

**Charakterisierung der Wechselwirkungen  
der Stress-induzierbaren Proteinkinase  
Casein Kinase 1 delta (CK1 $\delta$ )  
aus *Rattus norvegicus*  
mit zellulären und viralen Proteinen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg**

**vorgelegt von  
Sonja Alexandra Wolff**

**Hamburg, im Juli 2004**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>Problemstellung</b> .....	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
4.1	<b>Geräte</b> .....	<b>19</b>
4.2	<b>Chemikalien und Biochemikalien</b> .....	<b>20</b>
4.3	<b>Radiochemikalien</b> .....	<b>21</b>
4.4	<b>Verbrauchsmaterialien und Kits</b> .....	<b>21</b>
4.5	<b>Größenstandards</b> .....	<b>22</b>
4.6	<b>Enzyme</b> .....	<b>22</b>
4.7	<b>Antikörper und Seren</b> .....	<b>23</b>
4.7.1	Aufstellung aller Antikörper und Seren .....	23
4.7.2	Herstellung von anti-Peptid Kaninchenserum .....	23
4.8	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>24</b>
4.9	<b>Vektoren</b> .....	<b>27</b>
4.10	<b>Eukaryontische Zelllinien</b> .....	<b>32</b>
4.11	<b>Bakterienstämme</b> .....	<b>32</b>
4.12	<b>Hefestämme</b> .....	<b>32</b>
4.13	<b>Zellkulturtechniken</b> .....	<b>33</b>
4.13.1	Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien .....	33
4.13.2	Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zelllinien .....	33
4.13.3	Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen .....	33
4.13.4	Stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen .....	34
4.13.5	Präparation von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie .....	34
4.13.6	Präparation von Zellen für Immunfluoreszenzanalysen .....	35
4.13.7	Extraktion von Proteinen aus eukaryontischen Zellen .....	36
4.13.8	Extraktion von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen .....	36
4.13.9	Softagarklonierung .....	37

<b>4.14</b>	<b>Arbeiten mit Bakterien</b> .....	<b>37</b>
4.14.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ nach der Mehrionen-Technik .....	37
4.14.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	37
4.14.3	Präparation elektrokompeter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	38
4.14.4	Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (Elektroporation).....	38
4.14.5	Präparation von Vektor-DNA in kleinem Massstab (Mini-Präp).....	38
4.14.6	Präparation von Vektor-DNA in quantitativem Massstab .....	39
4.14.7	Bakterielle Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen .....	39
<b>4.15</b>	<b>Arbeiten mit Hefen</b> .....	<b>40</b>
4.15.1	LiAc-Transformation von <i>S. cerevisiae</i> AH109.....	40
4.15.2	Vektor-DNA Präparation aus <i>S. cerevisiae</i> .....	41
4.15.3	$\beta$ -Galaktosidase-Filter-Assay .....	41
<b>4.16</b>	<b>Nukleinsäure-analytische Methoden</b> .....	<b>42</b>
4.16.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	42
4.16.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	42
4.16.3	Quantifizierung von DNA-Mengen im Agarosegel.....	42
4.16.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	43
4.16.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	43
4.16.6	Reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) .....	44
4.16.7	TA-TOPO-Klonierung.....	44
4.16.8	Spaltung von Vektor-DNA durch Restriktions-Endonukleasen.....	45
4.16.9	Dephosphorylierung von Vektor-DNA .....	45
4.16.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	45
4.16.11	Sequenzierung von DNA.....	46
<b>4.17</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>47</b>
4.17.1	Quantifizierung von Proteinmengen.....	47
4.17.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
4.17.3	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue.....	47
4.17.4	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	48
4.17.5	Immundetektion (Western Blot Analyse).....	48
4.17.6	Immunpräzipitation .....	49
4.17.7	<i>In vitro</i> Transkription/Translation .....	49
4.17.8	<i>In vitro</i> Kinasierung von Proteinen.....	50
4.17.9	Autoradiographie radioaktiv markierter Protein.....	50
4.17.10	Proteinfraktionierung durch FPLC .....	51

4.17.11	Probenvorbereitung für die zweidimensionale Phosphopeptidanalyse.....	51
4.17.12	Zweidimensionale Phosphopeptidanalyse .....	52
<b>4.18</b>	<b>Computerprogramme .....</b>	<b>53</b>
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>5.1</b>	<b>Identifizierung von Interaktionspartnern der Proteinkinase CK1<math>\delta</math> im Yeast Two-Hybrid System .....</b>	<b>54</b>
5.1.1	Einführung in die Funktionsweise des Yeast-Two-Hybrid Systems .....	54
5.1.2	Isolierung von Interaktionspartnern von CK1 $\delta$ im Yeast Two-Hybrid System .....	55
5.1.3	Identifizierung der unbekannt Interaktionspartner von CK1 $\delta$ rev durch Sequenzierung der cDNAs der pACT2-Vektoren .....	57
5.1.3.1	Identifizierung der leichten Kette LC2 des humanen Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP1A als Interaktionspartner von CK1 $\delta$ rev .....	57
5.1.3.2	Identifizierung von murinem Snapin als Interaktionspartner von CK1 $\delta$ rev .....	61
5.1.3.3	Identifizierung von murinem RanBPM als Interaktionspartner von CK1 $\delta$ rev ..	62
5.1.4	Rekonstruktion der Interaktion von CK1 $\delta$ rev und CK1 $\delta$ wt mit den Proteinen LC2-F, Snapin und RanBPM .....	66
5.1.5	Nachweis der Spezifität der Interaktion der CK1 Isoform CK1 $\delta$ mit den Proteinen LC2-F, Snapin und RanBPM .....	67
<b>5.2</b>	<b>Charakterisierung der Wechselwirkung von CK1<math>\delta</math> mit den identifizierten Interaktionspartnern.....</b>	<b>67</b>
5.2.1	Amplifizierung der vollständigen, kodierenden cDNA-Sequenzen von LC2-F, Snapin und RanBPM55 und anschließende Klonierung der cDNAs in verschiedene Vektoren .....	67
5.2.2	Nachweis der Interaktion zwischen CK1 $\delta$ und LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 durch Koimmunpräzipitation.....	68
5.2.2.1	Analyse der Interaktion zwischen CK1 $\delta$ und LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 durch Koimmunpräzipitation aufgereinigter rekombinanter Proteine.....	69
5.2.2.2	Nachweis der Interaktion zwischen CK1 $\delta$ und LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 durch Koimmunpräzipitation aus zellulären Extrakten .....	69
5.2.3	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von LC2-F, Snapin und RanBPM55 durch CK1 $\delta$ ... ..	72
5.2.3.1	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von Teilbereichen von LC2-F, Snapin und RanBPM55 durch CK1 $\delta$ .....	74
5.2.3.2	Analyse des Phosphorylierungsmusters tryptischer Peptide von LC2-F, Snapin und RanBPM55 .....	77
5.2.4	Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$ , LC2-F, Snapin und RanBPM55 .....	79
5.2.4.1	Lokalisation von CK1 $\delta$ und Snapin in NRK, F111 und 3T3 Zellen .....	80

5.2.4.2	Lokalisation von CK1 $\delta$ und RanBPM55 in 3T3 und F111 Zellen .....	82
5.2.5	Kartierung des Bereichs der Interaktion zwischen CK1 $\delta$ und LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 auf CK1 $\delta$ .....	84
5.2.6	Kartierung der CK1 $\delta$ Bindungsdomänen von LC2-F, Snapin und RanBPM55 .....	86
<b>5.3</b>	<b>Charakterisierung des Einflusses von CK1<math>\delta</math> auf die Transformations-</b> <b>kompetenz des grossen Tumorantigens (T-Ag) von Simian Virus 40 (SV40)....</b>	<b>88</b>
5.3.1	Analyse der <i>in vitro</i> Phosphorylierung von T-Ag durch CK1 $\delta$ .....	89
5.3.2	Untersuchungen zur Reduktion der CK1 $\delta$ Kinaseaktivität im Rev2/SV-52 Zellsystem .....	89
5.3.2.1	Expressionstatus und subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$ in SV-52 und Rev2 Zellen .....	90
5.3.2.2	Reduktion der CK1 $\delta$ Aktivität in Rev2 Zellen .....	91
5.3.2.3	Identifizierung von Punktmutationen in der kodierenden Region von CK1 $\delta$ in Rev2 Zellen .....	94
5.3.2.4	Reduktion der Kinaseaktivität von rekombinanter mutierter CK1 $\delta$ aus Rev2 Zellen .....	95
5.3.3	Effekt der Überexpression von CK1 $\delta$ <sup>rev</sup> in SV-52 Zellen .....	95
5.3.3.1	Phänotypische Charakterisierung von CK1 $\delta$ <sup>rev</sup> überexprimierenden SV-52 Zellen .....	96
5.3.3.2	Reduktion der CK1 $\delta$ Kinaseaktivität in CK1 $\delta$ <sup>rev</sup> überexprimierenden SV-52 Zellen .....	98
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>100</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>120</b>
<b>Anhang .....</b>		
	Abkürzungen .....	136
	Danksagung .....	139
	Lebenslauf .....	140

## 1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Matchmaker 3 Yeast Two-Hybrid (YTH) Systems von Clontech die C-terminale Region der leichten Kette LC2 des humanen Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A (MAP1A), als LC2-F bezeichnet, das murine SNARE-assoziierte Protein Snapin und das murine Ran Binding Protein im MTOC (RanBPM) als neue, bisher nicht in der Literatur beschriebene Protein-Interaktionspartner von CK1 $\delta$  identifiziert und hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit CK1 $\delta$  charakterisiert. Die identifizierten Protein-Interaktionspartner interagierten im YTH System reproduzierbar mit der als „Köder“-Protein verwendeten CK1 $\delta$ rev, die eine reduzierte Kinaseaktivität besaß, sowie mit der Wildtyp-Kinase CK1 $\delta$ wt. LC2-F zeigte darüber hinaus eine Wechselwirkung mit CK1 $\epsilon$ , während Snapin und RanBPM im YTH System jeweils eine Interaktion mit CK1 $\epsilon$  und CK1 $\alpha$  aufwiesen.

Eine *in vivo* Assoziation von CK1 $\delta$  und LC2-F sowie der 55 kDa Variante RanBPM55 konnte durch die Koimmunpräzipitation der Proteine aus den Lysaten eukaryontischer Zellen nachgewiesen werden. Rekombinantes LC2-F, Snapin und RanBPM55 wurden *in vitro* von CK1 $\delta$  phosphoryliert. Die Lokalisation der Phosphorylierungsstellen erfolgte durch die *in vitro* Kinasierung von Fragmenten der Gesamtproteine sowie durch die Analyse des Phosphorylierungsmusters tryptischer Peptide. Die Interaktionsdomänen von den einzelnen Protein-Interaktionspartnern und von CK1 $\delta$  wurden durch Bindungsstudien im YTH System kartiert. Der Hauptanteil der Phosphorylierungsstellen von LC2-F war im N-terminalen Teilbereich zwischen den AS 2629-2683 lokalisiert, ein geringer Anteil zusätzlich zwischen den AS 2684-2753. Die Bindung von LC2-F an CK1 $\delta$  wurde über voneinander unabhängige Bindungsmotive zwischen den AS 2629-2753 im N-Terminus und zwischen den AS 2711-2805 im C-Terminus von LC2-F vermittelt. Für eine Interaktion von CK1 $\delta$  mit LC2-F waren die AS 76-103 in der Kinasedomäne und die AS 350-375 im C-Terminus von CK1 $\delta$  notwendig. Der Hauptanteil der phosphorylierten AS von Snapin wurde in der Region zwischen den AS 37 und 78 lokalisiert. Eine oder mehrere CK1 $\delta$  Interaktionsdomänen wurden zwischen den AS 37-136 von Snapin identifiziert. Für die Interaktion mit Snapin waren die AS 400-428 im C-Terminus von CK1 $\delta$  essentiell. Eine weitere Bindungsdomäne lag im N-Terminus von CK1 $\delta$  zwischen den AS 200-304. Bei LC2-F und Snapin überlappten damit die phosphorylierten Regionen mit den Bindungsdomänen dieser Proteine für CK1 $\delta$ . In den Fragmenten von RanBPM55 fand ein starker Phosphateinbau in der Region von AS 436-544 sowie ein geringer Phosphateinbau zwischen den AS 259-385 bzw. den AS 515-653 statt. Die Interaktion eines Fragments von RanBPM55 im YTH System korrelierte nur für die Region zwischen den AS 259-385 von RanBPM55 mit einer *in vitro* Phosphorylierung durch CK1 $\delta$ . Die Bindungsstudien im

YTH System liessen auf das Vorhandsein von zwei unabhängigen Interaktionsdomänen für RanBPM55 jeweils in der Kinasedomäne und im C-Terminus von CK1 $\delta$  schliessen.

Snapin kolokalisierte in verschiedenen Zelllinien im perinukleären Bereich partiell mit CK1 $\delta$ , dem Golgi-Apparat und dem Trans-Golgi-Netzwerk. RanBPM wurde im Zellkern in distinkten Foci variabler Grösse detektiert, die im Interchromatin-Bereich lagen.

Die Identifikation der neuen Interaktionspartner LC2, Snapin und RanBPM verbindet CK1 $\delta$  enger mit einer funktionellen Rolle in der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik sowie von Vesikel- und Membrantransportprozessen und stellt eine Verknüpfung von CK1 $\delta$  mit dem in verschiedene physiologische Prozesse involvierten RanBPM her.

Das virale Tumorantigen SV40 T-Ag wurde in dieser Arbeit als weiteres Substrat von CK1 $\delta$  charakterisiert. T-Ag wurde *in vitro* durch eine C-terminal trunke CK1 $\delta$  phosphoryliert. Der Einfluss von CK1 $\delta$  auf die Transformationskompetenz und den Phosphorylierungsstatus von T-Ag wurde im SV-52/Rev2 Zellsystem untersucht. SV-52 Zellen sind SV40 transformierte Rattenembryofibroblasten mit einem maximal transformierten Phänotyp und einem transformationskompetentem T-Ag. Die zelluläre Revertante Rev2 weist einen minimal transformierten Phänotyp und ein transformationsdefektes, unterphosphoryliertes T-Ag auf. Die subzelluläre Lokalisation und die exprimierte Proteinmenge von CK1 $\delta$  waren in SV-52 und Rev2 Zellen vergleichbar. Dagegen war die Kinaseaktivität von CK1 $\delta$  in Rev2 Zellen um 60% reduziert im Vergleich zu der Kinaseaktivität SV-52 Zellen. Die aus Rev2 Zellen isolierte CK1 $\delta$ rev wies sechs Punktmutationen in der kodierenden Sequenz auf. Aufgrund dieser Mutationen besass die aufgereinigte rekombinante GST-CK1 $\delta$ rev eine reduzierte *in vitro* Kinaseaktivität im Vergleich zu GST-CK1 $\delta$ wt. Durch die stabile Überexpression der mutierten CK1 $\delta$ rev in SV-52 Zellen wurde ein dominant-negativer Effekt von CK1 $\delta$ rev detektiert, der sich in einer partiellen Reversion des Phänotyps der stabil transfizierten Zellen und einer Reduktion der CK1 $\delta$  Kinaseaktivität äusserte. Daher scheint CK1 $\delta$  massgeblich an der Ausbildung des maximal transformierten Phänotyps in SV-52 Zellen beteiligt zu sein, wahrscheinlich über die Regulation des Phosphorylierungsstatus von T-Ag.

## 2. Einleitung

In einem vielzelligen Organismus ist jede Zelle einer Vielzahl von Umweltreizen und Signalen ausgesetzt. Ein System von Proteinen, zu denen Zelloberflächen-Rezeptoren und intrazelluläre Rezeptorproteine, Proteinkinasen und –phosphatasen, GTP-bindende Proteine sowie eine Vielzahl mit diesen Signalüberträgern wechselwirkende intrazelluläre Proteine gehören, gewährleistet die Wahrnehmung und Verarbeitung dieser Signale; ein Prozess, der in seiner Gesamtheit als Signaltransduktion bezeichnet wird.

Proteinkinasen und Proteinphosphatasen ermöglichen über die reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen eine schnelle intrazelluläre Signaltransduktion durch die kurzfristige Modulation der Aktivität, Stabilität und subzellulären Lokalisation von Proteinen sowie deren Fähigkeit, mit anderen Proteinen zu interagieren. Ungefähr 30% aller humanen intrazellulären Proteine sind phosphoryliert, und von den 30000 bis 40000 Genen des menschlichen Genoms entfallen 518 auf Proteinkinasen oder Gene putativer Kinasen. Während 90 von diesen Kinasen Tyrosinkinasen sind, gehört die Mehrheit der zellulären Proteinkinasen zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen (Lander *et al.*, 2001; Manning *et al.*, 2002).

Die Untergruppe der Casein Kinasen (CK) gehörte zu den ersten Proteinkinasen, die in der Literatur beschrieben wurden (Matsumura & Takeda, 1972; Lerch *et al.*, 1975; Hathaway & Traugh, 1979). Die Casein Kinasen 1 (CK1) und Casein Kinasen 2 (CK2) sind zwei Familien von heterologen Serin/Threonin-Kinasen, die das Phosphoprotein Casein als *in vitro* Substrat verwenden. Casein zählt nicht zu den physiologischen Substraten dieser Kinasen, sondern spiegelt die allgemeine Bevorzugung saurer oder bereits phosphorylierter Substrate in dieser Untergruppe wider, die aufgrund dieser Selektivität zusammen mit der Glykogen Synthase Kinase und der Golgi Casein Kinase die kleine Familie der sogenannten azidotropen Proteinkinasen bildet (zur Übersicht: Tuazon & Traugh, 1991). Die Casein Kinasen 2 werden aufgrund grosser Homologien in der Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne darüber hinaus in die Gruppe der CMGC (Cdk, MAPK, GSK3, CK2) Proteinkinasen eingeordnet. Die Casein Kinasen 1 sind dagegen eine eigenständige phylogenetische Familie von hochkonservierten, monomeren, Second Messenger-unabhängigen Kinasen, die ATP, nicht aber GTP, als Kofaktor für den Phosphattransfer verwenden.

Mitglieder der Casein Kinasen 1 konnten bisher in einer Vielzahl von Organismen einschliesslich *Xenopus laevis* (Pulgar *et al.*, 1996), *Caenorhabditis elegans* (Peters *et al.*, 1999; Sakanaka *et al.*, 1999), *Paramecium tetraurelia* (Walczak *et al.*, 1993), *Dyctiostelium discoideum* (Ospina & Fernandez-Renart, 1990), einigen Pflanzen (Klimczak & Cashmore, 1993; Liu *et al.*, 2003) sowie diverser Spezies von Mammalia nachgewiesen werden (zur Übersicht: Tuazon & Traugh, 1991).

Innerhalb der Familie der CK1 wurden in der Literatur bei Mammalia die sieben Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  beschrieben (Rowles *et al.*, 1991; Graves *et al.*, 1993; Zhai *et al.*, 1995; Fish *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996). Durch alternatives Spleissen werden 4 Varianten der Isoform CK1 $\alpha$  generiert (Rowles *et al.*, 1991; Gross *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996), und auch für die Isoform CK1 $\gamma_3$  wurde die Existenz alternativer Spleissprodukte postuliert (Zhai *et al.*, 1995). Des Weiteren existieren zahlreiche Transskriptvarianten von den Kinasen CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$ . Aufgrund genetischer Analysen konnten in der Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae* die homologen Proteinkinasen Hrr25, Yck1, Yck2 und Yck3 und der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* die homologen Kinasen Cki1, Cki2, Cki3, Hhp1 und Hhp2 aus der CK1 Familie identifiziert werden (Hoekstra *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1992; DeMaggio *et al.*, 1992; Dhillon & Hoekstra, 1994; Kearney *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde in *Drosophila melanogaster* mit DMCK1 eine zu CK1 $\alpha$  homologe Proteinkinase beschrieben (Santos *et al.*, 1996). Die Phylogenie der verschiedenen Isoformen ist in Abb. 1 dargestellt.

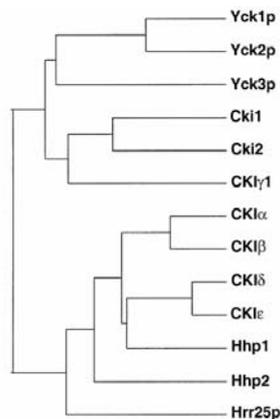


Abb. 1: **Phylogenetische Beziehungen der Casein Kinase 1 Isoformen aus Mammalia, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*.**

Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen der CK1 Familie als phylogenetischer Baum, in dem die Länge der Äste ein Mass für den Verwandtschaftsgrad der Kinasedomänen der einzelnen Isoformen ist (Gross & Anderson, 1998).

Die Aminosäuresequenzen innerhalb der katalytischen Domänen der einzelnen CK1 Isoformen sind zwischen 53% und 97% homolog, die Sequenzidentität zu den Kinasedomänen anderer Serin/Threonin-Kinasen liegt hingegen bei weniger als 25%. Bei weitem die engste Verwandtschaft

besteht zwischen den beiden Isoformen CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$ , die zu 97% homolog in der Kinasedomäne und zu 53% im C-Terminus sind. Mit CK1 $\alpha$  ist CK1 $\delta$  zu 76% identisch, und auch zu Hrr25 und Hhp1 aus der Hefe weist CK1 $\delta$  noch 66% bzw. 78% Homologie in der Kinasedomäne auf (Graves *et al.*, 1993; Zhai *et al.*, 1995).

Alle CK1 Isoformen besitzen eine zentral gelegene, in ihrer Aminosäuresequenz konservierte Kinasedomäne, die von einem kurzen variablen N-Terminus und einem längeren variablen C-Terminus flankiert wird (Abb. 2). Der N-Terminus umfasst 9-76 Aminosäuren, aber vor allem die unterschiedliche Länge des C-Terminus, die von 24 Aminosäuren bis hin zu über 200 Aminosäuren variiert (Cegielska *et al.*, 1998), führt dazu, dass das Molekulargewicht der verschiedenen Isoformen bei Mammalia zwischen 37 kDa (CK1 $\alpha$ ) und 51 kDa (CK1 $\gamma$ 3) liegt. Die CK1 Isoformen der Hefe sind mit Molekulargewichten zwischen 42 kDa (Hhp1 und Hhp2) und 62 kDa (Yck1 und Yck2) insgesamt etwas grösser als ihre Homologe in Mammalia.



Abb. 2: **Schematische Darstellung der Casein Kinase 1 Isoformen aus Mammalia.** Die Kinasedomäne ist jeweils rot, der N-Terminus grün und der C-Terminus blau dargestellt (nach: Gross & Anderson, 1998).

Die funktionellen Domänen der CK1 Isoformen sind in Abb. 3 am Beispiel der Isoform  $\delta$  aus *Rattus norvegicus* schematisch dargestellt. CK1 $\delta$  ist 428 Aminosäuren lang und besitzt ein kalkulierte Molekulargewicht von 49 kDa (Graves *et al.*, 1993).

In der Kinasedomäne von CK1 $\delta$  befindet sich neben der ATP-Bindungsstelle, die essentiell für die Katalyse der Phosphattransferreaktion ist, ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS), das homolog zum Motiv Thr-Lys-Lys/Arg-Gln-Lys-Tyr des grossen Tumor-Antigens (T-Ag) des Simian Virus 40 (SV40) ist. Dieses Motiv vermittelt möglicherweise den Kerntransport von T-Ag sowie des Histon 2B Proteins aus der Hefe (Moreland *et al.*, 1987; Silver *et al.*, 1989), scheint bei CK1 allerdings nicht ausreichend für einen Kernimport zu sein, da für CK1 $\alpha$  gezeigt wurde, dass nur Spleissformen mit einem L-Exon, das ein zusätzliches NLS aufweist, im Kern lokalisieren (Fu

*et al.*, 2001). Darüber hinaus enthält die Kinasedomäne in der sogenannten Kinesin-homologen Domäne (KHD) ein Sequenzmotiv, das in der Kopfreion von Motorproteinen der Kinesin-Familie die Interaktion mit den Mikrotubuli vermittelt (Roof *et al.*, 1992). Strukturell entspricht die katalytische Domäne von CK1 der von anderen eukaryontischen Proteinkinasen. Ein grundlegender Unterschied ist das Fehlen des konservierten Tripeptids Ala-Pro-Glu (APE-Motiv) in der Subdomäne VIII und des invarianten Arg in Subdomäne XI (Wang *et al.*, 1992), das mit dem Glu des APE-Motivs normalerweise über eine ionische Wechselwirkung die Struktur der Kinasedomäne stabilisiert (Hanks *et al.*, 1988; Knighton *et al.*, 1991).

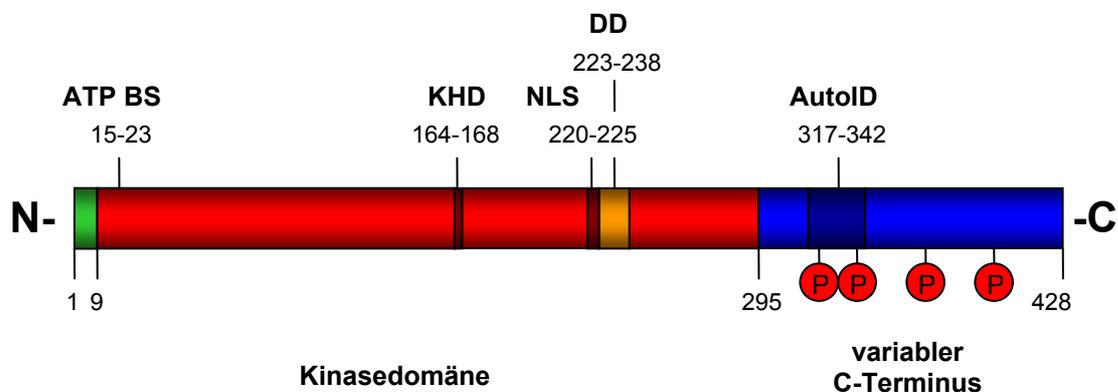


Abb. 3: **Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Casein Kinase 1δ (*Rattus norvegicus*).**

Die Nummerierung im oberen und unteren Teil der Abbildung gibt die Positionen von Aminosäureresten an. Der N-Terminus ist grün dargestellt; Bereiche der Kinasedomäne sind rot und Bereiche des C-Terminus blau dargestellt. ATP BS: ATP-Bindungsstelle; KHD: Kinesin-homologe Domäne; NLS: putatives Kernlokalisationssignal; AutoID: Autoinhibitorische Domäne; P: potentielle Autophosphorylierungsstellen

Die CK1 weisen auf der Ebene der Primärstruktur mit weniger als 25% Identität keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen Proteinkinase-Familien auf. Dennoch ist die Tertiärstruktur ihrer Kinasedomäne, die durch Röntgenstrukturanalyse der C-terminal trunkierten CK1 Isoformen CK1δ und Cki1 aufgeklärt werden konnte (Carmel *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1995; Longenecker *et al.*, 1996; Longenecker *et al.*, 1998), der dreidimensionalen Struktur der Kinasedomäne anderer Serin/Threonin-Kinasen sehr ähnlich. Die Kinasedomäne besitzt im Allgemeinen eine zweilappige Struktur, bestehend aus einer kleineren N-terminalen  $\beta$ -Domäne und einer grossen C-terminal gelegenen  $\alpha$ -Domäne, die in Abb. 4 dargestellt sind.

Die  $\beta$ -Domäne enthält 5 antiparallele, zueinander verdrehte  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta$ 1- $\beta$ 5) und eine  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ A) sowie ein Glycin-reiches Sequenzmotiv Gly-Glu-Gly-Ser-Phe-Gly, das eine  $\beta$ 1-Turn- $\beta$ 2 ATP-Bindungsschleife über der in dieser Domäne enthaltenen Nukleotid-Bindungsstelle bildet. In

der  $\alpha$ -Domäne befinden sich als Strukturelemente der Substratbindungsregion 4 lange antiparallel verlaufende  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ C,  $\alpha$ E,  $\alpha$ H,  $\alpha$ I) und eine rechtwinklig zu diesen angeordnete fünfte  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ F). Das katalytische Zentrum wird durch die  $\alpha$ -Domäne und die  $\beta$ -Domäne sowie eine diese verbindende kurze Scharnierregion gebildet, die die Flexibilität der beiden Domänen gewährleistet. An der Substratbindung scheinen ausserdem zwei Loops beteiligt zu sein, von denen einer das putative Kernlokalisierungssignal und der zweite die Kinesin-homologe Sequenz enthält (Xu *et al.*, 1995; Longenecker *et al.*, 1996).

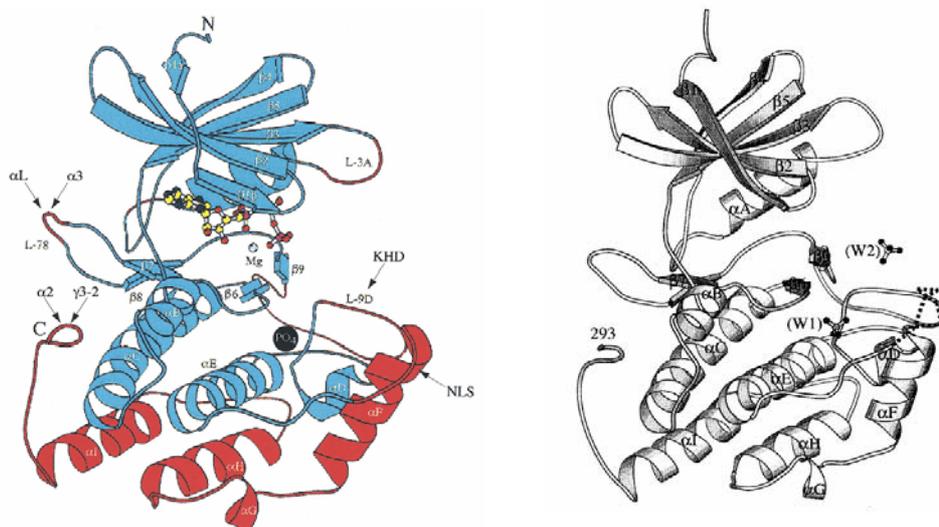


Abb. 4: **Dreidimensionale Struktur der C-terminal trunkierten Kinasen Cki1 $\Delta$ 298 aus *Schizosaccharomyces pombe* und CK1 $\delta$   $\Delta$ 317 aus *Rattus norvegicus*.**

A: Tertiärstruktur von Cki1 $\Delta$ 298 mit gebundenem MgATP.

B: Tertiärstruktur von CK1 $\delta$   $\Delta$ 317. (Xu *et al.*, 1995; Longenecker *et al.*, 1996).

Der hohe Gehalt an Arg und Lys in den Kinasedomänen von CK1 Isoformen, konzentriert in der Substratbindungsregion, bedingt den ungewöhnlich hohen isoelektrischen Punkt dieser Proteinkinase-Familie (Xu *et al.*, 1995). Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse der beiden C-terminal trunkierten CK1 Isoformen konnten zwei Anionenbindungsstellen identifiziert werden. Diese können eine Interaktion mit den sauren oder phosphorylierten Aminosäureresten von CK1 Substraten ermöglichen, aber auch die Bindung von autophosphorylierten Bereichen des C-Terminus, die als Pseudosubstrate möglicherweise das katalytische Zentrum blockieren können (Xu *et al.*, 1995; Longenecker *et al.*, 1998).

Es gibt eine Reihe von kompetitiven Inhibitoren und nicht-kompetitiven Inhibitoren für die Kinasen der CK1-Familie. Die Wirkungsweise kompetitiver Inhibitoren wie CKI-7 oder D4476 (Chijiwa *et al.*, 1989; Rena *et al.*, 2004), die mit ATP in Konkurrenz um seine Bindungsstelle treten, konnte aus Analysen der Kristallstruktur des bei einer  $IC_{50}$  von  $1\mu\text{M}$  für die Isoformen CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  spezifischen Inhibitors IC261 (3-[(2,4,6-Trimethoxyphenyl)methylindonyl]indolin-2-on) im Komplex mit der C-terminal trunkierten CK1 $\delta$  abgeleitet werden (Mashhoon *et al.*, 2000). IC261 bindet in der ATP-Bindungsstelle, und durch die damit einhergehende Konformationsänderung der Kinase wird das Molekül in einer Konformation zwischen der nicht-Ligand-gebundenen und der Ligand-gebundenen stabilisiert, so dass die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes verringert wird (Mashhoon *et al.*, 2000).

Die Konzentration positiver Ladung um die Substratbindungsstelle der Kinasedomäne liefert eine Erklärung für die Selektivität für saure Substrate in der azidotropen Proteinkinase-Familie CK1 (Longenecker *et al.*, 1996). Das Motiv S/T(P)-X<sub>1-2</sub>-S/T stellt die kanonische Konsensussequenz für CK1 dar, in dem S/T(P) für einen phosphorylierten Serin- oder Threoninrest und X für eine beliebige Aminosäure steht. Diese Konsensussequenz konnte durch Studien mit Peptidsubstraten bestimmt werden, deren Aminosäure-Abfolge aus der Sequenz physiologischer Substrate von CK1 wie der Glykogen-Synthase und SV40 T-Ag (Flotow & Roach, 1991; Umphress *et al.*, 1992) oder charakteristischer nicht-physiologischer Substrate wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein (Meggio *et al.*, 1991) abgeleitet wurde. Eine Ansammlung negativ geladener Aminosäurereste um die -3 Position in Bezug auf den zu phosphorylierenden Aminosäurerest, wie sie zum Beispiel der Inhibitor-2 der Protein-Phosphatase 1 besitzt (Marin *et al.*, 1994), kann das Phosphoserin oder Phosphothreonin in diesem Motiv ersetzen (Agostinis *et al.*, 1989; Flotow & Roach, 1991; Graves *et al.*, 1993). Die aus Studien mit Peptidsubstraten abgeleitete optimale Konsensussequenz EFDTGSIIFF von CK1 $\delta$  weist eine solche Ansammlung negativer Ladung in Kombination mit einem Isoleucin an der +1 Position auf (Songyang *et al.*, 1996). Die *in vivo* phosphorylierten CK1 Substrate  $\beta$ -Catenin und NF-AT besitzen mit dem SLS-Motiv ein nicht-kanonisches Konsensus-Motiv, das durch eine Anhäufung saurer Aminosäurereste C-terminal zur Phosphoakzeptor-Stelle gekennzeichnet ist (Marin *et al.*, 2003). Physiologische Substrate von CK1 wie SV40 T-Ag oder der Inhibitor-2 von PP1, in denen durch CK1 phosphorylierte Motive keine kanonische Konsensussequenz aufweisen, verdeutlichen, dass auch die lokale Struktur der Phosphoakzeptor-Stelle sowie die dreidimensionale Struktur des Substrates die Substratspezifität beeinflussen (Cegielska *et al.*, 1994; Marin *et al.*, 2003).

Seit der ersten Charakterisierung der Casein Kinase 1 Familie wurde eine grosse Anzahl von intrazellulären Proteinen als *in vitro* Substrate von CK1 beschrieben. Zu diesen Substraten, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, gehören Strukturproteine des Zytoskeletts sowie an diese bindende Proteine, an Zell-Zell-Kontakten beteiligte Adhäsionsfaktoren, Rezeptoren, Membrantransporter,

<b>Zytoskelett-Proteine und interagierende Proteine</b>	
Myosin, Troponin	(Singh <i>et al.</i> , 1982)
Ankyrin	(Lu <i>et al.</i> , 1985)
Spectrin3	(Eder <i>et al.</i> , 1986)
Filamin, Vinculin	(Nakajo <i>et al.</i> , 1987)
N-CAM	(Mackie <i>et al.</i> , 1989)
Neurofilamentproteine	(Floyd <i>et al.</i> , 1991; Link <i>et al.</i> , 1993)
Flagellares Dynein	(Yang & Sale, 2000)
$\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin, MAP4, Stathmin	(Behrend <i>et al.</i> , 2000a)
Tau	(Singh <i>et al.</i> , 1995; Behrend <i>et al.</i> , 2000a)
Keratin 17, Desmoglein, Annexin II	(Gao <i>et al.</i> , 2000)
<b>Rezeptoren</b>	
$\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors	(Rapuano & Rosen, 1991)
TNF $\alpha$ -Rezeptor	(Darnay <i>et al.</i> , 1997)
Muskarin M3-Rezeptor	(Tobin <i>et al.</i> , 1997)
Ste2p ( $\alpha$ -Faktor-Rezeptor)	(Hicke <i>et al.</i> , 1998)
Ste3p ( $\alpha$ -Faktor-Rezeptor)	(Feng & Davis, 2000)
PDGF-Rezeptor	(Bioukar <i>et al.</i> , 1999)
<b>Membrantransporter</b>	
Erythrocyten-Anionentransporter (Bande 3 Protein)	(Soong <i>et al.</i> , 1987)
Uracil-Permease ( <i>S. cerevisiae</i> )	(Marchal <i>et al.</i> , 2002)
<b>DNA-assozierte Faktoren</b>	
Nicht-Histon Chromatin-Proteine	(Christmann & Dahmus, 1981)
<b>ribosomale Proteine</b>	
ribosomale Proteine (15 kDa, 20 kDa, 35 kDa)	(Wojda <i>et al.</i> , 1999)
L4, L8, L13	(Gao <i>et al.</i> , 2000)
<b>Transkriptions- und Spleissfaktoren</b>	
RNA-Polymerase I, II	(Dahmus, 1981)
p53	(Milne <i>et al.</i> , 1992)
CREM (cAMP Response Element Modulator)	(de Groot <i>et al.</i> , 1993)
Swi6	(Ho <i>et al.</i> , 1997)
NF-AT	(Zhu <i>et al.</i> , 1998)
SR-Proteine	(Gross <i>et al.</i> , 1999)
Tcf3	(Lee <i>et al.</i> , 2001)
BMAL1, CRY	(Eide <i>et al.</i> , 2002)
$\beta$ -Catenin	(Liu <i>et al.</i> , 2002b; Sakanaka, 2002)
Armadillo	(Yanagawa <i>et al.</i> , 2002)
<b>Faktoren der Translationsmaschinerie</b>	
Initiationsfaktor 4B, 4E, 5	(Haas & Hagedorn, 1991)
<b>Virale Proteine</b>	
SV40 T-Ag	(Grasser <i>et al.</i> , 1988; Umphress <i>et al.</i> , 1992)
<b>Kinasen und Phosphatasen</b>	
cdk5	(Sharma <i>et al.</i> , 1999; Liu <i>et al.</i> , 2002b)
PKC (Proteinkinase C)	(Okano <i>et al.</i> , 2004)
<b>Inhibitoren und Modulatoren</b>	
Inhibitor 2 von Proteinphosphatase 1	(Agostinis <i>et al.</i> , 1992; Marin <i>et al.</i> , 1994)
DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein)	(Desdouits <i>et al.</i> , 1995)
I $\kappa$ B $\alpha$	(Lin <i>et al.</i> , 1996)
Dishevelled	(Peters <i>et al.</i> , 1999)
14-3-3 Proteine	(Dubois <i>et al.</i> , 1997)
mPER	(Vielhaber <i>et al.</i> , 2000)
APC	(Rubinfeld <i>et al.</i> , 2001)
Bid	(Desagher <i>et al.</i> , 2001)
<b>Enzyme des Zellmetabolismus</b>	
Acetyl-CoA Carboxylase	(Tipper <i>et al.</i> , 1983)
Glykogen-Synthase	(Poulter <i>et al.</i> , 1988; Kuret <i>et al.</i> , 1985)
<b>Vesikel-assozierte Proteine</b>	
SV2 (Syn. Vesikel assoziiertes Protein 2)	(Gross <i>et al.</i> , 1995)
$\beta$ 3A-, $\beta$ 3B Untereinheit des AP-3 Komplexes	(Faundez & Kelly, 2000)
<b>Faktoren der Alzheimer Erkrankung</b>	
Presinilin-2	(Walter <i>et al.</i> , 1998)
$\beta$ -Sekretase	(Walter <i>et al.</i> , 2001)

Tabelle 1: Auflistung der in der Literatur beschriebenen *in vitro* und *in vivo* Substrate der Casein Kinase 1 Familie.

DNA-assoziierte sowie ribosomale Proteine, Transkriptions-, Translations- und Spleissfaktoren, virale Proteine, Kinasen und Phosphatasen, zelluläre Inhibitoren und Modulatoren, Enzyme des Zellmetabolismus, Vesikel-assoziierte Proteine sowie Faktoren, die mit der Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Die grosse Anzahl von *in vitro* und *in vivo* Substraten positioniert die Mitglieder der CK1 Familie putativ in diversen Signaltransduktionsketten und zellulären Prozessen. Da die Mehrheit der aufgeführten Proteine *in vitro* Substrate darstellt, ist die physiologische Relevanz der Phosphorylierung der meisten Substrate noch nicht bestätigt und charakterisiert.

*In vitro* Studien mit Peptidsubstraten und verschiedenen CK1 Isoformen haben keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der bevorzugten Konsensussequenz zwischen den einzelnen Isoformen aufgezeigt (Pulgar *et al.*, 1999). Die Variabilität in der Funktion und Substrat-Selektivität einzelner Mitglieder dieser im Hinblick auf ihre subzelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung ubiquitären Kinase-Familie muss daher durch die Regulation der Expression und Aktivität der Isoformen, der subzellulären Verteilung der Kinasen und ihrer Substrate sowie der Verfügbarkeit von Bindungs- und Phosphorylierungsstellen bestimmt werden. Die Casein Kinasen 1 sind ubiquitäre Proteinkinasen, die in allen bisher untersuchten Organen bei Mammalia nachgewiesen wurden (Nakajo *et al.*, 1986; Graves *et al.*, 1993; Zhai *et al.*, 1995; Fish *et al.*, 1995; Rivers *et al.*, 1998). Studien zur Organ-Verteilung haben allerdings Unterschiede in der Aktivität und dem Expressionsgrad einzelner Isoformen aufgezeigt. Im Allgemeinen ist die CK1 Aktivität im Hoden, dem einzigen Organ, in dem bisher alle bekannten CK1 Isoformen detektiert werden konnten (Zhai *et al.*, 1995), sehr hoch im Vergleich zu anderen Organen (Nakajo *et al.*, 1986). Für die CK1 Isoform CK1 $\delta$  wurde ein Maximum der Aktivität in der Milz beschrieben (Maritzen *et al.*, 2003). Ein ubiquitäres Vorkommen ist auch hinsichtlich der subzellulären Lokalisation zu beobachten. CK1 Isoformen werden in nukleären sowie zytoplasmatischen Kompartimenten detektiert, und sie liegen im Zytoplasma sowohl löslich als auch mit dem Zytoskelett, mit Vesikeln oder der Plasmamembran assoziiert vor (Gross & Anderson, 1998).

Casein Kinasen 1 wurden als konstitutiv aktive Enzyme beschrieben, die aus verschiedenen Organismen und Zelllinien, aber auch als rekombinante Proteine aus *E. coli* oder Baculovirus-Expressionssystemen immer in aktivem Zustand isoliert werden können (Tuazon & Traugh, 1991). Ungeachtet dieser Tatsache konnte eine Anzahl von Regulationsmechanismen identifiziert werden, die *in vitro*, aber auch *in vivo* die Aktivität von CK1 beeinflussen. Nach direkter Stimulation von Zellen durch Hormone wie Insulin (Cobb & Rosen, 1983) oder nach viraler Transformation (Elias *et al.*, 1981) wird zum Beispiel eine Steigerung der Aktivität von CK1 beobachtet, und die Behandlung von Zellen mit Topoisomerase-Inhibitoren löst eine Erhöhung des Gehaltes an CK1 $\delta$  mRNA und Protein aus (Knippschild *et al.*, 1997). Die Aktivität der membranassoziierten Subpopulation von CK1 $\alpha$  in Erythrozyten und neuronalen Zellen wird durch geringe Unterschiede im

intrinsischen Gehalt von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in der Membran reguliert, das sich inhibitorisch auf CK1 $\alpha$  auswirkt (Bazenet *et al.*, 1990; Brockman & Anderson, 1991; Gross *et al.*, 1995).

Die Regulation der CK1 Aktivität durch posttranslationale Modifikation wird in erster Linie durch Phosphorylierung vermittelt. CK1 Isoformen werden in der Regel als aktive, aber phosphorylierte Kinasen aufgereinigt, deren *in vitro* Dephosphorylierung durch Protein-Phosphatase 1 oder 2 eine kurzfristige Steigerung der Aktivität bewirkt, die nach Inhibition der Phosphatasen durch die Autophosphorylierung des C-Terminus der Kinasen wieder aufgehoben wird (Graves & Roach, 1995; Cegielska *et al.*, 1998; Gietzen & Virshup, 1999). Sowohl die intramolekulare Autophosphorylierung, die für eine Reihe von CK1 Isoformen nachgewiesen wurde, als auch die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen scheinen *in vivo* Mechanismen zu sein, um die Aktivität der Kinasen zu regulieren. Nach der Aktivierung des Metabotropen Glutamatrezeptors wird die Phosphatase Calcineurin (PP2B) aktiviert, die durch Dephosphorylierung CK1 $\epsilon$  transient aktiviert (Liu *et al.*, 2002b). Auch in Zellkulturexperimenten mit Inhibitoren der Protein-Phosphatasen 1 und 2A konnte die Wirksamkeit dieses Regulationsmechanismus für CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  gezeigt werden (Rivers *et al.*, 1998). Die Autophosphorylierung lässt innerhalb des C-Terminus von CK1 $\delta$  Sequenzen der Art T(P)/S(P)-XXJ entstehen, in der J jede Aminosäure ausser Serin und Threonin darstellt (Graves & Roach, 1995). Derart phosphorylierte Bereiche binden möglicherweise als Pseudosubstrate an die Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum (Longenecker *et al.*, 1996); (Longenecker *et al.*, 1998) und bewirken durch das kompetitive Blockieren des aktiven Zentrums einen autoinhibitorischen Mechanismus, der auch für die Kinasen Twitchin, MLCK („Myosin Light Chain Kinase“) und die Calmodulin-abhängige Kinase I bereits aus der Kristallstrukturanalyse abgeleitet werden konnte (Knighton *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1994; Goldberg *et al.*, 1996). Diese Regulationsebene kann durch die proteolytische Abspaltung des C-Terminus (Carmel *et al.*, 1994; Cegielska *et al.*, 1998) ausser Kraft gesetzt werden. *In vitro* Versuche mit dem extrazellulären Proteoglycan Heparin, das zwar kein physiologischer Interaktionspartner von CK1 ist, aber die Aktivität der CK1 Isoform  $\delta$  gegenüber Peptidsubstraten steigern kann (Graves *et al.*, 1993), lassen darauf schliessen, dass darüber hinaus die Interaktion mit einem Aktivator eine Blockade des aktiven Zentrums aufheben könnte. Autophosphorylierung wurde bisher bei den CK1 Isoformen CK1 $\gamma$ 1-3 (Zhai *et al.*, 1995), CK1 $\delta$  (Graves *et al.*, 1993), CK1 $\epsilon$  (Fish *et al.*, 1995), Hrr25 (DeMaggio *et al.*, 1992) und Cki1 (Carmel *et al.*, 1994) nachgewiesen, wobei zumindest für CK1 $\epsilon$  auch im N-Terminus Autophosphorylierungsstellen beschrieben wurden (Gietzen & Virshup, 1999). Einen weiteren Mechanismus der Inhibition der Kinaseaktivität könnte der Verschluss des katalytischen Zentrums in der dimerisierten Form darstellen. Eine Homodimerisierung von Molekülen der CK1 Isoform  $\delta$  wurde aufgrund des Kristallisationsverhaltens in der Röntgenstrukturanalyse postuliert (Longenecker *et al.*, 1998).

Alternatives Spleissen des S- und L-Exons der CK1 Isoform  $\alpha$  beeinflusst die *in vitro* Kinaseaktivität und die Affinität der Spleissvarianten zu verschiedenen *in vitro* Substraten (Zhang *et al.*, 1996) sowie die Assoziation mit Neurofilament-Proteinen in Hühner-Neuronen und deren Phosphorylierung *in vivo* (Fu *et al.*, 1999). Da das L-Exon ein Kernimportsignal enthält, wird die subzelluläre Lokalisation der Spleissprodukte durch das Vorhandensein dieses Exons ebenfalls beeinflusst (Fu *et al.*, 2001).

Die Sequestrierung von CK1 an intrazellulären Strukturen oder Proteinkomplexen stellt ein Mittel dar, um die Kinasen mit einem lokalen Pool von Substraten oder Modulatoren zusammenzubringen. CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  werden über das Matrix-Protein CG-NAP/AKAP450 („Centrosomal and Golgi N-Kinase Anchoring Protein“) an das Zentrosom rekrutiert (Sillibourne *et al.*, 2002). Untersuchungen zum zirkadianen Rhythmus in Mäusen haben gezeigt, dass eine tageszeitlich regulierte nukleäre Lokalisation von CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  durch ihre Assoziation mit den unter zirkadianer Kontrolle exprimierten und nukleär akkumulierenden Proteinen mPER1, mPER2, mCRY1 und mCRY2 bedingt wird (Lee *et al.*, 2001). Der Kernimport von mPER1, mPER2, mCRY1 und mCRY2 führt zur Einleitung eines negativen Rückkopplungsmechanismus, der die Expression dieser Proteine über die Inaktivierung des konstitutiv DNA-gebundenen Transkriptionsfaktor-Komplexes CLOCK:BMAL1 inhibiert (Kume *et al.*, 1999). CK1 $\epsilon$  kann infolge der nukleären Akkumulation BMAL1 phosphorylieren, ein Vorgang, der sich stimulatorisch auf die Aktivität von BMAL1 auswirkt (Eide *et al.*, 2002) und dessen Koordination mit der beschriebenen Inhibition durch andere Komponenten des CK1 $\epsilon$ -PER-CRY-Komplexes noch zu klären ist. Ein weiteres Beispiel für die Positionierung von Substraten und CK1 Isoformen in Multiprotein-Komplexen stellt schliesslich die Bindung von CK1 $\epsilon$  an den Axin-APC- $\beta$ -Catenin-Komplex über das Matrix-Protein Axin und die Axin-abhängige Phosphorylierung von APC und  $\beta$ -Catenin durch CK1 $\epsilon$  dar (Rubinfeld *et al.*, 2001; Sakanaka, 2002).

Das Vorhandensein bzw. die Erreichbarkeit von Substraten kann auch auf der Ebene der subzellulären Kompartimentierung reguliert werden. Wie die YPT1 und Sec4 Proteine weisen auch die Kinasen Yck1 und Yck2 in ihren C-Termini ein Cys-Cys-Motiv auf, das die Isoprenylierung und die Verankerung dieser Proteine in der Plasmamembran bedingt (Wang *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1993). Die Lokalisation dieser Kinasen an der Plasmamembran ist essentiell für ihre biologische Funktion (Vancura *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996), aber auch ausreichend, verdeutlicht durch die Beobachtung, dass eine chimäre Kinase aus der Kinasedomäne der primär nukleären Kinase Hrr25 und dem C-Terminus von Yck2 den *yck1 $\Delta$ yck2 $\Delta$*  Phänotyp komplementieren konnte (Vancura *et al.*, 1994). Bei den höheren Eukaryonten ist vor allem die subzelluläre Verteilung der Isoform CK1 $\alpha$  gut untersucht, die sich Zellzyklus-abhängig verändert. Während sich CK1 $\alpha$  in Interphasezellen in Teilen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) und in Vesikeln befindet, lokalisiert sie in der Mitose am Spindelapparat und an den Zentrosomen.

