45-46-20/21.1-25.1-36/38-43-48/23/24/25.1-62	53.1-45	T
Ameisensäure	35	26-36/37/39-45	C
Bicinchoninsäure	-	22-24/25	-
Benzamidin	36/37/38	26-36	Xi
Carbenicillin, di-Natriumsalz	42/43	22-36/37	Xn
CHAPS	36/37/38	26-36	Xi
Chloramphenicol	-		22 -
DTT	22-36/37/38	26-36	Xn
DMSO	36/37/38	26-36	Xi
EDTA	36-52/53	26-36	Xi
Essigsäure	10-35	26-36/37/39-45	C
Ethanol		11 7-16	F
Formaldehyd	23/24/25-34-39/23/24/25-40-43	26-36/37/39-45-51	-
FSBA	-	22-24/25	-
Glutaraldehyd	23/25-34-42/43-50	26-36/37/39-45-61	T, N
HEPES	-	22-24/25	-
Imidazol	22-34	26-36/37/39-45	C
Kaliumchlorid	-	22-24/25	-
Magnesiumchlorid	36/37/38	26-36	Xi
2-Mercaptoethanol	22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61	T, N
MES	36/37/38	26-36	Xi
Methanol	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45	F, T
Natriumdihydrogenphosphat	36/37/38	26-36	Xi
Natriumfluorid	25-32-36/38	22-36-45	T
di-Natriumhydrogenphosphat	36/37/38	26-36	Xi
Natrium-(ortho)-vanadat	20/21/22	36-22	Xn
Natriumthiosulfat	36/37/38	26-36	Xi
NonidetP40	37-41	26-39	Xi
Pepstatin A	-	22-24/25	-
PIPES	-	22-24/25	-
PMSF	25-34	26-36/37/39-45	T
Pyridin	11-20/21/22	26-28	Xn
SDS	22-38-41	36-36/37/39	Xn
Silbernitrat	34-50/53	26-45-60-61	C, N
TCA	35-50/53	26-36/37/39-45-60-61	C, N
TRIS-HCl	36/37/38	26-36	Xi

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, 22. Januar 2003

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

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Bredehorst, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg, bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Gerard Drewes für die Einführung in die Thematik und die Hilfestellungen zu Beginn der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Joël Vandekerckhove danke ich für die Peptidanalysen.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Ferner danke ich für eine weit über den Laboralltag hinausgehende Freundschaft:

Antje, die immer eine ansteckende Fröhlichkeit verbreitet;

Arne und Stefan für schöne Stunden bei Wein und Musik;

Volker, der dabei immer für Hifi-Schnickschnack zu haben war;

Matthias, der mich für das "Birdland" und Oscar Peterson begeistert hat und mir immer mit Rat und Tat bei meinen Basteleien zur Seite gestanden ist.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Freundin Karin, die immer für mich da ist.

Meinen Eltern und meiner Schwester Claudia danke ich für ihre Unterstützung jeglicher Art.

Lebenslauf

Thomas Timm
geboren am 07.09.1969 in Buxtehude

Schulausbildung

09/1976 – 07/1980	Grundschule in Hamburg
08/1980 – 06/1986	Gymnasium Neuwiedenthal in Hamburg
08/1986 – 05/1989	Oberstufenzentrum Süderelbe in Hamburg
05/1989	Abitur

Studium

10/1990 – 12/1992	Grundstudium Chemie, Universität Hamburg
12/1992	Vordiplom
01/1993 – 12/1996	Hauptstudium Chemie, Universität Hamburg
01/1997 – 08/1997	Diplomarbeit bei Dr. C. Betzel, Arbeitsgruppe für Makromolekulare Strukturanalyse des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg, "Untersuchungen zur Struktur und Funktion der MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierenden Kinase MARK"
08/1997	Diplom
10/1997	Beginn der vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. E. Mandelkow, Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg

Beruflicher Werdegang

10/1997 – 07/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter des MPG-Forschungsvorhabens "Aktivationsweg der Proteinkinase MARK"
08/2001 – 09/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des DFG-Forschungsvorhabens MA 1103/8 "Tau mutations and their effects on intracellular transport"

Veröffentlichungen

Timm,T., Li,X.-Y., Biernat,J., Jiao,J., Mandelkow,E., Vandekerckhove,J. and Mandelkow,E.-M. (2003) MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/PAR-1. *EMBO J.*, **22**, 5090-5101.

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