Durch eine derartige zeitliche und räumliche Regulation kann eine Kinase spezifisch mit bestimmten Substraten in Kontakt gebracht werden. Zumindest bei der CK1 Isoform  $\delta$  wurde gezeigt, dass nicht nur das Vorhandensein der Kinasedomäne selbst, sondern auch die katalytische Aktivität essentiell für die normale subzelluläre Lokalisation der Kinase ist (Milne *et al.*, 2001).

Die Selektivität für Motive, die bereits phosphorylierte Aminosäuren enthalten, platziert CK1 in hierarchische Phosphorylierungskaskaden, in denen durch die Einführung von Phosphatgruppen in Substrate durch andere Kinasen ein „Priming“ für die nachfolgende Phosphorylierung durch CK1 stattfindet (Roach, 1991). Beispiele für synergistisch durch CK1 und andere Proteinkinasen phosphorylierte Substrate sind die Glykogen Synthase, die erst nach Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase über die CK1 Erkennungssequenz PLSRTL<sup>7</sup>(P)VSS<sup>10</sup>LPGL verfügt (Flotow & Roach, 1989; Nakielny *et al.*, 1991), N-CAM („Neuronal Cell Adhesion Molecule“) und die inhibitorische Untereinheit der Phosphatase 1 (Agostinis *et al.*, 1987; Mackie *et al.*, 1989) sowie das Tumorsuppressor-Protein p53, das erst nach „Priming“ an Ser 15 durch DNA-PK *in vitro* von CK1 an Thr 18 phosphoryliert werden kann (Dumaz *et al.*, 1999).

Die Casein Kinasen 1 sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, von der Regulation von Vesikel- und Proteintransport, Endo- und Exozytose, mitotischer und meiotischer Progression sowie Chromosomensegregation über Zytokinese, Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose, tageszeitlicher Rhythmik, DNA-Reparatur sowie DNA- und RNA-Metabolismus, Morphogenese und Sporulation bei Hefen, Kerntransport bis zur Modulation von Zytoskelettstrukturen, wobei ihre Funktionen in vielen Fällen noch nicht im Detail geklärt werden konnten.

Die Beteiligung von CK1 an intrazellulären Transportprozessen wurde vor allem in der Hefe untersucht. Für Hrr25 konnte als negativer Regulator eine Beteiligung an der Abschnürung von Vesikeln am Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Murakami *et al.*, 1999). Yck1 und Yck2 scheinen an der Exozytose des ABC („ATP Binding Cassette“-)Transporters Pdr5p (Decottignies *et al.*, 1999) und der Phosphorylierung und Endozytose der Uracil-Permease (Marchal *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2002), des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste2p (Hicke *et al.*, 1998) sowie des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste3p (Feng & Davis, 2000) beteiligt zu sein, an der die Untereinheit AP-3 des Clathrin-Adaptor (AP) Komplexes beteiligt ist (Panek *et al.*, 1997). In höheren Eukaryonten ist die Phosphorylierung dieses Faktors durch CK1 $\alpha$  erforderlich für die Bildung synaptischer Vesikel in neuronalen Zellen (Faundez & Kelly, 2000). CK1 $\alpha$  kolokalisiert in nicht-neuronalen Zellen mit Markerproteinen des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums (Gross *et al.*, 1995), während die CK1 Isoform  $\delta$  mit dem Trans-Golgi Netzwerk assoziiert und mit  $\gamma$ -Adaptin kolokalisiert, einen Clathrin-bindenden Markerprotein an post-Golgi-Strukturen, sowie mit Dynamin II, einem mit endozytotischen Clathrin-bedeckten Vesikeln interagierenden Protein (Behrend *et al.*, 2000a). Mutanten von Yck1 und Yck2 zeigen weiterhin Defekte bei der Sprossbildung und der Zytokinese, die durch CK1 $\gamma$ 1 und CK1 $\gamma$ 3 komplementiert werden können

(Robinson *et al.*, 1993). Yck3 in *S. cerevisiae* und auch Cki1 und Cki2 in *S. pombe* sind ebenfalls an Prozessen der Morphogenese, Zytokinese und Sprossbildung beteiligt (Wang *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996) und damit wie Yck1 und Yck2 für das vegetative Wachstum der Hefen unentbehrlich.

Die Deletion von Hrr25 lässt Hefezellen empfindlicher gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung werden, geht mit Defekten bei der Chromosomenverteilung in der Mitose und Meiose einher und lässt daher auf eine Beteiligung von Hrr25 an der DNA-Reparatur schließen (Hoekstra *et al.*, 1991). Hrr25 reguliert durch Phosphorylierung des Faktors Swi6 die Promotorbindung des Transkriptionsfaktors SBF („SCB binding factor“), der beteiligt ist an der transkriptionellen Aktivierung von DNA-Reparaturgenen und G1-spezifischen Cyclinen (Ho *et al.*, 1997). Hhp1 und Hhp2 sind in *S. pombe* ebenso in DNA-Reparaturprozesse involviert (Hoekstra *et al.*, 1994) wie das CK1 $\alpha$  Homolog DMCK1 in *Drosophila* (Santos *et al.*, 1996). Der Defekt der Hrr25 Mutanten kann von CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$ , nicht aber von CK1 $\alpha$  komplementiert werden (Fish *et al.*, 1995). Diese Untersuchungen in Hefen lassen auf eine mögliche Beteiligung von CK1 Isoformen an DNA-Reparaturvorgängen in höheren Eukaryonten schließen.

Die Isoform CK1 $\delta$  phosphoryliert wie auch CK1 $\epsilon$  das Tumorsuppressorprotein p53 N-terminal *in vitro* und *in vivo* und wird darüber nach genotoxischem Stress p53-abhängig transkriptionell aktiviert (Knippschild *et al.*, 1997). Nach Aktivierung durch DNA-Schädigung schaltet p53 als „Wächter des Genoms“ Signalwege an, die letztendlich die genomische Integrität der Zelle sicherstellen sollen (Lane, 1992). Die Phosphorylierung von p53 durch CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  erfolgt spezifisch am Übergang zwischen G2-Phase und Mitose (Knippschild *et al.*, 1997). p53 und CK1 $\delta$  assoziieren mit den Zentrosomen, und die Phosphorylierung von p53 am G2/M-Übergang spielt möglicherweise eine Rolle für die p53-vermittelte Erkennung von Spindelschäden. Die Behandlung von Zellen mit dem CK1 $\delta/\epsilon$  spezifischen Inhibitor IC261 führt zu zentrosomalen Veränderungen und zur Bildung multipolarer Spindeln. IC261 löst, ähnlich wie die Behandlung mit dem Spindel-inhibitor Nocodazol, nach einem transienten p53-unabhängigen Arrest der Zellen in der Mitose in Zellen mit intaktem p53 einen Arrest in einem G1-ähnlichen Zustand mit 4N DNA-Gehalt, vor p53-defizientem Hintergrund dagegen Endoreduplikation und Mikronukleation aus (Behrend *et al.*, 2000b). Es wird daher vermutet, dass CK1 $\delta$  an der Regulierung der Spindeldynamik und der Erkennung von Spindelschäden beteiligt sein könnte. Da Phosphorylierung ein wichtiges Instrument bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik darstellt, könnte der von IC261 hervorgerufene Effekt auf eine Reduktion der Phosphorylierung Spindel-assoziiierter Proteine zurückzuführen sein und auch die Chromosomensegregation beeinflussen.

Seit einiger Zeit werden Fehlregulationen von Casein Kinasen 1 mit verschiedenen neurodegenerativen Krankheitsbildern in Zusammenhang gebracht. Eine aberrante Akkumulation des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau wird bei zahlreichen sogenannten Tauopathien beobachtet,

zu denen die Alzheimer Erkrankung (AD) gehört. In den für diese Krankheit charakteristischen Proteinablagerungen im Gehirn der Patienten, den NTFs („neurofibrillary tangles“), kolokalisiert die hyperphosphorylierte Form des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau mit CK1 $\delta$  (Kuret *et al.*, 1997). In den Gehirnen von an AD Erkrankten konnte eine Überexpression von CK1 $\delta$  auf mRNA- und Proteinebene in den von Läsionen betroffenen Regionen nachgewiesen werden (Yasojima *et al.*, 2000). Die Hyperphosphorylierung von Tau, unter anderem durch CK1 $\delta$  (Singh *et al.*, 1995), induziert über eine Konformationsänderung des Proteins die Dissoziation von Tau von den Mikrotubuli und damit deren Destabilisierung (Li *et al.*, 2004). CK1 $\delta$  phosphoryliert neben Tau noch weitere mit AD assoziierte Proteine wie  $\beta$ -APP („beta-amyloid precursor protein“) und Presinilin-2 und kann in den bei zahlreichen anderen neurodegenerativen Erkrankungen auftretenden pathologischen Tau-Ablagerungen detektiert werden (Schwab *et al.*, 2000).

CK1 $\alpha$  und CK1 $\epsilon$  wurden als anti-apoptotische Faktoren in der durch den Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose in sogenannten Typ II-Zellen beschrieben, in denen die nach Bindung des Fas-Liganden gebildete Menge an „Death inducing signalling complex“ (DISC) nicht ausreichend ist, um genug Caspase 8 zu aktivieren und damit über die Aktivierung von Effektor-Caspasen direkt Apoptose herbeizuführen. Für die effektive Auslösung der Apoptose ist in Typ-II Zellen die Freisetzung apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien nötig, vermittelt über das pro-apoptotische Protein Bid der Bcl-2 Protein-Familie. Bid transloziert nach Spaltung durch Caspase 8 zum Mitochondrion, aus dem daraufhin pro-apoptotische Faktoren freigesetzt werden. Die proteolytische Prozessierung von Bid durch Caspase 8 kann allerdings nur erfolgen, wenn Bid nicht phosphoryliert ist. Neben CK2 sind sowohl CK1 $\alpha$  als auch CK1 $\epsilon$  *in vivo* mit Bid assoziiert und phosphorylieren Bid, wobei eine hierarchische Phosphorylierung durch die Kinasen angenommen wird (Desagher *et al.*, 2001). Die CK1 Isoformen  $\alpha$  und  $\epsilon$  sind nicht nur in apoptotische Signalwege involviert, sondern spielen auch eine Rolle bei der Regulation von Differenzierungsvorgängen. Die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade führt über die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und dessen Komplexierung mit den Transkriptionsfaktoren der Tcf3/Lef1-Familie zur Transaktivierung von Wnt-spezifischen Genen wie z. B. c-myc (McKay *et al.*, 2001a; McKay *et al.*, 2001b). Die Stabilität von  $\beta$ -Catenin wird durch einen Multiprotein-Komplex reguliert, in dem an das Matrix-Protein Axin unter anderem die Proteine  $\beta$ -Catenin, Adenomatous Polyposis Coli (APC), Dishevelled (Dsh), Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) und CK1 $\epsilon$  gebunden sind. Die konstitutive Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch GSK3 $\beta$  in Abwesenheit des Wnt-Liganden markiert  $\beta$ -Catenin für die Degradation am Proteasom. CK1 $\epsilon$  greift als positiver Regulator des Wnt-Weges auf unterschiedliche Art in den Wnt-Signalweg ein. Zum eine assoziiert es mit dem regulatorischen Multiprotein-Komplex und phosphoryliert Dsh, das dadurch aktiviert wird, GSK3 $\beta$  inhibiert und somit  $\beta$ -Catenin stabilisiert (Peters *et al.*, 1999). Des Weiteren aktiviert CK1 $\epsilon$  durch die Phosphorylierung von Tcf3 dessen Bindung an  $\beta$ -Catenin und induziert auf diese Weise die Bildung eines aktiven Transkriptionskomplexes

(Lee *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu scheint CK1 $\alpha$  als negativer Regulator des Wnt-Weges durch Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin die nachfolgende Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  zu ermöglichen (Liu *et al.*, 2002a), ein Prozess, der auch für CK1 $\epsilon$  beschrieben wurde und kontrovers diskutiert wird (Sakanaka, 2002). Die Wnt Signalkaskade hat eine kritische Bedeutung für die Regulation der Zellproliferation, denn Mutationen in Komponenten des Wnt-Weges werden in 85% aller Fälle des Kolonkarzinoms detektiert (Tucker & Pignatelli, 2000).

Für eine Beteiligung von CK1 an der Pathogenese verschiedener maligner Tumorerkrankungen spricht auch, dass in Nierenzellkarzinomen eine Steigerung der Expression von CK1 $\gamma$ 3 beobachtet wurde (Masuda *et al.*, 2003). Eine allgemein erhöhte Aktivität von CK1 konnte in verschiedenen humanen Leukämie-Zelllinien sowie in primären humanen myeloblastischen Zellen detektiert werden (Elias *et al.*, 1981). Die Tatsache, dass die Gene von humaner CK1 $\alpha$  und CK1 $\epsilon$  auf chromosomalen Loci gefunden werden, die mit chronischen lymphoproliferativen Erkrankungen und der Entwicklung von Meningiomen in Verbindung gebracht werden (in: Gross & Anderson, 1998), scheint einen Zusammenhang mit der Entstehung dieser Krankheitsbilder anzudeuten.

Die Beteiligung von CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  an Signaltransduktionsvorgängen im Bereich der zirkadianen Rhythmik, die die 24-stündige Periodizität vieler physiologischer Vorgänge vorgibt, wurde bereits erwähnt. Mutationen des Proteins Doubletime (DBT), eines CK1 $\epsilon$  Homologs, bewirken eine Veränderung in der Periodenlänge bei *Drosophila* (Price *et al.*, 1998), und Mutationen der CK1 $\epsilon$  Bindungsstelle des humanen PER2 Proteins führen bei Patienten mit FASPS („Family Advanced Sleep-Phase Syndrom“) zur einer Hypophosphorylierung von PER2, die mit einer Verkürzung der tageszeitlichen Periodik korreliert (Toh *et al.*, 2001).

CK1 Isoformen sind somit in eine Vielzahl physiologischer Vorgänge eingebunden, deren kontrollierter Ablauf essentiell für das Überleben und die Proliferation von Zellen ist. Die Störung dieser Prozesse durch die Fehlregulation von CK1 selbst oder von durch CK1 modulierten Faktoren kann mittlerweile mit einer Reihe von Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Die genaue Positionierung von CK1 in den beteiligten Signaltransduktionsketten und die Aufklärung der Funktionen von CK1 im Einzelnen ist bisher nur in wenigen Fällen schon erfolgt und noch Gegenstand der aktuellen Forschung.

### 3. Problemstellung

Die Aktivität und die subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  werden durch Wechselwirkung mit zellulären Proteinen und Strukturen moduliert. CK1 $\delta$  selbst beeinflusst durch die Phosphorylierung von Substraten deren Lokalisation, Aktivität und Funktion. Die Identifikation von zellulären Proteinen, die Modulatoren der Lokalisation oder der Aktivität von CK1 $\delta$  sind sowie Substrate von CK1 $\delta$  darstellen, kann Einblicke in Signaltransduktionswege ermöglichen, in die CK1 $\delta$  involviert ist.

Ziel dieser Arbeit war es daher, unter Verwendung des Matchmaker 3 YTH Systems von Clontech neue Protein-Interaktionspartner von CK1 $\delta$  zu identifizieren und deren Interaktion mit CK1 $\delta$  zu charakterisieren. Nach der Isolierung von cDNAs putativer Interaktionspartner von CK1 $\delta$  mit Hilfe des YTH Systems können die kodierten Proteine durch Sequenzierung identifiziert werden. Die cDNAs der Gesamtproteine sollten zur weitergehenden Charakterisierung der Interaktionen in verschiedene pro- und eukaryontische Expressionsvektoren integriert werden. Durch Ko-präzipitation der Interaktionspartner mit CK1 $\delta$  lassen sich die detektierten Interaktionen *in vitro* und *in vivo* verifizieren. Die Kartierung der für die Interaktion notwendigen Regionen sowohl von CK1 $\delta$  als auch von den wechselwirkenden Proteinen kann durch die Expression unterschiedlich stark verkürzter Fragmente von CK1 $\delta$  und den Interaktionspartnern im YTH System erfolgen. Die Frage, ob die jeweiligen Proteine Substrate von CK1 $\delta$  darstellen, lässt sich durch die *in vitro* Kinasierung von rekombinanten Formen der Interaktionspartner klären. Die Lokalisation der phosphorylierten Regionen der einzelnen Proteine sollte durch die *in vitro* Kinasierung der Teilfragmente und die Analyse des Phosphorylierungsmusters tryptischer Peptide dieser Fragmente und der Gesamtproteine erfolgen. Weiterhin lässt sich eine *in vivo* Interaktion von CK1 $\delta$  mit den einzelnen identifizierten Proteinen über eine mögliche Kolo-kalisation bei der Analyse der subzellulären Lokalisation bestätigen.

Nicht nur endogene zelluläre, sondern auch virale Proteine werden durch CK1 in ihrer Funktion moduliert. Es ist bekannt, dass die Initiation der SV40 DNA-Replikation über die Phosphorylierung von T-Ag durch die CK1 Isoform  $\alpha$  beeinflusst wird. Zunächst sollte überprüft werden, ob T-Ag ein *in vitro* Substrat von CK1 $\delta$  darstellt. Der Phosphorylierungsstatus von T-Ag beeinflusst auch die Transformation nicht-permissiver Zellen. Vor dem Hintergrund des SV-52/Rev2 Zellsystems, bestehend aus der parentalen, maximal transformierten Zelllinie SV-52 mit transformationskompetentem T-Ag und der revertanten, minimal transformierten Zelllinie Rev2 mit unterphosphoryliertem, transformationsdefektem T-Ag kann ein möglicher Einfluss von CK1 $\delta$  auf die Transformationskompetenz und den Phosphorylierungsstatus von T-Ag untersucht werden. Die Überprüfung des Expressionsstatus und der subzellulären Lokalisation von CK1 $\delta$  in den beiden

Zelllinien ermöglicht es, eine möglicherweise differentielle Expression oder Unterschiede in der zellulären Verteilung von CK1 $\delta$  in SV-52 und Rev2 Zellen zu detektieren. Über die Analyse der kodierenden Sequenz von CK1 $\delta$  in Rev2 Zellen kann festgestellt werden, ob die detektierte Reduktion der Aktivität von CK1 $\delta$  in Rev2 Zellen durch zelluläre Faktoren oder intrinsisch bedingt war. Nach der Identifikation von Punktmutationen in der Sequenz von CK1 $\delta$  in Rev2 Zellen sollte die mutante CK1 $\delta$ rev im Hinblick auf die *in vitro* Kinaseaktivität charakterisiert werden. Untersuchungen mit SV-52/Rev2 Fusionszellen haben einen dominant-negativen Charakter des Rev2 Phänotyps demonstriert (W. Deppert *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Durch die stabile Überexpression der mutanten CK1 $\delta$ rev in SV-52 Zellen kann untersucht werden, ob die mutante CK1 $\delta$ rev allein diesen dominant-negativen Effekt vermitteln kann. Die Charakterisierung der CK1 $\delta$ rev überexprimierenden Zellen im Hinblick auf die Ausbildung des maximal transformierten Phänotyps und die CK1 $\delta$  Kinaseaktivität lässt Rückschlüsse hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung der Reversion des Phänotyps in Rev2 Zellen durch die Aktivität von CK1 $\delta$ rev zu.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Geräte

ÄKTApurifier	Amersham Biosciences, Freiburg
Analysenwaage H54AR	Mettler, Giessen
Analysenwaage BA21009	Sartorius, Göttingen
Blotkammer Mini-Trans Blot	Biorad, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hamburg
Hoch-Volt Elektrophoresekammer für Dünnschichtchromatographie-Platten	T. Patschinsky, CCS GmbH, Hamburg
Epifluoreszenzmikroskop IX81	Olympus, Hamburg
Digitalkamera (Modell F-View) II	SIS, Hamburg
Epifluoreszenzmikroskop DM-RA	Leica, Heidelberg
Digitalkamera (Spot Modell 1.3.0)	Diagnostic Instruments, USA
Epifluoreszenzmikroskop IX70	Olympus, Hamburg
IMAGO-Kamera	Till Photonics, Gräfelfing
EttanLC	Amersham Biosciences, Freiburg
Fujix BAS-2000 Lesegerät	Fuji, USA
Geldokumentationsapparatur TFL-20M	Föbel, Frankreich
Geldokumentationsapparatur	Intas, Göttingen
Gelkammer für Agarosegele	Renner, Dannstadt
Gelkammer Modell 1068BD	Life Technologies, USA
Gelkammer Modell AE-6450	Atto, Japan
Geltrockner Model 583	Biorad, München
GenePulser XCell	Biorad, München
Heizblock Techne Dry-block DB2A	Thermo-Dux, Wertheim
Inkubator Modell 400	Memmert, Schwabach
Inkubator T 5042 E	Heraeus, Hamburg
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	B. Braun Biotech, Melsungen
Inkubationsschüttler AJ 115	Ifors, Schweiz
Inkubationsschüttler Innova 4230	NBS, Nürtingen
Mini-Trans Blot Kammer	Biorad, München
Mikrotiterplatten-Lesegerät Tecan SPECTRA Classic	TECAN München GmbH, Kirchheim
Oxford-Pipette	Oxford Instrument Co Ltd, UK
pH-Meter PH 525	WTW, Weilheim
pH-Meter PHM 82	Biorad, München
Phospho-Imager Folien	Fuji, USA
Power-Supply PAC 300	Biorad, München
Power-Supply EPS 2A 200	Hofer, USA
PTC-100 DNA Engine	Biozym, Hessisch Oldendorf

Speedvac Savant	Bachhofer, Reutlingen
Spektralphotometer CPS-240A	Shimadzu, Japan
Spektralphotometer BioSpec-1601E	Shimadzu, Japan
Sterilwerkbank HLB2472GS	Nunc, Wiesbaden
Sterilwerkbank HA2472GS	Bioflow, Meckenheim
Szintillationszähler LS5000TD	Beckman, Unterschleissheim-Lohhof
Thermocycler Primus 25/96	MWG Biotech, Ebersberg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Homburg
Ultraschall Sonifier 250	Branson, USA
Ultraschall Sonifier B12	Branson, USA
Vacuum-Pumpe Lyvac GT2	Heraeus, Homburg
Wasserbad Typ 1086	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Homburg
Zentrifuge Sorvall RC-5B	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen

## 4.2 Chemikalien und Biochemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden in Analysenqualität von den angegebenen Firmen bezogen. Nicht aufgeführte Chemikalien und Biochemikalien wurden bei den Firmen Sigma, München, Serva, Heidelberg und Fluka, Neu-Ulm erworben.

Ampicillin	Amersham Biosciences, Freiburg
ATP	Boehringer, Mannheim
Bacto Trypton	Difco Laboratories, USA
Bacto Hefe-Extract	Difco Laboratories, USA
BSA	NEB, Frankfurt a.M.
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMEM	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
DMEM ohne L-Cys, L-Met, L-Glu	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
DMEM ohne Phosphat, L-Glu	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Ethidiumbromid	Roche Applied Science, Mannheim
FCS	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Genitcin (G418)	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Glutathion-Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
IC261 (CK1 Inhibitor)	ICOS Corp., USA
IPTG	Biomol, Hamburg

Kanamycin	Amersham Biosciences, Freiburg
Leupeptin	Roche Applied Science, Mannheim
Magermilchpulver	Neuform, Herrenberg
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Protein A-Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Protogel (30% (w/v) Acrylamid/ 0,8% (w/v) Bisacrylamid)	National Diagnostics, UK
steriles Wasser für Injektionszwecke	Baxter, Belgien
Rabbit TNT-Reticulocyten Lysate	Promega, Madison, USA
RNasin®	Promega, Madison, USA
Trasylol (Wirkstoff Aprotinin)	Bayer, Leverkusen
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

### 4.3 Radiochemikalien

[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP	Hartmann, Braunschweig
Revidue® [ <sup>35</sup> S]	Amersham Biosciences, Freiburg
Tran [ <sup>35</sup> S]-Label®	Amersham Biosciences, Freiburg
	Hartmann, Braunschweig

### 4.4 Verbrauchsmaterialien und Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, USA
Biorad Protein Assay Kit	Biorad, München
Big Dye Terminormix	Applied Biosystems, USA
Dialyseschläuche Visking 8/32	Serva, Heidelberg
Dialyseschläuche ZelluTrans	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dünnschicht-Chromatographieplatten aus Zellulose	Merck Inc., USA
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Elektroporationsküvetten (1mm Elektrodenabstand)	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Gewebekulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Glasperlen 425-600 Mikron	Sigma, München
Glaswolle	Merck Inc., USA
Hybond-P Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
Mini Q Anionenaustauschersäule	Amersham Biosciences, Freiburg
Nucleobond AX Kit	Machery-Nagel GmbH, Düren
Resource Q Anionenaustauschersäule	Amersham Biosciences, Freiburg
Röntgenfilm Kodak X-OMAT AR	Kodak, USA

Röntgenfilm Kodak X-OMAT BMR	Kodak, USA
Sterilfilter 0,22µm	Millipore, Schwalbach
TiterMax Gold Adjuvant	Sigma, München
pcDNA3.1-V5/His© TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen, USA
Zellkulturschaber	Corning Costar Germany, Bodenheim
Zentrifugenröhrchen Falcon (15 bzw. 50 ml)	Becton Dickinson, USA
Zentrifugenröhrchen (15 bzw. 30 ml)	Corex, USA

#### 4.5 Grössenstandards

High Mass DNA Ladder	Invitrogen, USA
Low Mass DNA Ladder	Invitrogen, USA
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
1 kb DNA Ladder	Invitrogen, USA
1 kb Ladder DNA-Marker	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Protein-Marker 7B, vorgefärbt	Sigma, München
„Rainbow“ Protein-Marker, vorgefärbt	Amersham Biosciences, Freiburg

#### 4.6 Enzyme und Proteine

AMV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
CK1δ (C-terminal verkürzt)	NEB, Frankfurt a.M.
Lysozym	Sigma, München
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt a.M.
RNaseA	Sigma, München
Shrimp Alkaline Phosphatase	Roche Applied Science, Mannheim
T-Ag	aus dem Baculovirus-Expressions- system aufgereinigt; freundlicherweise von G. Warnecke, Heinrich-Pette- Institut, zu Verfügung gestellt
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg
T4-DNA-Ligase	Roche Applied Science, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Promega, Madison, USA
TPCK-Trypsin	Worthington Biochemicals, USA

## 4.7 Antikörper und Seren

### 4.7.1 Aufstellung aller Antikörper und Seren

$\alpha$ -Mannosidase II	Maus, monoklonal, Zellkulturüberstand (G. Banting, Bristol, GB)
CK1 $\delta$	Maus, monoklonal, IC128A (ICOS Corporation, USA) Kaninchen, polyklonales Serum, 108 (U.Knippschild, Ulm)
His-tag	Maus, monoklonal (Invitrogen, Karlsruhe)
MAP1A	Maus, monoklonal (Sigma, München)
Myc-tag	Maus, monoklonal (NEB, Frankfurt a. M.)
RanBPM	Kaninchen, polyklonales Serum (siehe Abschnitt 4.7.2)
Snapin	Kaninchen, polyklonales Serum (siehe Abschnitt 4.7.2)
V5-tag	Maus, monoklonal (Invitrogen, Karlsruhe)
anti-Kaninchen-Ig	Esel, polyklonal, konjugiert mit Alexa 488 (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen)
anti-Kaninchen-Ig	Esel, polyklonal, konjugiert mit Alexa 586 (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen)
anti-Maus-Ig	Ziege, polyklonal, konjugiert mit Alexa 488 (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen)
anti-Maus-Ig	Ziege, polyklonal, konjugiert mit Alexa 568 (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen)
anti-Kaninchen-Ig	Ziege, polyklonal, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (SAPU, Schottland)
anti-Maus-Ig	Ziege, polyklonal, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (SAPU, Schottland)

### 4.7.2 Herstellung von anti-Peptid Kaninchenserum

Die Peptide CLNHSVAKETARRRAMI (Aminosäurereste 109-124 von humanem bzw. murinem Snapin) und GFLNCSSKHDHEMED (Aminosäurereste 579-593 von humanem bzw. 503-517 von murinem RanBPM, 90kDa Protein) wurden für die Immunisierungen an KLH gekoppelt. Für die subkutane Injektion bei Kaninchen wurden 200  $\mu$ g der KLH-gekoppelten Peptide in 400  $\mu$ l einer 50% (v/v) TiterMax Gold Emulsion in 0,8% (w/v) NaCl gelöst. Die Tiere wurden dreimal immunisiert im Abstand von jeweils 2 Wochen. Nach der dritten Immunisierung wurden Testseren von den Tieren entnommen und auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper im ELISA mit den jeweiligen Peptiden untersucht. Die Spezifität der Seren CGW4 (anti-Snapin) und CGV1 (anti-RanBPM) wurde durch Wettbewerbsversuche mit dem entsprechenden Peptid in der Immunfluoreszenz überprüft. Die Tiere wurden ausgeblutet und das geronnene Blut zur Gewinnung des Serums abzentrifugiert (2000 rpm, 10 Minuten, 4°C). Das aus dem Blut gewonnene Serum wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

## 4.8 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der MWG Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

RT-PCR-Primer für die cDNA-Synthese von CK1 $\delta$ wt und CK1 $\delta$ rev (Ratte):

5'CK1 $\delta$ cDNA 5'-ATGGAGCTGAGGGTCGGGAATAG-3'  
(5' CK1 $\delta$  nt 1-23)

3'CK1 $\delta$ cDNA 5'-TCAGTAGGTGGTACGTCGTGG-3'  
(3' CK1 $\delta$  nt 1267-1287)

PCR-Primer für die Amplifikation von CK1 $\delta$ -Fragmenten (Ratte):

5'CK1 $\delta$ -1 5'-CGAATTCCATGGAGCTGAGGGTCGGGAAT-3'  
(5' CK1 $\delta$  nt 1-21, *EcoRI* / *NcoI*)

5'CK1 $\delta$ -26 5'-CGAATTCCATGGGTACGGACATTGCTGCA-3'  
(5' CK1 $\delta$  nt 76-93, *EcoRI* / *NcoI*)

5'CK1 $\delta$ -52 5'-CGAATTCCATGGAGAGCAAGATCTACAAAATGAT-3'  
(5' CK1 $\delta$  nt 154-176, *EcoRI* / *NcoI*)

5'CK1 $\delta$ -76 5'-CGAATTCCATGGACTACAATGTCATGGTGATG-3'  
(5' CK1 $\delta$  nt 226-246, *EcoRI* / *NcoI*)

5'CK1 $\delta$ -104 5'-CGAATTCCATGGTTCTGTGCTTGCTGAC-3'  
(5' CK1 $\delta$  nt 313-330, *EcoRI* / *NcoI*)

5'CK1 $\delta$ -149 5'-CGAATTCCATGGACTTTGGGCTGGCCAAG-3'  
(5' CK1 $\delta$  nt 445-462, *EcoRI* / *NcoI*)

5'CK1 $\delta$ -200 5'-CGAATTCCATGGGGTACGTGCTGATGTAC-3'  
(5' CK1 $\delta$  nt 598-615, *EcoRI* / *NcoI*)

5'CK1 $\delta$ -CT 5'-CGAATTCCATGGAGCGGGAACGCCG-3'  
(5' CK1 $\delta$  nt 913-926, *EcoRI* / *NcoI*)

3'CK1 $\delta$ -KD 5'-ACTCGAGTCGACAGCATCATCTGCAGCC-3'  
(3' CK1 $\delta$  nt 897-912, *XhoI* / *Sall*)

3'CK1 $\delta$ -350 5'-ACTCGAGTCGACTGAGGTAGGGGTAAGG-3'  
(3' CK1 $\delta$  nt 1035-1050, *XhoI* / *Sall*)

3'CK1 $\delta$ -375 5'-ACTCGAGTCGACACGGTGCAGCCGCA-3'  
(3' CK1 $\delta$  nt 1112-1125, *XhoI* / *Sall*)

3'CK1 $\delta$ -400 5'-ACTCGAGTCGACCCTCTGTGAGGTGGA-3'  
(3' CK1 $\delta$  nt 1186-1200, *XhoI* / *Sall*)

3'CK1δ-428 5'-ACTCGAGTCGACGTAGGTGGTACGTCGTG-3'  
(3' CK1δ nt 1268-1284, *XhoI* / *SalI*)

PCR-Primer für die Amplifikation von Fragmenten der leichten Kette 2 (LC2) des humanen Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A (MAP1A):

5'LC2-1 5'-GAATTCATGTCACCCACCCCTGGTAAAGGG-3'  
(5' LC2, nt 7885-7905, *EcoRI*)

5'LC2-2 5'-GAATTCATGAAGGGCAGCTCTGGTGCC-3'  
(5' LC2, nt 8050-8067, *EcoRI*)

5'LC2-3 5'-GAATTCATGTTCCGTCGAGTGCCTGCATC-3'  
(5' LC2, nt 8134-8153, *EcoRI*)

3'LC2-4 5'-CTCGAGGGAAGTCAAGGCCATTGGTC-3'  
(3' LC2, nt 8030-8049, *XhoI*)

3'LC2-5 5'-CTCGAGCACCTGAAGATTCTCCCCC-3'  
(3' LC2, nt 8241-8259, *XhoI*)

3'LC2-6 5'-CTCGAGGAACTCAATCTTGCAGGCAGG-3'  
(3' LC2, nt 8395-8415, *XhoI*)

3'LC2-7 5'-TGGATCCTCGAGGAACTCAATCTTGCAGGCA-3'  
(3' LC2, nt 8397-8415, *BamHI/XhoI*)

PCR-Primer für die Amplifikation von Snapin (murin, human):

5'Snapin-1 5'-TAGAATTCTCATATGGCCCGCAGCTGGTTCC-3'  
(5' Snapin, nt 1-18, *EcoRI/NdeI*)

5'Snapin-2 5'-TAGAATTCTCATATGGTGCAGCAGCTCGACTCT-3'  
(5' Snapin, nt 109-123, *EcoRI/NdeI*)

5'Snapin-3 5'-TAGAATTCTCATATGGACCCCTATGTTAAGAAG-3'  
(5' Snapin, nt 235-252, *EcoRI/NdeI*)

3'Snapin-4 5'-TACTCGAGGTACCTAGAGCTGCTGCACC 3'  
(3' Snapin, nt 108-120, *XhoI/KpnI*)

3'Snapin-5 5'-TACTCGAGGTACCTACAGATCCAGGGCCA-3'  
(3' Snapin, nt 221-234, *XhoI/KpnI*)

3'Snapin-6 5'-TACTCGAGGTACCTATTTGCTTGGAGAACCAG-3'  
(3' Snapin, nt 392-408, *XhoI/KpnI*)

PCR-Primer für die Amplifikation von Fragmenten des humanen und murinen Ran Binding Protein im MTOC (RanBPM55, 55 kDa Protein; die Angaben zu den Nukleotid-Positionen beziehen sich auf die Sequenz des murinen RanBPM90):

5'RanBPM-1	5'-TCTCGAGACCCGGGTATGGGAATTGGTCTTT-3' (5' <u>RanBPM90, nt 463-478</u> , <i>XhoI/XmaI</i> )
5'RanBPM-2	5'-TCTCGAGACCCGGGTATGTTTGTTGTTTGATAT-3' (5' <u>RanBPM90, nt 775-788</u> , <i>XhoI/XmaI</i> )
5'RanBPM-3	5'-TCTCGAGACCCGGGTATGCGGTGTTTGGGA-3' (5' <u>RanBPM90, nt 1156-1167</u> , <i>XhoI/XmaI</i> )
5'RanBPM-4	5'-TCTCGAGACCCGGGTATGGAAAGTTGTAGC-3' (5' <u>RanBPM90, nt 1306-1317</u> , <i>XhoI/XmaI</i> )
5'RanBPM-5	5'-TCTCGAGACCCGGGTATGGAAGATTGTGAC-3' (5' <u>RanBPM90, nt 1543-1557</u> , <i>XhoI/XmaI</i> )
3'RanBPM-6	5'-TCTCGAGGGTACCTAAGGATGTTGCCCAA-3' (3' <u>RanBPM90, nt 760-774</u> , <i>XhoI/KpnI</i> )
3'RanBPM-7	5'-TCTCGAGGGTACCTACACTTCACTGTCTGT-3' (3' <u>RanBPM90, nt 1141-1155</u> , <i>XhoI/KpnI</i> )
3'RanBPM-8	5'-TCTCGAGGGTACCTATACACCATTGCTACAAC-3' (3' <u>RanBPM90, nt 1310-1326</u> , <i>XhoI/KpnI</i> )
3'RanBPM-9	5'-TCTCGAGGGTACCTATTCGTGGTCATGTTTAG-3' (3' <u>RanBPM90, nt 1526-1542</u> , <i>XhoI/KpnI</i> )
3'RanBPM-10	5'-TCTCGAGGGTACCTAATGTAGGTAGTCTTCC-3' (3' <u>RanBPM90, nt 1944-1959</u> , <i>XhoI/KpnI</i> )

Für die Sequenzierung verwendete Oligonukleotide:

5'pACT2	5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3' (5' Sequenzierung von pACT2, nt 5091-5122)
pACT2-RP	5'-CAGTTGAAGTGAAGTGC-3' (3' Sequenzierung von pACT2, nt 4937-4954)
5'pcDNA3.1	5'-TTAATACGACTCACTATAGGG-3' (5' Sequenzierung von pcDNA3.1/V5-His-TOPO, nt-862-882)
3'pcDNA3.1	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGGCTG-3' (3' Sequenzierung von pcDNA3.1/V5-His-TOPO, nt 1108-1128)
PolyT-V	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (3' Sequenzierung, Hybridisierung mit polyA Sequenzen)
5'RanBPMseq	5'-AAGGAGAATGGCAGACCATG-3' (5' Sequenzierung von murinem RanBPM, nt 860-879)

oligo(dT)<sub>15</sub> primer Promega, Madison, USA

## 4.9 Vektoren

Eukaryontische Expressionsvektoren:

pCR3.1	Invitrogen, Karlsruhe
pCR3.1-CK1 $\delta$ wt	cDNA von CK1 $\delta$ wt ( <i>Rattus norvegicus</i> ), in pCR3.1 integriert
pCR3.1-CK1 $\delta$ rev	cDNA von CK1 $\delta$ aus Rev2 Zellen (embryonale, SV40 transformierte Rattenfibroblastenzelllinie, (Bauer <i>et al.</i> , 1987), in pCR3.1 integriert
pcDNA3.1-V5/His <sup>©</sup> TOPO <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe

Vektorbezeichnung	Exprimierte AS CK1 $\delta$	Oligonukleotide
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ KD	1-304	5'CK1 $\delta$ -1 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ N26	26-304	5'CK1 $\delta$ -26 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ N52	52-304	5'CK1 $\delta$ -52 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ N76	76-304	5'CK1 $\delta$ -76 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ N104	104-304	5'CK1 $\delta$ -104 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ N149	149-304	5'CK1 $\delta$ -149 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ N200	200-304	5'CK1 $\delta$ -200 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ CT	305-428	5'CK1 $\delta$ -CT / 3'CK1 $\delta$ -428
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ C350	305-350	5'CK1 $\delta$ -CT / 3'CK1 $\delta$ -350
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ C375	305-375	5'CK1 $\delta$ -CT / 3'CK1 $\delta$ -375
pcDNA3.1-CK1 $\delta$ C400	305-400	5'CK1 $\delta$ -CT / 3'CK1 $\delta$ -400

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten pcDNA3.1-V5/His<sup>©</sup> TOPO<sup>®</sup>-Konstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten von CK1 $\delta$  (*Rattus norvegicus*)

Vektorbezeichnung	Exprimierte AS LC2	Oligonukleotide
pcDNA3.1-LC2-14	2629-2683	5'LC2-1 / 3'LC2-4
pcDNA3.1-LC2-15	2629-2753	5'LC2-1 / 3'LC2-5
pcDNA3.1-LC2-16	2629-2805	5'LC2-1 / 3'LC2-6
pcDNA3.1-LC2-25	2684-2753	5'LC2-2 / 3'LC2-5
pcDNA3.1-LC2-26	2684-2805	5'LC2-2 / 3'LC2-6
pcDNA3.1-LC2-35	2712-2753	5'LC2-3 / 3'LC2-5
pcDNA3.1-LC2-36	2712-2805	5'LC2-3 / 3'LC2-6
pcDNA3.1-LC2-17	2629-2805	5'LC2-1 / 3'LC2-7

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten pcDNA3.1-V5/His<sup>©</sup> TOPO<sup>®</sup>-Konstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten von humanem LC2

Vektorbezeichnung	Exprimierte AS Snapin	Oligonukleotide
pcDNA3.1-Snapin14	1-40	5' Snapin-1 / 3' Snapin-4
pcDNA3.1-Snapin15	1-78	5' Snapin-1 / 3' Snapin-5
pcDNA3.1-Snapin16	1-136	5' Snapin-1 / 3' Snapin-6
pcDNA3.1-Snapin25	37-78	5' Snapin-2 / 3' Snapin-5
pcDNA3.1-Snapin26	37-136	5' Snapin-2 / 3' Snapin-6
pcDNA3.1-Snapin36	79-136	5' Snapin-3 / 3' Snapin-6

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten pcDNA3.1-V5/His<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup>-Konstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten von murinem Snapin

Vektorbezeichnung	Exprimierte AS RanBPM	Oligonukleotide
pcDNA3.1-RanBPM110	155-653	5' RanBPM-1 / 3' RanBPM-10
pcDNA3.1-RanBPM16	155-258	5' RanBPM-1 / 3' RanBPM-6
pcDNA3.1-RanBPM27	259-385	5' RanBPM-2 / 3' RanBPM-7
pcDNA3.1-RanBPM38	386-442	5' RanBPM-3 / 3' RanBPM-8
pcDNA3.1-RanBPM49	436-514	5' RanBPM-4 / 3' RanBPM-9
pcDNA3.1-RanBPM510	515-653	5' RanBPM-5 / 3' RanBPM-10

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten pcDNA3.1-V5/His<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup>-Konstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten von murinem RanBPM

pEYFP-C1	Clontech, USA
pECFP-N1	Clontech, USA
pECFP-LC2	cDNA von humanem MAP1A LC2 (AS 2629-2805), über <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> in pECFP-N1 integriert
pEYFP-Snapin	cDNA von murinem Snapin, über <i>EcoRI</i> und <i>KpnI</i> in pEYFP-C1 integriert
pEYFP-RanBPM55	cDNA von murinem RanBPM55, über <i>XhoI</i> und <i>KpnI</i> in pEYFP-C1 integriert

Expressionsvektoren für *Saccharomyces cerevisiae*:

pVA3-1	cDNA von murinem p53, AS 72-390, im Expressionsvektor pAS2-1 (Matchmaker, Clontech), Kontrollvektor im YTH System
pTD1-1	cDNA von SV40 T-Ag, AS 84-708, im Expressionsvektor pACT2 (Matchmaker, Clontech), Kontrollvektor im YTH System

pLAM5'-1	cDNA von humanem LaminC im Expressionsvektor pACT2 (Matchmaker, Clontech), Kontrollvektor im YTH System
pACT2-bm	cDNA Bank aus humanem Knochenmark im Vektor pACT2 (Clontech, USA)
pACT2-mt	cDNA Bank aus murinem Hoden im Vektor pACT2 (Clontech, USA)
pGBKT7	Clontech, USA
pGBKT7-CK1 $\delta$ wt	cDNA von CK1 $\delta$ wt ( <i>Rattus norvegicus</i> ), über <i>NcoI</i> und <i>SalI</i> in pGBKT7 integriert
pGBKT7-CK1 $\delta$ rev	cDNA von CK1 $\delta$ rev, über <i>NcoI</i> und <i>SalI</i> in pGBKT7 integriert
pGBKT7-CK1 $\alpha$	cDNA von CK1 $\alpha$ ( <i>Rattus norvegicus</i> ) im Expressionsvektor pGBKT7; das Konstrukt wurde von Dr. David Meek, Dundee, Schottland bereitgestellt
pGBKT7-CK1 $\gamma$ 3	cDNA von CK1 $\gamma$ 3 ( <i>Rattus norvegicus</i> ) im Expressionsvektor pGBKT7; das Konstrukt wurde von Dr. David Meek, Dundee, Schottland zur Verfügung gestellt
pGBKT7-CK1 $\epsilon$	cDNA von CK1 $\delta$ wt ( <i>Rattus norvegicus</i> ) im Expressionsvektor pGBKT7; das Konstrukt wurde von Dr. David Meek, Dundee, Schottland zur Verfügung gestellt

Vektorbezeichnung	Exprimierte AS CK1 $\delta$	Oligonukleotide
pGBKT7-CK1 $\delta$ KD	1-304	5'CK1 $\delta$ -1 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pGBKT7-CK1 $\delta$ N26	26-304	5'CK1 $\delta$ -26 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pGBKT7-CK1 $\delta$ N52	52-304	5'CK1 $\delta$ -52 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pGBKT7-CK1 $\delta$ N76	76-304	5'CK1 $\delta$ -76 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pGBKT7-CK1 $\delta$ N104	104-304	5'CK1 $\delta$ -104 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pGBKT7-CK1 $\delta$ N149	149-304	5'CK1 $\delta$ -149 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pGBKT7-CK1 $\delta$ N200	200-304	5'CK1 $\delta$ -200 / 3'CK1 $\delta$ -KD
pGBKT7-CK1 $\delta$ CT	305-428	5'CK1 $\delta$ -CT / 3'CK1 $\delta$ -428
pGBKT7-CK1 $\delta$ C350	305-350	5'CK1 $\delta$ -CT / 3'CK1 $\delta$ -350
pGBKT7-CK1 $\delta$ C375	305-375	5'CK1 $\delta$ -CT / 3'CK1 $\delta$ -375
pGBKT7-CK1 $\delta$ C400	305-400	5'CK1 $\delta$ -CT / 3'CK1 $\delta$ -400

Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten pGBKT7-Konstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten von CK1 $\delta$  (*Rattus norvegicus*); die Integration in pGBKT7 erfolgte über *NcoI* und *SalI*.

pGADT7 Clontech, USA



p267	cDNA der ersten 192 bp von p53 im Expressionsvektor pGEX-2T (Expression der AS 1-64 von murinem p53 als GST-Fusionsprotein, bezeichnet als FP267); das Konstrukt wurde von Dr. Uwe Knippschild bereitgestellt
pGEX-CK1 $\delta$ rev	cDNA von CK1 $\delta$ rev aus pCR3.1-CK1 $\delta$ rev in pGEX-2T integriert
pGEX-CK1 $\delta$ wt	cDNA von CK1 $\delta$ wt aus pCR3.1-CK1 $\delta$ wt, in pGEX-2T integriert

Vektorbezeichnung	Exprimierte AS LC2	Oligonukleotide
pGEX-LC2-14	2629-2683	5'LC2-1 / 3'LC2-4
pGEX-LC2-15	2629-2753	5'LC2-1 / 3'LC2-5
pGEX-LC2-16	2629-2805	5'LC2-1 / 3'LC2-6
pGEX-LC2-25	2684-2753	5'LC2-2 / 3'LC2-5
pGEX-LC2-26	2684-2805	5'LC2-2 / 3'LC2-6
pGEX-LC2-35	2712-2753	5'LC2-3 / 3'LC2-5
pGEX-LC2-36	2712-2805	5'LC2-3 / 3'LC2-6

Tabelle 10: **Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten pGEX-4T-1-Konstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten von humanem LC2; die Integration in pGEX-4T-1 erfolgte über *EcoRI* und *XhoI*.**

Vektorbezeichnung	Exprimierte AS Snapin	Oligonukleotide
pGEX-Snapin-14	1-40	5'Snapin-1 / 3'Snapin-4
pGEX-Snapin-15	1-78	5'Snapin-1 / 3'Snapin-5
pGEX-Snapin-16	1-136	5'Snapin-1 / 3'Snapin-6
pGEX-Snapin-25	37-78	5'Snapin-2 / 3'Snapin-5
pGEX-Snapin-26	37-136	5'Snapin-2 / 3'Snapin-6
pGEX-Snapin-36	79-136	5'Snapin-3 / 3'Snapin-6

Tabelle 11: **Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten pGEX-4T-3-Konstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten von murinem Snapin; die Integration in pGEX-4T-3 erfolgte über *EcoRI* und *XhoI*.**

Vektorbezeichnung	Exprimierte AS RanBPM	Oligonukleotide
pGEX-RanBPM-110	155-653	5'RanBPM-1 / 3'RanBPM-10
pGEX-RanBPM-16	155-258	5'RanBPM-1 / 3'RanBPM-6
pGEX-RanBPM-27	259-385	5'RanBPM-2 / 3'RanBPM-7
pGEX-RanBPM-38	386-442	5'RanBPM-3 / 3'RanBPM-8
pGEX-RanBPM-49	436-514	5'RanBPM-4 / 3'RanBPM-9
pGEX-RanBPM-510	515-653	5'RanBPM-5 / 3'RanBPM-10

Tabelle 12: **Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten pGEX-4T-1-Konstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten von murinem RanBPM; die Integration in pGEX-4T-1 erfolgte über *XmaI* und *XhoI* bzw. *EcoRI* und *NotI*.**

#### 4.10 Eukaryontische Zelllinien

Balb/c 3T3	Mausembryofibroblastenzelllinie (Aaronson & Todaro, 1968)
BXPC3	Humane Adenokarzinomzelllinie (Pankreas) (Loor <i>et al.</i> , 1982)
C57-MG	Epithelzelllinie aus Milchdrüsen von C57BL/6 Mäusen (Vaidya <i>et al.</i> , 1978)
CV1	SV40 permissive Affennierenzelllinie der Afrikanischen Grünen Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ) (Manteuil <i>et al.</i> , 1973)
F111	Immortalisierte Fischer Rattenfibroblasten (Freeman <i>et al.</i> , 1975)
HeLa	Humane epitheliale Adenokarzinomzelllinie (Cervix) (Scherer <i>et al.</i> , 1953)
Kplus	NRK Zellen mit stabiler Expression von GFP-TGN38 (G. Banting, Bristol, GB)
MiaPaCa-2	Humane Pankreaskarzinomzelllinie (Yunis <i>et al.</i> , 1977)
MCF7	Humane Mammakarzinomzelllinie (Soule <i>et al.</i> , 1973)
NRK	Nierenzelllinie aus der Ratte (Somers & Kirsten, 1968)
REF52	Rattenembryofibroblastenzelllinie (McClure <i>et al.</i> , 1982)
Rev2	Revertante Rattenfibroblastenzelllinie, aus SV-52 Zellen isoliert (Bauer <i>et al.</i> , 1987)
SV-52	Rattenfibroblastenzelllinie, entstanden nach Mikroinjektion von SV40 DNA in REF52 Zellen (Graessmann & Graessmann, 1983)
SV-CK	Bezeichnung für stabil mit CK1 $\delta$ transfizierte SV-52 Zellen

#### 4.11 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> ; endA1, hsdR17(rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ); supE44; thi-1; $\lambda^-$ ; recA1; gyrA96; relA1; $\Delta$ [argF-lacZYA]U169; [ $\Phi$ 80dlacZM15] (Hanahan, 1983)
-----------------------------	---

#### 4.12 Hefestämme

<i>S. cerevisiae</i> AH 109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-300, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2 :: GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3, MEL1, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2, URA3 :: MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> -lacZ (James <i>et al.</i> , 1996)
-----------------------------	---

## 4.13 Zellkulturtechniken

### 4.13.1 Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden auf Gewebekulturschalen in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) bei 5% CO<sub>2</sub>, 85% Humidität und 37°C kultiviert. SV-CK Zellen wurden in komplettem DMEM mit 200 µg/ml G418 kultiviert. Die Zellen wurden als subkonfluente Monolayer alle 2 Tage passagiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen durch eine 3-5 minütige Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturschale gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt und die Zelle in einer entsprechenden Verdünnung auf neue Gewebekulturschalen gegeben.

DMEM: Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Trypsin-EDTA-Lösung: 2% Trypsin in PBS; 0,5 mM EDTA [pH 8,0]

### 4.13.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden von einer Gewebekulturschale durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und die Reaktion mit Kulturmedium abgestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 2000 rpm, RT, pelletiert und das Zellpellet in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem Einfrierröhrchen sofort auf Eis gestellt, eine Stunde in der oberen und über Nacht in der unteren Gasphase des Stickstofftanks belassen und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurde der Inhalt eines Einfrierröhrchens bei 37°C aufgetaut, in 10 ml Medium verdünnt und für 2 Minuten zentrifugiert bei 2000 rpm, RT. Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und auf Gewebekulturschalen gegeben. Nach ca. 24 Stunden wurde das Medium erneuert.

Einfriermedium: 50% (v/v) FCS; 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>; 12% (v/v) DMSO in doppelt konzentriertem DMEM

### 4.13.3 Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen

Für die transiente Expression von Proteinen wurden die Zellen nach dem "Effectene Transfection Reagent"-Protokoll von QIAGEN transfiziert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen bis zu ca. 40% Konfluenz kultiviert und mit insgesamt 0,4 µg zu transfizierender zirkulärer Vektor-DNA pro

Vertiefung in 6-Well Platten bzw. 2 µg DNA in 90-mm Gewebekulturschalen nach Angaben des Herstellers transfiziert. Für eine anschließende Auswertung der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen auf Deckgläsern in 6-Well Platten transfiziert und bis zur Fixierung 1-2 Tage bei 37°C kultiviert.

#### 4.13.4 Stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen

Die Etablierung der Zelllinie SV-CK erfolgte nach stabiler Transfektion von SV-52 Zellen nach dem "Effectene Transfection Reagent"-Protokoll von QIAGEN. Die Zellen wurden auf 90-mm Gewebekulturschalen bis zu 40-60% Konfluenz kultiviert und mit 2 µg Vektor-DNA pro Schale Vertiefung nach Angaben des Herstellers transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 auf neue Zellkulturschalen umgesetzt und in komplettem DMEM mit 400 µg/ml G418 kultiviert. G418-resistente Kolonien wurden nach 2 Wochen zu Zelllinien expandiert und zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks in DMEM mit 200 µg/ml G418 kultiviert.

#### 4.13.5 Präparation von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse transient transfizierter eukaryotischer Zellen erfolgte 12-72 Stunden nach der Transfektion in Abhängigkeit vom Expressionsverhalten des zu analysierenden Proteins. Transient transfizierte Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert, nach Entfernung des Mediums mit 37°C warmem PBS gewaschen und anschliessend mit 3% (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 20 Minuten bei 37°C fixiert. Alternativ wurden die Zellen durch Inkubation in Methanol für 30 Minuten bei -20°C fixiert und zugleich permeabilisiert. Abhängig von der zu untersuchenden Fragestellung folgte eine Behandlung der Präparate für die Immunfluoreszenzmikroskopie wie unter Abschnitt 4.13.6 beschrieben. Für die Darstellung der Aktinfilamente wurden die Zellen für 20 Minuten bei 37°C mit 0.05 mg/ml Tetramethylrhodamineisothiocyanat (TRITC)-konjugiertem Phalloidin bzw. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem Phalloidin behandelt. Danach wurden die Präparate mit PBS und abschliessend mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor sie auf einem Objektträger in Mounting-Medium eingebettet wurden. Nach dem Aushärten des Mounting-Mediums über Nacht bei RT konnten die Zellen im Epifluoreszenzmikroskop mit einer hochauflösenden Kamera analysiert werden.

PBS: 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Mounting-Medium: 5% (w/v) Polyvinylalkohol (MW 70000-100000 Da); 10% (v/v) Glycerin in PBS

#### 4.13.6 Präparation von Zellen für Immunfluoreszenzanalysen

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen für 12-72 Stunden auf Deckgläsern kultiviert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Paraformaldehyd oder eiskaltem Methanol wie unter 4.13.5 beschrieben. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Zellen mit 0,3% (v/v) Triton X-100 in PBS für 3 Minuten bei RT permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen der Antikörper wurden durch Inkubation in 1,5 % (w/v) BSA in PBS für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Zellen wurden jeweils nach der Fixierung, der Permeabilisierung und der Absättigung dreimal mit PBS gewaschen.

Die Präparate wurden zunächst mit 50 µl einer Verdünnung des jeweiligen spezifischen Antikörpers für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Verdünnungsfaktoren der primären und der sekundären Antikörper in den Tabellen 13 und 14 angegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation der Präparate mit den sekundären Antikörpern für 45 Minuten bei RT im Dunkeln. Alternativ wurden die Präparate zunächst mit weiteren Verdünnungen spezifischer Antikörper inkubiert, wenn Doppelfärbungen angefertigt werden sollten. Nachdem die Präparate erneut in PBS gewaschen worden waren, wurde die zelluläre DNA durch Inkubation mit DAPI (0,1 µg/ml in PBS) für 15 Minuten bei RT im Dunkeln dargestellt. Danach wurden die Präparate mit PBS und abschliessend mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor sie auf einem Objektträger in Mounting-Medium eingebettet wurden. Die Auswertung erfolgte unter dem Epifluoreszenzmikroskop und die Bildokumentation mit einer hochauflösenden Digitalkamera.

Epitop	Spezies	Verdünnung
α-Mannosidase II	Maus, monoklonal	1:20
CK1δ IC128A	Maus, monoklonal	1:500
RanBPM	Serum CGV1, Kaninchen, polyklonal (siehe Abschnitt 4.7.2)	1:3000
Snapin	Serum CGW4, Kaninchen, polyklonal (siehe Abschnitt 4.7.2)	1:1500

Tabelle 13: Verdünnungen der in Immunfluoreszenz verwendeten primären Antikörper

Epitop	Spezies	Verdünnung
Maus-IgG	Ziege, polyklonal, konjugiert mit Alexa 488	1:500
Maus-IgG	Ziege, polyklonal, konjugiert mit Alexa 568	1:500
Kaninchen-Ig	Esel, polyklonal, konjugiert mit Alexa 488	1:500
Kaninchen-Ig	Esel, polyklonal, konjugiert mit Alexa 568	1:500

Tabelle 14: Verdünnungen der in Immunfluoreszenz verwendeten sekundären Antikörper

#### 4.13.7 Extraktion von Proteinen aus eukaryontischen Zellen

Zur Extraktion von Proteinen aus eukaryontischen Zellen wurden diese nach Entfernung des Mediums zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und anschliessend auf Eis mit 0,1-0,5 ml NP40-Lysispuffer pro 90-mmGewebekulturschale lysiert. Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Aprotinin, Benzamidin, EGTA) wurden jeweils frisch zum Lysispuffer gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellkulturschaber von den Gewebekulturschalen abgeschabt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation der Lysate bei 14000 rpm für 30 Minuten bei 4°C abgetrennt. Alternativ wurden die Proteine vor der Auftrennung in der FPLC in FPLC-Lysispuffer extrahiert.

NP40-Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 120 mM NaCl, 0,5% (v/v) NP40, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM EGTA, 1 mM Benzamidin, 50 µM Leupeptin, 1% (v/v) Trasylol (Aprotinin), 5 mM DTT

FPLC-Lysispuffer: 20 mM Tris-Acetat [pH 7,0], 0,27 mM Sucrose, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM EGTA, 1 mM Benzamidin, 50 µM Leupeptin, 1% (v/v) Trasylol (Aprotinin), 0,1% β-Mercaptoethanol

#### 4.13.8 Extraktion von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Nach Entfernung des Mediums wurden subkonfluente Monolayer der Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in 2 ml RNA-Lysispuffer lysiert. Das Lysat wurde zur Homogenisierung zehnmal durch eine 20G Kanüle (Ø 0,9 mm) gepresst. Dann wurden nacheinander 0,2 ml 2 M Natriumacetat [pH 4,0], 2 ml Phenol und 0,4 ml Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben und jeweils mit dem Lysat vermischt. Das Lysat wurde 10 Sekunden gevortext, 15 Minuten auf Eis inkubiert und 20 Minuten bei 10000xg und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit einem Volumen Isopropanol versetzt, die RNA 1 Stunde bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 10000xg und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 0,6 ml RNA-Lysispuffer resuspendiert und die RNA erneut mit 1 Volumen Isopropanol präzipitiert. Anschliessend wurde die RNA zweimal mit 75% (v/v) Ethanol gewaschen, in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -70°C gelagert. Die Quantifizierung der RNA erfolgte wie in Abschnitt 4.16.2 beschrieben.

RNA-Lysispuffer: 4 M Guanidinium-Thiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5 % (w/v) Natriumlaurylsarkosinat, 0,1 M β-Mercapthoethanol

#### 4.13.9 Softagarklonierung

SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen wurden jeweils in Zelldichten von  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  und  $1 \times 10^3$  Zellen pro 35-mm Gewebekulturschale in DMEM mit 10% FCS und 0,3% (w/v) Bacto-Agar auf einer Stützschiicht von 0,5% (w/v) Bacto-Agar in DMEM ausplattiert. Die Softagarklonierungen wurden 14 Tage bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert und dann zur Dokumentation fotografiert.

#### 4.14 Arbeiten mit Bakterien

##### 4.14.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$ nach der Mehrionen-Technik

100 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer Bakterienkultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  angeimpft und bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte von etwa 0,5 bei 595 nm Wellenlänge erreicht war. Die Bakterien wurden dann in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und auf Eis 10 Minuten abgekühlt. Nach dem Zentrifugieren für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4°C wurde das Bakteriensediment in 30 ml eiskaltem Tfb1 resuspendiert, 30-60 Minuten auf Eis inkubiert, wieder abzentrifugiert, in 5 ml Tfb2 aufgenommen und weitere 15 Minuten auf Eis belassen. Die kompetenten Bakterien wurden anschliessend entweder frisch verwendet oder portionsweise in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C bis zur Benutzung gelagert.

LB-Medium:	10 g/L Bacto-Trypton; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl, [pH 7,4] für Agarplatten wurde 2% Bacto-Agar zugegeben Ampicillin (50 $\mu$ g/ml) oder Kanamycin (25 $\mu$ g/ml) wurden nach dem Autoklavieren zugefügt
Tfb1:	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 30 mM Kaliumacetat, 15% (w/v) Glycerin, [pH 5,8] mit 0,2 M Essigsäure
Tfb2:	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15% (w/v) Glycerin, [pH 7,0] mit NaOH

##### 4.14.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und jeweils 50  $\mu$ l Aliquots mit 100-500 ng Vektor-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 37°C für 5 Minuten. Anschliessend wurden die Bakterien auf Eis für 2 Minuten abgekühlt. Nach Zugabe von 0,5 ml LB-Medium wurde die Bakteriensuspension für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt und dann auf

Agarplatten mit dem entsprechenden für die Selektion verwendeten Antibiotikum (Ampicillin, Kanamycin) ausplattiert.

#### 4.14.3 Präparation elektrokompenter *E. coli* DH5 $\alpha$

50 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* DH5 $\alpha$  angeimpft und bei 37°C und 180 rpm 12-18 Stunden inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 250 ml LB-Medium angeimpft und auf eine optische Dichte bei 595 nm Wellenlänge (OD<sub>595</sub>) von etwa 0,070-0,080 eingestellt. Die Kultur wurde bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>595</sub> von 0,750 erreicht war. Die Bakterien wurden 15 Minuten auf Eis abgekühlt und anschliessend 15 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 250 ml eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen und dann in eiskaltem destilliertem Wasser aufgenommen und auf eine OD<sub>595</sub> von 0,250 in einer 1:300 Verdünnung der Bakterien-suspension eingestellt. 40  $\mu$ l Aliquots der elektrokompenten Bakterien wurden sofort weiterverwendet für die Transformation von Vektor-DNA aus *S. cerevisiae* in *E. coli* DH5 $\alpha$ .

#### 4.14.4 Transformation elektrokompenter *E. coli* DH5 $\alpha$ (Elektroporation)

In einer eisgekühlten Elektroporationsküvette wurden 1-2  $\mu$ l einer Vektor-DNA Präparation aus *S. cerevisiae* AH109 und 40  $\mu$ l elektrokompente *E. coli* DH5 $\alpha$  zusammengegeben. Die Elektroporation fand im GenePulser bei 400 Ohm, 2,5 mF und 25 kV statt. Anschliessend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde 5 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 50  $\mu$ l LB-Medium aufgenommen. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf LB-Agarplatten mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert.

#### 4.14.5 Präparation von Vektor-DNA in kleinem Massstab (Mini-Präp)

3 ml LB-Medium mit 25  $\mu$ g/ml Kanamycin oder 50  $\mu$ g/ml Ampicillin wurden mit jeweils einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. 2 ml der Bakterienkulturen wurden 5000 rpm 2 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200  $\mu$ l Puffer S1 resuspendiert und nach Zugabe von 200  $\mu$ l Puffer S2 für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschliessend wurden 200  $\mu$ l Puffer S3 zugegeben und weitere 5-10 Minuten auf Eis inkubiert. Unlösliche Bakterienbestandteile wurden nach der Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 10 Minuten verworfen. Der Überstand wurde mit 600  $\mu$ l Isopropanol gemischt. Nach dem Zentrifugieren der Vektor-DNA bei 14000 rpm, RT, für 10 Minuten wurde diese mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur

Stammkulturhaltung wurden die Bakteriensuspensionen mit 25% (v/v) Glycerin versetzt und bei -70 °C eingefroren.

Puffer S1: RNase A (100 µg/ml), 50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA

Puffer S2: 0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS

Puffer S3: 2,55 M Kaliumacetat [pH 4,8]

#### 4.14.6 Präparation von Vektor-DNA in quantitativem Massstab

Um Vektor-DNA im quantitativen Massstab aufzureinigen wurde der "Nucleobond AX"-Kit der Firma Machery-Nagel GmbH nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die präparierte Vektor-DNA wurde in 200-500 µl sterilem destilliertem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

#### 4.14.7 Bakterielle Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin aus der entsprechenden *E. coli* DH5α Stammkonserve angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 450 ml LB-Medium hinzugefügt und bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,700-0,900 inkubiert. Die Expression erfolgte nach Induktion mit 0,1 mM IPTG bei 30°C und 180 rpm für 2 Stunden. Anschliessend wurde die Bakteriensuspension bei 5000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, das Bakteriensediment auf Eis in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und in ein 30 ml Sorvall Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 2,5 mg Lysozym wurden die Bakterien 30 Minuten auf Eis lysiert. Anschliessend wurden 10 ml Lysispuffer zugegeben. Mit Ultraschall (Ultraschall Sonifier, 2 Sekunden, Stufe 3) wurde die bakterielle DNA fragmentiert. Die unlöslichen Bakterienbestandteile wurden nach Zentrifugation bei 10000 rpm, 4°C für 30 Minuten verworfen. Der Überstand wurde mit 300 µl aufgeschwemmter Glutathion-Sepharose 1:1 (50% (v/v) Glutathion-Sepharose) für 2 Stunden bei 4°C rotiert. Nach der Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 Minuten bei 4°C wurde die Glutathion-Sepharose dreimal mit dem Lysispuffer, zweimal mit Lysispuffer mit 1M NaCl und zweimal mit 50 mM Tris-HCl [pH 7,5] und 150 mM NaCl gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte durch Inkubation der Sepharose mit 200-500 µl Elutionspuffer. Die eluierten Proteine wurden anschliessend 2x für 3 Stunden in 2 L 50 mM Tris-HCl [pH 7,5] bei 4°C dialysiert. Die Lagerung der Proteine erfolgte nach Zugabe von 10% (v/v) Glycerin und Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70 °C.

Lysispuffer:	20 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 0,5% NP40, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 50 $\mu$ M Leupeptin, Trasylol 1:100
Elutionspuffer:	50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM reduziertes Glutathion

## 4.15 Arbeiten mit Hefen

### 4.15.1 LiAc Transformation von *S. cerevisiae* AH109

50 ml YPDA-Medium wurden mit einer Hefekultur zu einer  $OD_{595}$  von 0,010 angeimpft und für 16-18 Stunden bei 30 °C und 250 rpm inkubiert, bis eine  $OD_{595}$  von 0,500 bis 1,500 erreicht war. Die Suspension wurde dann auf eine  $OD_{595}$  von 0,100 ( $3 \cdot 6 \times 10^6$  Zellen/ml) in YPDA-Medium verdünnt und bis zu einer  $OD_{595}$  von 0,500 ( $\sim 1,5 \times 10^7$  Zellen/ml) bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Nach dem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4000 rpm und RT wurde das Hefesediment mit 50 ml TE-Puffer (pro 100 ml Kultur) und anschliessend mit 50 ml (pro 100 ml Kultur) TE/LiAc-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen in 500  $\mu$ l TE/LiAc (pro 100 ml Kultur) resuspendiert und für eine Stunde bei 30°C und 500 rpm im Thermomixer inkubiert.

Vor der Transformation wurde 50-100  $\mu$ g sonifizierte Heringssperma-DNA (DNA Typ XIV) für 20 Minuten bei 100°C denaturiert und anschliessend auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurden 100 ng Vektor-DNA von jedem zu transfizierenden Vektor zugegeben. Das Gesamtvolumen der DNA blieb dabei unter 20  $\mu$ l, um eine Verdünnung des LiAc zu verhindern. 100  $\mu$ l der kompetenten Zellen wurden dann vorsichtig mit der DNA vermischt und 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschliessend wurden 700  $\mu$ l TE/LiAc/PEG pro Transformationsansatz zugegeben und für 45 Minuten bei 30°C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock der Hefezellen für 15 Minuten bei 42°C. Die Zellen wurden dann für 1-3 Minuten auf Eis abgekühlt und bei 4000 rpm 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml YPDA Medium resuspendiert. Danach wurde die Hefesuspension für eine Stunde bei 30°C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, das YPDA-Medium verworfen und die Zellen in TE-Puffer aufgenommen und auf Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert.

YPDA-Medium:	20 g/L Difco Pepton, 10 g/L Hefeextrakt, [pH 5,8], nach dem Autoklavieren supplementiert mit 2% (w/v) Glukose und 0,003% Adenin-Hemisulfat
	für Agarplatten wurde 2% (w/v) Bacto-Agar zugegeben

SD-Medium:	6,7 g/L Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren [pH 5,8], nach dem Autoklavieren supplementiert mit 0,003% Adenin-Hemisulfat, 2% (w/v) Glukose und den jeweiligen 10x Dropout Lösungen für Agarplatten wurde 2% (w/v) Bacto-Agar zugegeben
10x Dropout-Lösung:	20 mg/L Adenin-Hemisulfat, 20 mg/L Arginin-HCl, 20 mg/L Histidin-HCl Monohydrat, 30 mg/L Isoleucin, 100 mg/L Leucin, 30mg/L Lysin-HCl, 20 mg/L Methionin, 50 mg/L Phenylalanin, 200 mg/L Threonin, 20 mg/L Tryptophan, 30 mg/L Tyrosin, 20 mg/L Uracil, 150 mg/L Valin zu Selektionszwecken wurden je nach Anforderung Adenin, Tryptophan, Histidin und Leucin in den Medien weggelassen
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 1 mM EDTA
TE/LiAc/PEG:	8 ml 50% (w/v) PEG 3350; 1 ml 10x TE-Puffer; 1 ml 1 M LiAc [pH 7,5]

#### 4.15.2 Vektor-DNA Präparation aus *S. cerevisiae*

1,5 ml SD-Medium wurden mit jeweils einer Hefekolonie angeimpft und 16-18 Stunden bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Die Kultur wurde 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lysispuffer für Hefen resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Phenol/Chloroform (1:1) und 200 µl Glasperlen wurden die Zellen 2 Minuten gevortext. Anschliessend wurde 5 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert, um die wässrige Phase von der organischen zu trennen. Die wässrige Phase wurde mit 100 µl Chloroform reextrahiert. Der die Vektor-DNA enthaltende wässrige Überstand wurde bei -20 °C gelagert. Für die Elektroporation in *E. coli* DH5α wurden 1-2 µl Überstand verwendet.

Lysispuffer für Hefen: 2,5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 4% (v/v) Triton X-100, 62,5 mM EDTA [pH 8,0]

#### 4.15.3 β-Galaktosidase-Filter-Assay

Kolonien von transformierten Hefen wurden auf Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmedien ausgestrichen und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Anschliessend wurde jeweils ein steriler Filter auf jede Platte gegeben und die Kolonien auf diesen übertragen. Zur Lyse der Hefezellen wurden die Filter 10 Sekunden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Die Filter wurden mit den Kolonien nach oben auf ein in Z-Puffer/X-gal getränktes Whatman Filterpapier gelegt und bei 30°C bis zu 8 Stunden inkubiert, bis sich blau gefärbte Kolonien zeigten. Als Positivkontrolle einer Interaktion im β-Gal-Assay dienen p53 und SV40 T-Ag, exprimiert von den Vektoren pVA3-1 und pTD1-1. Eine Blaufärbung von Kolonien mit diesen Vektoren erfolgte im Allgemeinen nach 2-4 Stunden.

X-gal Lösung:	20 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galacto-pyranosid (X-gal) in Dimethylformamid (DMF)
Z-Puffer:	16,1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 5,5 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,75 g/L KCl, 0,246 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ [pH 7,0]
Z-Puffer/X-gal:	100 ml Z-Puffer, 0,27 ml $\beta$ -Mercaptoethanol, 1,67 ml X-gal Lösung

## 4.16 Nukleinsäure-analytische Methoden

### 4.16.1 Agarose-Gelelektrophorese

Vektoren und DNA-Fragmente wurden auf 0,8-2,0%igen Agarose-Gelen der Abmessung 80x90x7 mm bei 100 V aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer verwendet, und für die Detektion der DNA wurde den Gelen 0,1 mg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Vor dem Auftrag der DNA-Proben auf das Gel wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt. Parallel zu den Proben wurde ein DNA-Größenstandard aufgetrennt. Die Detektion der DNA erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

Agarose-Gele für DNA:	0,8-1,5% Agarose in TAE-Puffer, 1 $\mu$ g/ml Ethidiumbromid
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat [pH 8,0], 1 mM EDTA

### 4.16.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen und RNA-Lösungen wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt (1  $\text{OD}_{260}$  = 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA). Der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  diente dabei als Mass für die Reinheit der DNA und RNA und betrug im Idealfall 1,800 in  $\text{ddH}_2\text{O}$  für DNA und 1,900-2,100 in 10 mM Tris-Puffer für RNA.

### 4.16.3 Quantifizierung von DNA-Mengen im Agarosegel

DNA-Mengen wurden im Agarosegel über einen Vergleich der Fluoreszenzintensität der zu untersuchenden DNA-Bande mit der Fluoreszenzintensität von DNA-Banden der quantifizierten DNA-Größenstandards High Mass DNA Ladder und Low Mass DNA Ladder abgeschätzt. Mit Hilfe eines solchen DNA-Standards konnten DNA-Mengen bis zu 15 ng im Agarosegel quantifiziert werden.

#### 4.16.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel als kleiner Block ausgeschnitten. Die in der wässrigen Phase des Gels enthaltene DNA wurde durch Zentrifugation über ein Glaswolle-Filter für 5 Minuten bei 5000xg von der festen Agarosematrix getrennt. Zu dem Durchfluss wurde das 2,5-fache Volumen Ethanol und  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Kaliumacetat gegeben (Ethanolpräzipitation). Die DNA wurde für 1 Stunde oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt und dann für 30 Minuten bei 14000xg und  $4^{\circ}\text{C}$  pelletiert. Abschliessend wurde die DNA mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in Abhängigkeit von der aufgetrennten DNA-Menge in 10-50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 4.16.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Da die PCR-Produkte in der vorgelegten Arbeit meist in einen Vektor kloniert wurden, enthielten die Primer Restriktionsschnittstellen, die nicht komplementär zu der zu amplifizierenden DNA waren. Diese Schnittstellen erlaubten nach einer Restriktion die gerichtete Klonierung der PCR-Produkte in den entsprechenden Vektor.

PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Die Ausgangsmenge an Matrizen-DNA betrug 50-100 ng. Ein PCR-Ansatz enthielt neben der zu amplifizierenden DNA 5  $\mu\text{l}$  PCR-Puffer (10x), 125  $\mu\text{M}$  dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0,1  $\mu\text{M}$  Oligonukleotid-Primer 1+2, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 Einheit Taq-Polymerase und wurde auf 50  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Die in dieser Arbeit als PCR-Primer eingesetzten Oligonukleotide sind im Abschnitt 4.8 aufgeführt. Die für die Amplifizierung der Fragmente von CK1 $\delta$ , LC2, RanBPM und Snapin verwendeten Kombinationen von Primern sind aus Abschnitt 4.9 ersichtlich.

Alle Amplifikationen fanden in einem DNA-Thermo-Cycler nach folgendem Programm statt:

2 Minuten	94°C	
30 Sekunden	94°C	} 25 Zyklen
30 Sekunden	T <sub>a</sub>	
t <sub>pol</sub>	72°C	
10 Minuten	72°C	

T<sub>a</sub>: "Annealing"-Temperatur, Mittelwert der Schmelztemperaturen der beiden Oligonukleotide abzüglich 5-10°C

t<sub>pol</sub>: Polymerisationsdauer (es wurde eine geschätzte Polymerisationsdauer von 45 Sekunden pro 1000 bp für die Berechnung der t<sub>pol</sub> der einzelnen PCR-Amplifikate zugrunde gelegt)

Im Anschluss an die PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente im Agarosegel analysiert.

PCR-Puffer (10x): 100 mM Tris-HCl [pH 8,3], 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (w/v) Gelatine

#### 4.16.6 Reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Eine RT-PCR wurde durchgeführt, um CK1 $\delta$  cDNA (Ratte) aus RNA-Präparationen aus SV-52 and Rev2 Zellen zu synthetisieren. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus den aufgeführten Zelllinien extrahiert wie in Abschnitt 4.13.8 beschrieben. Für die Erststrangsynthese der cDNA wurde 1  $\mu$ g Gesamt-RNA mit 0.5  $\mu$ g oligo(dT)<sub>15</sub> primer 5 Minuten auf 70°C erhitzt und 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschliessend wurden 5  $\mu$ l AMV Reaktionspuffer, 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 40 Einheiten RNasin®, 4 mM Natriumpyrophosphat und 15 Einheiten AMV Reverse Transkriptase in einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l dazugegeben. Die reverse Transkription wurde für 60 Minuten bei 42°C durchgeführt. Eine 1:50 Verdünnung der Erststrangreaktion wurde in einer Standard-PCR als Matrizen-DNA verwendet. Die Zweitstrangsynthese und die anschliessende Amplifikation der cDNA fand unter Verwendung der Oligonukleotid-Primer 5'CK1 $\delta$ cDNA und 3'CK1 $\delta$ cDNA und den folgenden Bedingungen in einem DNA-Thermo-Cycler statt:

2 Minuten	95°C		
30 Sekunden	95°C	}	25 Zyklen
1 Minute	61,5°C		
2 Minuten	72°C		
10 Minuten	72°C		

Die resultierenden PCR-Produkte CK1 $\delta$ wt und CK1 $\delta$ rev wurden in pCR3.1 ligiert.

AMV Reaktionspuffer 5x: 250 mM Tris-HCl [pH 8,3], 250 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Spermidin, 50 mM DTT

#### 4.16.7 TA-TOPO-Klonierung

Die TA-TOPO-Klonierung ermöglichte die direkte Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pcDNA3.1-V5/His© TOPO®. Die Mengen der für die TOPO-Klonierung verwendeten PCR-Produkte wurden unmittelbar im Anschluss an die PCR-Reaktion im Agarosegel abgeschätzt. In

Anhängigkeit von der Menge des Amplifikats wurden 1-4 µl PCR-Produkt entnommen und nach Angaben des Herstellers in den Vektor pcDNA3.1-V5/His<sup>©</sup> TOPO<sup>®</sup> (pcDNA3.1-V5/His<sup>©</sup> TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit) integriert. Falls für die Amplifikation Vektoren als Matrizen-DNA verwendet wurden, die wie der Vektor pcDNA3.1-V5/His<sup>©</sup> TOPO<sup>®</sup> ein Ampicillin-Resistenzgen trugen, wurde der PCR-Ansatz vor der Klonierung über ein Agarosegel aufgereinigt wie im Abschnitt 4.16.4 beschrieben. Nach der TOPO-Klonierung wurden 2 µl des Reaktionsgemisches für die Transformation in *E. coli* verwendet.

#### 4.16.8 Spaltung von Vektor-DNA durch Restriktions-Endonukleasen

Für die Berechnung der in den Restriktionen benötigten Enzymmenge wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass 1 Einheit Restriktionsenzym ausreicht, um 1 µg DNA innerhalb 1 Stunde zu schneiden. Analytische Restriktionen zur Überprüfung von Minipräp-DNA wurden in 10 µl Reaktionsvolumen mit 3 Einheiten jedes Restriktionsenzym für 1 Stunde bei der für die Restriktionsenzyme optimalen Reaktionstemperatur im optimalen Reaktionspuffer durchgeführt. Anschliessend erfolgte eine Überprüfung der Restriktion im Agarosegel. In präparativen Restriktionen wurden 10-30 µg Vektor-DNA für 2-4 Stunden, in Einzelfällen auch über Nacht, in 100 µl Reaktionsvolumen mit 20-40 Einheiten jedes Restriktionsenzym bei der für die Restriktionsenzyme optimalen Reaktionstemperatur im optimalen Reaktionspuffer inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde im Agarosegel aufgetrennt, dann folgte die Elution aus dem Gel und Aufreinigung wie in Abschnitt 4.16.4 beschrieben.

#### 4.16.9 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um bei der Ligation die Wahrscheinlichkeit einer Religation der Vektor-DNA zu verringern, wurden die Vektoren während der präparativen Restriktion dephosphoryliert. Dazu wurde zu den Restriktionsansätzen während der Restriktion "Shrimp alkaline Phosphatase" (SAP) als DNA-spezifische Phosphatase gegeben und mit der Restriktion inkubiert. Für 5'-überstehende Enden wurden 0,1 Einheiten bei 1 pmol Enden und für 3'-überstehende Enden 0,5 Einheiten bei 1 pmol Enden benötigt (dies entspricht ca. 2,5 µg eines 3 kb grossen Vektors).

#### 4.16.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Vektoren und zu inserierende DNA-Fragmente wurden im molaren Verhältnis von 1:3 mit einer Gesamtmenge an DNA von maximal 200 ng in 30 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Der Reaktions-

ansatz wurde vermischt und nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase über Nacht bei 12°C inkubiert. 2-4  $\mu\text{l}$  der ligierten DNA wurden ohne weitere Aufarbeitung für die Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet.

Ligasepuffer (10x): 660 mM Tris-HCl [pH 7,5], 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 10 mM ATP

#### 4.16.11 Sequenzierung von DNA

Gene, die über eine PCR-Reaktion amplifiziert worden waren, wurden nach der ersten Insertion in einen Zielvektor sequenziert, um die genetische Information der jeweiligen Sequenz zu verifizieren.

Die Sequenzierung der am HPI in Hamburg hergestellten Vektoren erfolgte nach dem Protokoll für den ABI-PRISM Analyser der Firma PE APPLIED BIOSYSTEMS. Von der in Vektor-Minipräparationen und Vektor-Maxipräparationen isolierten DNA wurden 500 ng für die Sequenzierung verwendet. Die DNA wurde mit 5 pmol des entsprechenden Sequenzierungsprimers und 3  $\mu\text{l}$  Big Dye in einem 10- $\mu\text{l}$ -PCR-Ansatz sequenziert.

Die Kettenverlängerung erfolgte nach folgendem Programm in einem DNA-Thermo-Cycler:

10 Sekunden 96°C	}	25 Zyklen
30 Sekunden 50°C		
4 Minuten 60°C		

Im Anschluss an die Sequenzierungsreaktion wurde zu den Reaktionsansätzen 30  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O und 60  $\mu\text{l}$  Isopropanol gegeben und die DNA 30 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert. Die DNA wurde 30 Minuten durch Zentrifugation bei 11000xg pelletiert, mit 70% (v/v) Isopropanol gewaschen und getrocknet.

Die Auswertung wurde im Biochemischen Institut des Universitätskrankenhauses Eppendorf vorgenommen.

Die cDNA-Insertionen der pACT2-Vektoren, die im Yeast Two-Hybrid System für putative Interaktionspartner von CK1 $\delta$ rev kodierten, wurden als Vektor-Minipräparationen in der Abteilung für molekulare und zelluläre Pathologie, Ninewells Hospital, Dundee, Schottland, sequenziert.

Die Sequenzierung der in Ulm hergestellten Vektoren erfolgte durch die Firma GATC Biotech, Konstanz. Von der in Vektor-Minipräparationen und Vektor-Maxipräparationen isolierten DNA wurden 30  $\mu\text{l}$  Volumina (Konzentration 100-200 ng/ $\mu\text{l}$ ) mit 30  $\mu\text{l}$  Volumina des entsprechenden Sequenzierungsprimers (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) an die Firma GATC Biotech AG, Konstanz gegeben.

## 4.17 Proteinbiochemische Methoden

### 4.17.1 Quantifizierung von Proteinmengen

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde der "Bio-Rad Protein Assay" Kit verwendet. 10 µl des zu analysierenden Zellextraktes wurden in 800µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 200µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die OD<sub>595</sub> der Proteinlösung im Spektralphotometer bestimmt. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde bei jeder Messung eine BSA-Eichreihe erstellt. Alternativ wurde der "BCA Protein Assay" Kit (Pierce Biotechnology) benutzt. 10 µl Zellextrakt wurden mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt und nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C im Dunkeln im Mikrotiterplatten-Lesegerät ausgewertet.

### 4.17.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese. Es wurden Gele der Abmessung 90x80x1 mm verwendet. Alle verwendeten Gele bestanden jeweils aus einem Trenngel und einem darüber gegossenen Sammelgel. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Proteine wurden im Sammelgel bei einer Spannung von 80 V konzentriert und im Trenngel bei 200 V getrennt.

SDS-Sammelgelpuffer:	0,1% (w/v) SDS, 4% (w/v) Acrylamid, 130 mM Tris-HCl [pH 6,8]; erst unmittelbar vor dem Giessen der Gele wurden 0,09% (w/v) APS und 0,3% (v/v) TEMED zugegeben
SDS-Trenngelpuffer:	0,1% (w/v) SDS, 10-15% (w/v) Acrylamid, 130 mM Tris-HCl [pH 8,8]; erst unmittelbar vor dem Giessen der Gele wurden 0,05% (w/v) APS und 0,12% (v/v) TEMED zugegeben
SDS-PAGE-Laufpuffer:	250 mM Tris-HCl, 1,9 M Glyzin, 1% (w/v) SDS
5x SDS-Probenpuffer:	250 mM Tris-HCl [pH 6,8], 25% (v/v) β-Mercaptoethanol, 50% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) Bromphenolblau

### 4.17.3 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Die Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurden für 15 Minuten in Coomassie Brilliant Blue Färbelösung angefärbt. Anschliessend wurden die Gele bis zur Entfärbung des Hintergrunds in Coomassie-Entfärbung geschwenkt.

Coomassie-Färbelösung:	1,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 1 L Methanol/ddH <sub>2</sub> O/Eisessig (5:5:1)
Coomassie-Entfärber:	10% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure in ddH <sub>2</sub> O

#### 4.17.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nach der Gelelektrophorese wurden die Polyacrylamidgele 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert und die Proteine dann für 1,5 Stunden bei 60 V in einer Nassblot-Apparatur (Mini-Trans Blot Kammer) aus den Gelen in Richtung Anode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Transferpuffer: 192 mM Glyzin; 50 mM Tris-HCl [pH 8,3]

#### 4.17.5 Immundetektion (Western Blot Analyse)

Auf der Nitrozellulosemembran wurden Proteine durch Immundetektion mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen der Antikörper auf der Membran mit Blockpuffer 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die anschließenden Inkubationen der Membran mit Antikörpern sowie alle Waschschritte unter Ausnahme jener, an die sich unmittelbar die Detektion anschloss, wurden in Blockpuffer durchgeführt. Die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper erfolgte für 45 Minuten bei RT. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten in Blockpuffer wurde die Membran mit dem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten, Spezies-spezifischen sekundären Antikörper für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Verdünnungen der in der Immundetektion eingesetzten primären und sekundären Antikörper und Seren ist in den Tabellen 15 und 16 angegeben. Abschliessend wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Chemilumineszenzsystem, bei dem Luminol durch die Antikörper-gebundene Peroxidase HRP in alkalischer Lösung mit Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Je 10 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 wurden gemischt und die Membran für 1-2 Minuten darin inkubiert. Im Dunkeln wurden dann Röntgenfilme in verschiedenen Zeitintervallen belichtet.

TBS:	10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl
Waschpuffer:	0,05% (v/v) Tween-20 in TBS
Blockpuffer:	5% (w/v) Milchpulver in Waschpuffer

ECL-Lösung 1: 2,5 mM Luminol, 400  $\mu$ M p-Coumarinsäure, 100 mM Tris-HCl [pH 8,5]

ECL-Lösung 2: 13 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl [pH 8,5]

Epitop	Spezies	Verdünnung
CK1 $\delta$	Maus, monoklonal, IC128A	1:5000
CK1 $\delta$	Kaninchen, polyklonales Serum, 108	1:1000
MAP1A	Maus, monoklonal	1:2000
RanBPM	Kaninchen, polyklonales Serum CGV1	1:200
Snapin	Kaninchen, polyklonales Serum CGW4	1:100
V5-tag	Maus, monoklonal	1:5000

Tabelle 15: Verdünnung der in der Immundetektion verwendeten primären Antikörper.

Epitop	Spezies	Verdünnung
Kaninchen-Ig	Ziege, polyklonal, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	1:5000
Maus-Ig	Ziege, polyklonal, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	1:5000

Tabelle 16: Verdünnung der in der Immundetektion verwendeten sekundären Antikörper

#### 4.17.6 Immunpräzipitation

Vor der Immunpräzipitation wurden zunächst die Proteinkonzentrationen von Proteinlösungen und Zelllysaten nach der BCA-Methode oder der Bradford-Methode quantifiziert. Danach wurde der spezifische Antikörper und 50  $\mu$ l Protein A-Sepharose (1:1 in PBS aufgeschwemmt) zu den Proteinlösungen oder Zellextrakten gegeben, nachdem die Proteinmengen angeglichen worden waren. Nach zweistündiger Inkubation bei langsamer Rotation bei 4°C wurden die an PAS gebundenen Immunkomplexe 5 Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die an PAS gebundenen Immunkomplexe wurden dreimal bis fünfmal in NP40-Lysispuffer gewaschen und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion der immunpräzipitierten Proteine mit spezifischen Antikörpern im Western Blot.

#### 4.17.7 *In vitro* Transkription/Translation

Um Proteine mit Hilfe von Vektoren mit T7-Promotor zu synthetisieren, wurde der TNT-Retikulozytenextrakt der Firma Promega nach den Angaben des Herstellers verwendet. Um die Proteine in der Autoradiographie detektieren zu können, wurde dem TNT-Retikulozytenextrakt [<sup>35</sup>S]-Methionin zugesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt 25  $\mu$ l Kaninchen-Retikulozytenlysate, 2  $\mu$ l Reaktionspuffer, 1  $\mu$ l T7-Polymerase, 1 mM Aminosäuremix ohne Methionin, 20  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]-

Methionin, 40 Einheiten RNasin® Ribonuklease Inhibitor und 1 µg DNA in 50 µl Gesamtvolumen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der T7-Polymerase gestartet und für 1,5 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschliessend wurde der Reaktionsansatz mit 20% (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.17.8 *In vitro* Kinasierung von Proteinen

In Versuchen zur *in vitro* Kinasierung wurden verschiedene Proteine und Peptide als potentielle Substrate für CK1δ untersucht. Pro Ansatz von 20 µl wurden 0,2 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, 20-100 µM ATP und 0,5-1 µg des jeweiligen Substrats in Kinasepuffer mit 100-500 Einheiten einer C-terminal verkürzten CK1δ (Kinasedomäne, NEB) inkubiert. Alternativ zur Kinasedomäne wurden 2 µl von FPLC-Fractionen als Enzym-haltige Lösung in die Reaktionsansätze gegeben. Die Kinasereaktionen wurden durch Zugabe der Kinase gestartet und nach 30 Minuten bei 30°C mit 5 µl 6xSDS-Probenpuffer abgestoppt.

Eine Einheit CK1δ katalysiert den Transfer von 1 pmol Phosphat auf das Peptid KRRRALS(P)VASLPGL (70 µM) in 1 Minute bei 30°C in einem Reaktionsvolumen von 25 µl (Definition der Einheit).

*In vitro* Kinasierungsreaktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Färben und Entfärben wurden die Gele getrocknet. Die Quantifizierung erfolgte durch Cherenkov-Zählung der ausgeschnittenen Proteinbanden im Szintillationszähler. Gemessen wurden die Zerfälle pro Minute („Counts per minute“, cpm), die als relatives Mass für die Intensität der Phosphorylierung dienen. Alternativ wurden die Gele nach dem Trocknen auf Phospho-Imager Folien exponiert, und die Intensität der Phosphorylierung wurde durch Messung der Photonen-stimulierten Lumineszenz pro mm<sup>2</sup> (PSL/mm<sup>2</sup>) bestimmt, gemessen mit dem Fujix BAS-2000 Lesegerät.

Kinasepuffer (10x): 1 mM ATP, 250 mM Tris-HCl [pH 7,5], 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA

#### 4.17.9 Autoradiographie radioaktiv markierter Proteine

Mit [<sup>35</sup>S]-Methionin oder [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP markierte Proteine wurden auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Auftrennung der Proteine wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue Färbelösung gefärbt und bis zur Entfärbung des Hintergrunds in Coomassie-Entfärber geschwenkt.

Für die Darstellung von [<sup>35</sup>S]-Methionin markierten Proteinen wurden die Gele vor dem Trocknen 10 Minuten in Eisessig dehydriert und dann 15 Minuten mit 20 % (w/v) 2,5-Diphenyloxazol (PPO) in Essigsäure geschwenkt. Das PPO im Gel wurde für 10 Minuten mit Leitungswasser gefällt. Die Gele wurden anschliessend unter Vakuum getrocknet und zur Detektion der Proteine auf einem Röntgenfilm exponiert.

#### 4.17.10 Proteinfractionierung durch FPLC

Um die *in vitro* Kinaseaktivität von CK1δ in zellulären Extrakten zu bestimmen, wurden Zellextrakte von SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen in FPLC-Lysispuffer hergestellt wie in Abschnitt 4.13.7 beschrieben und zunächst die relativen Proteinmengen der Extrakte nach Bradford bestimmt. Äquivalente Mengen an Protein wurden mit FPLC-Lysispuffer auf 1 ml aufgefüllt und durch einen 0,22 µm Filter auf eine Mini Q oder Resource Q Anionenaustauschersäule gegeben, die an ein FPLC-System (entweder ÄKTApurifier oder EttanLC) angeschlossen war. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten aufsteigender Konzentration im Bereich von 50 bis 550 mM. Es wurden jeweils 0,5 ml (ÄKTApurifier) bzw. 0,2 ml Fraktionen (EttanLC) gesammelt. 2 µl Aliquots der Fraktionen wurden in Versuchen zur *in vitro* Kinasierung von Substraten durch CK1δ eingesetzt. Zur Immundetektion von CK1δ wurden die Fraktionen im Vakuum auf 100 µl bzw. 40 µl eingeeengt, mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten bei 100°C denaturiert und 20 µl jeder Fraktion in der SDS-PAGE aufgetrennt.

FPLC-Puffer A: 50 mM Tris-HCl [pH 7,0], 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5% (v/v) Glycerin, 0,03% Brij (w/v), 0,1% (v/v) β-Mercapthoethanol, 50 µM Leupeptin, 1% (v/v) Trasylol (Aprotinin)

FPLC-Puffer B: wie Puffer A, zusätzlich 1 M NaCl

#### 4.17.11 Probenvorbereitung für die zweidimensionale Phosphopeptidanalyse

Nach der Markierung von Proteinen mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP in den *in vitro* Kinasierungen wurden die Phosphoproteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Nach dem Transfer wurden die Proteinbanden mit Hilfe eines Autoradiogramms identifiziert und aus der Membran ausgeschnitten. Die Membranstücke wurden für 30 Minuten bei 37°C in 5% Polyvinylpyrrolidon (PVP) in ddH<sub>2</sub>O abgesättigt und anschliessend mit 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gewaschen. Die tryptische Spaltung und die Elution der Phosphopeptide aus den Membranstücken erfolgte in 150 µl 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> mit 10 µg TPCK-Trypsin und 10 µg BSA für 4 Stunden bei RT und dann nach Zugabe von 10 µg zusätzlichem Trypsin für weitere 3 Stunden. Die Eluate

wurden zur Abtrennung von Verunreinigungen 15 Minuten bei 10000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und über Nacht in der Speedvac lyophilisiert. Das Pellet wurde 2 Stunden auf Eis mit 50 µl Perameisensäure oxidiert. Die Oxidation wurde durch Zugabe von 1 ml H<sub>2</sub>O abgestoppt. Die Proben wurden lyophilisiert und nach der Aufnahme in 100 µl pH 3,6-Puffer erneut lyophilisiert. Die Radioaktivität der getrockneten Peptide wurde mittels Cherenkov-Zählung bestimmt. Abschliessend wurden die Peptide in pH 3,6-Puffer aufgenommen und für die zweidimensionalen Phosphopeptidanalysen verwendet.

Perameisensäure: 10% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 90% (v/v) Ameisensäure, 1 Stunde bei RT im Dunkeln vorinkubiert

pH 3,6-Puffer: Essigsäure/Pyridin/H<sub>2</sub>O (10:1:289)

#### 4.17.12 Zweidimensionale Phosphopeptidanalyse

Die radioaktiv markierten Peptide wurden mit einer Oxford-Pipette auf eine Dünnschichtchromatographie(DC)-Platte aus Zellulose (20x20 cm) aufgetragen. Das Auftragen eines Farbmärkers am unteren Rand der DC-Platten ermöglichte es, den Stromfluss in der Elektrophorese und damit die Wanderung der Peptide im elektrischen Feld zu überprüfen. Die Platte wurde vor der Elektrophorese mit pH 1,9-Puffer angefeuchtet und mit Pufferbrücken aus Whatman-Papier der Stromkreis von den Elektrodenkammern über die DC-Platte geschlossen. Die Peptide wurden elektrophoretisch bei 15°C, 1-1,5 bar und 1200V in 20 Minuten in einer Hoch-Volt Elektrophoresekammer aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die DC-Platte getrocknet, anschliessend erfolgte die Auftrennung der Peptide in der zweiten Dimension chromatographisch in Chromatographiepuffer in ca. 12 Stunden. Nach der Chromatographie wurden die Platten 24 Stunden getrocknet und anschliessend auf einem Röntgenfilm exponiert.

pH 1,9-Puffer: Ameisensäure/Essigsäure/Pyridin/ddH<sub>2</sub>O (60:12,5:2,5:925), [pH 1,9]

Chromatographiepuffer: n-Butanol/Essigsäure/Pyridin/ddH<sub>2</sub>O (75:15:50:60), [pH 5,2]

Farbmarker: 5 mg/ml DNP-Lysin, 1 mg/ml Xylencyanol FF

#### 4.18 Computerprogramme

Bildverarbeitung:	Photoshop 5.0 Image J
Bilddokumentation:	DM-RA: Spot IX-70: Tillvision IX-81: Cell^R
Literaturverwaltung:	EndNote 6.0

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Identifizierung von Interaktionspartnern der Proteinkinase CK1 $\delta$ im Yeast Two-Hybrid System

Die Casein Kinasen 1 sind eine Familie ubiquitär exprimierter Proteinkinasen, die in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert ist (zur Übersicht: (Gross & Anderson, 1998)). Allerdings ist wenig bekannt im Hinblick auf zelluläre Strukturen und Proteine, die mit CK1 interagieren und dadurch die Aktivität und/oder die Lokalisation der Kinasen beeinflussen. Die Identifikation von Proteinen, die mit CK1 interagieren, ermöglicht es, erste Hinweise zu erhalten auf bisher nicht oder nicht im Detail beschriebene Signaltransduktionsvorgänge, an denen CK1 beteiligt ist. Um Einblicke in zelluläre Signaltransduktionswege zu erhalten, in die die CK1 Isoform CK1 $\delta$  involviert ist, sollten in dieser Arbeit daher neue, bisher nicht in der Literatur beschriebene Protein-Interaktionspartner von CK1 $\delta$  identifiziert werden.

#### 5.1.1 Einführung in die Funktionsweise des Yeast-Two-Hybrid Systems

Für die Identifikation neuer Interaktionspartner von CK1 $\delta$  wurde das Matchmaker 3 Yeast Two-Hybrid (YTH) System von Clontech verwendet, ein genetisches System zum *in vivo* Nachweis von Protein-Interaktionen in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Grundlage dieses Systems ist die modulare Struktur eukaryontischer Transkriptionsfaktoren. Viele Transkriptionsfaktoren bestehen im Wesentlichen aus zwei funktionell und strukturell voneinander unabhängigen Domänen: die DNA-Bindungsdomäne vermittelt die Bindung des Transkriptionsfaktors an definierte DNA-Konsensus-Sequenzen im Promotorbereich, die Transaktivierungsdomäne die Interaktion mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie (Keegan *et al.*, 1986). Beide Domänen sind in der Regel auch dann korrekt gefaltet und voll funktionsfähig, wenn sie jeweils als Fusionsproteine mit anderen Proteinen in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Im Matchmaker 3 YTH System wird das Protein GAL4 als ein solcher transkriptioneller Aktivator in *S. cerevisiae* verwendet. Wenn beide Domänen von GAL4 zusammen in *S. cerevisiae* exprimiert werden, erfolgt zunächst keine Transaktivierung GAL4-responsibler Promotoren, da die Domänen nicht in physischen Kontakt zueinander kommen (Abb. 5A). Werden die beiden Domänen dagegen als Fusionsproteine (Hybride) mit zwei verschiedenen Proteinen exprimiert, die miteinander interagieren, werden durch die physische Interaktion der beiden Fusionsproteinanteile die DNA-Bindungsdomäne und die Transaktivierungsdomäne von GAL4 in räumliche Nähe gebracht, und die Aktivierung von Promotoren mit Erkennungssequenzen für GAL4 (GAL4 UAS: GAL4 Upstream Activating Sequence) kann erfolgen (Abb. 5B) (Fields & Song, 1989).

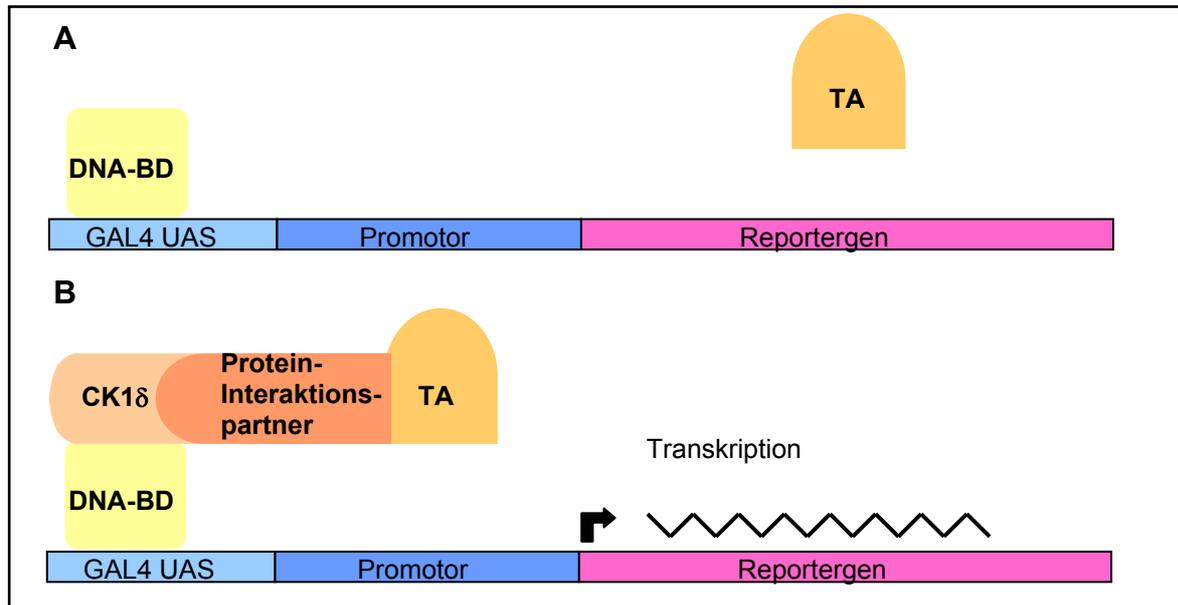


Abb. 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Yeast Two-Hybrid Systems.

A: Die Expression der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und der Transaktivierungsdomäne (TA) von GAL4 in *S. cerevisiae* führt nicht zur Transaktivierung GAL4-responsibler Promotoren, da die Domänen nicht in physischen Kontakt zueinander kommen.

B: Durch die Expression der DNA-Bindungsdomäne und der Transaktivierungsdomäne von GAL4 als Fusionsproteine mit zwei verschiedenen Proteinen, die miteinander interagieren, hier am Beispiel der Proteine CK1 $\delta$  und eines putativen Protein-Interaktionspartners dargestellt, werden die beiden Domänen in räumliche Nähe gebracht. Die Expression von Reportergenen, die unter der Kontrolle von Promotoren mit Erkennungssequenzen für GAL4 stehen, wird aktiviert.

GAL4 UAS: GAL4 responsibles Element, DNA-BD: DNA-Bindungsdomäne, TA: Transaktivierungsdomäne

Im Matchmaker 3 YTH System wird zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen der *S. cerevisiae* Stamm AH109 verwendet. Dieser Hefestamm besitzt drei verschiedene Reportergen-Konstrukte, die unter der Kontrolle von komplett heterologen, unterschiedlich stringenten Promotoren stehen. Die Verwendung von zwei Nährstoffmarkern (Komplementierung von Auxotrophien für Adenin und Histidin) und einem zusätzlichen genetischen Marker ( $\beta$ -Galaktosidase-Genexpression) ermöglicht eine stringente Selektion positiver Klone und reduziert die Wahrscheinlichkeit des Auftretens falsch positiver Klone. Die Expression der Fusionsproteine erfolgt konstitutiv unter dem Alkohol-Dehydrogenase Promotor (ADH1 Promotor).

### 5.1.2 Isolierung von Interaktionspartnern von CK1 $\delta$ im Yeast Two-Hybrid System

Für die Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern von CK1 $\delta$  wurden kommerziell erhältliche cDNA-Banken aus humanem Knochenmark (hbm) und murinem Hoden (mt) im Hefe-Expressionsvektor pACT2 (Matchmaker 3, Clontech) verwendet. Im Folgenden wird die

Gesamtheit dieser Vektoren als pACT2-hbm bzw. als pACT2-mt bezeichnet. Der Vektor pACT2 exprimiert die in der cDNA-Bank kodierten, unbekannt Proteine als C-terminale Fusionsproteine mit der transaktivierenden Domäne des Proteins GAL4. pACT2 trägt ein Ampicillin-Resistenzgen ( $Amp^r$ ) als Selektionsmarker in *E. coli* und den LEU2 Nährstoffmarker für die Selektion in *S. cerevisiae*. Als sogenanntes „Köder“-Protein wurde eine CK1 $\delta$  Mutante mit reduzierter Kinaseaktivität eingesetzt, um zytotoxische Effekte auszuschliessen, die bei der Überexpression von Wildtyp-Kinasen häufig auftreten. Die cDNA-Synthese und die Eigenschaften dieser mutanten Kinase CK1 $\delta$ rev sind im Abschnitt 5.3 näher beschrieben. Die cDNA von CK1 $\delta$ rev wurde in der PCR unter Verwendung der Primer 5'CK1 $\delta$ -1 und 3'CK1 $\delta$ -428 amplifiziert und in die *Nco*I und *Sal*I Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGBKT7 integriert (Vektor pGBKT7-CK1 $\delta$ rev), von dem CK1 $\delta$ rev in *S. cerevisiae* als C-terminales Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne des Proteins GAL4 exprimiert werden konnte.

Um auszuschliessen, dass das „Köder“-Protein CK1 $\delta$ rev die Expression der Reportergene HIS3, ADE2 und lacZ autonom aktivierte, wurde der Vektor pGBKT7-CK1 $\delta$ rev zunächst mit dem Vektor pGADT7, der nur die transaktivierende Domäne des Proteins GAL4 exprimiert, in den Hefestamm AH109 kotransformiert. Die Transformationen wurden auf selektive Synthetic Dropout-Medien (SD-Medien) ohne Trp und Leu (SD/-Trp/-Leu) plattiert, um auf Transformanden mit den Vektoren pGBKT7 und pGADT7 zu selektieren. Anschliessend wurden die Transformanden auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade überstrichen. Es wuchsen keine Kolonien auf den selektiven Platten, wenn pGBKT7-CK1 $\delta$ rev mit pGADT7 in AH109 transformiert wurde (Test auf Autoaktivierung). Die Transformanden wurden zusätzlich auf SD/-Trp/-Leu überstrichen und im  $\beta$ -Galaktosidase-Filter-Assay ( $\beta$ -Gal-Assay) auf Aktivierung des lacZ Reportergens untersucht. Nach der Kotransformation von pGBKT7-CK1 $\delta$ rev und pGADT7 konnte nach 12 Stunden Inkubation keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität detektiert werden.

Um nach Interaktionspartnern von CK1 $\delta$ rev zu suchen, wurden jeweils 100  $\mu$ g der Vektoren pGBKT7-CK1 $\delta$ rev und pACT2-hbm bzw. pACT2-mt in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert. Die Transformationen wurden für eine mittelstringente Selektion zunächst auf SD/-Trp/-Leu/-His plattiert, um auch schwache Protein-Protein-Interaktionen detektieren zu können. Die Transformanden wurden dann bis zu 10 Tage nach der Transformation für eine stringente Wachstums-Selektion auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade überstrichen und nach 2 Tagen einem  $\beta$ -Gal-Assay unterzogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden etwa 400 positive Klone isoliert, die potentielle Interaktionspartner von CK1 $\delta$  exprimierten. Die pACT2-Vektoren dieser Klone wurden aus den jeweiligen Hefe-Kolonien isoliert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  elektroporiert. Die pACT2-Vektoren wurden aus *E. coli* isoliert und die Vektor-Minipräparationen von jeweils drei *E. coli* Klonen mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Xho*I gespalten, um die Grösse der inserierten cDNAs zu dokumentieren und zu überprüfen, ob mehrere pACT2-Vektoren in einer positiven AH109

Kolonie enthalten waren. Anschliessend wurden die isolierten pACT2-Vektoren erneut mit pGBKT7-CK1 $\delta$ rev in den Hefestamm AH109 kotransformiert (Rekonstruktion). Die Rekonstitution sollte eine mögliche Reversion des Hefestamms AH109 im Verlauf der Selektion positiver Klone ausschliessen. Infolge einer Reversion hätte AH109 unter Umständen die Fähigkeit wiedererlangen können, ohne eine Interaktion des unbekanntem exprimierten Proteins des pACT2 Vektors mit CK1 $\delta$ rev auf den selektiven Medien zu wachsen. Durch die Rekonstitution konnte weiterhin festgestellt werden, ob bei einer möglichen Transformation von mehreren verschiedenen pACT2-Vektoren in eine Hefezelle der Interaktionspartner von CK1 $\delta$ rev tatsächlich von dem isolierten Vektor exprimiert wurde. Es wurden je drei Klone der rekonstruierten Hefestämme auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade ausgestrichen und auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität überprüft. Darüber hinaus wurde für alle unbekanntem Proteine eine Autoaktivierung der Reportergene HIS3, ADE2 und lacZ ausgeschlossen.

### **5.1.3 Identifizierung der unbekanntem Interaktionspartner von CK1 $\delta$ rev durch Sequenzierung der cDNAs der pACT2-Vektoren**

Zur Identifikation der mit CK1 $\delta$ rev interagierenden Proteine wurden die cDNAs von allen isolierten pACT2-Vektoren, die keine autonom aktivierenden Proteine exprimierten und reproduzierbar eine vergleichsweise starke Interaktion mit CK1 $\delta$ rev zeigten, zunächst mit dem Primer 5'pACT2 ansequenziert. Die DNA-Sequenzdaten wurden unter Verwendung des Programms „Translate“ (ExpASY Molecular Biology Server) in Aminosäure-Sequenzen translatiert und mit dem Programm „Protein Blast“ (NCBI) mit verschiedenen Datenbanken verglichen. Von den kodierten Peptiden bzw. Proteinen wurden insgesamt 3 in dieser Arbeit näher charakterisiert. Unter Verwendung zusätzlicher Primer wurden die cDNAs der zugehörigen pACT2-Vektoren zunächst vollständig sequenziert.

#### **5.1.3.1 Identifizierung der leichten Kette LC2 des humanen Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP1A als Interaktionspartner von CK1 $\delta$ rev**

Die inserierte cDNA des Vektors pVI5 kodierte für ein C-terminales Fragment des humanen Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A (MAP1A), dass als C-terminaler Bereich der leichten Kette 2 (LC2) beschrieben wurde. LC2 entsteht vermutlich durch proteolytische Prozessierung eines MAP1A Polyproteins aus der N-terminalen schweren Kette, konventionell als MAP1A im engeren Sinn bezeichnet, und der C-terminalen leichten Kette LC2 (Langkopf *et al.*, 1992; Fink *et al.*, 1996). Die in dieser Arbeit verwendete Nummerierung auf DNA- und Proteinebene orientierte sich an der Sequenz des MAP1A Polyproteins, da die exakte Position der proteolytischen Spaltung nicht

bekannt ist (Mann & Hammarback, 1994). Zur vollständigen Sequenzierung wurden die Primer 5'pACT2, 5'LC2-3 und pACT2-RP verwendet. Der Vergleich der cDNA- bzw. Aminosäuresequenz erfolgte zum Zeitpunkt der Auswertung mit den einzigen vorliegenden Datenbank-Einträgen der Zugangsnummern U38292 (DNA) bzw. AAB41133 (Aminosäuresequenz), publiziert von Fink *et al.*, 1996. Die genauen Basenpaare bzw. Aminosäurereste (AS) der publizierten Sequenzen waren nicht an allen Positionen definitiv bestimmt. Der aus dem Vektor pVI5 stammenden cDNA von MAP1A LC2 fehlten am 5'-Ende die ersten 7881 Basenpaare (bp) im Vergleich zur vollständigen cDNA des human MAP1A Polyproteins. Die Position 1 der cDNA entsprach der Base 7882 der kodierenden Sequenz des humanen MAP1A Polyproteins. Das im YTH System identifizierte Protein, im Folgenden als LC2-F bezeichnet, bestand somit aus den letzten 176 AS des humanen MAP1A Polyproteins bzw. des humanen LC2. An Position 8261-8266 wurde ausserdem eine Deletion von insgesamt 6 bp festgestellt, die zu einer „in frame“ Deletion der AS an Position 2754 und 2755 führte. Ein Vergleich mit der entsprechenden Sequenz aus der Datenbank zeigte, dass diese Deletion für die MAP1A Sequenz aus der Ratte beschrieben wurde (gi:205537, Zugangsnummer M83196). Somit wird in dieser Arbeit erstmals eine neue putative Form der humanen MAP1A Sequenz beschrieben. Die Sequenz von Fink *et al.* wurde am 18.3.2004 durch den Datenbank-Eintrag der Zugangsnummer NM\_002373 (DNA) bzw. NP\_002364 (Aminosäuresequenz) ersetzt. In dieser Sequenz liegt bei Nummerierung entsprechend des Datenbank-Eintrags an Position 8473-8475 der cDNA-Sequenz ein Stop-Kodon vor, das resultierende Protein endet somit an Position 2680 der Aminosäuresequenz. Des Weiteren ist die Deletion einer Base an Position 8466 beschrieben, die zu einem Austausch der letzten beiden AS an Position 2679 und 2680 führt. In Abbildung 6A ist ein Vergleich der cDNA-Sequenz aus dem Vektor pVI5 mit den Sequenzen aus der Datenbank zu sehen. Abbildung 6B zeigt einen Vergleich der in Aminosäuresequenz translatierten cDNA-Sequenz des Vektors pVI5 mit dem humanen Protein MAP1A entsprechend der beiden beschriebenen Sequenzen.

## A

pVI5	1	--CGCTCACCCACCCCTGGTAAAGGGCCTGCAGATCGAGCATCCCGGGCCCCACCTCGAC	58
U38292	7880	AACGCTCACCCACCCCTGGTAAAGGGTCTGNAGATCGAGTATCCCGNCCCCANCTCGAT	7939
NM_002373	8312	AACGCTCACCCACCCCTGGTAAAGGGCCTGCAGATCGAGCATCCCGGGCCCCACCTCGAC	8371
pVI5	59	CACGCAGCACCACAAGCCAGGTCACCCAGCAGAGGAAAAGGATGGACACAGCCCCATGT	118
U38292	7940	CACGNAGTANCAACAAGCCAGGTCACCCAGCAGAGGAAAAGGATGGACACAGCCCCATGT	7999
NM_002373	8372	CACGCAGCACCACAAGCCAGGTCACCCAGCAGAGGAAAAGGATGGACACAGCCCCATGT	8431
pVI5	119	CCAAAGGCCTAGTCAATGGACTCAAGGCAGGACCAATGGCCTTGAGTTCCAAGGGCAGCT	178
U38292	8000	CCAAAGGYCTAGTCAATGGACTCAAGGCAGGACCAATGGCCTTGAGTTCCAAGGGCAGCT	8059
NM_002373	8432	CCAAAGGCCTAGTCAATGGACTCAAGGCAGGACCAATGGCCTTCAATTCCAAGGGCAGCT	8490
pVI5	179	CTGGTGCCCTGTATATGTGGATCTCGCCTACATCCCGAATCATTGCAGTGGCAAGACTG	238
U38292	8060	CTGGTGCCCTGTATATGTGGATCTCGCCTACATCCCGAATCATTGCAGTGGCAAGACTG	8119
NM_002373	8491	CTGGTGCCCTGTATATGTGGATCTCGCCTACATCCCGAATCATTGCAGTGGCAAGACTG	8550
pVI5	239	CTGACCTTGACTTCTTCCGTCGAGTGCCTGCATCCTACTATGTGGTCAGTGGGAATGACC	298
U38292	8120	CTGACCTYGACTTCTTCCGTCGAGTGCCTGCATCCTACTATGTGGTCAGTGGGAATGACC	8179
NM_002373	8551	CTGACCTTGACTTCTTCCGTCGAGTGCCTGCATCCTACTATGTGGTCAGTGGGAATGACC	8610

pVI5	299	CTGCCAATGGCGAGCCAAGCCGGGCTGTGCTGGATGCCCTGCTGGAGGGCAAGGCCAGT	358
U38292	8180	CTGCCAATGGCGAGCCAAGCCGGGCTGTGCTGGATGCCCTGCTGGAGGGCAAGGCCAGT	8239
NM_002373	8611	CTGCCAATGGCGAGCCAAGCCGGGCTGTGCTGGATGCCCTGCTGGAGGGCAAGGCCAGT	8670
pVI5	359	GGGGGAGAATCTTCAGGTGA-----CTCTGATCCCTACTCATGACACGGAGGTGACTC	412
U38292	8240	GGGGGAGAATCTTCAGGTGAAGGTGACTCTGATCCCTACTCATGACACGGAGGTGACTC	8299
NM_002373	8671	GGGGGAGAATCTTCAGGTGA--GTGACTCTGATCCCTACTCATGACACGGAGGTGACTC	8728
pVI5	413	GTGAGTGGTACCAACAAACTCATGAGCAGCAGCAACAACGAATGTCCTGGTCCCTGGCTA	472
U38292	8300	GTGAGTGGTACCAACAAACTCATGAGCAGCAGCAACAACGAATGTCCTGGTCCCTGGCTA	8359
NM_002373	8729	GTGAGTGGTACCAACAAACTCATGAGCAGCAGCAACAACGAATGTCCTGGTCCCTGGCTA	8788
pVI5	473	GCAGCAGCACCGTGGTGTGTCAGGATGAGTCCTTCCCTGCCTGCAAGATTGAGTTCTGAA	532
U38292	8360	GCAGCAGCACCGTGGTGTGTCAGGATGAGTCCTTCCCTGCCTGCAAGATTGAGTTCTGA-	8418
NM_002373	8789	GCAGCAGCACCGTGGTGTGTCAGGATGAGTCCTTCCCTGCCTGCAAGATTGAGTTCTGAA	8848
pVI5	533	AGAGCCGCCCTCCCTTCCCAAGGATCCACTCCCCAGCTCCTTTAGAGAATGGCTACTG	592
U38292		-----	
NM_002373	8849	AGAGCCGCCCTCCCTTCCCAAGGATCCACTCCCCAGCTCCTTTAGAGAATGGCTACTG	8908
pVI5	593	CTGAGTCCTTTGGGGTTGAGGGAGATGGGAGCTAGGGGGAGGGAGGAGATGTCTTGTT	652
U38292		-----	
NM_002373	8909	CTGAGTCCTTTGGGGTTGAGGGAGATGGGAGCTAGGGGGAGGGAGGAGATGTCTTGTT	8968
pVI5	653	GTGGGGACTTGGGCTGGGCTAAATGGGAGGGGTTGTCCCTCCCCATCATCCATTCTGTG	712
U38292		-----	
NM_002373	8969	GTGGGGACTTGGGCTGGGCTAAATGGGAGGGGTTGTCCCTCCCCATCATCCATTCTGTG	9028
pVI5	713	AGGTGTCTCAAACCAAAGTTAACAGGGAGAGGATGGGGAGGGGACAAATTAGAATAGGA	772
U38292		-----	
NM_002373	9029	AGGTGTCTCAAACCAAAGTTAACAGGGAGAGGATGGGGAGGGGACAAATTAGAATAGGA	9088
pVI5	773	TAGCATCTGATGCCTGAGAACCCTCTCCTAGCACTGTCAAATGCTGGTATTGAATGGGGA	832
U38292		-----	
NM_002373	9089	TAGCATCTGATGCCTGAGAACCCTCTCCTAGCACTGTCAAATGCTGGTATTGAATGGGGA	9148
pVI5	833	CTGAGGATGGGTCTCAGAGAGCAACCTCCTCCCTCGTAGAGGGAGATTATATCCCCAACT	892
U38292		-----	
NM_002373	9149	CTGAGGATGGGTCTCAGAGAGCAACCTCCTCCCTCGTAGAGGGAGATTATATCCCCAACT	9208
pVI5	893	CCAGGGACCTCTTTATCTCAATCTATTTATTTGGCATCCTGGGAAGGATTTCCAATAGTA	952
U38292		-----	
NM_002373	9209	CCAGGGACCTCTTTATCTCAATCTATTTATTTGGCATCCTGGGAAGGATTTCCAATAGTA	9268
pVI5	953	ATTTATGTGACCTGGCAGGATACCGTCAGTGAGGTGCCAGAGCTGCACCCTTTCCTC	1012
U38292		-----	
NM_002373	9269	ATTTATGTGACCTGGCAGGATACCGTCAGTGAGGTGCCAGAGCTGCACCCTTTCCTC	9328
pVI5	1013	CATTTCCCATCCCCATCTCCTCAACCACCAGGGTCTGAGTTCTAGCAGGGTCTGGGGG	1072
U38292		-----	
NM_002373	9329	CATTTCCCATCCCCATCTCCTCAACCACCAGGGTCTGAGTTCTAGCAGGGTCTGGGGG	9388
pVI5	1073	TATCCCCTGCTATACTGTTCTACTGCTTCCCTCAGTATCTGAATGTCTCAATTTAAA-C	1131
U38292		-----	
NM_002373	9389	TATCCCCTGCTATACTGTTCTACTGCTTCCCTCAGTATCTGAATGTCTCAATTTAAA-A	9448
pVI5	1132	TTGAAGCTCTTTAGACCAATAGACTGGTGAGAGGAGAAAGGAGCTTATCCCCAGACCCT	1191
U38292		-----	
NM_002373	9449	TTGAAGCTCTTTAGACCAATAGACTGGTGAGAGGAGAAAGGAGCTTATCCCCAGACCCT	9508
pVI5	1192	GCTTTATACCATTACATCCCAGGGCTGTGTCCAGACAGCACAAAACGGCAAGGAGAGCC	1251
U38292		-----	
NM_002373	9509	GCTTTATACCATTACATCCCAGGGCTGTGTCCAGACAGCACAAAACGGCAAGGAGAGCC	9568
pVI5	1252	CAAGCCCCAATGCCAGAATTCTTCCAACTCCCTGACTCTTTGAAGTTTTTACTCACCCC	1311
U38292		-----	
NM_002373	9569	CAAGCCCCAATGCCAGAATTCTTCCAACTCCCTGACTCTTTGAAGTTTTTACTCACCCC	9628
pVI5	1312	ATTTCAATTATCCTGATCCCTTCTCATCCCCTGCTTGGCTTCTCTGCATGTGGTCATCTG	1371
U38292		-----	
NM_002373	9629	ATTTCAATTATCCTGATCCCTTCTCATCCCCTGCTTGGCTTCTCTGCATGTGGTCATCTG	9688

```

pVI5      1372 CTGTGGCTTGGTGTTTAATGGGTAAAAATAAGCCACTGCCTGACATCCCAACATTTGAC 1431
U38292    -----
NM_002373 9689 CTGTGGCTTGGTGTTTAATGGGTAAAAATAAGCCACTGCCTGACATCCCAACATTTGAC 9748

pVI5      1432 ACCCCAGCAATGTGTGACTCCCCAACATTCCTATGCCATCCTGCAGTGAAATGGGA 1491
U38292    -----
NM_002373 9749 ACCCCAGCAATGTGTGACTCCCCAACATTCCTATGCCATCCTGCAGTGAAATGGGA 9808

pVI5      1492 AACTGGCTGCCTCTCCAAACCCGCTCTTGGACAGAGGATCTGGGAGGTGGAAGCCAGGC 1551
U38292    -----
NM_002373 9809 AACTGGCTGCCTCTCCAAACCCGCTCTTGGACAGAGGATCTGGGAGGTGGAAGCCAGGC 9868

pVI5      1552 CAGAGGACTTGGGGAAAAATGAGATGGAGGAAGGAAAAGGGAGAAGCTGAGCCACAGCTT 1611
U38292    -----
NM_002373 9869 CAGAGGACTTGGGGAAAAATGAGATGGAGGAAGGAAAAGGGAGAAGCTGAGCCACAGCTT 9928

pVI5      1612 AACTCCTACAGAGTGAAATGAAAACGGGCTGAAAATACCACCCCAGGAGGACCTCGCC 1671
U38292    -----
NM_002373 9929 AACTCCTACAGAGTGAAATGAAAACGGGCTGAAAATACCACCCCAGGAGGACCTCGCC 9988

pVI5      1672 CCAAGCAAGCCAGTGAGCAGCCCTGCCAGACTACTGCCAGACTGAGAAACCCAGAAGCTG 1731
U38292    -----
NM_002373 9989 CCAAGCAAGCCAGTGAGCAGCCCTGCCAGACTACTGCCAGACTGAGAAACCCAGAAGCTG 10048

pVI5      1732 GTAGTCATGTGGGCTTGCCCTTCTCTGCCAAACGACTGGGAAACCAAATGAGCCACCTT 1791
U38292    -----
NM_002373 10049 GTAGTCATGTGGGCTTGCCCTTCTCTGCCAAACGACTGGGAAACCAAATGAGCCACCTT 10108

pVI5      1792 GTGTTCTTCTTAGCTCCACCCCTCCCTGCTGTGTGTTCTGCTCCTCCCACGCTTCCC 1851
U38292    -----
NM_002373 10109 GTGTTCTTCTTAGCTCCACCCCTCCCTGCTGTGTGTTCTGCTCCTCCCACGCTTCCC 10168

pVI5      1852 TGCTATAGTTCCCAGCTGCTGTAACGGAGCCACCTCCAACCTAACAATAAACCAAGTTC 1911
U38292    -----
NM_002373 10169 TGCTATAGTTCCCAGCTGCTGTAACGGAGCCACCTCCAACCTAACAATAAACCAAGTTC 10228

pVI5      1912 ATTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGATCTAGAATCGTGATCGAAA----- 1962
U38292    -----
NM_002373 10229 ATTGCA GATAGTGTAAAAAAAAAAAAAAAA----- 10259

```

**B**

```

pVI5      1 -----RSPTPGKGPADRA 13
AAB41133 2581 .....RSPTPGKGSXDRV 2640
NP_002364 2581 .....RSPTPGKGPADRA 2640

pVI5      14 SRAPPRPRSTTSQVTPAEKDGHSKGLVNLKAGPMA LSSKSSGAPVYVDLAYIPN 73
AAB41133 2641 SRAPPRPRSTTSQVTPAEKDGHSKGLVNLKAGPMA LSSKSSGAPVYVDLAYIPN 2700
NP_002364 2641 SRAPPRPRSTTSQVTPAEKDGHSKGLVNLKAGPMA LSSKSSGAPVYVDLAYIPN 2680

pVI5      74 HCSGKTADLDFRRVRASYVVS GNDPANGEPSRAVL DALLEGKAQWGENLQV---TLIPT 131
AAB41133 2701 HWSGKTADLDFRRVRASYVVS GNDPANGEPSRAVL DALLEGKAQWGENLQV---TLIPT 2760
NP_002364 -----

pVI5      132 HDTEVTREWYQQTHEQQQLNVLV LASSSTVVMQDESFPACKIEF 176
AAB41133 2761 HDTEVTREWYQQTHEQQQLNVLV LASSSTVVMQDESFPACKIEF 2805
NP_002364 -----

```

**Abb. 6 MAP1A LC2: Sequenzvergleiche auf DNA- und Proteinebene**

A: Vergleich der cDNA-Sequenz aus dem Vektor pVI5 mit der mRNA-Sequenz von humanem MAP1A (gi:1790879, Zugangsnummer U38292, (Fink *et al.*, 1996), und gi:45580726, Zugangsnummer NM\_002373). Die kodierende Sequenz ist grau und das Stop-Kodon rot unterlegt.

B: Vergleich der in Aminosäure-Sequenz translatierten cDNA-Sequenz aus dem Vektor pVI5 mit der Aminosäure-Sequenz von humanem MAP1A (gi:1790880, Zugangsnummer AAB41133, (Fink *et al.*, 1996), und gi:45580727, Zugangsnummer NP\_002364).

Nicht übereinstimmende Bereiche der Sequenzen sind jeweils gelb unterlegt.

### 5.1.3.2 Identifizierung von murinem Snapin als Interaktionspartner von CK1δrev

Zur Sequenzierung der cDNA des Vektors pVII9 wurden die Primer 5'pACT2 und pACT2-RP verwendet. Die cDNA aus dem Vektor pVII9 kodiert für die AS 40-136 des murinen Proteins Snapin, auch als SNAP-assoziiertes Protein oder Snapap bezeichnet (Ilardi *et al.*, 1999). Das exprimierte Protein bestand aus den C-terminalen 97 AS des insgesamt 136 AS umfassenden murinen Snapins (Zugangsnummer AAD11418.1). Die kodierende Sequenz der Snapin mRNA (Zugangsnummer NM\_133854) beginnt bei Position 31 und endet bei Position 441, die vollständige kodierende Sequenz besteht aus 411 bp. Die aus dem Vektor pVII9 stammende cDNA von Snapin begann an Position 148 der mRNA bzw. 118 der kodierenden Sequenz. Damit fehlten am 5'-Ende die ersten 117 bp der kodierenden Sequenz. Nach dem Stop-Kodon an Position 439-441 der kodierenden Sequenz folgten am 3'-Ende 1129 bp der insgesamt 1457 bp umfassenden untranslatierten 3' Sequenz (Abb. 7).

#### A

pVII9	1	ctcgactctcacgtgcacgcggtcagagaaagccaagtagagctccgggaacaaattgac	60
NM_133854	148	ctcgactctcacgtgcacgcggtcagagaaagccaagtagagctccgggaacaaattgac	207
pVII9	61	aacctagctacagaactgtgccggatcaatgaggatcagaaagtggccctggatctggac	120
NM_133854	208	aacctagctacagaactgtgccggatcaatgaggatcagaaagtggccctggatctggac	267
pVII9	121	ccctatgttaagaagctgcttaatgccaggcgacgagttgtcttggtaacaatatat	180
NM_133854	268	ccctatgttaagaagctgcttaatgccaggcgacgagttgtcttggtaacaatatat	327
pVII9	181	cagaatgcacaggaacgactaaggcgggttaaaccacagcgtggccaaggaacagctcgc	240
NM_133854	328	cagaatgcacaggaacgactaaggcgggttaaaccacagcgtggccaaggaacagctcgc	387
pVII9	241	aggagagctatgctggattcaggagtttaccctcctggttctccaagcaaa	300
NM_133854	388	aggagagctatgctggattcaggagtttaccctcctggttctccaagcaaa	447
pVII9	301	gcccgtagcctgagtatacaagtacaattctccaacggctttgtctggtagacag	360
NM_133854	448	gcccgtagcctgagtatacaagtacaattctccaacggctttgtctggtagacag	507
pVII9	361	gattccaggaaagtctctgtagacttttga-tttttttgcactatgtactcattcatgta	419
NM_133854	508	gattccaggaaagtctctgtagacttttga-tttttttgcactatgtactcattcatgta	567
pVII9	420	gccgcctcaagaacatgctgacggcaggactatctcctaaagaacctccatcacagctt	479
NM_133854	568	gccgcctcaagaacatgctgacggcaggactatctcctaaagaacctccatcacagctt	627
pVII9	480	gtccatccaagaagagcctctaccttttgggttttggtaactcttgagacaagatctcag	539
NM_133854	628	gtccatccaagaagagcctctaccttttgggttttggtaactcttgagacaagatctcag	687
pVII9	540	tatgtagtcccggctggcctcaaacatgtcctcttgccttagcctcctgaatgctgggat	599
NM_133854	688	tatgtagtcccggctggcctcaaacatgtcctcttgccttagcctcctgaatgctgggat	747
pVII9	600	tataataggcatgtgtcagagtgccgggctcaagcctctatatatattcccccaagaata	659
NM_133854	748	tataataggcatgtgtcagagtgccgggctcaagcctctatatatattcccccaagaata	807
pVII9	660	ctaagtaaataggcatcgtgtggtagaaaattgagaaaacaccagatttagtgagaaaag	719
NM_133854	808	ctaagtaaataggcatcgtgtggtagaaaattgagaaaacaccagatttagtgagaaaag	867
pVII9	720	tatactcctatatttctccccctctgcttaccacagttcctctcagaagtaataaccttt	779
NM_133854	868	tatactcctatatttctccccctctgcttaccacagttcctctcagaagtaataaccttt	927
pVII9	780	ccaggatcatcttacactcgtttaatggttaggttaactcctattaacaagtttcgcaac	839
NM_133854	928	ccaggatcatcttacactcgtttaatggttaggttaactcctattaacaagtttcgcaac	986

pVII9	840	tgttgccttcattgctacccaaggagagcatgccagatagcgaggatccaaggccaagc	899
NM_133854	987	tgttgccttcattgctacccaaggagagcatgccagatagcgaggatccaaggccaagc	1046
pVII9	900	agagccttgacagctaagagtcctaagccttttgcgatttttttttctgttttagactacat	959
NM_133854	1047	agagccttgacagctaagagtcctaagccttttgcgatttttttttctgttttagactacat	1105
pVII9	960	attttaagggctagagggatggctcaatgggtaagaacactggtgattcttccagatggc	1019
NM_133854	1106	attttaagggctagagggatggctcaatgggtaagaacactggtgattcttccagatggc	1165
pVII9	1020	gtccagtgccttagcgcccacatggtgactcacagcagcctctaactccagctccagggga	1079
NM_133854	1166	gtccagtgccttagcgcccacatggtgactcacagcagcctctaactccagctccagggga	1225
pVII9	1080	acccaatgcccttgcctggccttttggccagcacacacacacatatgatgcagatatat	1139
NM_133854	1226	acccaatgcccttgcctggccttttggccagcacacacacacatatgatgcagatatat	1285
pVII9	1140	atgcaggcaaaaacaaccatcctcataaaaaataaaatttaaaagttacatatttaagcgcca	1199
NM_133854	1286	atgcaggcaaaaacaaccatcctcataaaaaataaaatttaaaagttacatatttaagcgcca	1345
pVII9	1200	tcctttccaggcttagccagccagtggttaaccatcctgttactcctattactggggctgg	1259
NM_133854	1346	tcctttccaggcttagccagccagtggttaaccatcctgttactcctattactggggctgg	1405
pVII9	1260	gcagtttcctttacctgtaactccactttggtttacaactgaggacttaggtaaagtcaag	1319
NM_133854	1406	gcagtttcctttacctgtaactccactttggtttacaactgaggacttaggtaaagtcaag	1465
pVII9	1320	gtaaataatttatcctccttggccaccctggccttgactatggttaattaagatttgctca	1379
NM_133854	1466	gtaaataatttatcctccttggccaccctggccttgactatggttaattaagatttgctca	1525
pVII9	1380	acattattaaataaatgcttgactggttattttaa	1423
NM_133854	1526	acattattaaataaatgcttgactggttattttaac	1569

## B

pVII9	1	LDSHVHAVRESQVELREQIDNLATELCRINEDQKVALDLDPYVKLLNARRRVVLVNNIL	60
AAD11418.1	40	LDSHVHAVRESQVELREQIDNLATELCRINEDQKVALDLDPYVKLLNARRRVVLVNNIL	99
pVII9	61	QNAQERLRRLNHSVAKETARRRAMLD SGVYPPGSPSK	97
AAD11418.1	100	QNAQERLRRLNHSVAKETARRRAMLD SGVYPPGSPSK	136

### Abb. 7 Snapin: Sequenzvergleiche auf DNA- und Proteinebene

A: Vergleich der cDNA-Sequenz aus dem Vektor pVII9 mit der mRNA-Sequenz von murinem Snapin (gi: 31981593, Zugangsnummer NM\_133854). Die kodierende Sequenz ist grau und das Stop-Kodon rot unterlegt. Nicht übereinstimmende Bereiche der Sequenz sind gelb unterlegt.

B: Vergleich der in Aminosäure-Sequenz translatierten cDNA-Sequenz aus dem Vektor pVII9 mit der Aminosäure-Sequenz von murinem Snapin (gi: 4206090, Zugangsnummer AAD11418.1).

### 5.1.3.3 Identifizierung von murinem RanBPM als Interaktionspartner von CK1δrev

Die im pACT2-Vektor pVII16 enthaltene cDNA kodierte, beginnend bei Aminosäure 76, für das murine Protein Ran Binding Protein im MTOC („Microtubule Organizing Center“) (RanBPM), das auch als Ran Bindeprotein 9 (Ran bp9) oder B-Zell Antigen-Rezeptor Igβ-assoziiertes Protein beschrieben wurde (Nakamura *et al.*, 1998; Nishitani *et al.*, 2001). Zur vollständigen Sequenzierung wurden die Primer 5'pACT2, 5'RanBPMseq und pACT2-RP verwendet. Der Vergleich der cDNA aus dem Vektor pVII16 mit der in der Datenbank veröffentlichten Sequenz von RanBPM zeigte, dass der cDNA aus pVII16 am 5'-Ende die ersten 225 bp der kodierenden cDNA des murinen RanBPM bzw. die ersten 271 bp der gesamten mRNA fehlten. Die kodierende Sequenz ab

Position 226 stimmte vollständig mit der Sequenz des Datenbank-Eintrags für RanBPM (Zugangsnummer AF006465) (Abb. 8A) überein, und auch die in Aminosäuresequenz translatierte cDNA war identisch mit der entsprechenden Sequenz des Datenbank-Eintrags (Zugangsnummer AAD01272.1) (Abb. 8B). Der äusserste 3' Bereich der kodierenden Sequenz sowie die 3'-untranslatierte Sequenz im Vektor pVII16 war mit der Sequenz eines weiteren Datenbank-Eintrags identisch, der als muriner cDNA-Klon IMAGE: 6512643 eingetragen ist (Zugangsnummer BC050877) und der somit den 3' Bereich der cDNA des murinen RanBPM enthielt. Im Bereich der kodierenden Sequenz war dagegen kaum eine Übereinstimmung der Sequenz mit der Zugangsnummer BC050877 mit der cDNA des Vektors pVII16 und der Sequenz des Datenbank-Eintrags für RanBPM mit der Zugangsnummer AAD01272.1 zu finden (Abb. 8A).

## A

pVII16	1	-----CTGAAGCGCCTCTACCCGGCTGTGGATGAG	30
AF006465	271	-----CTGAAGCGCCTCTACCCGGCTGTGGATGAG	300
BC050877		-----	
pVII16	31	CAGGAGACGCCGCTGCCCGGCTCTGGAGCCCGAAGGACAAGTTCAGCTACATCGGCCCTC	90
AF006465	301	CAGGAGACGCCGCTGCCCGGCTCTGGAGCCCGAAGGACAAGTTCAGCTACATCGGCCCTC	360
BC050877		-----	
pVII16	91	TCGCAGAACAACTGCGGGTGCCTACAAAGGTCATGGTAAAAACCCCAAGATGCAGCA	150
AF006465	361	TCGCAGAACAACTGCGGGTGCCTACAAAGGTCATGGTAAAAACCCCAAGATGCAGCA	420
BC050877		-----	
pVII16	151	TCTGTTTCGAGCCACGCATCCAATACCAGCGGCCTGTGGGATTTATTATTTTGAAGTAAAA	210
AF006465	421	TCTGTTTCGAGCCACGCATCCAATACCAGCGGCCTGTGGGATTTATTATTTTGAAGTAAAA	480
BC050877	1	-----CTGCTGTCACTTTTAATTTTAAAGATCTACTTT	35
pVII16	211	ATTGTCAGTAAGGGAAGAGATGGCTACATGGGAATTGGTCTTTCTGCTCAA--GGTGTGA	268
AF006465	481	ATTGTCAGTAAGGGAAGAGATGGCTACATGGGAATTGGTCTTTCTGCTCAA--GGTGTGA	538
BC050877	36	ATTATATGTAATGCACTGTAGCTGTCTTCAGACATACCAGAAGAGGGCATCAGGTCTTA	95
pVII16	269	ACATGAATAGACTACCAGGTTGGGATAAACATTCATATGGTTACCATGGGGATGATGGAC	328
AF006465	539	ACATGAATAGACTACCAGGTTGGGATAAACATTCATATGGTTACCATGGGGATGATGGAC	598
BC050877	96	TTACAGAT--G--T----GGTTGCTGGGATTTGAACCTCGGGACCTCTGGAGAGCAGTCA	148
pVII16	329	ATTCATTTTGTCTTCTGGAACCTGGACAACCGTATGGACCAACTTTTACAACCTGGTGATG	388
AF006465	599	ATTCATTTTGTCTTCTGGAACCTGGACAACCGTATGGACCAACTTTTACAACCTGGTGATG	658
BC050877	149	TGCTCTTAACCACTGAGCCATCTCTCCAGCCACACTACAGTCTCTTGTCCATTTGTAT	208
pVII16	389	TCATTGGCTGTTGTGTTAATCTTATCAACAATACCTGCTTTTACACGAAGAATGGACATA	448
AF006465	659	TCATTGGCTGTTGTGTTAATCTTATCAACAATACCTGCTTTTACACGAAGAATGGACATA	718
BC050877	209	TTATTCCCTGTGTGTGGAATAATACTCTAGGTGAGGCTATTGAATTGGCAATAACAAA	268
pVII16	449	GTTTAGGTATTGCTTTTACCGACTTACCGCCAAATTTGTATCCTACTGTGGGGCTTCAGA	508
AF006465	719	GTTTAGGTATTGCTTTTACCGACTTACCGCCAAATTTGTATCCTACTGTGGGGCTTCAGA	778
BC050877	269	ATACTATACTGCTTAGTGTCTTAGTTACTGTTCTGTT--TGCTATGAAGAGACACTATT	327
pVII16	509	CACCAGGAGAAGTGGTTGATGCCAACTTTGGGCAACATCCTTTTGTGTTTGATATAGAAG	568
AF006465	779	CACCAGGAGAAGTGGTTGATGCCAACTTTGGGCAACATCCTTTTGTGTTTGATATAGAAG	838
BC050877	328	ATCAAGGC--AATTC--TTACAGTTTATTTGGGGTGGTTCACATGAGGGTTAGCCCATGAT	385
pVII16	569	ACTACATGCGAGAATGGAGAACCAAAATACAGGCCAGATAGACCGCTTTCCTATCGGGG	628
AF006465	839	ACTACATGCGAGAATGGAGAACCAAAATACAGGCCAGATAGACCGCTTTCCTATCGGGG	898
BC050877	386	CATGCAAG--AAGCAGACAGCTTGGTGTGGAGTGCCAGCTGAGAGCCTTACATCTTTGG--	443
pVII16	629	ATCGAGAAGGAGAATGGCAGACCATGATCCAAAAAATGGTTTCATCTTATTTAGTCCACC	688
AF006465	899	ATCGAGAAGGAGAATGGCAGACCATGATCCAAAAAATGGTTTCATCTTATTTAGTCCACC	958
BC050877	444	TCAACAGCAGCAGCAGAGATCTGGGCT-----TTGGTGCAGACTTTTGAATCGCA	496

pVII16	689	ATGGGTACTGTGCCACAGCAGAGGCCCTTTGCCAG-ATCTACAGACCAGACTGTTCTAGAA	747
AF006465	959	ATGGGTACTGTGCCACAGCAGAGGCCCTTTGCCAG-ATCTACAGACCAGACTGTTCTAGAA	1016
BC050877	497	AGGTTCAAT----CCAGTAACCTACCTCTCCAGCAAGCACACCTAACTCTCTCCAAACA	552
pVII16	748	G--AATTAGCTTCCATTAAGAATAGACAAAGAATTCAGAAGTTGGTGTAGCAGGACGAA	805
AF006465	1017	G--AATTAGCTTCCATTAAGAATAGACAAAGAATTCAGAAGTTGGTGTAGCAGGACGAA	1075
BC050877	553	GTTTCATTAACTGGGTACCAAGCTTTCAAAACATCGCCTACAGGGGTCACCTCTCACTCAGAC	612
pVII16	806	TGGGAGAAGCCATTGAAACAACACAACAGTTATACCCAGTTTACTTGAAAGAAATCCCA	865
AF006465	1076	TGGGAGAAGCCATTGAAACAACACAACAGTTATACCCAGTTTACTTGAAAGAAATCCCA	1135
BC050877	613	CACCATAGGACATTGCTAATTTTCATTGGTCTCACACAATTCTTCTCTGTGTAATAACTTC	672
pVII16	866	ATCTCCTTTTTCACATTAAGAATACGTGAGTTTATAGAAATGGTGAATGGTACAGACAGTG	925
AF006465	1136	ATCTCCTTTTTCACATTAAGAATACGTGAGTTTATAGAAATGGTGAATGGTACAGACAGTG	1195
BC050877	673	TCTTTGTAAATCACCCCAAAATCACAGTCCGATGATGAAACTGTGCAATTAAGACAATCTGGG	732
pVII16	926	AAGTGCAGTGTGGGAGGCCAAGTCCAAAATC-TCAAGACAGTTATCCCCTCAGTCCT	984
AF006465	1196	AAGTGCAGTGTGGGAGGCCAAGTCCAAAATC-TCAAGACAGTTATCCCCTCAGTCCT	1254
BC050877	733	ATTTTGGTAAAGGGCCAAAGCTAGCAAGTAGTACAGCTTGACTTGAAGCAGTGTCT	792
pVII16	985	CGACCCCTTAGTAGTCCAAAGCATGAGCCCCAGTCATGGAATGAGTATCCACAGCTTAGCA	1044
AF006465	1255	CGACCCCTTAGTAGTCCAAAGCATGAGCCCCAGTCATGGAATGAGTATCCACAGCTTAGCA	1314
BC050877	793	TGAATCTAGCATGTGCCCTCCATGGTAA--AGTAAAGGAGAGTAAAGAGGAAGTATGTG	850
pVII16	1045	CCAGGC----AAAAGCAGCACTGCACATTTTTCTGGTTTTGAAAGTTGTAGCA-----A	1094
AF006465	1315	CCAGGC----AAAAGCAGCACTGCACATTTTTCTGGTTTTGAAAGTTGTAGCA-----A	1364
BC050877	853	CCAGTTGTTTTAAAGCTGTAAAGCAAATGCTTCAGGATAGCTGGAAAATAATACTAGGAA	912
pVII16	1095	TGGTGTAAATATCAAATAAAGCACACCAATCATATTGCCA-----TAGTAA	1139
AF006465	1365	TGGTGTAAATATCAAATAAAGCACACCAATCATATTGCCA-----TAGTAA	1409
BC050877	913	GTCTACAAGATCATCTTGGCTTTAATATCTACTACCCTAAACTTGAGATGGTAGTCA	972
pVII16	1140	ACACCAGCTATCCAGCTTGACTGTACCGGAGCTAAACAGTCTCAATGTATCAAGGTCACA	1199
AF006465	1410	ACACCAGCTATCCAGCTTGACTGTACCGGAGCTAAACAGTCTCAATGTATCAAGGTCACA	1469
BC050877	973	ATGAAACTCTTTCAGTGCCCATATTTGTCCAAAAATAAGGCAGGGCTTATCCCC-TGGTG	1031
pVII16	1200	GCAAGTTAATAACTTTACCAGTAATGATGTAGACATGGAAACAGATCACTACTCCAATGG	1259
AF006465	1470	GCAAGTTAATAACTTTACCAGTAATGATGTAGACATGGAAACAGATCACTACTCCAATGG	1529
BC050877	1032	TCAAATTCATATCAGAGGTCACATGTGAGAAAGCATCTGGACGTTTGTCTCTTCTTCTT	1091
pVII16	1260	AGTTGGAGAAACTTCATCCAATGGTTTCTTAATGGTAGCTCTAAACATGACCACGAAAT	1319
AF006465	1530	AGTTGGAGAAACTTCATCCAATGGTTTCTTAATGGTAGCTCTAAACATGACCACGAAAT	1589
BC050877	1092	CGTATTAGCCCATCTCTTTCAGAACTGGTTAATTTCCCCGGTTTGTCTTGTGGTGGAGAA	1151
VII16	1320	GGAAGATTGTGACACCGAAATGGAAGTTGACTGCAGTCAGTTAAGACGCCAGCTGTGTGG	1379
AF006465	1590	GGAAGATTGTGACACCGAAATGGAAGTTGACTGCAGTCAGTTAAGACGCCAGCTGTGTGG	1649
BC050877	1152	GGCAGAAATAAACACGAAAAGTGA-----AGCCAGTTAGACTTTGCTGTGTCTG	1204
pVII16	1380	AGGAAGTCAGGCTGCCATAGAGAGGATGATTCACCTTTGGCCGAGAGCTACAAGCCATGAG	1439
AF006465	1650	AGGAAGTCAGGCTGCCATAGAGAGGATGATTCACCTTTGGCCGAGAGCTACAAGCCATGAG	1709
BC050877	1203	AAACATAAACACATAAGTTAAAGGAT-ATA-A-TCA--CCAGTGTCTTAAGACTATCT	1257
pVII16	1440	TGAGCAGCTGAGGAGAGAATGTGCCAAGAACACAGCAAATAAGAAAATGTTGAAGGACGC	1499
AF006465	1710	TGAGCAGCTGAGGAGAGAATGTGCCAAGAACACAGCAAATAAGAAAATGTTGAAGGACGC	1769
BC050877	1258	TAACTTTCAACCTGGAGCTGTGTGACACATTTGACATGTTTCAA----CAGGACGC	1312
pVII16	1500	ATTCAGCTTACTAGCATATTCGGATCCTTGGAAATAGTCCAGTTGGAAAATCAGCTTGACCC	1559
AF006465	1770	ATTCAGCTTACTAGCATATTCGGATCCTTGGAAATAGTCCAGTTGGAAAATCAGCTTGACCC	1829
BC050877	1313	ATTCAGCTTACTAGCATATTCGGATCCTTGGAAATAGTCCAGTTGGAAAATCAGCTTGACCC	1372
pVII16	1560	AATTCAGAGAGAACCTGTGTGCTCAGCTCTTAACAGTGAATATAGAAAACCCACAATCT	1619
AF006465	1830	AATTCAGAGAGAACCTGTGTGCTCAGCTCTTAACAGTGAATATAGAAAACCCACAATCT	1889
BC050877	1373	AATTCAGAGAGAACCTGTGTGCTCAGCTCTTAACAGTGAATATAGAAAACCCACAATCT	1432
pVII16	1620	GCCAAAGCAACCTCCACTTGCCCTAGCCATGGGACAGGCCACACAGTGTCTAGGCTGTAT	1679
AF006465	1890	GCCAAAGCAACCTCCACTTGCCCTAGCCATGGGACAGGCCACACAGTGTCTAGGCTGTAT	1949
BC050877	1433	GCCAAAGCAACCTCCACTTGCCCTAGCCATGGGACAGGCCACACAGTGTCTAGGCTGTAT	1492
pVII16	1680	GGCTCGGTGAGGAGTTGGGTCCTGTGCATTTGCCACAGTGGAAAGACTACCTACATTAGCT	1739
AF006465	1950	GGCTCGGTGAGGAGTTGGGTCCTGTGCATTTGCCACAGTGGAAAGACTACCTACATTAGCT	2009
BC050877	1493	GGCTCGGTGAGGAGTTGGGTCCTGTGCATTTGCCACAGTGGAAAGACTACCTACATTAGCT	1552

pVII16 AF006465 BC050877	1740 ATGCACTTCAAGAGCTCACACTCACATTGTGGCAAACAGTCAACATGGAAGTAGACCGGC 1799 2010 ATGCACTTCAAGAGCTCACACTCACATTGTGGCAAACAGTCAACATGGAAGTAGACCGGC 2069 1553 ATGCACTTCAAGAGCTCACACTCACATTGTGGCAAACAGTCAACATGGAAGTAGACCGGC 1612
pVII16 AF006465 BC050877	1800 TCTGCTGATTTGAAATTTAGATTTTTTTTTTAATTATGTGCTGGGGACAGGTTTTTGTCTGC 1859 2070 TCTGCTGATTTGAAATTTAGATTTTTTTTTTAATTATGTACTGGGGACAGGTTTTTGTCTGC 2129 1613 TCTGCTGATTTGAAATTTAGATTTTTTTTTTAATTATGTACTGGGGACAGGTTTTTGTCTGC 1672
pVII16 AF006465 BC050877	1860 TTTACATTGCTTCCCTAGTTT-ACAGCATGATGCAAATGA-TTTTCTAACTTAGTGTTAGG 1917 2130 TTTACATTGCTTCCCTAGTTTACAGCATGATGCAAATGAATTTTCTAACTTAGTGTTAGG 2189 1673 TTTACATTGCTTCCCTAGTTT-ACAGCATGATGCAAATGA-TTTTCTAACTTAGTGTTAGG 1730
pVII16 AF006465 BC050877	1918 AGAAAAATATTTCCATCTTTTAACCTCTTAGTTGTCTAAGAGTTAAATATTACTGAATTT 1977 2190 G----- 2190 1731 AGAAAAATATTTCCATCTTTTAACCTCTTAGTTGTCTAAGAGTTAAATATTACTGAATTT 1790
pVII16 AF006465 BC050877	1978 CAGACGTTCAAATTGATCATCAGAAATCCTTTAAACAATTACCTAAAAGAAACCAAAAA 2037 ----- 1791 CAGACGTTCAAATTGATCATCAGAAATCCTTTAAACAATTACCTAAAAGAAACCAAAAA 1850
pVII16 AF006465 BC050877	2038 TCCTGCCTTCTTTGTTGGGGGAGAAGGGGAAGGAAATGGAACAAGTTGTGTTTGTGTT 2097 ----- 1851 TCCTGCCTTCTTTGTTGGGGGAGAAGGGGAAGGAAATGGAACAAGTTGTGTTTGTGTT 1910
pVII16 AF006465 BC050877	2099 AGCATGTGGGTGATGTAAACTACAAATGGGAGCTGTTCCGACCCCGCTCCTGTGTAAG 2157 ----- 1911 AGCATGTGGGTGATGTAAACTACAAATGGGAGCTGTTCCGACCCCGCTCCTGTGTAAG 1970
pVII16 AF006465 BC050877	2158 CATTCAATCAGTGAACCTGCAAATGCATAAACATCCGACAGTTTGAATTAATAGTGTT 2217 ----- 1971 CATTCAATCAGTGAACCTGCAAATGCATAAACATCCGACAGTTTGAATTAATAGTGTT 2030
pVII16 AF006465 BC050877	2218 GATGGAAGAAATCATTTTTAATGTGTACTGTAAACTTAAAATACTCAGGAGCTGAGTGA 2277 ----- 2031 GATGGAAGAAATCATTTTTAATGTGTACTGTAAACTTAAAATACTCAGGAGCTGAGTGA 2090
pVII16 AF006465 BC050877	2278 GTATGTTTGTGCTACTTACAATCCCAACCTGTTAGTCCCAGTAGTTTTGTTTTAACATG 2337 ----- 2091 GTATGTTTGTGCTACTTACAATCCCAACCTGTTAGTCCCAGTAGTTTTGTTTTAACATG 2150
pVII16 AF006465 BC050877	2338 GTCTTTTCAACTTTGTTTCTGTTTAACTACAGATGACTTCTGTTGTAGACTCACAAGT 2397 ----- 2151 GTCTTTTCAACTTTGTTTCTGTTTAACTACAGATGACTTCTGTTGTAGACTCACAAGT 2210
pVII16 AF006465 BC050877	2398 TTAAGTGTGATTATAACAGTATTACATGTCAACAGTGTGGTTATGACC----- 2446 ----- 2211 TTAAGTGTGATTATAACAGTATTACATGTCAACAGTGTGGTTATGACC----- 2258

**B**

pVII16 AAD01272.1	1 LKRLYPVAVDEQETPLPRSWSPKDKFSYIGLSQNNLRVHYKGGKTPKDAASVRATHPIPA 60 76 LKRLYPVAVDEQETPLPRSWSPKDKFSYIGLSQNNLRVHYKGGKTPKDAASVRATHPIPA 135
pVII16 AAD01272.1	61 ACGIYYFEVKIVSKGRDGYMGIGLSAQGVNMNRLPGWDKHSYGYHGDDGHSFCSSGTGQP 120 136 ACGIYYFEVKIVSKGRDGYMGIGLSAQGVNMNRLPGWDKHSYGYHGDDGHSFCSSGTGQP 195
pVII16 AAD01272.1	121 YGPTFTTGDVIGCCVNLINNTCFYTKNGHSLGIAFTDLPPNLYPTVGLQTPGEVVDANFG 180 196 YGPTFTTGDVIGCCVNLINNTCFYTKNGHSLGIAFTDLPPNLYPTVGLQTPGEVVDANFG 255
pVII16 AAD01272.1	181 QHPFVFDIEDYMEWRWTKIQAQIDRFPIGDREGEWQTMIQKMVSSYLVHHGYCATAEFA 240 256 QHPFVFDIEDYMEWRWTKIQAQIDRFPIGDREGEWQTMIQKMVSSYLVHHGYCATAEFA 315
pVII16 AAD01272.1	241 RSTDQTVLEELASIKNRQRIQKLVLAGRMGEAIEETQQLYPSLLERNPNLLFTLKVRQFI 300 316 RSTDQTVLEELASIKNRQRIQKLVLAGRMGEAIEETQQLYPSLLERNPNLLFTLKVRQFI 375
pVII16 AAD01272.1	301 EMVNGTDSEVRCLGGRSPKSDSYVSPRPFSSPSMSPSHGMSIHS LAPGKSTAHFSGF 360 376 EMVNGTDSEVRCLGGRSPKSDSYVSPRPFSSPSMSPSHGMSIHS LAPGKSTAHFSGF 435
pVII16 AAD01272.1	361 ESCSNGVISNKAHQSYCHSKHQLSSLTVPENLSLNVRSRQQVNNFTSNDVDMETDHSNG 420 436 ESCSNGVISNKAHQSYCHSKHQLSSLTVPENLSLNVRSRQQVNNFTSNDVDMETDHSNG 495

```

pVII16          421 VGETSSNGFLNGSSKHDHEMEDCDTEMEVDCSQLRRQLCGGSQAAIERMIHFGRELQAMS 480
AAD01272.1     496 VGETSSNGFLNGSSKHDHEMEDCDTEMEVDCSQLRRQLCGGSQAAIERMIHFGRELQAMS 555

pVII16          481 EQLRRECGKNTANKKMLKDAFSLAYS DPWNSPVGNQLDPIQREPVCALNSAILETHNL 540
AAD01272.1     556 EQLRRECGKNTANKKMLKDAFSLAYS DPWNSPVGNQLDPIQREPVCALNSAILETHNL 615

pVII16          541 PKQPPLALAMGQATQCLGLMARSVGVSCAFATVEDYLH 578
AAD01272.1     616 PKQPPLALAMGQATQCLGLMARSVGVSCAFATVEDYLH 653

```

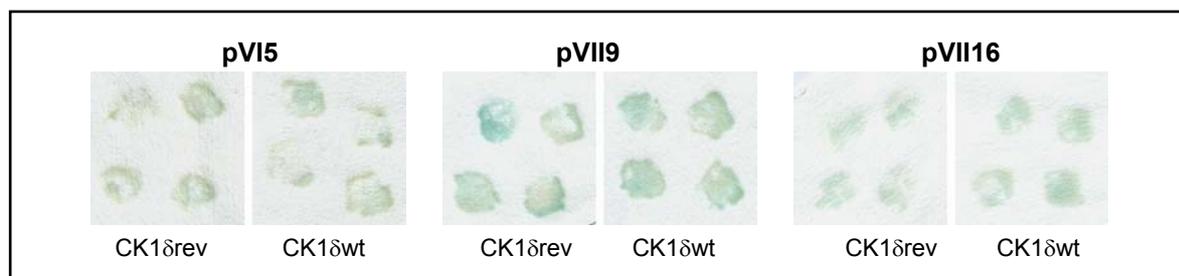
#### Abb. 8 **RanBPM: Sequenzvergleiche auf DNA- und Proteinebene**

A: Vergleich der ansequenzierten cDNA-Sequenz aus dem Vektor pVII16 mit der mRNA Sequenz von murinem RanBPM (gi: 4101717, Zugangsnummer AF006465) sowie des Maus cDNA Klons IMAGE: 6512643 (gi: 29747820, Zugangsnummer BC050877).

B: Vergleich der in Aminosäure-Sequenz translatierten cDNA-Sequenz aus dem Vektor pVII16 mit der Aminosäure-Sequenz von murinem RanBPM (gi: 4101718, Zugangsnummer AAD01272.1).

### 5.1.4 **Rekonstruktion der Interaktion von CK1 $\delta$ rev und CK1 $\delta$ wt mit den Proteinen LC2-F, Snapin und RanBPM**

Da CK1 $\delta$ rev Konformationsänderungen im Vergleich zur Wildtyp-Kinase (CK1 $\delta$ wt) aufweisen könnte, wurde die Interaktion der für eine weitergehende Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Proteine LC2-F, Snapin und RanBPM mit CK1 $\delta$ wt im Kontext des YTH Systems analysiert. Zu diesem Zweck wurde die cDNA von CK1 $\delta$ wt mittels PCR unter Verwendung der Primer 5'CK1 $\delta$ -1 und 3'CK1 $\delta$ -428 amplifiziert und in die *NcoI* und *SalI* Restriktionsschnittstellen des Vektors pGBKT7 integriert (Vektor pGBKT7-CK1 $\delta$ wt). Nach Kotransformation von pGBKT7-CK1 $\delta$ wt mit pVI5, pVII9 bzw. pVII16 in AH109 wurden jeweils drei transformierte Klone auf SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade ausgestrichen und auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität überprüft. Die von den Vektoren pVI5, pVII9 und pVII16 exprimierten Teilbereiche von humanem LC2, murinem Snapin und murinem RanBPM interagierten im YTH System reproduzierbar sowohl mit CK1 $\delta$ rev als auch mit CK1 $\delta$ wt (Abb. 9). Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch die Wildtyp-Kinase zum Nachweis von Interaktionen im YTH als „Köder“-Protein benutzt werden kann.



#### Abb. 9 **Nachweis der Interaktion von LC2-F, Snapin und RanBPM mit CK1 $\delta$ rev und CK1 $\delta$ wt**

Die pACT2-Vektoren pVI5, pVII9 und pVII16 wurden jeweils mit pGBKT7-CK1 $\delta$ rev bzw. pGBKT7-CK1 $\delta$ wt in den Hefestamm AH109 kotransformiert. Abgebildet sind die  $\beta$ -Gal-Assays von je drei positiven Klonen auf SD/-Leu/-Trp/-His.

### **5.1.5 Nachweis der Spezifität der Interaktion der CK1 Isoform CK1 $\delta$ mit den Proteinen LC2-F, Snapin und RanBPM**

Casein Kinasen 1 sind eine Familie hochkonservierter Proteinkinasen, deren Aminosäuresequenzen innerhalb der katalytischen Domänen zwischen 53% und 97% homolog sind. CK1 $\delta$  ist mit CK1 $\alpha$  zu 76% identisch, und CK1 $\epsilon$  und CK1 $\delta$  sind zu 97% homolog in der Kinasedomäne und zu 53% im C-Terminus (Graves *et al.*, 1993; Zhai *et al.*, 1995). Um festzustellen, ob die Interaktion von LC2, Snapin und RanBPM spezifisch nur mit der CK1 Isoform CK1 $\delta$  erfolgte, wurde im YTH System eine mögliche Interaktion mit den CK1 Isoformen CK1 $\alpha$ , CK1 $\gamma$ 3 und CK1 $\epsilon$  untersucht.

Die Interaktion der drei analysierten Proteine beschränkte sich nicht auf CK1 $\delta$ . LC2-F interagiert mit CK1 $\epsilon$ , während Snapin und der Teilbereich von RanBPM im Kontext des YTH Systems jeweils eine Interaktion mit CK1 $\epsilon$  und CK1 $\alpha$  aufwiesen.

## **5.2 Charakterisierung der Wechselwirkung von CK1 $\delta$ mit den identifizierten Interaktionspartnern**

### **5.2.1 Amplifizierung der vollständigen kodierenden cDNA-Sequenzen von LC2-F, Snapin und RanBPM55 und anschließende Klonierung der cDNAs in verschiedene Vektoren**

Die im YTH System isolierten Vektoren pVI5, pVII9 und pVII16 enthielten nicht die vollständigen cDNAs von LC2, Snapin und RanBPM. Um eine weitergehende Analyse der Wechselwirkungen mit CK1 $\delta$  zu ermöglichen, wurden die vollständigen kodierenden cDNA-Sequenzen von Snapin und RanBPM in der PCR amplifiziert und anschliessend zunächst in pcDNA3.1-V5/His<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> und dann in verschiedene Expressionsvektoren inseriert. Da die genaue Position der proteolytischen Spaltung des MAP1A Polyproteins und damit der exakte Beginn der Aminosäuresequenz der leichten Kette LC2 nicht bekannt ist, wurde für die weitere Charakterisierung der Interaktion von CK1 $\delta$  mit LC2 der im Vektor pVI5 enthaltene Bereich amplifiziert und in die Zielvektoren integriert. Dieser Teilbereich von MAP1A LC2 wird im Folgenden als LC2-F bezeichnet.

Die kodierende Sequenz für das MAP1A LC2 Fragment LC2-F im Vektor pVI5, der als Matrizen-DNA für die PCR verwendet wurde, bestand aus 528 bp (Position 7882-8415). Die Amplifikation erfolgte bei 61°C mit den Primern 5'LC2-1 und 3'LC2-6 (pcDNA3.1-LC2-16) für die Subklonierung in pGADT7 und pGEX-4T-1 bzw. mit 5'LC2-1 und 3'LC2-7 (pcDNA3.1-LC2-17) für die Subklonierung in pECFP-N1.

Die kodierende Sequenz für murines Snapin umfasst 411 bp (Ilardi *et al.*, 1999). Die cDNA von Snapin wurde aus pACT2-mt mit den PCR-Primern 5'Snapin-1 und 3'Snapin-6 bei 55°C amplifiziert (pcDNA3.1-Snapin16).

Humanes RanBPM war zunächst als ein 500 AS umfassendes Protein mit einer molaren Masse von 55 kDa beschrieben worden (Zugangsnummer NP\_005484.1, gi:4885571), dessen kodierende Sequenz 1503 bp lang war (Zugangsnummer NM\_005493.1, gi: 4885570) (Nakamura *et al.*, 1998). Dieses Protein stellte eine im N-terminalen Bereich trunkierte Variante des vollständigen humanen RanBPM mit einer molaren Masse von 90 kDa dar (RanBPM90, Zugangsnummer NP\_005484.2, gi:39812378), das aus 729 AS und dementsprechend einer kodierenden Sequenz von 2190 bp besteht (Zugangsnummer NM\_005493.2, gi:39812377) (Nishitani *et al.*, 2001). Der verkürzten Variante RanBPM55 fehlen im 5'-Bereich die ersten 687 bp bzw. am N-Terminus 229 AS gegenüber der längeren Form. Die vollständige kodierende Sequenz des RanBPM ist bei der Maus 1959 bp lang (Zugangsnummer AAD01272.1). Obwohl für die Maus die verkürzte Form des RanBPM (RanBPM55) nicht beschrieben worden ist, wurden entsprechende 5'-Primer verwendet, um beide Varianten von RanBPM aus pACT2-mt in der PCR amplifizieren zu können. Nur die cDNA-Sequenz der verkürzten Form des RanBPM55 konnte bei 55°C unter Verwendung der Oligonukleotide 5'RanBPM-1 und 3'RanBPM-10 amplifiziert werden (pcDNA3.1-RanBPM110), die cDNA der längeren Form RanBPM90 nicht. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden alle Untersuchungen mit der trunkierten Variante von murinem RanBPM durchgeführt. Angaben zu Positionen von Basenpaaren oder Aminosäureresten beziehen sich dagegen immer auf die entsprechende Sequenz des vollständigen murinen RanBPM90.

Alle in der PCR amplifizierten cDNAs wurden zunächst in den Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO kloniert. Die als Primer verwendeten Oligonukleotide, aufgeführt im Abschnitt 4.8, besaßen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, damit die amplifizierten cDNAs aus den so generierten Vektoren pcDNA3.1-LC2-16, pcDNA3.1-LC2-17, pcDNA3.1-Snapin16 und pcDNA3.1-RanBPM110 geschnitten und in die Vektoren pGEX-4T-1/3, pGADT7, pECFP-N1 und pEYFP-C1 inseriert werden konnten. Die pcDNA3.1 Vektoren wurden in Restriktionsanalysen auf die richtige Insertion der PCR-Produkte überprüft und vor der Subklonierung in die Zielvektoren vollständig sequenziert. Die auf diese Weise hergestellten Vektoren sind im Abschnitt 4.9 aufgeführt.

### **5.2.2 Nachweis der Interaktion zwischen CK1 $\delta$ und LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 durch Koimmunpräzipitation**

Das YTH System ist ein genetisches System, in dem in der Hefe *S. cerevisiae* Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* durch Reporteragenaktivierungen nachgewiesen werden. Da in diesem System unter Umständen auch Interaktionen nachgewiesen werden, die im Parentalorganismus nicht auftreten, müssen die detektierten Interaktionen mit Hilfe biochemischer und zellbiologischer Methoden überprüft und bestätigt werden.

### 5.2.2.1 Analyse der Interaktion zwischen CK1 $\delta$ und LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 durch Koimmunpräzipitation aufgereinigter rekombinanter Proteine

Die Interaktion zwischen CK1 $\delta$  und LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 sollte zunächst *in vitro* durch Koimmunpräzipitation rekombinanter Proteine nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde CK1 $\delta$ rev als Fusionsprotein mit einem myc-tag vom Vektor pGBKT7-CK1 $\delta$ rev im TNT-Retikulozytenextrakt *in vitro* transkribiert und translatiert. Die cDNAs von LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 wurden von den Vektoren pcDNA3.1-LC2-16, pcDNA3.1-Snapin16 und pcDNA3.1-RanBPM110 ebenfalls im TNT-Retikulozytenextrakt *in vitro* transkribiert und translatiert. Da auf diese Weise keine *in vitro* Translation von LC2-F erfolgte, konnte in der anschließenden Koimmunpräzipitation lediglich eine mögliche *in vitro* Interaktion von Snapin und RanBPM55 mit CK1 $\delta$ rev untersucht werden. Nach Vereinigung der Translationen wurde CK1 $\delta$ rev über einen anti-myc-Antikörper an Protein A-Sepharose immunpräzipitiert und das Präzipitat nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Autoradiographie auf die Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem Snapin bzw. RanBPM untersucht. Weder Snapin noch RanBPM55 konnten mit CK1 $\delta$ rev kopräzipitiert werden. Beide Proteine konnten im Überstand der jeweiligen Immunpräzipitationen detektiert werden.

Weiterhin wurde versucht, die als GST-Fusionsproteine aufgereinigten Proteine LC2-F, Snapin und RanBPM55 mit *in vitro* translaterter CK1 $\delta$ rev bzw. CK1 $\delta$ wt zu präzipitieren. Die Proteininduktion und Aufreinigung über Glutathion-Sepharose war nur für LC2-F und Snapin möglich, als GST-Fusionsprotein exprimiertes RanBPM55 konnte nach der Proteininduktion nicht aus dem bakteriellen Lysat aufgereinigt werden. Weder LC2-F noch Snapin konnte als GST-Fusionsprotein mit *in vitro* translaterter CK1 $\delta$ rev bzw. CK1 $\delta$ wt präzipitiert werden. In reziproken Versuchsansätzen, in denen die *in vitro* translateren Proteine Snapin und RanBPM55 mit CK1 $\delta$ rev bzw. CK1 $\delta$ wt, aufgereinigt als GST-Fusionsproteine, präzipitiert werden sollten, konnte ebenfalls keine Interaktion der beteiligten Proteine nachgewiesen werden.

### 5.2.2.2 Nachweis der Interaktion zwischen CK1 $\delta$ und LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 durch Koimmunpräzipitation aus zellulären Extrakten

Da der Nachweis einer Interaktion von CK1 $\delta$  mit den jeweiligen aufgereinigten, rekombinanten Proteinen LC2-F, Snapin und RanBPM55 nicht möglich gewesen war, wurde versucht, CK1 $\delta$  mit den endogenen Proteinen aus eukaryontischen Zellen zu kopräzipitieren. Es standen keine kommerziell erwerblichen Antikörper zur Verfügung, die gegen die zu untersuchenden Proteine gerichtet waren. Deshalb wurden zunächst Kaninchen mit Peptiden immunisiert, um spezifische anti-Peptid-Antiseren zu erzeugen. Während auf diese Weise die Seren CGW4 gegen Snapin und

CGV1 gegen RanBPM hergestellt wurden, konnte kein spezifisches Serum gegen LC2-F gewonnen werden. Somit war es nicht möglich, einen direkten Nachweis der endogenen leichten Kette LC2 von MAP1A zu erbringen.

Um eine Interaktion zwischen CK1 $\delta$  und LC2-F nachzuweisen, wurde der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1-LC2-16 in F111 Zellen transfiziert, um LC2-F transient als Fusionsprotein mit einem V5-tag zu exprimieren. LC2-F wurde aus dem Zelllysate mit Hilfe eines anti-V5-Antikörpers an Protein A Sepharose (PAS) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden isoliert, im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mittels Western Blot Analyse detektiert. Der Nachweis von LC2-F erfolgte mit dem anti-V5-Antikörper und die Detektion von CK1 $\delta$  mit dem polyklonalen Kaninchenserum 108 (Abb. 10).

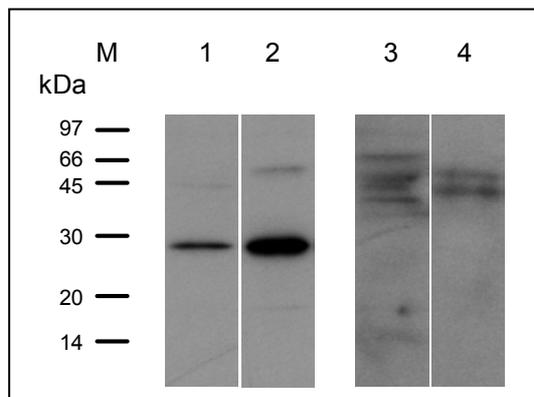


Abb. 10 **Koimmunpräzipitation von CK1 $\delta$  mit MAP1A LC2-F.**

MAP1A LC2-F wurde nach der Expression in F111 Zellen aus dem Zelllysate mit einem anti-V5-Antikörper und Protein A-Sepharose immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden isoliert und im Western Blot analysiert. Die Darstellung erfolgte nach Detektion mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern und dem ECL-System. Um die Expression des rekombinanten Proteins zu dokumentieren, wurde LC2-F im Zelllysate der transfizierten Zellen mit dem anti-V5-Antikörper detektiert (Spur 1) und im Immunpräzipitat nachgewiesen (Spur 2). Der Nachweis der Expression von

endogener CK1 $\delta$  im Zelllysate der transfizierten Zellen (Spur 3) und von CK1 $\delta$  im Immunpräzipitat (Spur 4) erfolgte mit dem spezifischen Kaninchenserum 108. Der Pfeil zeigt die Position von CK1 $\delta$  an. kDa: Kildalton, M: Protein-Marker.

LC2-F konnte in Zelllysaten transfizierter F111-Zellen detektiert und über den an PAS gebundenen anti-V5-Antikörper immunpräzipitiert werden (Abb. 10, Spur 1 und 2). CK1 $\delta$  wurde sowohl in dem Zelllysate der transfizierten Zellen als auch in dem Immunkomplex mit LC2-F nachgewiesen (Abb. 10, Spur 3 und 4). Durch die Koimmunpräzipitation von CK1 $\delta$  und MAP1A LC2 konnte die Interaktion zwischen den beiden Proteinen *in vivo* bestätigt werden.

Zum Nachweis einer Interaktion zwischen CK1 $\delta$  und Snapin bzw. RanBPM sollten die endogenen Proteine mit den spezifischen Seren aus Lysaten verschiedener Zelllinien immunpräzipitiert werden. Das schwach exprimierte endogene Snapin (Vites *et al.*, 2004) konnte im Western Blot in den zellulären Lysaten verschiedener untersuchter Zelllinien nicht detektiert werden (Abb. 11, Spur 1-6). Mit dem spezifischen Serum konnte allerdings rekombinantes GST-Snapin nachgewiesen werden (Abb. 11, Spur 7), wodurch gezeigt wurde, dass der Antikörper prinzipiell Snapin im Western Blot erkennen kann. Aus keiner der analysierten Zelllinien konnte endogenes Snapin

mit dem Serum CGW4 präzipitiert werden. Eine Koimmunpräzipitation von CK1 $\delta$  mit Snapin wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen.

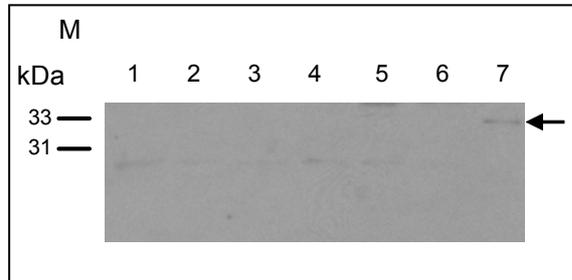


Abb. 11 **Western Blot Analyse von verschiedenen zellulären Lysaten und rekombinatem GST-Snapin mit anti-Snapin Serum.**

Zelluläre Lysate von den nachfolgend aufgeführten Zelllinien wurden nach Auftrennung in der SDS-PAGE und dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran mit dem spezifischen anti-Snapin Kaninchenserum im Western Blot auf die Anwesenheit von endogenem Snapin untersucht.

Zusätzlich wurde bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes GST-Snapin analysiert. Der Pfeil zeigt die Position von GST-Snapin an. Spur 1: C57, Spur 2: CV1, Spur 3: HeLa, Spur 4: F111, Spur: MCF7, Spur 6: Balb/c 3T3. Spur 7: GST-Snapin. kDa: Kilodalton, M: Protein-Marker.

Mit dem anti-RanBPM-Antiserum CGV1 wurde eine starke Expression eines Proteins mit einer molaren Masse von ungefähr 55 kDa in den pankreatischen Zelllinien MiaPaCa-2 und BXPC3 im Western Blot nachgewiesen (Abb. 12 A, Spur 1 und 2), sodass davon ausgegangen werden konnte, dass RanBPM in diesen Zelllinien exprimiert wurde. RanBPM wurde aus den Lysaten von MiaPaCa-2 und BXPC3-Zellen präzipitiert und das Präzipitat auf die Anwesenheit von CK1 $\delta$  untersucht. Im Immunkomplex konnte kopräzipitierte CK1 $\delta$  mit dem spezifischen Antikörper ICOS128A detektiert und damit ein Nachweis der Interaktion von CK1 $\delta$  mit RanBPM *in vivo* erbracht werden (Abb. 12 B, Spur 1 und 2).

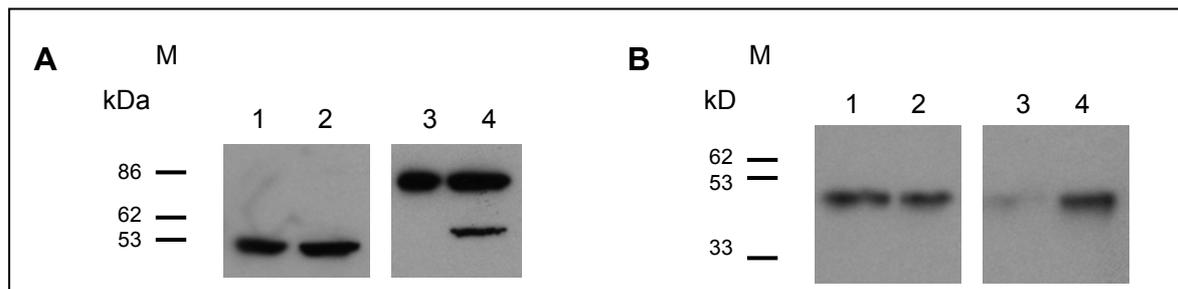


Abb. 12 **Koimmunpräzipitation von CK1 $\delta$  mit RanBPM und MAP1A.**

A: Zelluläre Lysate von MiaPaCa-2 und BXPC3-Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis von RanBPM im Western Blot erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchenserum CGV1. MAP1A wurde mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Spur 1: BXPC3, anti-RanBPM, Spur 2: MiaPaCa-2, anti-RanBPM, Spur 3: BXPC3, anti-MAP1A, Spur 4: MiaPaCa-2, anti-MAP1A

B. Nach der Immunpräzipitation von RanBPM bzw. MAP1A mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern wurden die Präzipitate in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Der Nachweis von CK1 $\delta$  im Immunkomplex erfolgte mit dem Antikörper ICOS128A. Spur 1: BXPC3, IP gegen RanBPM, Spur 2: MiaPaCa-2, IP gegen RanBPM, Spur 3: BXPC3, IP gegen MAP1A, Spur 4: MiaPaCa-2, IP gegen MAP1A. kDa: Kilodalton, M: Protein-Marker.

Um die nachgewiesene Interaktion von MAP1A LC2 mit CK1 $\delta$  näher zu charakterisieren, wurde die schwere Kette von MAP1A mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper, der spezifisch ist für die schwere Kette und die leichte Kette nicht erkennt, in Zellysaten von MiaPaCa-2 und BXPC3-Zellen detektiert (Abb 12 A, Spur 3 und 4) und aus Lysaten dieser Zelllinien immunpräzipitiert. CK1 $\delta$  konnte auch in diesem Fall im Immunpräzipitat detektiert werden (Abb. 12 B, Spur 3 und 4).

### 5.2.3 *In vitro* Phosphorylierung von LC2-F, Snapin und RanBPM55 durch CK1 $\delta$

Die Isoform CK1 $\delta$  phosphoryliert ihre Substrate an Serin- und Threonin-Resten, die sich C-terminal zu sauren oder phosphorylierten Aminosäureresten befinden. Mit dem Programm "NetPhos 2.0" (Center for Biological Sequence Analysis CBS, ExPASy Molecular Biology Server) wurden in den Aminosäuresequenzen von LC2-F, Snapin und RanBPM55 jeweils mehrere Serin- und Threoninreste identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit phosphoryliert werden. Mit Hilfe des Programms „PhosphoBase“ (Center for Biological Sequence Analysis CBS, ExPASy Molecular Biology Server) wurden als potentielle CK1 Phosphorylierungsstellen in der Sequenz von LC2-F Ser<sup>2652</sup>, Ser<sup>2667</sup>, Ser<sup>2686</sup>, Thr<sup>2706</sup>, Thr<sup>2760</sup>, Thr<sup>2766</sup> und Thr<sup>2790</sup>, bei Snapin Ser<sup>11</sup> sowie bei RanBPM55 Ser<sup>189</sup>, Thr<sup>202</sup>, Thr<sup>220</sup>, Thr<sup>321</sup>, Ser<sup>395</sup>, Ser<sup>402</sup>, Ser<sup>410</sup>, Ser<sup>418</sup>, Ser<sup>433</sup>, Ser<sup>454</sup>, Thr<sup>462</sup>, Ser<sup>472</sup>, Ser<sup>493</sup>, Ser<sup>607</sup> und Ser<sup>642</sup> identifiziert. Darüber hinaus konnten weitere Serin- und Threoninreste in den Sequenzen von LC2-F, Snapin und RanBPM55 identifiziert werden, die in einem für die Phosphorylierung durch CK1 günstigen Sequenzkontext standen und durch die verwendeten Programme nicht angezeigt wurden.

Um zu überprüfen, ob die zu untersuchenden Proteine *in vitro* Substrate von CK1 $\delta$  darstellten, wurden LC2-F und Snapin mit Hilfe der Vektoren pGEX-LC2-16 bzw. pGEX-Snapin-16 bakteriell als GST-Fusionsproteine exprimiert. RanBPM55 wurde mit dem Vektor pcDNA3.1-RanBPM110 *in vitro* als His-tag Fusionsprotein translatiert und vor der Verwendung als Substrat mit einem anti-His-tag-Antikörper immunpräzipitiert. Die aufgereinigten Proteine wurden mit einer kommerziell erhältlichen, C-terminal verkürzten Form von CK1 $\delta$  (Kinasedomäne, NEB) phosphoryliert, die eine 20-fach erhöhte Aktivität im Vergleich zu CK1 $\delta$ wt besitzt und keine inaktivierende Auto-phosphorylierungsaktivität *in vitro* aufweist (Cegielska *et al.*, 1998).

Als GST-Fusionsproteine exprimiertes LC2-F und Snapin wurden durch CK1 $\delta$  *in vitro* phosphoryliert (Abb. 13, Spur 2 und 5). Auf dem Autoradiogramm der Kinasierung von His-RanBPM waren mehrere phosphorylierte Banden zu erkennen (Abb. 13, Spur 8). Das Auftreten einer Bande auf der Höhe von ungefähr 55 kDa, die mit der Bande von [<sup>35</sup>S]-markiertem und immunpräzipitiertem His-RanBPM55 auf dem Autoradiogramm der *in vitro* Translation zur Deckung gebracht werden konnte (Abb. 13, Spur 7), deutete darauf hin, dass RanBPM55 von

CK1 $\delta$  *in vitro* phosphoryliert werden kann. In den Kontrollansätzen ohne Kinase konnte kein Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die Substrate nachgewiesen werden (Abb. 13, Spur 3, 6, 9). Aufgereinigtes GST wurde mit CK1 $\delta$  inkubiert, um auszuschliessen, dass die Phosphorylierung im GST-Anteil der Fusionsproteine stattfand. GST wurde nicht von CK1 $\delta$  phosphoryliert (Abb. 13, Spur 11). Um erste Anhaltspunkte hinsichtlich der Stärke der Phosphorylierung zu erhalten, wurde gereinigtes FP267 als Substrat in einer Kinasierung eingesetzt. Das GST-Fusionsprotein FP267 enthält die AS 1-64 von murinem p53 und damit die N-terminalen Phosphorylierungsstellen, von denen einige durch CK1 $\delta$  phosphoryliert werden (Milne *et al.*, 1992), (Knippschild *et al.*, 1997), (Dumaz *et al.*, 1999). FP267 wies aufgrund des Vorliegens multipler Konsensussequenzen für CK1 $\delta$  eine starke Phosphorylierung durch CK1 $\delta$  auf (Abb. 13, Spur 13).

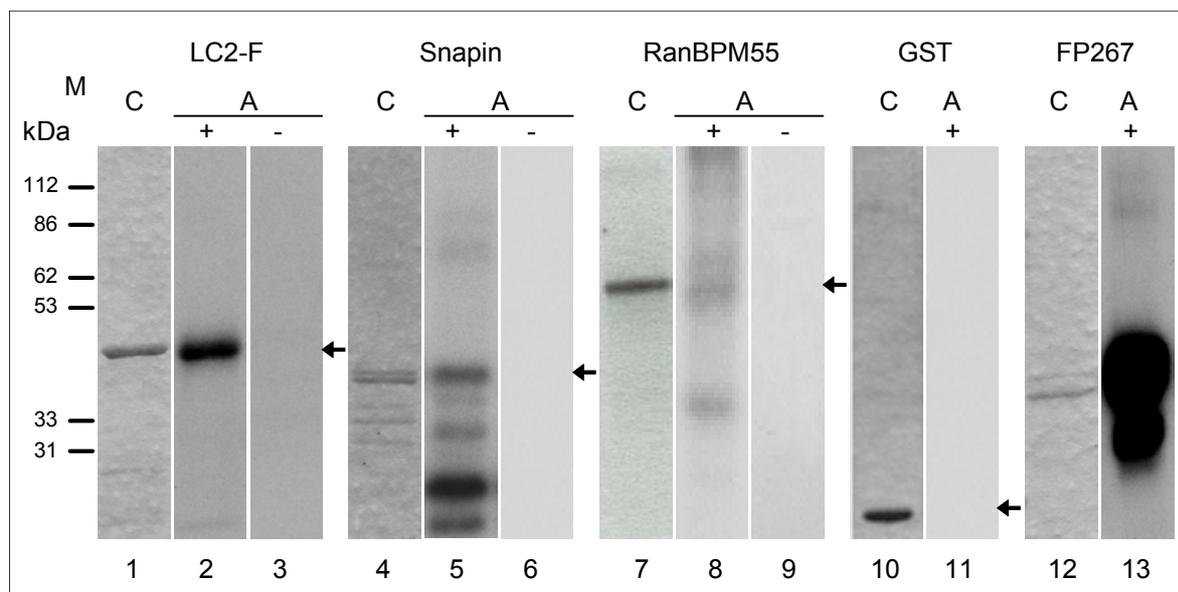


Abb. 13 **Darstellung der *in vitro* Phosphorylierung von LC2-F, Snapin und RanBPM55 durch CK1 $\delta$ .** GST-LC2-F und GST-Snapin sowie His-RanBPM55 wurden mit der C-terminal verkürzten CK1 $\delta$  oder ohne Kinase in Gegenwart von [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP inkubiert. GST und FP267 wurden nur mit C-terminal verkürzter CK1 $\delta$  inkubiert. Die Proteine wurden in der SDS-Page aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Die Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie detektiert.

Spur 1, 2 und 3: GST-LC2-F, Spur 4, 5 und 6: GST-Snapin, Spur 7, 8 und 9: His-RanBPM, Spur 10 und 11: GST, Spur 12 und 13: FP267. C: Coomassie-Färbung, A: Autoradiogramm, +/-: Inkubation mit/ohne CK1 $\delta$ . M: Protein-Marker, kDa: Kilodalton

### 5.2.3.1 *In vitro* Phosphorylierung von Teilbereichen von LC2-F, Snapin und RanBPM55 durch CK1 $\delta$

Die Ergebnisse der *in vitro* Kinasierungen belegten, dass GST-LC2-F und GST-Snapin *in vitro* Substrate von CK1 $\delta$  waren. Die Phosphorylierung eines 55 kDa Proteins in einer Aufreinigung von *in vitro* translatiertem RanBPM55 gab einen Anhaltspunkt dafür, dass auch RanBPM55 *in vitro* ein Substrat für CK1 $\delta$  darstellte. Um die Lage der Phosphorylierungsstellen in Bezug auf die Aminosäuresequenz der untersuchten Proteine zu kartieren, wurden Teilbereiche der cDNAs der einzelnen Proteine mittels PCR amplifiziert und nach der Insertion in pcDNA3.1-V5/His<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> in pGEX-4T-1/3 subkloniert. Die auf diese Weise generierten pGEX-Vektoren sowie alle Angaben zu den verwendeten PCR-Primern sind in Abschnitt 4.8 und 4.9 aufgeführt. Ungefähr gleiche Mengen der einzelnen aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden jeweils mit CK1 $\delta$  phosphoryliert.

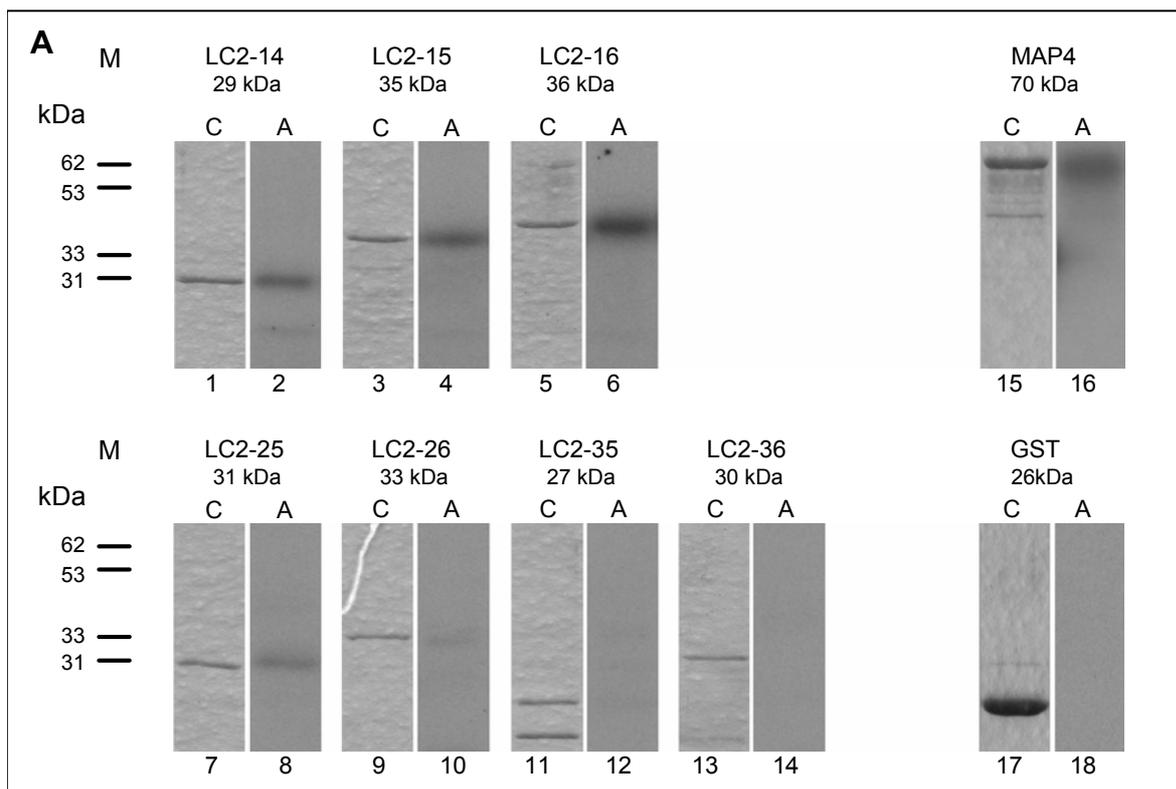


Abb. 14 *In vitro* Phosphorylierung von GST-LC2-F-Fragmenten durch CK1 $\delta$ .

A: Die GST-MAP1A-Fragmente wurden mit der C-terminal verkürzten CK1 $\delta$  in Gegenwart von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert. Die Proteine wurden in der SDS-Page aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung (C) gefärbt. Die Phosphorylierung der Fragmente (A) wurde durch Autoradiographie detektiert. Spur 1 und 2: GST-LC2-14 (AS 2629-2683), Spur 3 und 4: GST-LC2-15 (AS 2629-2753), Spur 5 und 6: GST-LC2-16 (AS 2629-2805), Spur 7 und 8: GST-LC2-25 (AS 2684-2753), Spur 9 und 10: GST-LC2-26 (AS 2684-2805), Spur 11 und 12: GST-LC2-35 (AS 2712-2753), Spur 13 und 14: GST-LC2-36 (AS 2712-2805), Spur 15 und 16: GST-MAP4 (AS 214-375), Spur 17 und 18: GST. Im oberen Teil der Abbildungen sind jeweils die kalkulierten molekularen Massen angegeben. kDa: Kilodalton, M: Protein-Marker, AS: Aminosäurerest. Abb. 14 B: siehe nächste Seite.

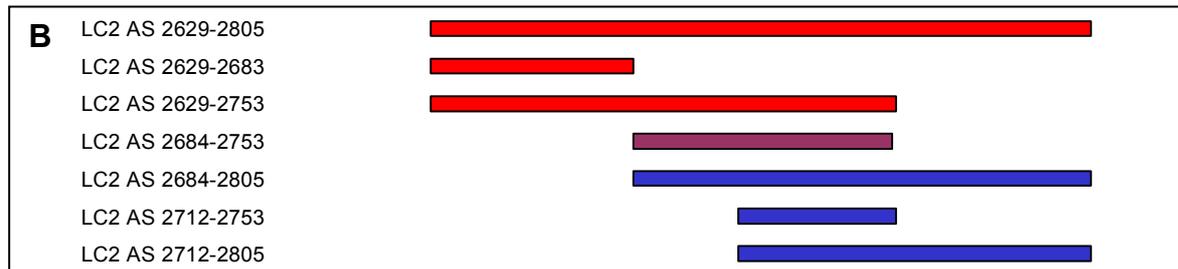


Abb. 14 **In vitro** Phosphorylierung von GST-LC2-F-Fragmenten durch CK1 $\delta$ .

B: Schematische Darstellung der durch CK1 $\delta$  phosphorylierten Teilbereiche von MAP1A LC2-F unter Angabe der Position der Aminosäurereste. Stark phosphorylierte Teilbereiche sind in rot und schwach phosphorylierte in violett dargestellt. Nicht phosphorylierte Teilbereiche sind blau dargestellt.

Neben dem Gesamtbereich LC2-16/LC2-F von AS 2629-2805 (Abb. 14 A, Spur 6) wurden die Teilbereiche LC2-14 von AS 2629-2683 (Abb. 14 A, Spur 2) und LC2-15 von AS 2629-2753 (Abb. 14 A, Spur 4) mit vergleichbarer Intensität phosphoryliert. Die Phosphorylierung dieser Fragmente von LC2-F war insgesamt etwas schwächer als die Phosphorylierung einer ungefähr gleichen Menge eines GST- MAP4 Fusionsproteins (Abb. 14 A, Spur 16), eines als Substrat von CK1 $\delta$  beschriebenen Mikrotubuli-assoziierten Proteins (Behrend *et al.*, 2000a). Der Teilbereich LC2-25 von AS 2684-2753 wurde schwach phosphoryliert (Abb. 14 A, Spur 10), alle weiteren Fragmente von LC2 nicht oder mit zu vernachlässigender Intensität. Die Stärke der Phosphorylierung aller Fragmente, die den Teilbereich von AS 2629-2683 enthielten, liess auf das Vorhandensein mehrerer Phosphorylierungsstellen in diesem Bereich von LC2 schliessen. Da das Fragment LC2-25 nur schwach und alle übrigen Teilfragmente nicht phosphoryliert wurden, schienen C-terminal von AS 2683 nur eine oder einige wenige Phosphorylierungsstellen lokalisiert zu sein (Abb. 14 B).

Snapin wurde als Gesamtprotein stark phosphoryliert (Abb. 15 A, Spur 6), allerdings etwas schwächer als das Fragment Snapin-15 von AS 1-78 (Abb. 15 A, Spur 4). Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine partielle Degradation der aufgereinigten Proteine zurückzuführen, die auch beim Gesamtprotein zu beobachten war. Der N-terminale Bereich, repräsentiert durch das Fragment Snapin-14, wurde nicht phosphoryliert (Abb. 15 A, Spur 2). Die Intensität der Phosphorylierung von Snapin-25 und Snapin-36 deutete auf das Vorhandensein mehrerer Phosphorylierungsstellen im Teilbereich von AS 37-78 (Abb. 15 A, Spur 8) sowie einer oder mehrerer Phosphoakzeptoren in der Region von AS 79-136 hin (Abb. 15 A, Spur 12). Die Intensität der Phosphorylierung der einzelnen Fragmente von Snapin ist in Abb. 15 B schematisch dargestellt.

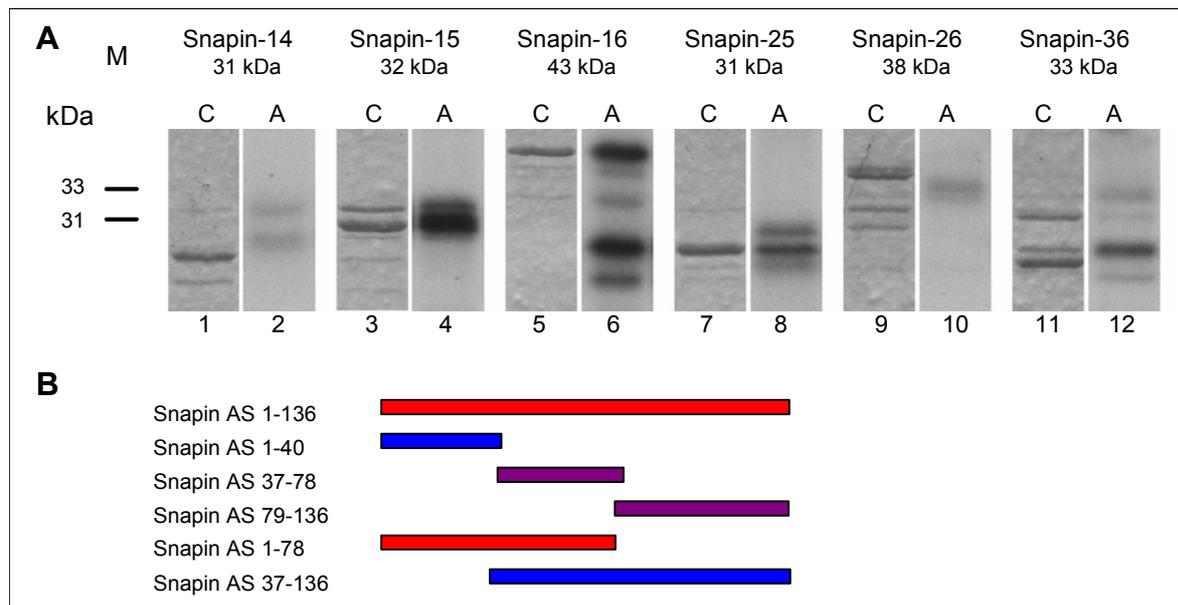


Abb. 15 ***In vitro* Phosphorylierung von GST-Snapin-Fragmenten durch CK1 $\delta$ .**

A: Die GST-Snapin-Fragmente wurden mit der C-terminal verkürzten CK1 $\delta$  in Gegenwart von [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP inkubiert. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung (C) gefärbt. Die Phosphorylierung der Fragmente (A) wurde durch Autoradiographie detektiert. Spur 1 und 2: GST-Snapin-14 (AS 1-40), Spur 3 und 4: GST-Snapin-15 (AS 1-78), Spur 5 und 6: GST-Snapin-16 (AS 1-136), Spur 7 und 8: GST-Snapin-25 (AS 37-78), Spur 9 und 10: GST-Snapin-26 (AS 37-136), Spur 11 und 12: GST-Snapin-36 (AS 79-136). Im oberen Teil der Abbildungen sind jeweils die kalkulierten molekularen Massen angegeben. kDa: Kilodalton, M: Protein-Marker, AS: Aminosäurerest.

B. Schematische Darstellung der durch CK1 $\delta$  phosphorylierten Teilbereiche von Snapin unter Angabe der Position der Aminosäurereste. Stark phosphorylierte Teilbereiche sind in rot und schwach phosphorylierte in violett dargestellt. Nicht phosphorylierte Teilbereiche sind blau dargestellt.

Aufgrund seiner im Vergleich zu LC2-F und Snapin mit 499 AS langen Aminosäuresequenz wurde RanBPM in 5 Teilbereiche aufgeteilt, die nicht überlappend waren. Alle Fragmente waren nach der Aufreinigung in unterschiedlichem Ausmass degradiert, sodass Aussagen über die Stärke der Phosphorylierung der einzelnen Fragmente nur bedingt möglich waren. Die starke Phosphorylierung des Fragments RanBPM55-49 deutete die Existenz zahlreicher Phosphorylierungsstellen im Bereich zwischen AS 436 und 514 an (Abb. 16 A, Spur 8). Die C-terminale Region zwischen AS 515 und 653 (Abb. 16 A, Spur 10) sowie der Bereich von AS 259 bis AS 385 (Abb. 18, Spur 4) wurden mit wesentlich schwächerer Intensität phosphoryliert. Diese Beobachtung liess auf das Vorhandensein jeweils einer oder einiger zusätzlicher Phosphoakzeptoren in diesen Bereichen schliessen. Das Fragment zwischen AS 259 und AS 285 war partiell degradiert, phosphoryliert wurde vor allem ein Abbauprodukt. Das Fragment von AS 515 bis AS 653 war nach der Aufreinigung stark degradiert, sodass in diesem Fall das vollständige Fragment nur einen sehr geringen Anteil des Gesamtproteins in der Kinasierungsreaktion ausmachte und in erster Linie die

Abbauprodukte phosphoryliert wurden. Die Intensität der Phosphorylierung der einzelnen Fragmente von Snapin ist in Abb. 16 B schematisch dargestellt.

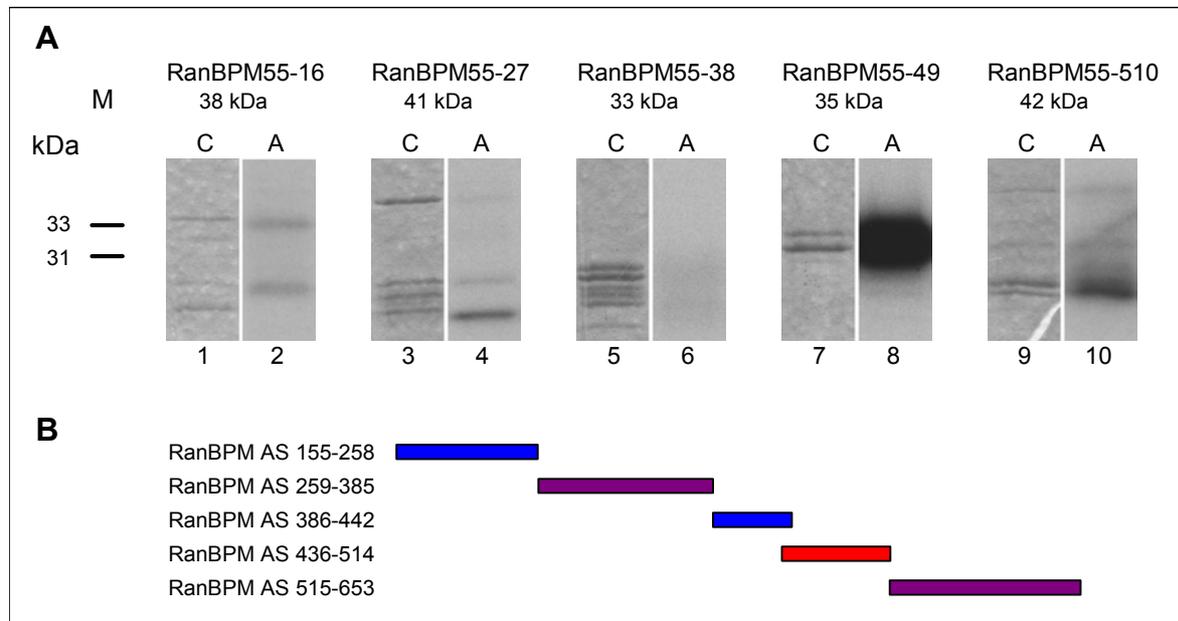


Abb. 16 ***In vitro* Phosphorylierung von GST-RanBPM55-Fragmenten durch CK1δ.**

A: Die GST-RanBPM55-Fragmente wurden mit der C-terminal verkürzten CK1δ in Gegenwart von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  inkubiert. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung (C) gefärbt. Die Phosphorylierung der Fragmente (A) wurde durch Autoradiographie detektiert. Spur 1 und 2: GST-RanBPM55-16 (AS 155-258), Spur 3 und 4: GST-RanBPM55-27 (AS 259-385), Spur 5 und 6: GST-RanBPM55-38 (AS 386-442), Spur 7 und 8: GST-RanBPM55-49 (AS 436-514), Spur 9 und 10: GST-RanBPM55-510 (AS 515-653). Im oberen Teil der Abbildungen sind jeweils die kalkulierten molekularen Massen angegeben. kDa: Kilodalton, M: Protein-Marker, AS: Aminosäurerest.

B. Schematische Darstellung der durch CK1δ phosphorylierten Teilbereiche von RanBPM55 unter Angabe der Position der Aminosäurereste. Stark phosphorylierte Teilbereiche sind in rot und schwach phosphorylierte in violett dargestellt. Nicht phosphorylierte Teilbereiche sind blau dargestellt.

### 5.2.3.2 Analyse des Phosphorylierungsmusters tryptischer Peptide von LC2, Snapin und RanBPM55

Um genauere Informationen über die ungefähre Lokalisation und die Anzahl der Phosphorylierungsstellen in den einzelnen Proteinen zu erhalten, wurden die *in vitro* phosphorylierten GST-Fusionsproteine LC2-14, LC2-15 und LC2-16 und Snapin-15, Snapin-16, Snapin-25 und Snapin-36 7 Stunden mit Trypsin gespalten und die tryptischen Phosphopeptide anschliessend in der zwei-dimensionalen Phosphopeptid-Analyse untersucht. Da von RanBPM keine überlappenden Teilfragmente vorlagen und aus der Analyse der Spaltmusters keine zusätzlichen Informationen über die relative Lokalisation von Phosphorylierungsstellen im Gesamtprotein abgeleitet werden konnten, wurden keine Phosphopeptidanalysen mit Fragmenten von RanBPM durchgeführt.

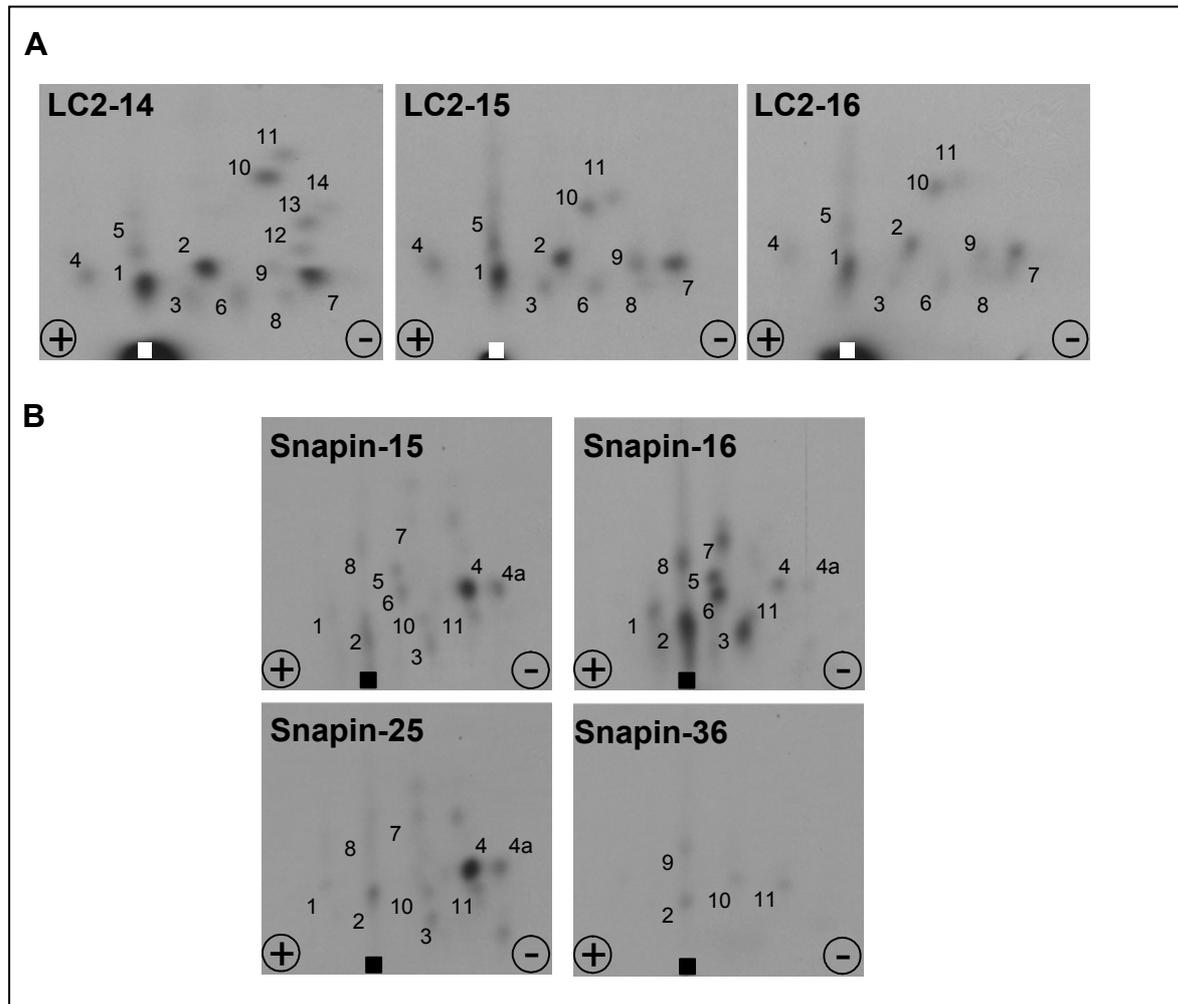


Abb. 17 **Zweidimensionale Phosphopeptidanalyse der LC2-Fragmente LC2-14, LC2-15 und LC2-16 und der Snapin-Fragmente Snapin-15, Snapin-16, Snapin-25 und Snapin-36.**

Jeweils 1  $\mu\text{g}$  der GST-Fusionsproteine der verschiedenen Fragmente wurde mit der C-terminal verkürzten CK1 $\delta$  phosphoryliert, 4 Stunden mit 10  $\mu\text{g}$  Trypsin und weitere 3 Stunden mit zusätzlichen 10  $\mu\text{g}$  gespalten und anschliessend zweidimensional durch Elektrophorese und aufsteigende Chromatographie auf Zellulose-Dünnschichtplatten aufgetrennt. Die Darstellung der Phosphopeptide erfolgte durch Autoradiographie. Die Hauptpeptide sind durch Nummern angezeigt. Der Auftragspunkt ist jeweils durch ein Quadrat markiert.

A: LC2-14 (AS 2629-2683), LC2-15 (AS 2629-2753) und LC2-16 (AS 2629-2805)

B: Snapin-15 (AS 1-78), Snapin-16 (1-136), Snapin-25 (AS 37-78) und Snapin-36 (AS 79-136)

AS: Aminosäurerest

Die drei LC-2 Fragmente repräsentierten das Gesamtfragment LC2-F (LC2-16, AS 2629-2805) sowie die C-terminal verkürzten LC2-14 (AS 2629-2683) und LC2-15 (AS 2629-2753). Alle Fragmente waren von der C-terminal trunkierten CK1 $\delta$  *in vitro* mit vergleichbarer Intensität phosphoryliert worden (Abschnitt 5.2.3). Insgesamt wurden nach der Auftrennung 14 tryptische Phosphopeptide auf dem Autoradiogramm detektiert (Abb. 17 A), von denen die Peptide 1-11 bei allen tryptisch gespaltenen Fragmenten von LC2 auftraten. Diese Population der Peptide, die neben den stark phosphorylierten Hauptpeptiden 1, 2, 7 und 10 zahlreiche schwächer phosphorylierte

Peptide enthielt, repräsentierte die Phosphorylierungsstellen des N-terminalen Bereichs zwischen AS 2629-2683, da die Trunkierung des gesamten C-terminalen Bereichs ab AS 2684, wie sie im Teilfragment LC2-14 vorlag, keinen Verlust von tryptischen Phosphopeptiden zur Folge hatte. Anhand der Analyse des Phosphorylierungsmusters der tryptischen Peptide von LC2-14, LC2-15 und LC2-16 konnten sämtliche Phosphorylierungsstellen von LC2-F in der Region zwischen AS 2629-2683 lokalisiert werden. Die Peptide 12, 13 und 14 waren sowohl in der Auftrennung der Peptide des Gesamtfragments LC2-16 als auch unter den Peptiden des grösseren Teilfragments LC2-15 nicht detektierbar.

In der Darstellung des Phosphorylierungsmusters von Snapin, repräsentiert durch das Gesamtfragment Snapin-16, wurden neben den stark phosphorylierten Hauptpeptiden 2, 3, 5 und 6 die etwas schwächer phosphorylierten Peptide 1, 7, 8 und 4 sowie die schwach phosphorylierten Peptide 4a und 11 detektiert. Die Trunkierung der C-terminalen 58 Aminosäuren in den Teilfragmenten Snapin-15 und Snapin-25 führte zu einer relativen Reduktion der Intensität aller Hauptpeptide sowie einer Steigerung der relativen Intensität der Peptid 4 und 4a. Die Spaltmuster dieser beiden Fragmente waren nahezu identisch mit der Einschränkung, dass mit der Deletion der N-terminalen 36 AS im Fragment Snapin-25 die Peptide 5 und 6 eliminiert wurden, die demnach N-terminale Phosphorylierungsstellen enthielten. Der überwiegende Anteil an Phosphopeptiden verschwand mit der Abspaltung der Aminosäuren 1-78 im Fragment Snapin 79-136, dessen Spaltmuster nur das Hauptpeptid 2 und das Peptid 10 des Gesamtproteins aufwies sowie die bisher nicht detektierten Peptide 9 und 11 (Abb. 17 B). Da das N-terminale Fragment Snapin-14 nicht phosphoryliert worden war (Abschnitt 5.2.3), konnte der Hauptanteil der phosphorylierten Serin- und Threoninreste in der Region zwischen den AS 37 und 78 lokalisiert werden.

#### **5.2.4 Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$ , LC2, Snapin und RanBPM55**

Die Koimmunpräzipitation von LC2-F und RanBPM55 sowie die im YTH System durchgeführten Interaktionsstudien gaben erste Anhaltspunkte dafür, dass LC2-F, Snapin und RanBPM55 *in vivo* mit CK1 $\delta$  interagierten. Daher wurde versucht, eine Interaktion von CK1 $\delta$  mit diesen Proteinen in tierischen Zellen nachzuweisen. Die subzelluläre Verteilung von Snapin und RanBPM55 wurde mit dem jeweiligen spezifischen Kaninchenserum in der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Darüber hinaus sollte die Lokalisation von den exogen als ECFP- bzw. EYFP-Fusionsprotein überexprimierten Interaktionspartnern analysiert werden. CK1 $\delta$  wurde in allen Präparaten mit dem monoklonalen Antikörper ICOS128A in den Zellen detektiert. Nach der Überexpression von ECFP-LC2-F zeigte sich eine diffuse Lokalisation des Proteins im Zytoplasma und im Zellkern. Es konnte keine Assoziation mit bestimmten subzellulären Strukturen oder Kompartimenten beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die Verteilung von LC2-F nicht weiter analysiert.

### 5.2.4.1 Lokalisation von CK1 $\delta$ und Snapin in NRK, F111 und Balb/c 3T3 Zellen

Die subzelluläre Verteilung von endogenem Snapin und CK1 $\delta$  wurde in den Fibroblastenzelllinien NRK und Balb/c 3T3 analysiert.

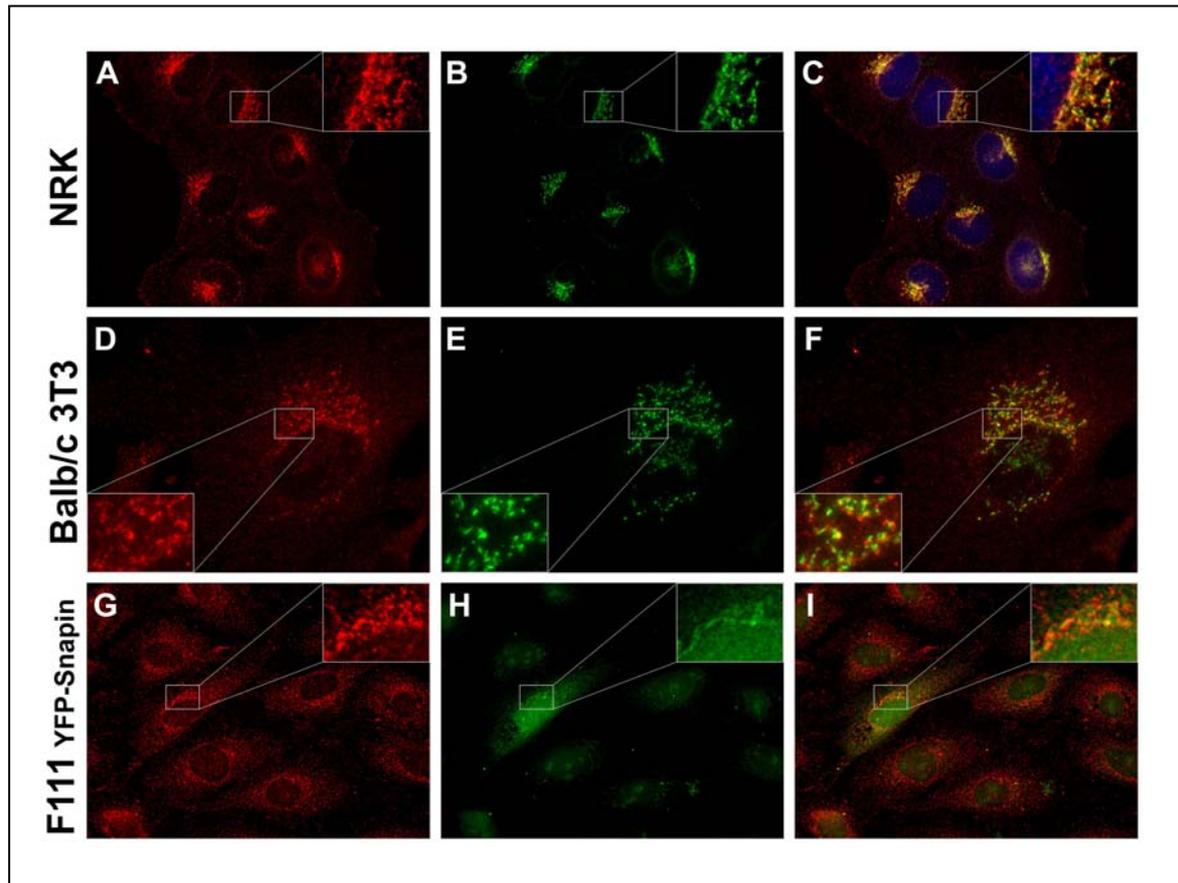


Abb. 18 Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  und Snapin in NRK, 3T3 und F111 Zellen.

A-F: Darstellung von CK1 $\delta$  und endogenem Snapin in NRK und Balb/c 3T3 Zellen in der Doppelimmunfluoreszenz. NRK und Balb/c 3T3 Zellen wurden mit eiskaltem Methanol fixiert und permeabilisiert. CK1 $\delta$  wurde mit dem monoklonalen Antikörper ICOS128A in Verbindung mit einem Alexa 568-konjugierten anti-Maus-Antikörper dargestellt (A, D). Snapin wurde mit dem spezifischen Kaninchenserum CGW4 markiert und mit einem Alexa 488-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper dargestellt (B, E). In der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle (C, F) ist in der Teilabbildung C das Chromatin mit dem DNA-färbenden Agens DAPI dargestellt. G-I: Subzelluläre Lokalisation von überexprimiertem EYFP-Snapin und endogener CK1 $\delta$  in F111 Zellen. F111-Zellen wurden 1 Tag nach der Transfektion des Vektors pEYFP-Snapin in Methanol fixiert und permeabilisiert. CK1 $\delta$  wurde in der Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Maus-Antikörper ICOS128A und einem Alexa 568-konjugierten anti-Maus-Antikörper markiert (G). EYFP-Snapin (H) wurde in der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle (I) auf eine mögliche Kolokalisation mit CK1 $\delta$  untersucht. Die Aufnahmen wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop erstellt.

CK1 $\delta$  zeigte in Methanol-fixierten Zellen die in der Literatur beschriebene Verteilung (Behrend *et al.*, 2000a). Zusätzlich zu einer schwachen und etwas diffusen, zum Teil granulären Anfärbung des peripheren Zytoplasmas wurde eine immunreaktive perinukleäre Struktur sichtbar (Abb. 18, A und D). Mit dem Serum CGW4 konnte Snapin ebenfalls diffus im Zytoplasma verteilt detektiert werden. Da bereits in Immunfluoreszenzuntersuchungen in verschiedenen Zelllinien mit dem Präserum von Snapin im Verlauf der Immunisierung eine ähnliche Anfärbung des Zytoplasmas beobachtet worden war, wurde diese Färbung als nicht spezifisch betrachtet. Darüber hinaus konnte Snapin in einer topologisch und morphologisch ähnlichen Struktur detektiert werden wie CK1 $\delta$ , die perinukleär lokalisiert war (Abb. 18, B und E). In der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle konnte eine Kolo-kalisation von CK1 $\delta$  und Snapin in dieser Kern-nahen immunreaktiven Struktur in den gelb erscheinenden Regionen dargestellt werden (Abb. 18, C und F). Die Ausschnittsvergrößerungen der entsprechenden Zellbereiche zeigten, dass die Kolo-kalisation partiell war und sich auf Teile des angefärbten Bereich beschränkte, in denen eine Kolo-kalisation beider Proteine im gleichen Abschnitt der Struktur zur Gelbfärbung führte (Abb. 18, C und F). Zusätzlich zu diesen Bereichen nahezu vollständiger Überlagerung wurden Bereiche sichtbar, in denen CK1 $\delta$ -immunreaktive Regionen an Regionen angrenzten, in denen Snapin detektiert werden konnte.

Die subzelluläre Verteilung von exogenem, als EYFP-Fusionsprotein überexprimiertem Snapin entsprach der Lokalisation des endogenen Proteins. Eine Anfärbung perinukleärer, scharf umgrenzter Bereiche war ebenso zu beobachten wie eine allgemein starke, diffuse Anfärbung des gesamten Zytoplasmas und des Zellkerns, die möglicherweise auf die Überexpression zurückzuführen war (Abb. 18, H). Infolge der Transfektion und Überexpression kam es weiterhin zu einer Vakuolisierung in einigen Zellen. Das rekombinante Snapin lokalisierte somit im gleichen Kompartiment der Zellen wie das endogene Snapin und konnte in Doppelfärbungen mit dem anti-CK1 $\delta$  Antikörper (Abb. 18, G) ebenfalls in Teilbereichen der perinukleären Struktur in einer partiellen Kolo-kalisation mit CK1 $\delta$  dargestellt werden (Abb 18, I).

Für CK1 $\delta$  ist im perinukleären Bereich eine Kolo-kalisation mit dem Protein TGN38 beschrieben worden (Behrend *et al.*, 2000a), das ein spezifischer Marker des Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) ist, des äusseren, zur Zellperipherie orientierten Abschnitts des Golgi-Apparats (Luzio *et al.*, 1990). Um die Snapin-immunreaktive Struktur näher zu charakterisieren, wurde in NRK Fibroblasten unter Verwendung eines anti- $\alpha$ -MannosidaseII Antikörpers zunächst der Golgi-Apparat angefärbt. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte eine Kern-nahe Membranstruktur dargestellt werden (Abb. 19, A). Die Detektion von Snapin erfolgte mit dem Serum CGW4 (Abb. 19, B). In der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle zeigte sich, dass die beiden immunreaktiven Kompartimente eine ähnliche Morphologie besaßen und teilweise zur Deckung gebracht werden konnten (Abb. 19, C).

Snapin wurde weiterhin in stabil GFP-TGN38 überexprimierenden Kplus Zellen zusammen mit dem TGN dargestellt (Abb. 19, D). Das TGN wies als Teilbereich des Golgi-Apparats eine ähnliche Morphologie wie dieser auf (Abb. 19, E) und konnte nur durch den Nachweis spezifischer Markerproteine vom Golgi-Apparat unterschieden werden. Snapin zeigte in der durch GFP-TGN38 gefärbten Region des TGN in der überlagerten Darstellung der Fluoreszenzkanäle eine partielle Kolokalisation mit dem spezifischen Markerprotein TGN38 (Abb. 19, F).

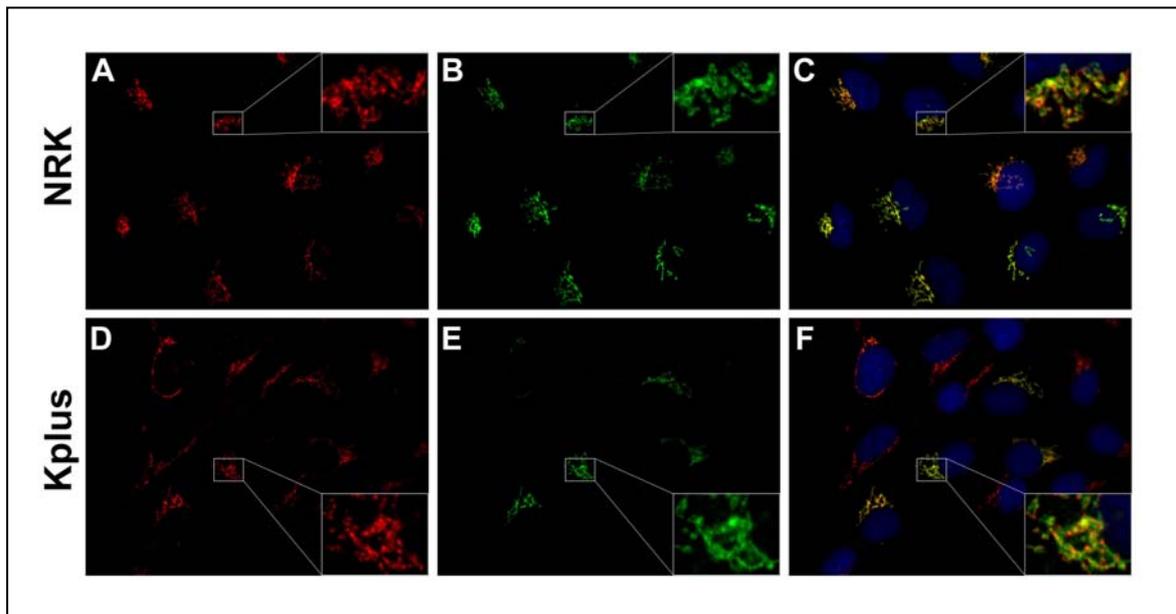


Abb. 19 **Subzelluläre Lokalisation von Snapin und dem Golgi-Apparat bzw. dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in NRK und Kplus Zellen.**

NRK Zellen und Kplus Zellen wurden mit eiskaltem Methanol fixiert und permeabilisiert. Snapin wurde mit dem Kaninchenserum CGW4 markiert und mit einem Alexa 488-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (B) bzw. einem Alexa 568-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (D) dargestellt

A-C: Darstellung von endogenem Snapin (B) und dem Golgi-Apparat (A) in NRK Zellen in der Doppelimmunfluoreszenz. Der Golgi-Apparat wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das spezifische Markerprotein  $\alpha$ -MannosidaseII in Verbindung mit einem Alexa 568-konjugierten anti-Maus-Antikörper dargestellt. In der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle (C) ist das Chromatin mit dem DNA-färbenden Agens DAPI dargestellt.

D-F: Darstellung von Snapin (D) und dem TGN (E) in GFP-TGN38 überexprimierenden Kplus Zellen. In der Überlagerung der Kanäle (F) wurde das Chromatin mit DAPI dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop erstellt.

#### 5.2.4.2 Lokalisation von CK18 und RanBPM55 in Balb/c 3T3 und F111 Zellen

Die subzelluläre Lokalisation von RanBPM wurde in verschiedenen Zelllinien mit dem spezifischen Kaninchenserum CGV1 analysiert. Generell entsprach die zu beobachtende Verteilung von RanBPM in den Zellen zwei unterschiedlichen Typen, in dieser Arbeit gezeigt am Beispiel der

Fibroblastenzelllinien Balb/c 3T3 (Abb. 20, A-F) und F111 (Abb. 20, G-L). In allen untersuchten Zelllinien wurde ausschliesslich eine Anfärbung von Strukturen im Zellkern beobachtet, eine zytoplasmatische Verteilung des Proteins lag nicht vor (Abb. 20, B, C, E, F, H, I, K, L).

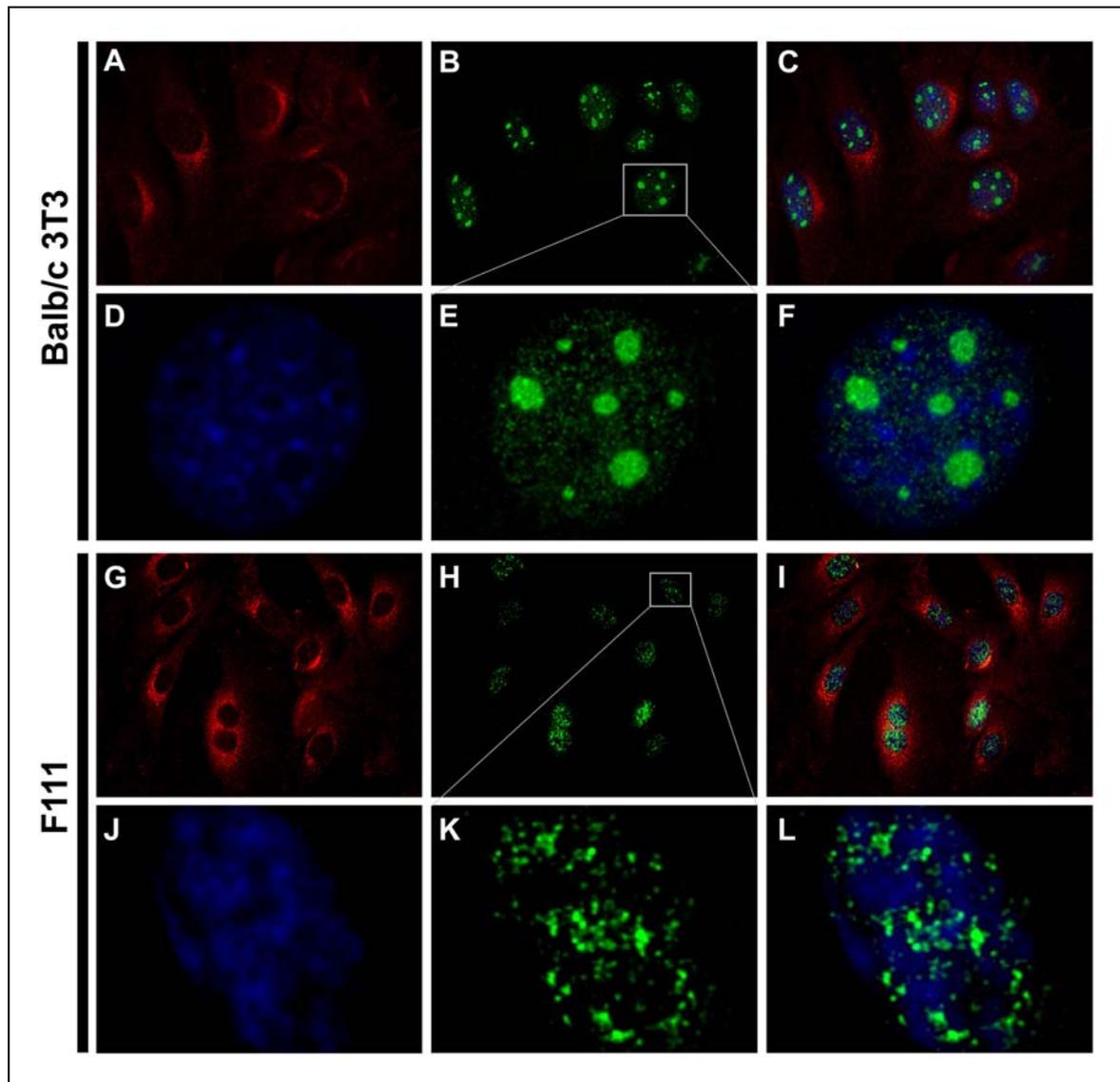


Abb. 20 Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  und RanBPM in Balb/c 3T3 und F111 Zellen.

Balb/c 3T3 und F111 Zellen wurden mit eiskaltem Methanol fixiert und permeabilisiert. Die Darstellung von endogenem RanBPM in Balb/c 3T3 (B, C, E, F) und F111 (H, I, K, L) Zellen erfolgte mit dem spezifischen Kaninchenserum CGV1 und mit einem Alexa 488-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper. CK1 $\delta$  (A, G) wurde in der Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Maus-Antikörper ICOS128A und einem Alexa 568-konjugierten anti-Maus-Antikörper markiert. In der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle dieser Immunfluoreszenzen (C, F, I, L) wurde das Chromatin zusätzlich mit DAPI gefärbt. Ausschnittsvergrößerungen zeigen die exakte Struktur des Chromatins (D, J) und von RanBPM (E, K) sowie die Überlagerung der vergrösserten Darstellungen (F, L). Die Aufnahmen wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop erstellt.

In einem Teil der untersuchten Zelllinien, zu denen Balb/c 3T3 gehörten, war RanBPM hauptsächlich auf die grossen, Chromatin-freien Areale innerhalb des Zellkerns beschränkt, in denen eine starke und dichte Anfärbung zu sehen war. Eine Subpopulation war in einer Vielzahl wesentlich kleinerer, distinkter Foci angeordnet, die im gesamten Karyoplasma verteilt waren (Abb. 20, B, C, E, F). Die zweite Gruppe von Zelllinien im Hinblick auf die Lokalisation des endogenen RanBPM wurde von F111 Zellen repräsentiert. In diesen Zellen wurde mit dem Serum CGV1 ebenfalls eine Vielzahl distinkter Foci in den Chromatin-freien Regionen des Zellkerns angefärbt. Diese Substrukturen waren insgesamt grösser als die kleinen Foci, die in Balb/c 3T3 Zellen detektiert wurden, und besaßen darüber hinaus eine unregelmässige Anordnung und Grösse (Abb. 20, H, I, K, L).

CK1 $\delta$  lokalisierte in allen untersuchten Zelllinien im perinukleären Bereich und wurde nicht im Zellkern nachgewiesen (Abb. 20, A und G). Eine Kolokalisation von CK1 $\delta$  und RanBPM konnte aufgrund der Verteilung der Proteine in den unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten Zytoplasma und Karyoplasma in der Immunfluoreszenz nicht detektiert werden.

Die Analyse der subzellulären Verteilung von EYFP-RanBPM55 in verschiedenen Zelllinien zeigte eine diffuse karyo- und zytoplasmatische Lokalisation des rekombinanten überexprimierten Proteins. Eine Assoziation mit distinkten Strukturen konnte weder im Zellkern noch im Zytoplasma beobachtet werden. Die Lokalisation des exogenen Proteins entsprach somit nicht der subzellulären Verteilung von endogenem RanBPM, die mit dem spezifischen Serum detektiert worden war.

### **5.2.5 Kartierung des Bereichs der Interaktion zwischen CK1 $\delta$ und LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 auf CK1 $\delta$**

Um den Bereich von CK1 $\delta$  näher zu bestimmen, der die Interaktion mit LC2-F, Snapin bzw. RanBPM55 vermittelte, wurden N- und C-terminal verkürzte Fragmente von CK1 $\delta$  im YTH System auf eine Interaktion mit LC2-F, Snapin und RanBPM55 untersucht. Zu diesem Zweck wurden unterschiedlich lange N-terminal verkürzte Fragmente des N-Terminus sowie C-terminal verkürzte Fragmente des C-Terminus von CK1 $\delta$ wt in der PCR amplifiziert, in den Vektor pcDNA3.1-V5/His<sup>©</sup> TOPO<sup>®</sup> integriert und anschliessend über *NcoI* und *SalI* in pGBKT7 inseriert. Eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotid-Primer, die auf diese Weise generierten Vektoren, sowie die von den einzelnen Vektoren exprimierten Fragmente von CK1 $\delta$  unter Angabe der Aminosäurereste des exprimierten Proteins, ist in Abschnitt 4.9 aufgeführt. Zunächst wurde eine mögliche Autoaktivierung der Reportergene durch die einzelnen Vektoren ausgeschlossen. Die Vektoren wurden dann mit pGADT7-LC2-16, pGADT7-Snapin-16, bzw. pGADT7-RanBPM-510 in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert. Die Transformanden wurden auf das Wachstum auf selektiven SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade Platten überprüft und einem  $\beta$ -Gal-Filter-Assay unterzogen.

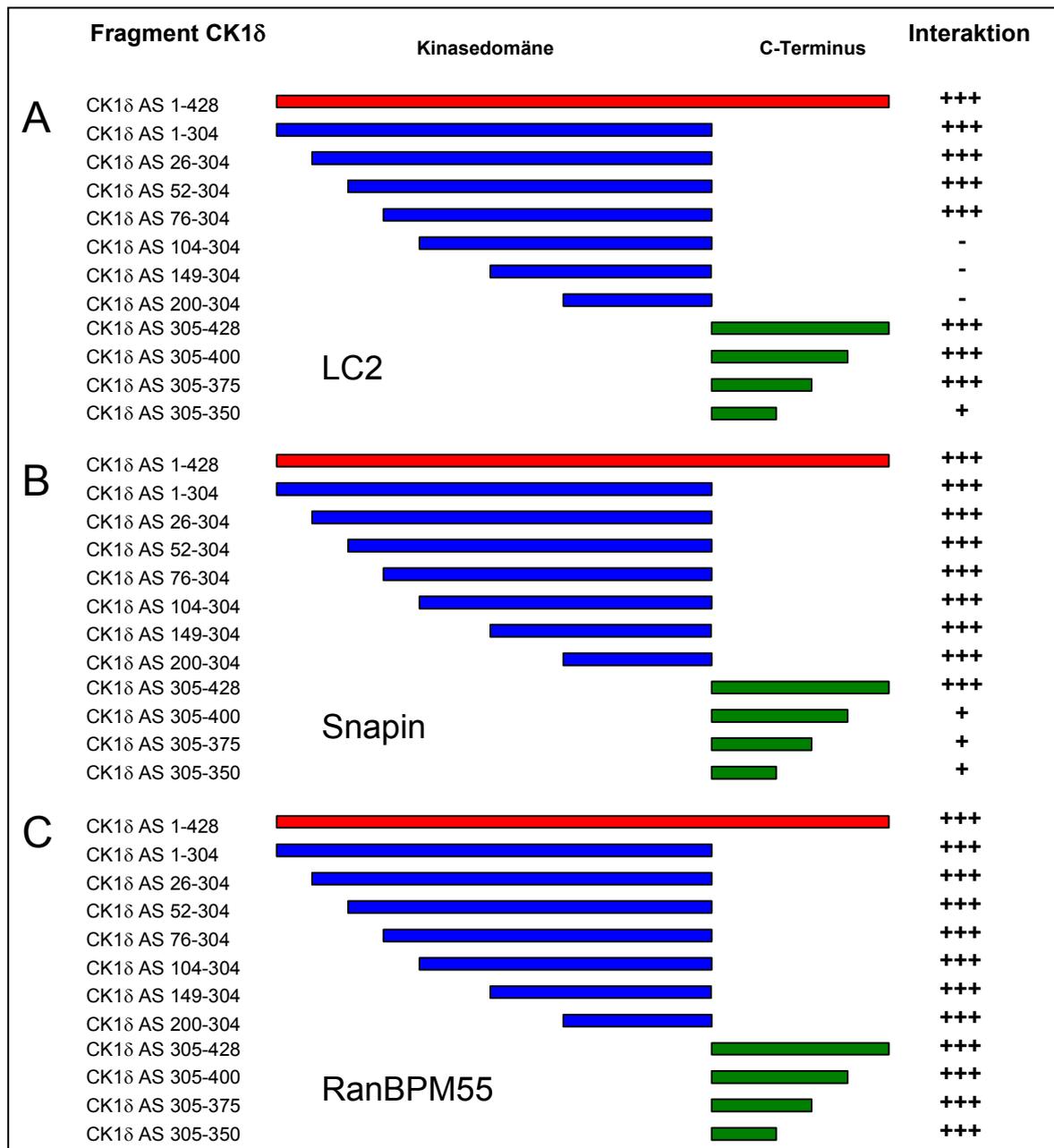


Abb. 21 **Kartierung der Bindungsdomäne von CK1δ für LC2-F, Snapin und RanBPM55.**

Die Vektoren pGADT7-LC2-16, pGADT7-Snapin-16, bzw. pGADT7-RanBPM-510 wurden mit den unter Abschnitt 4.9 aufgeführten Vektoren, die N- und C-terminale Fragmente von CK1δ enthielten, in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert. Der Nachweis der Interaktion erfolgte jeweils durch Wachstum auf selektiven SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade Agarplatten, zusätzlich wurde ein β-Gal-Filter-Assay mit den Transformanden durchgeführt. A: LC2, B: Snapin, C: RanBPM. Die Teilbereiche von CK1δ sind als Balken unterschiedlicher Länge dargestellt, die Länge der Balken repräsentiert die Grösse der einzelnen Teilfragmente jeweils massstabsgetreu. Die Domänen von CK1δ (rot) sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Als Kinasedomäne wird der Bereich zwischen AS Aminosäure 1 und 304 (Price *et al.*) und als regulatorische C-terminale Domäne der Bereich ab AS 305 bezeichnet (grün). Die Stärke der Interaktion ist wie folgt gekennzeichnet: +++ starke Interaktion, ++ mittelstarke Interaktion, + schwache Interaktion, - keine Interaktion. AS. Aminosäurerest

LC2 interagiert mit dem C-sowie N-Terminus von CK1 $\delta$  sowie allen N-terminalen Fragmenten, die den N-terminalen Bereich bis AS 75 von CK1 $\delta$  enthielten (Abb. 21 A). Eine Deletion der AS 76-103 führte zum vollständigen Verlust der Interaktion mit LC2-F, dieser Bereich von CK1 $\delta$  war essentiell für eine Wechselwirkung der Proteine im Kontext des YTH Systems. Die Interaktion mit dem C-Terminus wurde stark reduziert bei einer Trunkierung der AS 351-375, während die C-terminal verkürzten Konstrukte, die die AS 305-375 enthielten, eine starke Interaktion zeigten. Die AS 350-375 des C-Terminus von CK1 $\delta$  waren damit ebenfalls notwendig, um die Wechselwirkung mit LC2-F im YTH System zu vermitteln (Abb. 21 A).

Interaktionsdomänen von CK1 $\delta$  mit Snapin lagen sowohl im N-Terminus als auch im C-Terminus von CK1 $\delta$  vor. Die Interaktion im N-terminalen Bereich von CK1 $\delta$  wurde über die AS 200-304 vermittelt. Die AS 1-200 waren nicht notwendig für eine Wechselwirkung mit Snapin, da bei einer Deletion dieser Region weiterhin eine Wechselwirkung der Proteine im Kontext des YTH Systems detektiert werden konnte (Abb. 21 B). Im C-Terminus von CK1 $\delta$  fand bei der Trunkierung der AS 400-428 nur noch eine schwach nachweisbare Interaktion mit Snapin statt, während der gesamte C-Terminus eine starke Interaktion aufwies. Der Bereich zwischen AS 400 und 428 von CK1 $\delta$  war damit notwendig, um die Wechselwirkung von CK1 $\delta$  mit Snapin zu vermitteln.

Für RanBPM konnte der Bereich von CK1 $\delta$ , der für eine Interaktion mit RanBPM notwendig war, mit dem vorgestellten experimentellen Ansatz auf die AS 200-350 eingeschränkt werden. Der N- und der C-Terminus sowie alle unterschiedlichen N- und C-terminal verkürzten Fragmente von CK1 $\delta$  interagierten mit RanBPM mit vergleichbarer Stärke (Abb. 21 C). Da eine Wechselwirkung sowohl mit dem kürzesten N-terminalen Fragment (AS 200-304) als auch mit dem kürzesten C-terminalen Fragment (AS 305-350) stattfand, gab es möglicherweise zwei Interaktionsdomänen von CK1 $\delta$  mit RanBPM, die im Bereich zwischen AS 200 und 350 von CK1 $\delta$  lagen.

### **5.2.6 Kartierung der CK1 $\delta$ Bindungsdomänen von LC2-F, Snapin und RanBPM55**

Die im YTH System als Interaktionspartner von CK1 $\delta$  identifizierten Proteine waren Substrate von CK1 $\delta$ , von denen jeweils Teilbereiche von CK1 $\delta$  unterschiedlich stark phosphoryliert wurden, wie unter Abschnitt 5.2.3 beschrieben worden ist. Die Identifizierung der Bereiche von LC2-F, Snapin und RanBPM55, die die Interaktion mit CK1 $\delta$  jeweils vermittelten bzw. für die Interaktion notwendig waren, wurde im Kontext des YTH Systems durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Teilbereiche der cDNAs der einzelnen Proteine, deren Amplifikation in Abschnitt 5.2.3.1 beschrieben worden ist, in pGADT7 integriert. Die auf diese Weise generierten pGADT7-Vektoren sowie alle Angaben zu den verwendeten Restriktionsenzymen und den exprimierten Teilfragmenten sind im Abschnitt 4.8 und 4.9 aufgeführt. Die einzelnen Vektoren wurden jeweils mit

pGBKT7-CK1 $\delta$ wt in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert. Die Transformanden wurden auf ein Wachstum auf selektiven SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade Agarplatten überprüft und zusätzlich einem  $\beta$ -Gal-Filter-Assay unterzogen. Die Ergebnisse unterschiedlicher Versuche sind jeweils in Abb. 22 schematisch zusammengefasst.

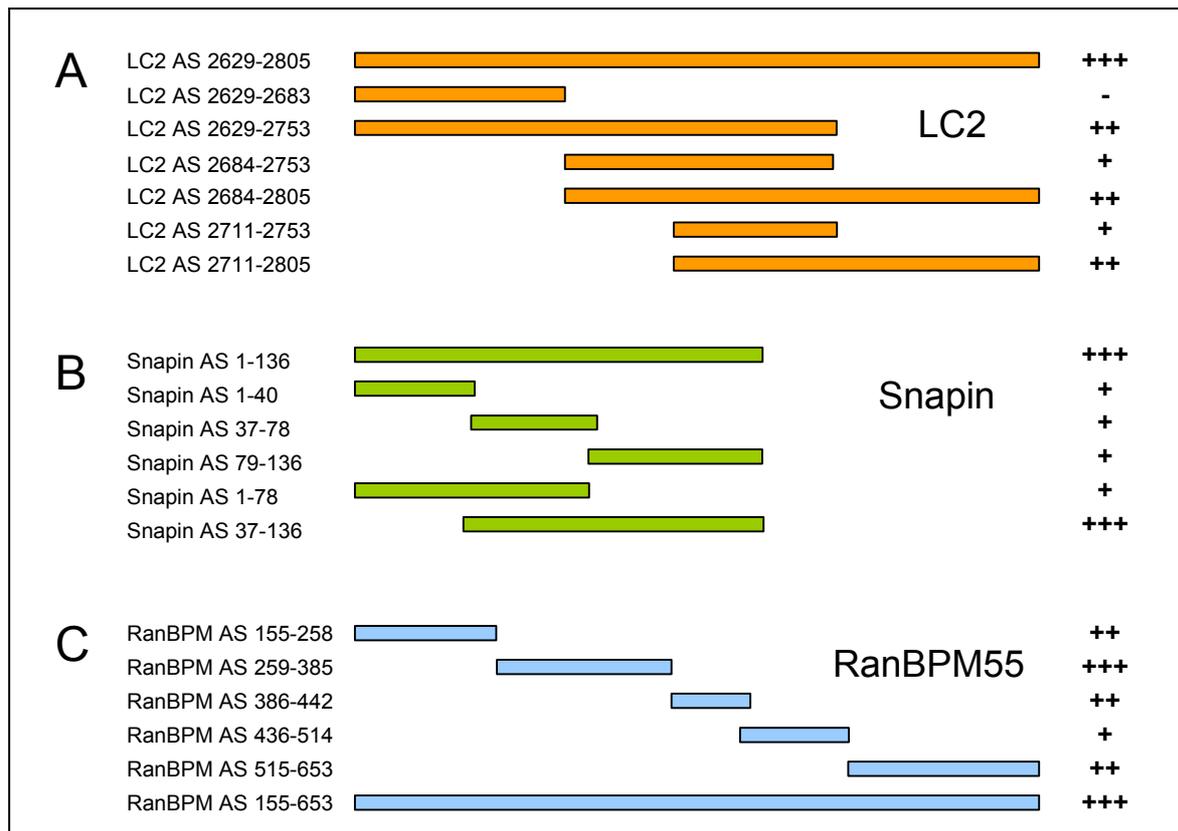


Abb. 22 **Kartierung der Bindungsdomänen von LC2-F, Snapin und RanBPM55 mit CK1 $\delta$ .**

Die unter Abschnitt 4.9 aufgeführten Vektoren, die jeweils unterschiedlich lange Fragmente der Proteine LC2-F, Snapin bzw. RanBPM exprimieren, wurden mit pGBKT7-CK1 $\delta$ wt in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert. Der Nachweis der Interaktion erfolgte jeweils durch Wachstum auf selektiven SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade Agarplatten, zusätzlich wurde ein  $\beta$ -Gal-Filter-Assay mit den Transformanden durchgeführt. Die Ergebnisse unterschiedlicher Versuche sind schematisch zusammengefasst. A: LC2, B: Snapin, C: RanBPM. Die Teilbereiche der Proteine sind als Balken unterschiedlicher Länge dargestellt, die Länge der Balken repräsentiert die Grösse der einzelnen Teilfragmente jeweils massstabsgetreu für jedes Protein. Die Stärke der Interaktion ist wie folgt gekennzeichnet: +++ starke Interaktion, ++ mittelstarke Interaktion, + schwache Interaktion, - keine Interaktion. AS: Aminosäurerest

Der N-terminale Teilbereich von LC2-F von AS 2629-2683 konnte keine Interaktion mit CK1 $\delta$  im YTH System vermitteln, und auch die sich anschliessende Region zwischen AS 2684-2753 interagiert nur schwach (Abb. 22 A). Die mittelstarke Interaktion des Fragments von AS 2629-2753 wies dagegen auf das Vorhandensein einer Interaktionsdomäne im N-terminalen Bereich hin. Die Region von AS 2684-2805 interagiert mittelstark mit CK1 $\delta$ , und auch das in dieser Region

enthaltene Teilfragment von AS 2711-2805 reichte aus, um diese mittelstarke Interaktion aufrechtzuerhalten. Da die Trunkierung der AS 2754-2805 die Wechselwirkung nahezu eliminierte und auch der Teilbereich zwischen AS 2684-2753 nur schwach interagiert, konnte eine weitere Bindungsstelle von CK1 $\delta$  zwischen AS 2711 und AS 2805 von LC2-F lokalisiert werden. Ob die Interaktion von LC2-F mit CK1 $\delta$  simultan jeweils durch mehr als eine Bindungsstelle in den Teilbereichen zwischen AS 2629 und AS 2753 bzw. zwischen AS 2711 und AS 2805 vermittelt wurde oder ob Bindungsstellen in den Übergangsbereichen um AS 2683/2684 bzw. AS2753/2754 vorlagen, konnte mit der vorgestellten experimentellen Anordnung nicht geklärt werden (Abb. 22 A).

Der Gesamtbereich von Snapin interagiert reproduzierbar mit CK1 $\delta$  im YTH System. Die drei kurzen Teilfragmente von Snapin, die die Bereiche von AS 1-40, AS 37-78 bzw. AS 79-136 repräsentieren, waren jeweils nicht ausreichend, um eine mittelstarke oder starke Interaktion mit CK1 $\delta$  zu vermitteln (Abb. 22 B). Der Teilbereich zwischen AS 1 und AS 78 zeigte ebenfalls nur eine schwache Interaktion. Die Region zwischen AS 37 und 136 interagiert mit vergleichbarer Stärke mit CK1 $\delta$  wie das Gesamtprotein und war damit verantwortlich für die Vermittlung der Interaktion. Ob mehrere Bindungsstellen in den Teilbereichen zwischen AS 1-40 bzw. 37-78 gleichzeitig die Interaktion vermitteln oder ob eine einzelne Bindungsstelle im Übergangsbereich zwischen den beiden essentiellen Teilbereichen vorhanden war, bleibt zu klären.

Die Region zwischen AS 259 und 385 von RanBPM55 zeigte eine Wechselwirkung mit CK1 $\delta$  von vergleichbarer Stärke wie das Gesamtprotein RanBPM55. Die Regionen von AS 155-258, AS 386-442 und 515-653 interagierten mittelstark mit CK1 $\delta$  im YTH System, der Bereich zwischen AS 436 und 514 konnte keine Interaktion vermitteln (Abb. 22 C).

### **5.3 Charakterisierung des Einflusses von CK1 $\delta$ auf die Transformationskompetenz des grossen Tumorantigen (T-Ag) von Simian Virus 40 (SV40)**

Bei der überwiegenden Anzahl der bisher beschriebenen Substrate der Casein Kinase 1 Familie ist nicht geklärt, ob die Phosphorylierung auch *in vivo* auftritt und ob eine biologische Relevanz dieser posttranslationalen Modifikation vorliegt. Eines der wenigen gesicherten *in vivo* Substrate von CK1 ist das grosse Tumorantigen (T-Ag) des Simian Virus 40 (SV40). T-Ag wird durch die CK1 Isoformen CK1 $\alpha$  und CK1 $\epsilon$  phosphoryliert. Die Phosphorylierung von T-Ag an Ser<sup>120</sup> und Ser<sup>123</sup> durch CK1 $\alpha$  beeinflusst die Initiation der SV40 DNA-Replikation (Cegielska & Virshup, 1993; Cegielska *et al.*, 1994). Aufgrund der Tatsache, dass CK1 $\epsilon$  in der Lage ist, T-Ag *in vitro* zu phosphorylieren (Fish *et al.*, 1995), konnte zu Beginn dieser Arbeit postuliert werden, dass die mit CK1 $\epsilon$  verwandte Isoform CK1 $\delta$ , die mit CK1 $\epsilon$  in der Kinasedomäne zu 97% identisch ist, T-Ag

ebenfalls phosphorylieren kann. Daher sollte zunächst geklärt werden, ob T-Ag ein Substrat von CK1 $\delta$  darstellt.

### 5.3.1 Analyse der *in vitro* Phosphorylierung von T-Ag durch CK1 $\delta$

Um zu überprüfen, ob CK1 $\delta$  SV40 T-Ag *in vitro* phosphorylieren kann, wurde eine *in vitro* Kinasierung mit rekombinantem, im Baculovirus-Expressionssystem produzierten T-Ag durchgeführt. Da CK1 $\epsilon$  aufgrund einer inhibitorischen Autophosphorylierung im C-Terminus des Enzyms T-Ag mit 9-fach geringerer Effizienz phosphoryliert als CK1 $\alpha$  (Cegielska *et al.*, 1998), wurde als Enzym eine C-terminal trunke CK1 $\delta$  eingesetzt, die funktionell der Kinasedomäne entsprach. Die trunke CK1 $\delta$  phosphorylierte T-Ag *in vitro* (Abb. 23).

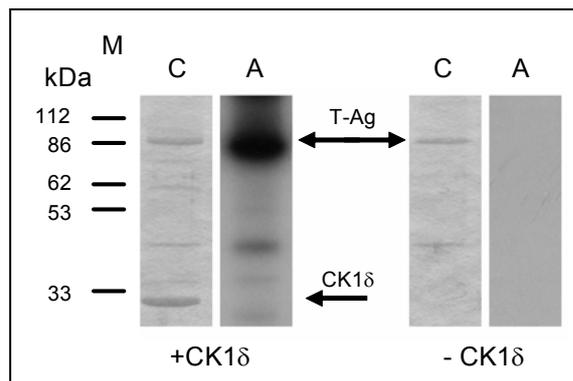


Abb. 23 ***In vitro* Phosphorylierung von T-Ag durch CK1 $\delta$ .**

1  $\mu$ g des aus dem Baculovirus-Expressionssystem aufgereinigten T-Ag wurde mit 500 Einheiten der C-terminal trunke CK1 $\delta$  30 Minuten bei 30°C inkubiert und die Kinasierung gelelektrophoretisch in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Autoradiogramm wurde nach 30 Minuten Exposition entwickelt. C: Coomassie-Färbung, A: Autoradiogramm.

### 5.3.2 Untersuchungen zur Reduktion der CK1 $\delta$ Kinaseaktivität im Rev2/SV-52 Zellsystem

Der Phosphorylierungsstatus von SV40 T-Ag beeinflusst nicht nur die Replikation der viralen DNA im lytischen Zyklus (zur Übersicht: Prives, 1990), sondern auch die Transformationskompetenz von T-Ag in nicht-permissiven Zellen. Transformationsrelevante Phosphorylierungsstellen von T-Ag konnten durch Untersuchungen in zellulären Systemen bestimmt werden, in denen eine Transformationsinkompetenz von T-Ag beobachtet wurde (Deppert *et al.*, 1991; Knippschild *et al.*, 1991). Das SV-52/Rev2 Zellsystem stellt ein derartiges System dar, bestehend aus der nach Mikroinjektion von SV40-DNA in REF52 Rattenembryofibroblasten etablierten, maximal transformierten Zelllinie SV-52 (Graessmann & Graessmann, 1983) und der von diesen Zellen abgeleiteten revertanten Zelllinie Rev2 (Bauer *et al.*, 1987). Rev2 Zellen weisen einen minimal transformierten Phänotyp auf, der vergleichbar ist mit dem Phänotyp von immortalisierten

REF52 Zellen. Da Rev2 Zellen authentisches Wildtyp T-Ag in Bezug auf die kodierende Sequenz exprimieren, müssen zelluläre Faktoren an der Ausprägung des transformierten Phänotyps beteiligt sein, die die transformierenden Eigenschaften von T-Ag beeinflussen (Bauer *et al.*, 1987; Deppert *et al.*, 1991). Die Untersuchung der transformationsrelevanten biochemischen Eigenschaften von T-Ag zeigte, dass T-Ag in Rev2 Zellen nicht mit dem zellulären Chromatin assoziiert und zudem eine reduzierte Affinität für SV40 ORI-DNA aufweist. Diese biochemischen Veränderungen korrelieren mit einer Reduktion in der Phosphorylierung der transformationsrelevanten Phosphorylierungsstellen Ser<sup>120</sup>, Ser<sup>123</sup>, Ser<sup>670</sup> und Ser<sup>679</sup> (Deppert *et al.*, 1991). Die Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von T-Ag in Rev2 Zellen können entweder auf eine gesteigerte Aktivität zellulärer Phosphatasen oder auf eine Reduktion der Aktivität von Kinasen zurückzuführen sein. Da Mitglieder der CK1 Familie transformationsrelevante Phosphorylierungsstellen von T-Ag *in vitro* phosphorylieren (Grasser *et al.*, 1988; Cegielska & Virshup, 1993; Cegielska *et al.*, 1994; Fish *et al.*, 1995), sollte nachfolgend der Status von CK1 $\delta$  in SV-52 und Rev2 Zellen analysiert werden.

### 5.3.2.1 Expressionstatus und subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$ in SV-52 und Rev2 Zellen

Der Expressionsstatus von CK1 $\delta$  in SV-52 und Rev2 Zellen wurde im Western Blot dokumentiert. In gleichen Mengen von zellulärem Gesamtprotein konnten vergleichbare Mengen von CK1 $\delta$  in SV-52 und Rev2 Zellen detektiert werden (Abb. 24). Das Auftreten einer höhermolekularen Form von CK1 $\delta$  in den Extrakten von SV-52 Zellen, angezeigt durch eine reduzierte elektrophoretische Mobilität (Abb. 24, Spur 1), könnte auf posttranslationale Modifikationen von CK1 $\delta$  in SV-52 Zellen zurückzuführen sein.

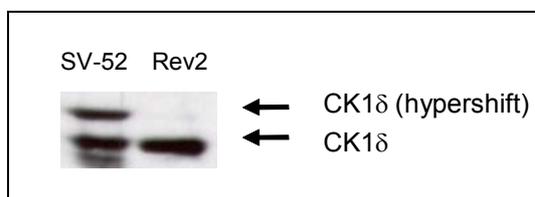


Abb. 24 **Expressionsstatus von CK1 $\delta$  in SV-52 und Rev2 Zellen**

Angeglichene Proteinmengen von SV-52 und Rev2 Zelllysaten wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. CK1 $\delta$  wurde mit dem monoklonalen Antikörper ICOS128A detektiert.

Immunfluoreszenzanalysen der subzellulären Lokalisation von CK1 $\delta$  zeigten die gleiche perinukleäre Verteilung der Kinase in SV-52 Zellen und Rev2-Zellen (Abb. 25 A und D). Die unterschiedliche Morphologie der spindelförmigen, maximal transformierten SV-52 Zellen und der flachen, minimal transformierten Rev2 Zellen wurde durch eine Aktin-Färbung mit Phalloidin-FITC verdeutlicht (Abb. 25 B, C, E und F).

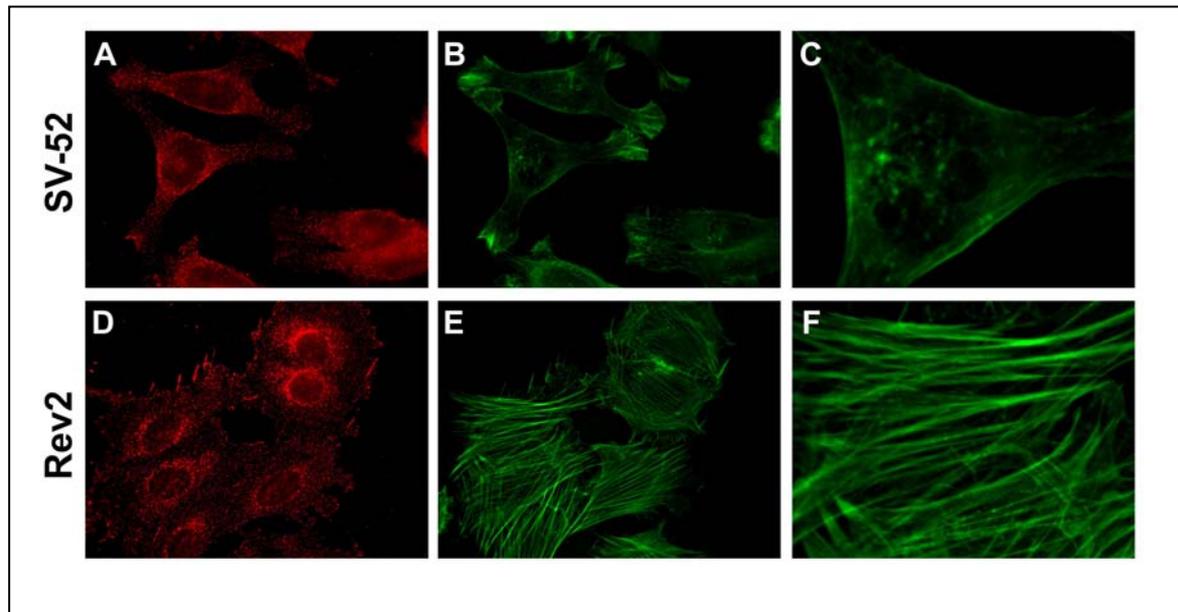


Abb. 25: **Subzelluläre Verteilung von CK1δ in SV-52 und Rev2 Zellen.**

SV-52 und Rev2 Zellen wurden 2 Tage auf Deckgläschen kultiviert, mit 3% Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. CK1δ wurde mit dem Antikörper ICOS128A detektiert (A und D) und ist in rot dargestellt. Die Aktinfilamente wurden mit Phalloidin-TRITC angefärbt (B und E) und sind in grün dargestellt. Die Ausschnittsvergrößerungen (C und F) zeigen jeweils einen Teilbereich des Aktinfilament-systems von SV-52 und Rev2 Zellen.

### 5.3.2.2 Reduktion der CK1δ Aktivität in Rev2 Zellen

Der minimal transformierte Phänotyp von Rev2 Zellen korreliert mit der Expression eines transformationsdefekten T-Ag und einer reduzierten Phosphorylierung der transformationsrelevanten Phosphorylierungsstellen Ser<sup>120</sup>, Ser<sup>123</sup> und Thr<sup>124</sup> von T-Ag. Um zu überprüfen, ob Unterschiede in der Kinaseaktivität von CK1δ in Rev2 Zellen im Vergleich zu SV-52 auftraten, wurden gleiche Proteinmengen zellulärer Extrakte beider Zelllinien durch Anionenaustauschchromatographie über eine Resource Q Anionenaustauschersäule fraktioniert. Zur Quantifizierung der Kinaseaktivität in den Zelllinien wurden *in vitro* Kinasierungen mit den einzelnen Fraktionen durchgeführt. Die Quantifizierung der Kinaseaktivität erfolgte durch Cherenkov-Zählung der ausgeschnittenen Substratbanden nach der Auftrennung der Reaktionsansätze in der SDS-PAGE und dem Trocknen der Gele. Als Substrate wurden FP267 und aus dem Baculovirus-Expressionssystem aufgereinigtes T-Ag verwendet. In beiden Zelllinien wurde ein einzelner Peak mit CK1 Kinaseaktivität detektiert, der bei 200 mM NaCl für SV-52 Zellen und bei 180mM NaCl für Rev2 Zellen eluiert. Die in Rev2 Zellen detektierte Kinaseaktivität betrug bei Verwendung von FP267 als Substrat lediglich ungefähr 40% der *in vitro* Kinaseaktivität, die in Extrakten von SV-52 Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 26 A, D). Bei Verwendung von T-Ag als Substrat war die

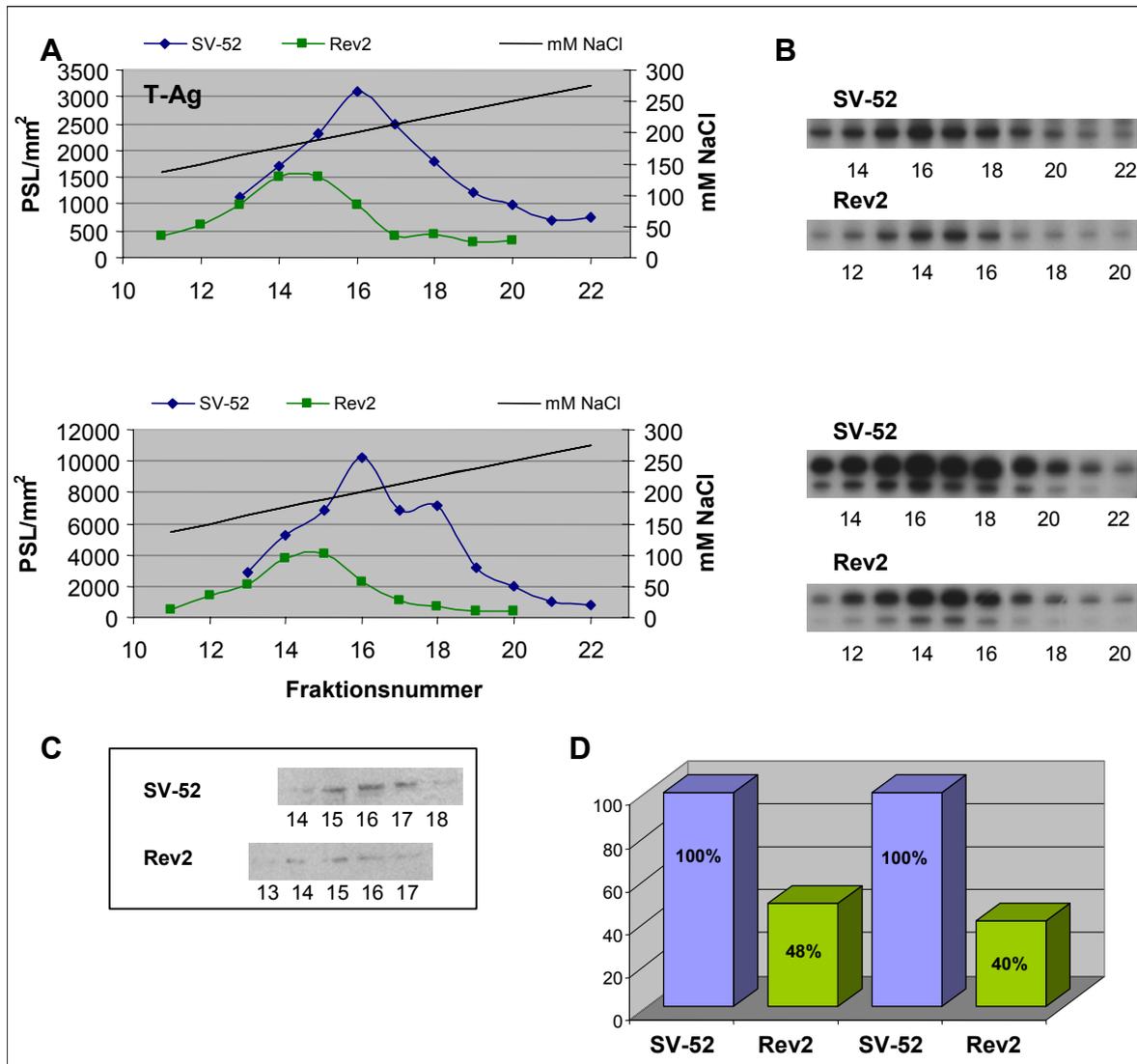


Abb. 26 Charakterisierung der CK1 Aktivität in SV-52 und Rev2 Zellen

Zelluläre Extrakte von SV-52 und Rev2 Zellen wurden in der Anionenaustauschchromatographie fraktioniert. Jeweils 2 µl der Peakfraktionen wurden in *in vitro* Kinasierungen mit den Substraten T-Ag und FP267 verwendet. Die Quantifizierung erfolgte nach der Auftrennung der Reaktionen in der SDS-PAGE durch Cherenkov-Zählung der aus den Gelen ausgeschnittenen, getrockneten Substratbanden. cpm: „counts per minute“ (Zerfälle pro Minute)

A: *In vitro* Kinasierung von T-Ag und FP267: Graphische Darstellung

B: *In vitro* Kinasierung von T-Ag und FP267: Autoradiogramm der phosphorylierten Substrate T-Ag und FP267. Die Nummerierung zeigt die einzelnen Fraktionen an, mit denen die *in vitro* Kinasierungen von T-Ag und FP267 jeweils durchgeführt wurden.

C: Nachweis von CK1δ in den eluierten Peakfraktionen. Nach der Konzentration der Peakfraktionen, der Auftrennung in der SDS-PAGE und dem Transfer auf Nitrozellulose-Membranen wurde CK1δ mit dem monoklonalen Antikörper ICOS128A detektiert.

D: Darstellung der CK1 Kinaseaktivität in Rev2 Zellen im Vergleich zu der in SV-52 Zellen detektierten Aktivität im Balkendiagramm. Die in SV-52 Zellen detektierte Kinaseaktivität wurde mit 100% gleichgesetzt.

Kinaseaktivität in Rev2 Zellen im Vergleich zu SV-52 Zellen um 50% reduziert (Abb. 26 A, B, D). In Western Blot Analysen der Peakfraktionen konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinmengen von CK1 $\delta$  mit dem Auftreten der Aktivität korrelierte, die FP267 und T-Ag phosphorylierte (Abb. 26 C). Diese Beobachtung deutete an, dass die Phosphorylierung von FP267 und T-Ag in den Zellextrakten von SV-52 und Rev2 Zellen durch CK1 $\delta$  erfolgte.

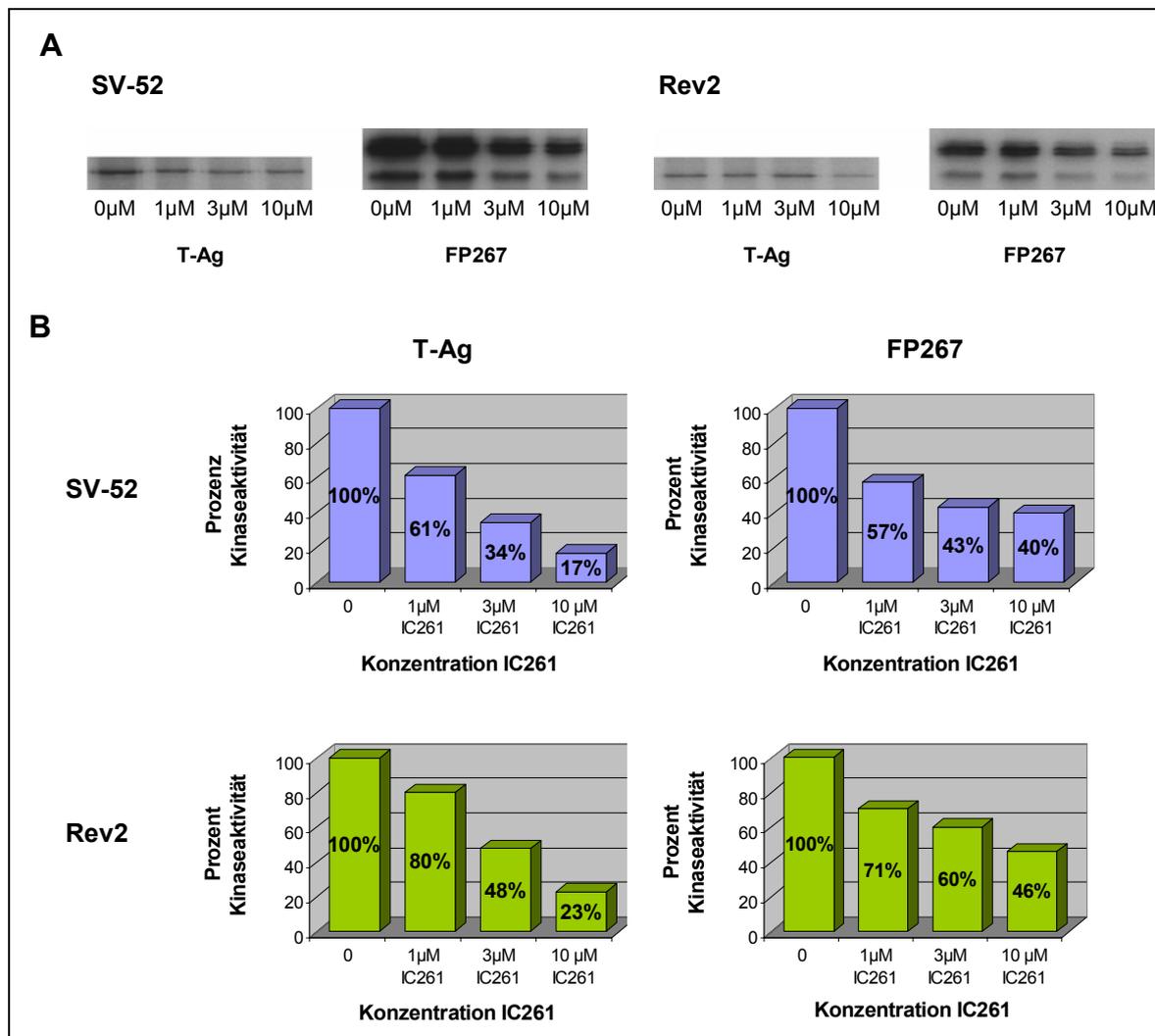


Abb. 27 **Inhibition der CK1 Kinaseaktivität durch Zugabe des spezifischen Inhibitors IC261.**

A: *In vitro* Kinaseaktivität in zellulären Extrakten von SV-52 und Rev2 Zellen in Gegenwart von 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M und 10  $\mu$ M IC261.

B: Darstellung der CK1 *in vitro* Kinaseaktivität in zellulären Extrakten von SV-52 und Rev2 Zellen in Gegenwart von 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M und 10  $\mu$ M IC261 im Balkendiagramm. Die Aktivität bei der Kinasierung von T-Ag bzw. FP267 ohne Zugabe von IC261 wurde jeweils mit 100% gleichgesetzt.

Um die Spezifität der Phosphorylierung der Substrate näher zu bestimmen, wurden *in vitro* Kinasierungen in Gegenwart des für die CK1 Isoformen CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  spezifischen Inhibitors IC261 durchgeführt. Die Zugabe von 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M IC261 reduzierte die in der Peakfraktion von SV-52 Zellen vorhandene Kinaseaktivität um 39%, 56% bzw. 83% bei Verwendung von T-Ag als *in vitro* Substrat und um 43%, 57% bzw. 60% bei dem Einsatz von FP267. In Rev2 Zellen war bei einer *in vitro* Kinasierung in Gegenwart von 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M IC261 eine Reduktion der Kinaseaktivität der Peakfraktion um 20%, 52% bzw. 77% bei der Nutzung von T-Ag und um 29%, 40% bzw. 45% bei Verwendung von FP267 als Substrat zu beobachten (Abb. 27 A und B).

### 5.3.2.3 Identifizierung von Punktmutationen in der kodierenden Region von CK1 $\delta$ in Rev2 Zellen

Die Aktivität von CK1 $\delta$  wird durch Veränderungen im Phosphorylierungsstatus der Kinase beeinflusst (Graves & Roach, 1995). Die unterschiedlichen Elutionsprofile nach der Fraktionierung über die Anionenaustauschersäule wiesen bereits auf das Vorhandensein von posttranslationalen Modifikationen von CK1 $\delta$  in SV-52 und Rev2 Zellen hin. Die Reduktion der Kinaseaktivität in Rev2 Zellen könnte daher auf Änderungen im Phosphorylierungsstatus der Kinase oder Modifikationen durch zelluläre Faktoren zurückzuführen sein, die die Aktivität der Kinase verändern. Alternativ könnte CK1 $\delta$  Mutationen aufweisen, die zu Konformations- und Aktivitätsänderungen führten. Es wurde postuliert, dass in den Wildtyp T-Ag exprimierenden Rev2 Zellen zelluläre Mutationen die Transformationskompetenz von T-Ag reduzieren (Deppert *et al.*, 1991). Durch Sequenzierung von CK1 $\delta$  aus SV-52 und Rev2 Zellen wurde überprüft, ob CK1 $\delta$  einer dieser zellulären Faktoren sein könnte. Zu diesem Zweck wurde RNA aus SV-52 und Rev2 Zellen in einer RT-PCR umgeschrieben und in den Vektor pCR3.1 integriert. In der CK1 $\delta$  cDNA aus SV-52 Zellen wurde im Vergleich mit der publizierten Sequenz aus der Ratte (Graves *et al.*, 1993) eine Basensubstitution an Position 671 (AAG $\rightarrow$ AGG) entdeckt, die den Austausch eines basischen Lysins gegen ein ebenfalls basisches Arginin bewirkte. Im Gegensatz dazu zeigte die DNA-Sequenz-Analyse der cDNA aus Rev2 Zellen Punktmutationen an den Positionen 71 (TAT $\rightarrow$ TGT), 139 (CTT $\rightarrow$ TCT), 514 (ACC $\rightarrow$ GAC), 605 (GTG $\rightarrow$ GCG), 994 (GGC $\rightarrow$ AGC) und 1150 (TCT $\rightarrow$ CCT), die zu einem Austausch der Aminosäurereste an den Positionen 24 (Tyr $\rightarrow$ Cys), 47 (Pro $\rightarrow$ Ser), 172 (Asn $\rightarrow$ Asp), 202 (Val $\rightarrow$ Ala), 332 (Gly $\rightarrow$ Ser) und 384 (Ser $\rightarrow$ Pro) führten.

### 5.3.2.4 Reduktion der Kinaseaktivität von rekombinanter mutierter CK1 $\delta$ aus Rev2 Zellen

Da die in Abschnitt 5.3.2.2 beschriebene Reduktion der Kinaseaktivität in den zellulären Extrakten von Rev2 Zellen mit der Expression der mutierten CK1 $\delta$  (CK1 $\delta$ rev) korrelierte, sollte überprüft werden, ob die aus Rev2 Zellen isolierte Kinase eine Reduktion der *in vitro* Kinaseaktivität im Vergleich zu der aus SV-52 Zellen isolierten CK1 $\delta$  (CK1 $\delta$ wt) aufwies. Zu diesem Zweck wurden die cDNAs der Kinasen in den Vektor pGEX-2T inseriert und als GST-Fusionsproteine aufgereinigt. Mit angeglichenen Mengen der rekombinanten Kinasen wurden die Substrate FP267 und T-Ag *in vitro* phosphoryliert. CK1 $\delta$ rev wies eine deutlich reduzierte Kinaseaktivität gegenüber FP267 auf im Vergleich zu CK1 $\delta$ wt (Abb. 28). Es konnte eine starke Autophosphorylierung der aus Bakterien aufgereinigten rekombinanten Kinasen beobachtet werden. Diese allgemein für rekombinante CK1 $\delta$  beschriebene Autophosphorylierung übte möglicherweise einen inaktivierenden Einfluss auf CK1 $\delta$  aus, der dazu führte, dass T-Ag weder durch CK1 $\delta$ wt noch durch CK1 $\delta$ rev *in vitro* phosphoryliert wurde (Abb. 28).

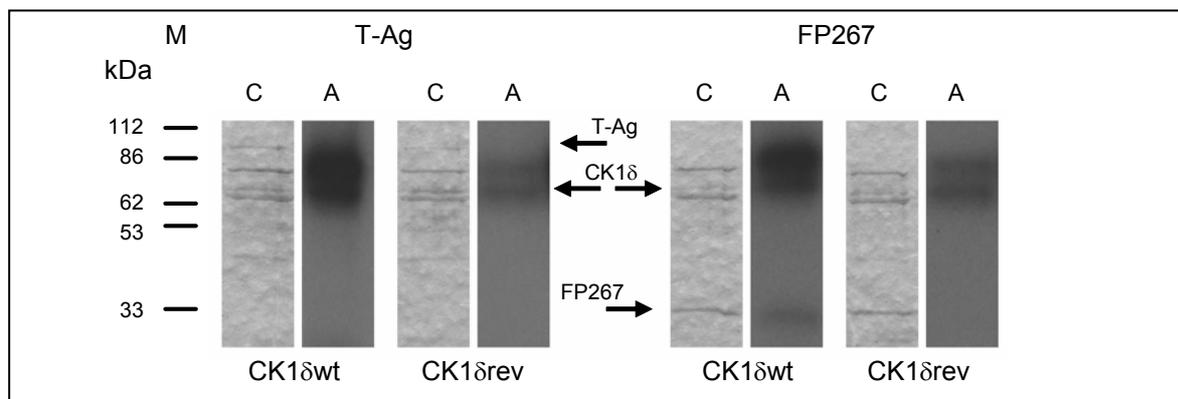


Abb. 28 **Charakterisierung der CK1 Aktivität von rekombinanter CK1 $\delta$ rev und CK1 $\delta$ wt**

CK1 $\delta$ rev und CK1 $\delta$ wt wurden als GST-Fusionsproteine aufgereinigt und als Enzyme zur *in vitro* Kinisierung von FP267 und T-Ag in Gegenwart von [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP verwendet. Die phosphorylierten Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung (C) gefärbt. Die Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie (A) detektiert.

CK1 $\delta$ : Position der autophosphorylierten CK1 $\delta$ , M: Protein-Marker, kDa: Kilodalton

### 5.3.3 Effekt der Überexpression von CK1 $\delta$ rev in SV-52 Zellen

Die Charakterisierung von CK1 $\delta$  in SV-52 und Rev2 Zellen hatte gezeigt, dass CK1 $\delta$  in Rev2 Zellen eine Anzahl von Punktmutationen aufwies, die zu einer Reduktion der Kinaseaktivität im Vergleich zur CK1 $\delta$  Kinaseaktivität in SV-52 Zellen führte. Da SV40 T-Ag ein *in vitro* Substrat

von CK1 $\delta$  darstellte, könnte die Ausprägung des minimal transformierten Phänotyps von Rev2 Zellen zumindest teilweise auf die Expression der mutierten CK1 $\delta$ rev mit reduzierter Kinaseaktivität zurückzuführen sein.

Experimente mit Fusionszellen aus SV-52 und Rev2 Zellen haben einen dominant-negativen Charakter der zellulären Mutation(en) in Rev2 Zellen dokumentiert (W. Deppert *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). SV-52/Rev2 Fusionszellen wiesen einen Phänotyp auf, der dem von Rev2 Zellen entsprach. Das in diesen Zellen exprimierte T-Ag besaß die charakteristischen Eigenschaften von transformationsdefektem T-Ag wie eine fehlende Assoziation mit dem zellulären Chromatin und eine reduzierte Phosphorylierung transformationsrelevanter Phosphorylierungsstellen. Die Expression katalytisch inaktiver Kinasen übt häufig einen dominant-negativen Effekt im Hinblick auf die Aktivität der korrespondierenden Wildtyp-Kinase aus (He *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1999; Sakanaka *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob die mutierte CK1 $\delta$ rev einen solchen dominant-negativen Effekt im zellulären Hintergrund von Rev2 Zellen ausübte, sollte CK1 $\delta$ rev in SV-52 Zellen überexprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden SV-52 Zellen mit pCR3.1-CK1 $\delta$ rev transfiziert und stabile Zelllinien nach Selektion mit G418 etabliert. Kontrollzellen wurden mit pCR3.1 transfiziert. Die etablierten, CK1 $\delta$ rev überexprimierenden SV-52 Klone (SV-CK) wurden im Hinblick auf den Transformationsgrad und die Aktivität von CK1 $\delta$  charakterisiert.

### **5.3.3.1 Phänotypische Charakterisierung von CK1 $\delta$ rev überexprimierenden SV-52 Zellen**

Um Änderungen im Transformationsstatus von SV-CK Zellen zu detektieren, wurde die Morphologie dieser Zelllinien mit der Morphologie von SV-52 und Rev2 Zellen verglichen. Zu diesem Zweck wurden die Aktinfilamente der Zellen mit Phalloidin-TRITC gefärbt (Abb 29). SV-52 Zellen zeigten einen spindelförmigen Phänotyp, begleitet von der Ausbildung eines schwach ausgeprägten und wenig organisierten Aktin-Netzwerks, wie es für den transformierten Phänotyp beschrieben wurde (Risser & Pollack, 1974). Im Gegensatz dazu besaßen Rev2 Zellen und SV-CK Zellen ein dichtes, stark ausgeprägtes Netzwerk von Aktinfilamenten. Die flache Zellform von SV-CK Zellen entsprach dem Phänotyp von Rev2 Zellen und wies keine Ähnlichkeiten mit dem Phänotyp von SV-52 Zellen auf (Abb. 29).

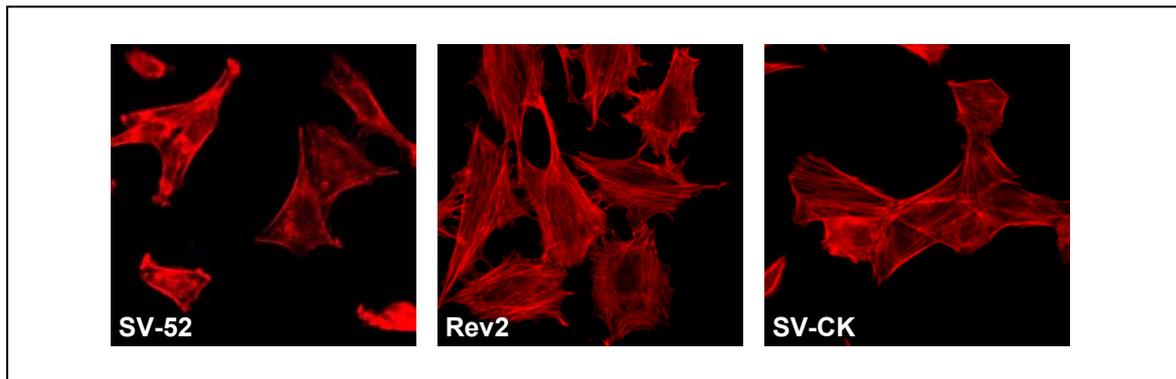


Abb. 29 **Färbung der Aktinfilamente von SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen**

SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen wurden 2 Tage auf Deckgläschen kultiviert, mit 3% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,3% Triton X-100 permeabilisiert. Die Aktinfilamente in den Zellen wurden mit Phalloidin-TRITC angefärbt.

Zur weitergehenden Charakterisierung des Transformationsstatus von SV-CK Zellen hinsichtlich der Nomenklatur von Risser und Pollack (Risser & Pollack, 1974) wurde eine Softagarklonierung mit SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen durchgeführt. Die für transformierte Zellen charakteristische Fähigkeit, unabhängig von einer Verankerung am Substrat wachsen zu können, wurde durch die Kultivierung von Einzelzellklonen in Softagar überprüft. Einzelzellen der Zelllinien wurden in Softagar eingebettet, und nach der Kultivierung für 2 bis 3 Wochen im Zellkulturinkubator wurde die Grösse der gewachsenen Kolonien dokumentiert. SV-52 Zellen bildeten grosse Kolonien und besaßen insgesamt eine hohe Klonierungseffizienz. Rev2 und SV-CK Zellen wuchsen zu kleinen Kolonien heran, jeweils mit einer geringen Klonierungseffizienz (Abb. 30, Tabelle 17).



Abb. 30 **Kolonie-Bildung von SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen in Softagar**

SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen wurden in Softagar eingebettet und nach 14 Tagen Kultivierung im Zellkulturinkubator fotografiert.

Zelllinie	Klonierungseffizienz in Softagar in %	Koloniegrösse in Softagar
SV-52	100	Makrokolonie
Rev2	2,2	Mikrokolonie
SV-CK	10	Mikrokolonie

Tabelle 17 **Klonierungseffizienz von SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen in Softagar**

Die Klonierungseffizienz von SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen in Softagar wurde nach 14 Tagen Kultivierung im Zellkulturinkubator durch Auszählen der Gesamtheit der gebildeten Kolonien, unabhängig von der Grösse der jeweiligen Kolonien, bestimmt. Der Mittelwert der Gesamtzahl der Kolonien auf Platten mit SV-52 Zellen wurde mit 100% gleichgesetzt. Die Gesamtzahl der Kolonien auf Platten mit Rev2 bzw. SV-CK Zellen wurde als Prozent der Anzahl der Kolonien auf den Platten mit SV-52 Zellen angegeben.

### 5.3.3.2 Reduktion der CK1 Kinaseaktivität in CK1 $\delta$ rev überexprimierenden SV-52 Zellen

In Rev2 Zellen beeinflussten Mutationen in der kodierenden Sequenz die Aktivität von CK1 $\delta$  und die Transformationskompetenz von T-Ag. Daher sollte die CK1 $\delta$  Kinaseaktivität in SV-CK Zellen bestimmt und mit der Kinaseaktivität in SV-52 und Rev2 Zellen verglichen werden. Gleiche Mengen zellulärer Extrakte von den Zelllinien wurden in der Anionenaustauschchromatographie über eine Mini Q Anionenaustauschersäule fraktioniert. Die Kinaseaktivität der Zelllinien wurde durch *in vitro* Kinasierungen mit den einzelnen Fraktionen unter Verwendung von FP267 als Substrat quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte nach der Auftrennung der einzelnen *in vitro* Kinasierungen in der SDS-PAGE und der Exposition auf einer Phosphoimager-Folie durch die Bestimmung der Intensität der Banden mit dem Fujix BAS-2000 Lesegerät. Die CK1 Kinaseaktivität eluierte bei 360 mM NaCl (SV-52 Zellen), 400 mM NaCl (Rev2 Zellen) und 435 mM NaCl (SV-CK Zellen) (Abb. 31 B, C). Das unterschiedliche Elutionsverhalten spiegelte möglicherweise die bereits im Abschnitt 5.3.2.1 angesprochenen Unterschiede im Hinblick auf posttranslationale Modifikationen wider und trat nur bei Verwendung der Mini Q Säule auf. Die Kinaseaktivität in SV-CK Zellen betrug ungefähr 50% der in SV-52 Zellen detektierten CK1 Aktivität. In Extrakten von Rev2 Zellen betrug die Kinaseaktivität ungefähr 30% der SV-52 Zellen detektierten CK1 Aktivität (Abb. 31 A). Die Spezifität der Kinaseaktivität für die Phosphorylierung von FP267 wurde durch Western Blot Analysen der Peakfraktionen mit dem CK1 $\delta$  spezifischen Antikörper ICOS128A gezeigt. CK1 $\delta$  konnte jeweils in den Peakfraktionen der Elutionen der einzelnen Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 31 C). Die *in vitro* Kinaseaktivität in den Extrakten von SV-CK Zellen, die stabil mutierte CK1 $\delta$ rev mit reduzierter Kinaseaktivität exprimierten, ähnelte damit der reduzierten *in vitro* Kinaseaktivität, die in den revertanten Rev2 Zellen vorlag. Die Reduktion der CK1 Kinaseaktivität korrelierte mit der beschriebenen Veränderung des Transformationsstatus in SV-CK Zellen im Vergleich zu Rev2 Zellen und deutete

einen dominant-negativen Effekt der Überexpression der mutierten CK1 $\delta$  aus Rev2 Zellen in SV-52 Zellen an.

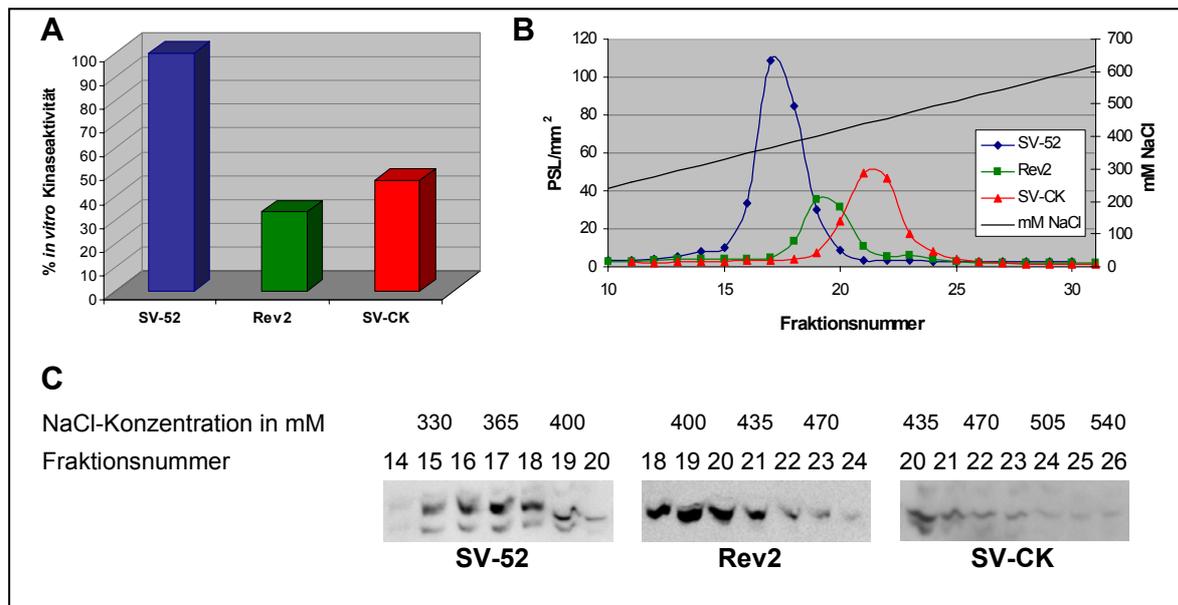


Abb. 31 **Charakterisierung der CK1 Aktivität in SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen**

Gleiche Proteinmengen von zellulären Extrakten von SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen wurden in der Anionenaustauschchromatographie fraktioniert. Die Proteine wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten steigender Konzentration eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden auf CK1 Kinaseaktivität getestet.

A: Darstellung der *in vitro* Kinaseaktivität in SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen als Balkendiagramm. Die in SV-52 Zellen gemessene Aktivität ist als 100% angegeben.

B: *In vitro* Kinasierung von FP267. Schematische Darstellung der *in vitro* Kinaseaktivität in zellulären Extrakten von SV-52, Rev2 und SV-CK Zellen. PSL/mm<sup>2</sup>: Photonen-stimulierte Lumineszenz, gemessen mit dem Fujix BAS-2000 Lesegerät.

C: Nachweis von CK1 $\delta$  in den eluierten Peakfraktionen. Nach der Konzentration der Peakfraktionen, der Auftrennung in der SDS-PAGE und dem Transfer auf Nitrozellulose-Membranen wurde CK1 $\delta$  in den einzelnen Fraktionen mit dem monoklonalen Antikörper ICOS128A detektiert.

## 6. Diskussion

### **Identifizierung neuer Interaktionspartner der Proteinkinase CK1 $\delta$ mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems**

Die Stress-induzierbare Proteinkinase CK1 $\delta$  ist ein Mitglied der CK1 Proteinfamilie. CK1 Isoformen phosphorylieren eine grosse Anzahl von Proteinen aus allen zellulären Kompartimenten. Die Einbindung von CK1 in zahlreiche zelluläre Prozesse ist nachgewiesen, und nicht zuletzt aufgrund des weit gefassten Substratspektrums und der Lokalisation in vielen subzellulären Kompartimenten ist eine Beteiligung dieser Kinasefamilie an einer Vielzahl intrazellulärer Signaltransduktionswege wahrscheinlich. Dennoch konnte bisher nur in einer limitierten Anzahl von Fällen ein direkter Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung eines Substrats durch CK1 und einem physiologischen Vorgang nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist wenig bekannt im Hinblick auf zelluläre Strukturen und Proteine, die mit CK1 interagieren und dadurch die Aktivität und/oder die Lokalisation der Kinase beeinflussen. Die Identifikation neuer Protein-Interaktionspartner ermöglicht es, Einblicke in zelluläre Signaltransduktionswege zu erhalten, in die CK1 involviert ist. In dieser Arbeit wurden drei neue, bisher nicht in der Literatur beschriebene Interaktionspartner der CK1 Isoform  $\delta$  vorgestellt: der C-terminale Teilbereich der leichten Kette LC2 des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A (MAP1A), das SNARE-assoziierte Protein Snapin und das mit der Ran GTPase assoziierte Ran Binding Protein im MTOC (RanBPM). Die Interaktion mit CK1 $\delta$  wurde im Kontext des Yeast Two-Hybrid (YTH) Systems detektiert und für die einzelnen Proteine mit biochemischen und zellbiologischen Methoden verifiziert. Alle untersuchten Proteine interagierten reproduzierbar nicht nur mit CK1 $\delta$ rev, sondern auch mit CK1 $\delta$ wt sowie weiteren CK1 Isoformen und waren *in vitro* Substrate von CK1 $\delta$ . Die Charakteristika der einzelnen Interaktionen sowie mögliche Konsequenzen, die die Phosphorylierung der Proteine durch CK1 $\delta$  im zellulären Kontext haben könnte, werden in den nachfolgenden Abschnitten besprochen.

### **Der C-terminale Bereich der leichten Kette LC2 des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A (MAP1A) ist ein weiteres *in vitro* Substrat von CK1 $\delta$ aus der funktionellen Gruppe der MAPs, Regulatoren der Mikrotubuli-Dynamik**

Die Mikrotubuli bilden eines der Filamentsysteme des eukaryontischen Zytoskeletts aus. Sie sind essentiell für eine Vielzahl zellulärer Funktionen, unter anderem für die Steuerung der Zellmotilität, Zellform und Polarität. Viele intrazelluläre Transportvorgänge werden durch das Vorhandensein des organisierten Mikrotubuli-Netzwerks der Interphasezelle ermöglicht, und der Spindel-

apparat gewährleistet als spezialisierte Mikrotubuli-Struktur der mitotischen Zelle die Chromosomensegregation. Die Proteinkinase CK1 $\delta$  nimmt im Hinblick auf die Wechselwirkung mit den Mikrotubuli und assoziierten Faktoren eine duale Funktion im Verlauf des Zellzyklus wahr. In der Interphase wurde eine Beteiligung von CK1 $\delta$  an Vesikeltransportprozessen beschrieben. Die Phosphorylierung von  $\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin sowie den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) MAP4, Stathmin und Tau (Behrend *et al.*, 2000a; Singh *et al.*, 1995) durch CK1 $\delta$  deutet auf eine allgemeine Funktion in der Regulation der Mikrotubulodynamik hin. Die konstitutive Assoziation mit den Zentrosomen und die Stress-induzierte Rekrutierung von CK1 $\delta$  an die mitotische Spindel lassen darüber hinaus auf eine Rolle von CK1 $\delta$  bei der Regulation der Funktion der Zentrosomen und in der Mitose bei der Regulation der Spindeldynamik schliessen (Behrend *et al.*, 2000b).

Durch den Nachweis der Interaktion des C-terminalen Abschnitts der leichten Kette LC2 von MAP1A mit CK1 $\delta$  im Yeast Two-Hybrid-System wurde den bereits beschriebenen Protein-Interaktionspartnern aus der Gruppe der MAPs ein weiterer Mikrotubuli-assoziiertes Faktor hinzugefügt. Die kodierende Sequenz von LC2 liegt im 3'-Bereich der mRNA von MAP1A (Langkopf *et al.*, 1992). Nach der Translation eines MAP1A Polyproteins findet eine proteolytische Spaltung in eine schwere Kette, die im weiteren Sinn als MAP1A bezeichnet wird, und die mit der schweren Kette assoziierte leichte Kette LC2 statt. Die genaue Position der Spaltstelle ist unbekannt, und aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Interaktion von CK1 $\delta$  mit dem aus dem YTH System isolierten C-terminalen Teilfragment LC2-F charakterisiert, das den Aminosäureresten (AS) 2629-2805 des MAP1A Polyproteins entspricht.

Die Wechselwirkung von CK1 $\delta$  mit LC2-F wurde *in vivo* in höheren Eukaryonten durch die Koimmunpräzipitation von CK1 $\delta$  mit LC2-F nach der Überexpression dieses Fragments in F111 Zellen verifiziert. CK1 $\delta$  wurde darüber hinaus auch in Immunkomplexen mit der schweren Kette von MAP1A nachgewiesen. Die Assoziation der leichten Kette LC1 des mit MAP1A verwandten MAP1B mit der schweren Kette von MAP1B wird über eine Domäne in den C-terminalen 120 AS von LC1 aus der Ratte vermittelt, die eine Bindung an den N-Terminus der schweren Kette im Bereich der Mikrotubuli-Bindungsstelle ermöglicht (Togel *et al.*, 1998; Kuznetsov *et al.*, 1986; Hammarback *et al.*, 1991). Diese beiden Domänen der leichten und schweren Kette zeigen eine grosse Homologie zu den entsprechenden Regionen von MAP1A (Langkopf *et al.*, 1992), sodass vermutlich auch bei MAP1A diese Domänen für die Interaktion der leichten und der schweren Kette verantwortlich sind. Der in dieser Arbeit untersuchte Teilbereich von humanem LC2 enthielt die C-terminalen, homologen Regionen, die die LC/HC-Interaktion von MAP1B ermöglichen (Abb. 32). Die Detektion von CK1 $\delta$  im Immunpräzipitat mit der schweren Kette von MAP1A könnte daher auf das Vorhandensein von endogenem LC2 im Komplex mit MAP1A HC zurückzuführen sein.

Der C-terminale Bereich von LC2-F, der dem vollständigen C-Terminus der leichten Kette LC2 entspricht, ist homolog zu der C-terminalen Region von LC2 aus der Ratte, die eine direkte Bindung von LC2 an Aktin-Filamente vermittelt. Der N-Terminus von LC2 der Ratte ermöglicht dagegen eine direkte Assoziation von LC2 mit den Mikrotubuli (Noiges *et al.*, 2002). Die entsprechenden homologen Regionen von humanem LC2 umfassen die AS 2579-2688 im N-Terminus und 2689-2805 im C-Terminus. Das Fragment LC2-F enthielt die AS 2629-2805 der leichten Kette und damit die vollständige Aktin-Bindungsdomäne sowie etwas mehr als die Hälfte des Bereichs, der eine Assoziation mit den Mikrotubuli vermittelt, wobei die genaue Grösse und die exakte Lage des Mikrotubuli-Bindungsmotivs nicht bekannt sind (Abb. 32). Es konnte gezeigt werden, dass die Assoziation der leichten Kette LC1 von MAP1B mit den Aktinfilamenten oder alternativ mit den Mikrotubuli abhängig von posttranslationalen Modifikationen ist. Bakteriell aufgereinigtes LC1 interagiert mit Aktin und den Mikrotubuli. Ektopisch in eukaryontischen Zellen exprimiertes LC1 oder aus Rinderhirn aufgereinigter MAP1B Gesamtkomplex assoziiert dagegen ausschliesslich mit den Mikrotubuli (Pedrotti & Islam, 1995; Noiges *et al.*, 2002). Es wird daher vermutet, dass posttranslationale Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung die Assoziation von MAP1B und LC1 mit Aktin inhibieren (Pedrotti & Islam, 1996; Diaz-Nido *et al.*, 1988; Ulloa *et al.*, 1993). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch das Bindungsverhalten von LC2 gegenüber den verschiedenen Zytoskelettkomponenten beeinflussen, und möglicherweise spielt die Phosphorylierung spezifischer Phosphorylierungsstellen von LC2 durch CK1 $\delta$  eine Rolle bei der Regulation dieses Interaktionsverhaltens.

LC2-F wurde *in vitro* mit vergleichbarer Stärke wie das bereits als Substrat von CK1 $\delta$  beschriebene MAP4 phosphoryliert. Die unterschiedlich starke Phosphorylierung von verschiedenen, zum Teil überlappenden Fragmenten von LC2-F durch CK1 $\delta$  gab erste Hinweise auf die Lokalisation der Phosphoakzeptoren. Da der N-terminale Teilbereich zwischen AS 2629-2683 mit vergleichbarer Intensität wie das Gesamtfragment LC2-F phosphoryliert wurde, während alle Fragmente, denen diese Region fehlte, nicht bzw. nur schwach phosphoryliert wurden, waren vermutlich nahezu alle Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Teilbereich von LC2-F lokalisiert (Abb. 32). Die schwächere Phosphorylierung des Fragments von AS 2684-2753 deutete an, dass in dieser Region zusätzlich eine oder einige wenige Phosphorylierungsstellen lokalisiert waren. Durch die Analyse des Spaltmusters tryptischer Phosphopeptide wurde bestätigt, dass der Hauptanteil der phosphorylierten AS in der Region zwischen den AS 2629 und 2683 im Bereich der Mikrotubuli-Bindungsdomäne von LC2 lag (Noiges *et al.*, 2002).

Im YTH System durchgeführte Interaktionsstudien mit verschiedenen Fragmenten von LC2-F zeigten die Existenz von zwei Teilbereichen von LC2-F auf, die die Wechselwirkung mit CK1 $\delta$  vermittelten (Abb. 32). Der N-terminale Teilbereich von AS 2629-2753 integrierte mittelstark mit CK1 $\delta$ . Die Regionen von LC2-F zwischen AS 2629 und AS 2683 und zwischen AS 2684-2753

zeigten dagegen keine oder nur eine schwache Interaktion mit CK1 $\delta$ . Daher war das Vorhandensein von Sequenzen N- und C-terminal von AS 2683 zur Assoziation mit CK1 $\delta$  erforderlich. Diese im N-terminalen Bereich von LC2-F positionierte Interaktionsdomäne überlappte partiell mit der Region zwischen AS 2629 und AS 2683, die den Hauptanteil der Phosphorylierungsstellen aufwies. Darüber hinaus wurde ein zweites Interaktionsmotiv im C-terminalen Bereich von LC2-F zwischen den AS 2711 und 2805 identifiziert. Fragmente, die diese Region enthielten, konnten im YTH System eine mittelstarke Interaktion mit CK1 $\delta$  hervorrufen, während die Deletion der AS 2753-2805 die Interaktion mit CK1 $\delta$  nachweislich reduzierte. Die C-terminale Interaktionsdomäne lag partiell im schwach phosphorylierten Teilbereich zwischen AS 2684 und 2753 von LC2-F. Die beiden stark bzw. schwach phosphorylierten Regionen von LC2-F überlappten daher mit Bereichen, in denen eine Bindung mit CK1 $\delta$  im YTH System stattfand. Die Interaktionsstudien im YTH System zeigten weiterhin, dass die Interaktion mit LC2-F durch zwei voneinander unabhängige Bereiche im N- und im C-Terminus von CK1 $\delta$  vermittelt wurde. In der Kinasedomäne waren die AS 76-103 und im C-Terminus die AS 350-375 essentiell, um eine Interaktion von LC2-F mit CK1 $\delta$  nachweisen zu können (Abb. 32).

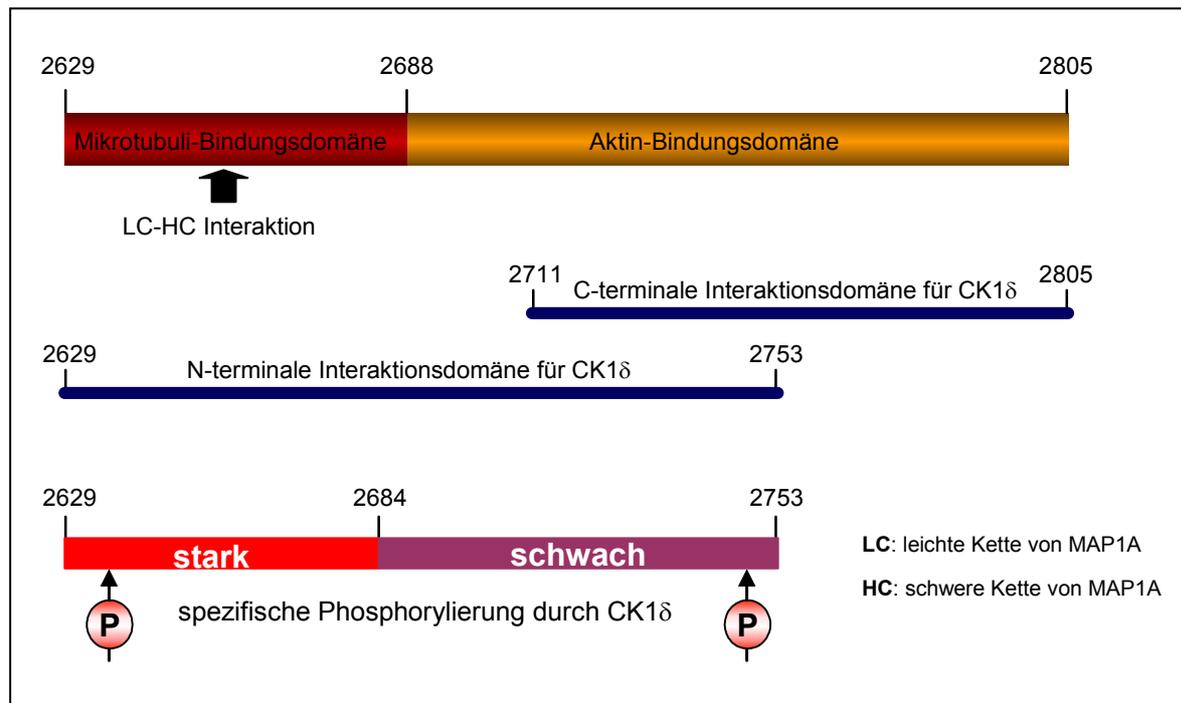


Abb. 32 Schematische Darstellung von MAP1A LC2-F und Lokalisation funktioneller Domänen

Die Bindung von Mikrotubuli-assoziierten Faktoren an Mikrotubuli reguliert die Dynamik und Stabilität dieses intrazellulären Filamentsystems. Die Bindung von Mitgliedern der destabilisierenden Stathmin Phosphoprotein-Familie induziert *in vitro* und *in vivo* die

Depolymerisation von Mikrotubuli durch die Sequestrierung von freiem Tubulin (zur Übersicht: (Gavet *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von Stathmin im Verlauf des Zellzyklus oder als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Signale schwächt die Interaktion von Stathmin mit Tubulin und reduziert seine Mikrotubuli-destabilisierende Aktivität (Marklund *et al.*, 1996; Melander Gradin *et al.*, 1997; Gradin *et al.*, 1998). Zu den stabilisierenden Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) gehören die vorwiegend neuronalen Faktoren MAP1A, MAP1B, MAP1C, MAP2, MAP3 und Tau sowie das ubiquitäre MAP4 (Zur Übersicht: Mandelkow & Mandelkow, 1995). Die Bindung von MAPs an Mikrotubuli wird über den Phosphorylierungsstatus dieser Proteine reguliert, wobei in den meisten Fällen eine Phosphorylierung von stabilisierenden MAPs die Interaktion mit den Mikrotubuli schwächt und somit einen destabilisierenden Einfluss auf die Mikrotubuli ausübt (Illenberger *et al.*, 1996; Drewes *et al.*, 1997; Ebner *et al.*, 1999). Die durch CK1 $\delta$  phosphorylierten AS von LC2-F waren hauptsächlich in der N-terminalen Region im Bereich der Mikrotubuli-Bindungsdomäne lokalisiert. Eine Phosphorylierung dieser Region durch CK1 $\delta$  könnte die Bindung von LC2 an die Mikrotubuli in ähnlicher Weise negativ beeinflussen, wie es bereits für andere MAPs beschrieben wurde. Aufreinigungen von MAP1A und MAP1B aus Rattenhirn enthielten mit diesen Faktoren assoziierte Kinasen, die als CK1- und CK2-ähnliche Kinasen beschrieben wurden (Fujii *et al.*, 1996). Die Beschreibung der autonomen, von der Präsenz der schweren Kette unabhängigen Bindungsfunktionen der leichten Ketten von MAP1A und MAP1B sowie die Entdeckung, dass im MAP1B LC/HC-Komplex die schwere Kette die Mikrotubuli-Bindung der leichten Kette reduziert (Togel *et al.*, 1998), haben Anlass zur Formulierung der Hypothese gegeben, dass generell die Funktion der leichten Kette als aktive Untereinheit durch eine regulatorische schwere Kette beeinflusst wird. MAP1B LC1 existiert in der Zelle sowohl in einer mit der schweren Kette von MAP1B assoziierten Form als auch in einer unkomplexierten Form (Mei *et al.*, 2000), und aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit von LC1 und LC2 könnte eine derartige Fraktion von LC2 ebenfalls existieren. Eine Modulation der Eigenschaften der leichten Kette LC2 durch CK1 $\delta$  würde daher nicht nur die Funktion des LC/HC-Komplexes beeinflussen, sondern möglicherweise auch zusätzliche Funktionen, die von der unkomplexierten freien leichten Kette LC2 ausgeübt werden.

### **CK1 $\delta$ interagiert mit Snapin, einem SNARE-assoziierten Protein, das in Prozesse des Vesikeltransports und der Membranfusion in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen involviert ist**

Nach der Identifikation als Interaktionspartner des SNARE Proteins SNAP25 im Yeast Two-Hybrid System wurde Snapin zunächst als ein ausschliesslich neuronales Protein beschrieben. Snapin reguliert die Assoziation des Kalzium-Sensors Synaptotagmin mit dem SNARE-Komplex,

und die Inhibition dieser Bindung in Neuronen verhindert die Freisetzung von Acetylcholin aus synaptischen Vesikeln (Ilardi *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde im YTH System eine Interaktion der AS 37-136 von murinem Snapin mit CK1 $\delta$  detektiert. Inzwischen wurde Snapin als ubiquitäres Protein beschrieben, dass unter anderem auch im Hoden exprimiert wird und nicht nur mit dem neuronalen SNAP25, sondern auch mit dem homologen und ubiquitär exprimierten Protein SNAP23 interagiert (Buxton *et al.*, 2003). Dieses ubiquitäre Vorkommen, wurde durch die Herkunft der cDNA von Snapin, die in dieser Arbeit isoliert wurde, bestätigt.

Rekombinantes Snapin, aufgereinigt als GST-Fusionsprotein, wurde in dieser Arbeit mit einem spezifischen anti-Snapin Kaninchenserum im Western Blot detektiert. Eine Expression von endogenem Snapin konnte in den Lysaten von verschiedenen eukaryontischen Zelllinien dagegen nicht nachgewiesen werden. Eine in anderen Studien beschriebene geringe Expression von Snapin (Buxton *et al.*, 2003; Vites *et al.*, 2004) könnte den fehlgeschlagenen Nachweis von endogenem Snapin in dieser Arbeit erklären. Die Wechselwirkung von Snapin mit CK1 $\delta$  konnte zwar nicht durch *in vitro* Bindungsstudien bestätigt werden, wurde allerdings im Yeast Two-Hybrid System nicht nur für CK1 $\delta$ rev, sondern auch für CK1 $\delta$ wt nachgewiesen. Darüber hinaus sind Bindungen in Enzym-Substrat-Komplexen sind oft nur von intermediärem Charakter und daher nicht stabil genug, um eine Kopräzipitation der beteiligten Faktoren *in vitro* zu ermöglichen. Die *in vitro* Phosphorylierung von Snapin durch CK1 $\delta$  sowie die partielle Kolo-kalisation der Proteine im perinukleären Bereich, die in verschiedenen Zelllinien dokumentiert wurde, waren dagegen deutliche Indikatoren für eine Interaktion der beiden Proteine im *in vitro* und *in vivo* Kontext.

Die subzelluläre Lokalisation von Snapin im perinukleären Bereich wurde in der Immunfluoreszenz in NRK und Balb/c 3T3 Zellen mit Hilfe des anti-Snapin Serums dargestellt und konnte durch die Überexpression eines EYFP-Snapin Fusionsproteins bestätigt werden. Die in diesen Zelllinien beobachtete zelluläre Verteilung von Snapin entsprach der von Buxton *et al.* beschriebenen Lokalisation von Snapin in COS7 Zellen und 3T3-L1 Adipozyten. Da in diesen Zellen auf der Basis von Immunfluoreszenzanalysen und Zellfraktionierungen allerdings auch eine zytosolische Verteilung von Snapin gezeigt worden war, wurde Snapin als ein vorwiegend zytoplasmatisches Protein beschrieben (Buxton *et al.*, 2003). Die AS 1-20 von Snapin bilden ein hydrophobes Segment aus, das als putative Transmembrandomäne angesehen wird (Ilardi *et al.*, 1999). Snapin wurde dagegen von Ilardi *et al.* 1999 ausschliesslich in der Fraktion der synaptischen Vesikel nachgewiesen. Daher wurde postuliert, dass Snapin ein Transmembran-Protein ist, das ausschliesslich mit den synaptischen Vesikeln neuronaler Zellen assoziiert ist. Die in dieser Arbeit beschriebene Lokalisation entsprach der eines Membran-assoziierten Proteins oder Transmembranproteins, das an einem Membransystem in Kernnähe sequestriert war. Im Hinblick auf eine zytoplasmatische Lokalisation von Snapin konnte aufgrund der starken unspezifischen Anfärbung des Zytoplasmas bereits durch das Präserum keine Aussage getroffen werden.

Snapin wurde im perinukleären Bereich in einer ähnlichen morphologischen Struktur wie CK1 $\delta$  detektiert, und es konnte eine partielle Kolokalisation der Proteine in dieser Struktur festgestellt werden. Für CK1 $\delta$  ist eine Kolokalisation mit dem für das Trans-Golgi-Netzwerk spezifischen Markerprotein TGN38 beschrieben worden (Behrend *et al.*, 2000a), und CK1 Isoformen werden mit Membran- und Vesikeltransportvorgängen in Hefen, aber auch in höheren Eukaryonten in Verbindung gebracht. Die zu CK1 $\delta$  homologe Kinase Hrr25 aus *S. cerevisiae* ist ein negativer Regulator der Abschnürung von Vesikeln am Endoplasmatischen Retikulum (Murakami *et al.*, 1999). Yck1 und Yck2 aus *S. cerevisiae* sind an Vorgängen der Exozytose (Decottignies *et al.*, 1999) und der Endozytose beteiligt (Marchal *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2002; Hicke *et al.*, 1998; Feng & Davis, 2000; Panek *et al.*, 1997). Die CK1 Isoform CK1 $\alpha$  aus Mammalia kolokalisiert in nicht-neuronalen Zellen mit Markerproteinen des Golgi-Apparates, des TGN und des Endoplasmatischen Retikulums (Gross *et al.*, 1995). In neuronalen Zellen ist darüber hinaus die Phosphorylierung der Untereinheit AP-3 des Clathrin-Adaptor (AP) Komplexes durch CK1 $\alpha$  erforderlich für die Bildung synaptischer Vesikel (Faundez & Kelly, 2000). Die in dieser Arbeit gezeigte partielle Kolokalisation von Snapin, einem mit CK1 $\delta$  wechselwirkenden Protein, mit TGN38 sowie mit Teilen des Golgi-Apparates war ein weiteres Indiz für die Beteiligung von CK1 $\delta$  an Vesikeltransportprozessen, die auch durch die Interaktion von CK1 $\delta$  mit  $\gamma$ -Adaptin, einem Clathrin-bindenden Markerprotein an post-Golgi Strukturen, sowie mit Dynamin II, einem mit endozytotischen Clathrin-bedeckten Vesikeln interagierenden Protein, angedeutet wird (Behrend *et al.*, 2000a). Möglicherweise vermittelt Snapin als Transmembranprotein durch die Interaktion mit CK1 $\delta$  die Assoziation der Kinase mit vesikulären Strukturen.

In den Bindungsstudien im Kontext des YTH Systems waren sowohl der N- als auch der C-Terminus von CK1 $\delta$  ausreichend für eine Interaktion mit Snapin. Im C-Terminus waren die AS 400-428 essentiell für die Wechselwirkung, die damit entweder ausschliesslich durch diesen Bereich oder zusätzlich durch weitere, N-terminal dieser Sequenz gelegene AS vermittelt wurde. Da die Deletion der AS 1-200 keinen Verlust der Wechselwirkung mit sich brachte, konnte die Region im N-Terminus von CK1 $\delta$ , die notwendig war für die Interaktion mit Snapin, auf die AS 201-304 eingegrenzt werden. Die Bindungsstudien im YTH System liessen daher auf das Vorhandensein von zwei unabhängigen Bindungsdomänen für Snapin im N- und im C-Terminus von CK1 $\delta$  schliessen. Im YTH System konnte die Interaktionsdomäne von Snapin mit CK1 $\delta$  zwischen den AS 37-136 von Snapin lokalisiert werden (Abb. 33). Da die Teilbereiche von AS 37-78 bzw. AS 79-136 jeweils nicht ausreichend waren, um eine Interaktion mit CK1 $\delta$  zu vermitteln, erfolgte die Interaktion entweder simultan durch Bindungsmotive in beiden Teilbereichen, oder eine einzelne Bindungsstelle lag im Übergangsbereich zwischen den beiden essentiellen Teilbereichen.

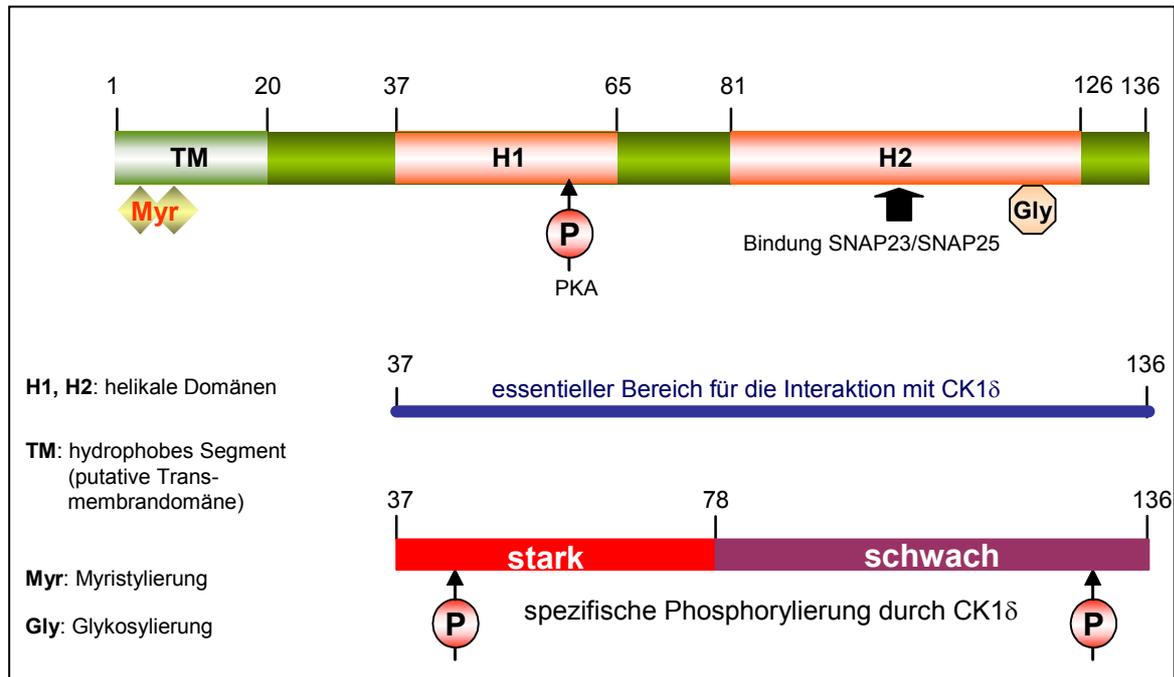


Abb. 33 Schematische Darstellung von Snapin und Lokalisation funktioneller Domänen

Das Phosphorylierungsmuster der *in vitro* durch CK1 $\delta$  phosphorylierten Teilbereiche von Snapin korrelierte mit den Befunden aus den Bindungsstudien (Abb. 33). Die Region von AS 37-136 wurde mit vergleichbarer Intensität phosphoryliert wie das Gesamtprotein, während die N-terminale Region von AS 1-40 nicht phosphoryliert wurde. Das Fragment, das AS 37-78 repräsentierte, wies insgesamt eine etwas schwächere Phosphorylierung auf als das Gesamtprotein, während die Region zwischen AS 79 und 136 schwächer phosphoryliert wurde als der Bereich von AS 37-78. Durch die Analyse des Spaltmusters tryptischer Peptide konnte die Lokalisation des Hauptanteils der phosphorylierten AS in der Region zwischen den AS 37 und 78 bestätigt werden. Das Spaltmuster des Fragments von AS 37-78 war nahezu identisch mit dem Spaltmuster der AS 37-136. Im Vergleich dazu waren im Teilbereich zwischen AS 79-136 nur zwei der Hauptpeptide detektierbar. Snapin enthält eine hohe Anzahl an Spaltstellen für Trypsin, die eine Vielzahl alternativer Spaltprodukte bedingen könnte. Dies würde die grosse Anzahl an Phosphopeptiden von Snapin mit unterschiedlichem Verhalten in der zweidimensionalen Auftrennung erklären, die die Anzahl an möglichen Phosphorylierungsstellen für CK1 $\delta$  bei weitem überstieg. Die putative CK1 Phosphorylierungsstelle Ser<sup>11</sup> liegt im Bereich des hydrophoben hypothetischen Transmembransegments im N-Terminus von Snapin, der nicht durch CK1 $\delta$  phosphoryliert wurde. Hydrophobe Sequenzen liegen oft im Inneren eines Proteins, und ein solcher Einschluss von Ser<sup>11</sup> könnte diese in einer CK1 Konsensussequenz liegende Phosphorylierungsstelle unzugänglich machen. Von den übrigen Phosphoakzeptorstellen von Snapin waren lediglich Thr<sup>15</sup> und Ser<sup>136</sup>, die

beide in nicht oder nur schwach phosphorylierten Teilbereichen lagen, in eine CK1 $\delta$  Erkennungssequenz eingebettet. Die dennoch starke Phosphorylierung des Gesamtproteins durch CK1 $\delta$  deutete auf die Erkennung von nicht-kanonischen Motiven hin, die möglicherweise erst im Kontext der Tertiärstruktur von Snapin vorlagen und erkannt wurden. CK1 Substrate wie SV40 T-Ag oder der Inhibitor-2 von PP1 besitzen ähnliche Motive, die durch die lokale Struktur der Phosphoakzeptor-Stelle sowie durch die dreidimensionale Struktur bedingt werden (Cegielska *et al.*, 1994; Marin *et al.*, 2003).

Die Interaktion neuronaler und nicht-neuronaler SNARE-Proteine sowie assoziierter Faktoren wird über die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen reguliert. Diese Modulation kann die Zusammensetzung des SNARE-Komplexes und somit die Funktionalität der Exo- und Endozytose-Maschinerie beeinflussen und die synaptische Neurotransmitter-Freisetzung modulieren. Die NGF-induzierte, PKC-abhängige Phosphorylierung von SNAP25 an Ser<sup>187</sup> steuert über die Bindung von Synaptobrevin die Interaktion von Syntaxin 1A und SNAP25 im SNARE-Komplex und dadurch die Freisetzung von Neurotransmittern (Shimazaki *et al.*, 1996; Kataoka *et al.*, 2000). Weiterhin ist bekannt, dass CK1 über die Phosphorylierung des Vesikel-assoziierten Proteins SV2 dessen Wechselwirkung mit Synaptotagmin moduliert (Risinger & Bennett, 1999). Das SNARE-Protein Syntaxin-1A ist ein Substrat von CK1 $\alpha$  (Dubois *et al.*, 2002), und die Assoziation von CK1 mit dem präsynaptischen Protein Centaurin- $\alpha$ 1 gibt einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von CK1 Isoformen an Prozessen des Vesikeltransports und vor allem der synaptischen Transmission (Dubois *et al.*, 2001).

In der Region zwischen AS 37 und 136 von Snapin liegen zwei putative helikale Domänen, H1 zwischen AS 37-65 und H2 von AS 81-126 (Abb. 33). Helikale Domänen vermitteln häufig Protein-Protein-Interaktionen von synaptischen Proteinen (Weimbs *et al.*, 1997), und es konnte gezeigt werden, dass Snapin über die Domäne H2 an SNAP23 bindet (Buxton *et al.*, 2003). Die Bindungsstelle von SNAP25 liegt ebenfalls im Bereich der H2 Region von Snapin (Ilardi *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von Ser<sup>50</sup> im Bereich der Domäne H1 von Snapin durch PKA fördert die Bindung von Snapin an SNAP25 und steigert die Interaktion von Synaptotagmin mit dem SNARE-Komplex *in vitro*. Durch die *in vivo* Phosphorylierung von Snapin durch PKA wird die Anzahl von Freisetzungskompetenten synaptischen Vesikeln erhöht und damit die synaptische Transmission direkt beeinflusst (Chheda *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung von Snapin in den H1 und H2 Regionen durch CK1 $\delta$  könnte ebenfalls einen regulatorischen Effekt auf Snapin im Hinblick auf die Interaktion mit Komponenten des SNARE-Komplexes ausüben und CK1 $\delta$  damit eine Funktion in der Regulation von Exo- und Endozytoseprozessen zuweisen.

### **CK1 $\delta$ phosphoryliert Regionen des Ran Binding Protein im MTOC (RanBPM) *in vitro* – Interaktion mit einem putativen zentrosomalen Protein, für das eine nukleäre Lokalisation detektiert wurde**

Das Ran Binding Protein im MTOC (RanBPM) wurde als perinukleär mit dem Zentrosom kolokalisierendes Protein beschrieben, das bei ektopischer Expression die Nukleation von Mikrotubuli induzieren kann (Nakamura *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Beobachtung wurde postuliert, dass RanBPM eine Rolle in der durch die Ran GTPase stimulierten Ausbildung von Mikrotubuli spielen könnte. Die weitergehende Analyse des 5'-Bereichs der humanen RanBPM cDNA zeigte, dass ein trunkiertes Protein als RanBPM beschrieben worden ist und dem verkürzten Protein N-terminal 229 AS in der vollständig 729 AS umfassenden Sequenz fehlten (Nishitani *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die murine verkürzte Version RanBPM55 charakterisiert, deren Interaktion mit CK1 $\delta$  nicht nur im YTH System gezeigt werden konnte, sondern auch durch die Koimmunpräzipitation des endogenen Proteins mit CK1 $\delta$  aus pankreatischen Zelllinien verifiziert wurde. Im Western Blot mit zellulären Gesamtlisaten pankreatischer Zelllinien wurde ein Protein von ungefähr 55kDa detektiert, entsprechend der Grösse des trunkierten RanBPM55. Ein Protein mit der molaren Masse von 90 kDa des vollständigen Proteins RanBPM90 wurde dagegen nicht detektiert.

*In vitro* translatiertes RanBPM55 wurde von CK1 $\delta$  mit geringer Intensität phosphoryliert. Die Aminosäureabfolge des RanBPM55 enthält zahlreiche putative Phosphorylierungsstellen für CK1. Die schwache Phosphorylierung wurde möglicherweise durch die Generation des Substrates in der beschriebenen experimentellen Anordnung bedingt. Die schwächere Phosphorylierung von RanBPM55 im Vergleich zu den *in vitro* Substraten LC2-F und Snapin könnte zum Teil auf eine geringere Menge des *in vitro* translatierten RanBPM55 in der Kinasierungsreaktion im Vergleich zu den beiden anderen, bakteriell exprimierten CK1 $\delta$  Interaktionspartnern LC2-F und Snapin zurückgeführt werden. Die Aufreinigung von RanBPM war durch Immunpräzipitation erfolgt, und eine Verunreinigung des Immunkomplexes durch kopräzipitierte Phosphatasen oder Inhibitoren im Retikulozytenextrakt könnte zu einem geringeren Nettophosphateinbau in RanBPM55 geführt haben. Die Phosphorylierung verschiedener Fragmente von RanBPM55 von CK1 $\delta$  liess dagegen einen Rückschluss auf eine Verwendung des Gesamtproteins als Substrat zu. Unter Umständen waren einzelne Phosphorylierungsstellen der Teilbereiche im Gesamtprotein nicht zugänglich. Die starke Intensität der Phosphorylierung des Fragments zwischen den AS 436 und 544 liess auf das Vorhandensein mehrerer Phosphorylierungsstellen in dieser Region schliessen. Die Teilbereiche von AS 259-385 bzw. von AS 515-653 wiesen eine schwache Phosphorylierung auf und könnten daher eine oder mehrere Phosphoakzeptorstellen enthalten haben (Abb. 34).

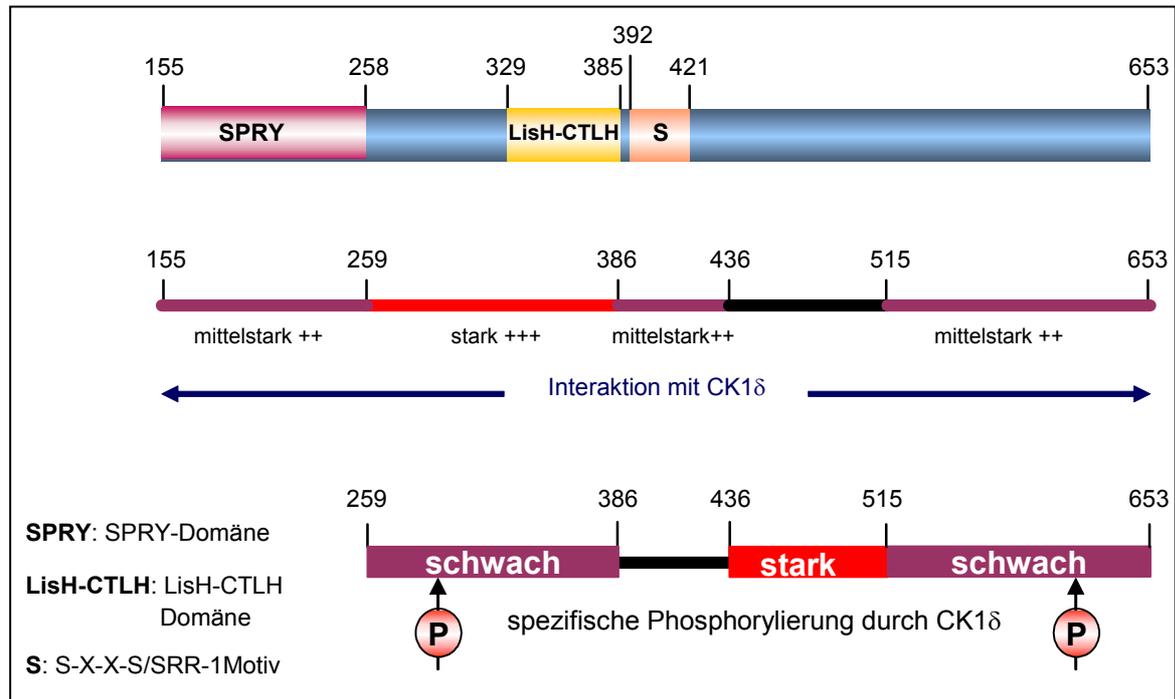


Abb. 34 Schematische Darstellung von RanBPM und Lokalisation funktioneller Domänen

Der für die Interaktion von CK1δ mit RanBPM55 erforderliche Bereich von CK1δ konnte im Kontext des YTH Systems auf die AS 201-350 eingeschränkt werden. Da sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus von CK1δ mit RanBPM55 interagierten, wurde die Bindung von RanBPM55 an CK1δ durch zwei unterschiedliche Motive von CK1δ vermittelt, die im N-Terminus sowie im C-Terminus lokalisiert waren. Eine starke Interaktion von RanBPM mit CK1δ wurde über die AS 259-385 von RanBPM55 vermittelt (Abb. 34). In diesem Bereich mit schwach detektierbarer Phosphorylierung durch CK1δ fand daher nicht nur eine Substratbindung, sondern auch die Umsetzung statt. Der stark phosphorylierte Teilbereich zwischen AS 436-544 interagiert dagegen im YTH System nicht mit CK1δ, und von den Teilbereichen, für die lediglich eine mittelstarke Wechselwirkung mit CK1δ im YTH nachgewiesen werden konnte, wurde nur der Bereich von AS 515-653 mit geringer Intensität phosphoryliert. Die Interaktion eines Fragments von RanBPM55 mit CK1δ im YTH System korrelierte daher nicht in allen Fällen mit der Verwendung dieses Fragments als *in vitro* Substrat von CK1δ. Die Bindung eines Enzyms an sein Substrat kann durch Regionen vermittelt werden, die nicht im Bereich der Phosphorylierungsstelle liegen, und die Diskrepanzen hinsichtlich der Nutzung von Phosphorylierungsstellen und Interaktionsdomänen des RanBPM55 durch CK1δ könnten in einer solchen Trennung von Bindungsdomäne(n) und phosphorylierten Sequenzen begründet sein.

Eine Anzahl funktionell nicht weiter miteinander in Beziehung stehender Proteine wurde als Interaktionspartner von RanBPM beschrieben, und entsprechend der unterschiedlichen Natur dieser

Proteine wurde RanBPM in einer Vielzahl von subzellulären Kompartimenten nachgewiesen. Die jeweils detektierte Lokalisation in der Zelle war in den einzelnen Studien in Abhängigkeit von der verwendeten Nachweismethode in der Regel auf ein distinktes Kompartiment beschränkt. RanBPM wurde als peripheres Membranprotein beschrieben, das mit dem Integrin LFA-1 assoziiert (Denti *et al.*, 2004). Konsistent mit dieser Sequestrierung an der Plasmamembran ist die Interaktion mit Muskelin, einem in die Regulation der Zelladhäsion und der Dynamik von Fokalkontakten involvierten Faktor (Umeda *et al.*, 2003), dem Neurotrophin-Rezeptor p75NTR (Bai *et al.*, 2003) und der Rezeptor-Tyrosinkinase MET (Wang *et al.*, 2002a). In einer Reihe von Studien wurde RanBPM als primär nukleäres Protein beschrieben, in einigen Fällen wurde zusätzlich eine Subpopulation von RanBPM im Zytoplasma nachgewiesen. Nukleäre Interaktionspartner von RanBPM wie z. B. CDK11<sup>p110</sup> (Mikolajczyk *et al.*, 2003), der Androgen- und der Glukokortikoid-Rezeptor (Rao *et al.*, 2002), die Ubiquitin-spezifischen Protease USP11 (Ideguchi *et al.*, 2002) und die Kinasen HIPK2 (Wang *et al.*, 2002b) sowie Mirk/Dyrk1B (Zou *et al.*, 2003) aus der Dyrk-Kinasefamilie wurden neben zytoplasmatischen Interaktionspartnern identifiziert wie der Keimzell-spezifischen, ATP-abhängigen RNA-Helikase MVH, die mit RanBPM in der perinukleären Region kolokalisiert (Shibata *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2003). RanBPM besitzt eine SPRY-Domäne (Abb. 34), die die AS 137-258 von murinem RanBPM90 umfasst und involviert ist in die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen (Ponting *et al.*, 1997). Die Wechselwirkung der meisten identifizierten Protein-Interaktionspartner von RanBPM wurde im YTH System detektiert und über die SPRY Domäne vermittelt. Die im Vektor pVII16 in dieser Arbeit identifizierte cDNA kodierte für die AS 76-653 von RanBPM und enthielt damit die SPRY-Domäne. Die Bindungsstudien im YTH-System machten allerdings deutlich, dass die SPRY-Domäne nicht notwendig war, um die Interaktion mit CK1δ zu vermitteln. Protein-Interaktionsdomänen wie die SPRY-Domäne können unspezifische, artifizielle Wechselwirkungen vermitteln, und die starke Interaktion von CK1δ mit dem von der SPRY-Domäne unabhängigen Teilbereich zwischen AS 259 und AS 385 von RanBPM55 unterstrich die Spezifität der Assoziation.

RanBPM konnte in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, die Lokalisation des Proteins war dabei ausschliesslich auf den Zellkern beschränkt. Eine Kolokalisation von CK1δ und RanBPM konnte aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Proteine in den subzellulären Kompartimenten Zytoplasma und Karyoplasma nicht nachgewiesen werden. In einem Teil der untersuchten Zelllinien war RanBPM hauptsächlich in grossen, Chromatin-freien Arealen und zu einem geringen Anteil in einer Vielzahl wesentlich kleinerer, distinkter Foci innerhalb des Zellkerns angeordnet. Alternativ wurde RanBPM in einer Vielzahl von Foci mittlerer Grösse ebenfalls in den Chromatin-freien Regionen des Zellkerns dargestellt. Die detektierte Anordnung von RanBPM ähnelte derjenigen, die für die sogenannten „Nuclear Speckles“ beschrieben wurde, subnukleäre Strukturen, die im Interchromatin-Bereich lokalisiert sind. Diese Strukturen dienen als

Speicherkompartimente und/oder Assoziationsstätten für Komponenten der Spleiss- und Transkriptionsmaschinerie und weisen einen hohen Gehalt an Prä-mRNA Spleissfaktoren wie z. B. SR-Proteinen und snRNPs auf (Mintz & Spector, 2000; Mintz *et al.*, 1999; zur Übersicht: (Lamond & Spector, 2003). Die CK1 Isoform CK1 $\alpha$  assoziiert mit „Nuclear Speckles“ und phosphoryliert die SR-Proteine SRp30, SRp40 und SRp55 (Gross *et al.*, 1999). Eine nukleoplasmatische Lokalisation von katalytisch aktiver CK1 $\delta$  wurde bisher weder beschrieben noch im Rahmen dieser Arbeit detektiert, eine Interaktion mit Faktoren im Zellkern scheint daher unwahrscheinlich. SR-Proteine unterliegen wie alle karyoplasmatischen Proteine dem posttranslationalen Transport in den Zellkern, und es ist bekannt, dass der Phosphorylierungsstatus von SR-Proteinen diesen Import reguliert (Yeakley *et al.*, 1999; Yun *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit beschriebenen Lokalisation wurde in anderen Studien eine zytoplasmatische Verteilung von RanBPM demonstriert, und möglicherweise lokalisiert RanBPM in Abhängigkeit vom zellulären Kontext und der physiologischen Situation der Zelle im Zytoplasma und steht dort für die Interaktion mit der Kinase CK1 $\delta$  zur Verfügung.

Eine Phosphorylierung von RanBPM im Zytoplasma durch CK1 $\delta$  könnte den nukleären Import dieses Faktors mit bisher unbekannter Funktion beeinflussen. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass CK1 den Kerntransport einer Reihe von latenten zytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren über die Phosphorylierung einer Serie von Serinresten reguliert, die jeweils getrennt sind durch zwei weitere Aminosäurereste. Die Phosphorylierung des sogenannten SRR-1 Motivs des Faktors NFAT1 führt zur Inhibition des Kerntransports und zur Sequestrierung von NFAT1 im Zytoplasma (Okamura *et al.*, 2004), die Phosphorylierung von S-X-X-S Wiederholungen des Proteins mPER1 ist dagegen notwendig für den nukleären Import von mPER1 (Takano *et al.*, 2004). Im Bereich der AS 392-421 von RanBPM liegt eine dem SRR-1 Motiv bzw. dem S-X-X-S Motiv ähnliche Sequenzabfolge vor (Abb. 34, 35), in der Wiederholungen von Serinresten, durch zwei oder drei Aminosäurereste getrennt, nicht nur eine Abfolge von Konsensussequenzen für CK1 darstellt, sondern darüber hinaus wie im Fall der Faktoren NFAT1 und mPER1 den Kernimport von RanBPM über eine Phosphorylierung durch CK1 $\delta$  regulieren könnte.

mPER1	SVSVTSQCSFSST
mPER2	SVVSLTSQCSYSST
NFAT1	SPASSGSSASFISDTF
NFAT2	SPASSLSSRSCNSEAS
NFAT4	SPASSISSRSWFSDAS
RanBPM	SPKSQDSYPVSPRPFSSPSMSPSHGMSIHS

Abb. 35 **Der Bereich von AS 392-421 von RanBPM weist Ähnlichkeit mit dem SRR-1 von NFAT1 bzw. dem S-X-X-S Motiv von mPER1 auf.**

(in Anlehnung an : Okamura *et al.*, 2004; Takano *et al.*, 2004)

Im Gegensatz zu den meisten anderen Ran-bindenden Proteinen ist RanBPM konnte bisher keine Verbindung von RanBPM mit nukleozytoplasmatischen Transportvorgängen nachgewiesen werden. RanBPM besitzt neben der SPRY-Domäne eine LisH-CTLH-Domäne (Lis1-homolog und C-terminal zum LisH Motiv) (Abb. 34), ein Motiv, das in Proteinen zu finden ist, die involviert sind in die Steuerung der Mikrotubuli-Dynamik, der Zellmigration und der Chromosomensegregation (Emes & Ponting, 2001; Smith *et al.*, 2000; Wynshaw-Boris & Gambello, 2001). Diese Funktionen überlappen nicht nur mit denen der Ran GTPase (zur Übersicht: Sazer & Dasso, 2000), sondern im Hinblick auf die Regulation von Mikrotubuli-Dynamik und Chromosomensegregation auch mit Funktionen von CK1 $\delta$ . RanBPM55 wurde in dieser Arbeit als neues Substrat von CK1 $\delta$  mit einer nukleären Lokalisation vorgestellt. Der Besitz einer LisH-CTLH-Domäne impliziert eine Beteiligung von RanBPM an zytoplasmatischen Prozessen, die durch die CK1 Isoform CK1 $\delta$  beeinflusst werden, möglicherweise über eine Interaktion mit RanBPM.

### **Mutationen in der kodierenden Sequenz von CK1 $\delta$ führen zu einer Reduktion der CK1 $\delta$ Kinaseaktivität in Rev2 Zellen**

Die Transformation von Zellen durch Simian Virus 40 (SV40) wird durch die Interaktion des grossen SV40 Tumorantigens (T-Ag) mit zellulären Proteinen und Strukturen vermittelt. Dabei ist die Expression von T-Ag notwendig, aber nicht ausreichend, um den transformierten Status der Zellen zu etablieren und zu erhalten (Jat & Sharp, 1986; Jat *et al.*, 1986). Die Interaktion von T-Ag mit kooperierenden zellulären Faktoren ist erforderlich, um einen transformationskompetenten Status von T-Ag zu gewährleisten (Topp *et al.*, 1979; Ryan *et al.*, 1985; Bauer *et al.*, 1987; Deppert *et al.*, 1987; Deppert *et al.*, 1989; Richter & Deppert, 1990; Deppert *et al.*, 1991; Knippschild *et al.*, 1991). Die Identifikation von Proteinen, die allgemein die Aktivität viraler Onkogene von DNA-Tumorviren, wie z. B. die des SV40 T-Ag, modulieren, trägt dazu bei, Gene bzw. Proteine zu identifizieren, die den Prozess der zellulären Transformation beeinflussen. Die Interaktion viraler Onkogene mit zellulären Proteinen wird häufig beeinflusst durch ihren Phosphorylierungsstatus, der durch das Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen in der Wirtszelle bestimmt wird (Noh *et al.*, 2004; Firzlaff *et al.*, 1989; Firzlaff *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1989; Dumont *et al.*, 1993; Teodoro & Branton, 1997).

Auch der Phosphorylierungsstatus von T-Ag hat einen immer wieder dokumentierten Effekt auf die Interaktion von T-Ag mit Proteinen und Strukturen der Wirtszelle, der im Gegenzug die Funktionen von T-Ag selbst bestimmt (Montenarh & Henning, 1980; Greenspan & Carroll, 1981; Sturzbecher *et al.*, 1985; Mohr *et al.*, 1987; Sturzbecher *et al.*, 1987; Knippschild *et al.*, 1991). Korrespondierende Zellsysteme, bestehend aus Wildtyp SV40 transformierten Zellen und

revertanten Zelllinien, die T-Ag exprimieren, aber einen nicht voll transformierten Phänotyp besitzen, bieten ein Werkzeug, um den Einfluss zellulärer Faktoren auf die Etablierung und Erhaltung des transformierten Status zu analysieren. In dieser Arbeit wurde ein solches Zellsystem, das SV-52/Rev2 Zellsystem, verwendet. Rev2 Zellen sind T-Ag positive zelluläre Revertanten von Wildtyp SV40 transformierten SV-52 Rattenembryofibroblasten, die wie die parentale Zelllinie SV-52 authentisches Wildtyp T-Ag exprimieren, allerdings im Gegensatz zu dieser nach der Nomenklatur von Risser und Pollack (Risser & Pollack, 1974) einen minimal transformierten Phänotyp besitzen. In Rev2 Zellen konnte gezeigt werden, dass die spezifische Phosphorylierung einzelner transformationsrelevanter Phosphorylierungsstellen von T-Ag die Interaktion von T-Ag mit zellulären Strukturen verändert und diese Veränderungen mit der Ausprägung eines minimal transformierten Phänotyps korrelieren (Deppert *et al.*, 1991).

Um zelluläre Gene zu identifizieren, die die transformierenden Eigenschaften von T-Ag beeinflussen, wurde in dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf die Identifizierung von Kinasen gelegt, die T-Ag phosphorylieren und damit in seiner Funktion modulieren. Es konnte gezeigt werden, dass T-Ag nicht nur, wie bereits beschrieben worden ist, durch CK1 $\alpha$  und CK1 $\epsilon$  phosphoryliert wird (Cegielska & Virshup, 1993; Cegielska *et al.*, 1994; Fish *et al.*, 1995), sondern auch durch die CK1 Isoform CK1 $\delta$ . In Extrakten von Rev2 Zellen, die über eine Anionenaustauschersäule fraktioniert worden waren, wurde eine Reduktion der CK1 *in vitro* Kinaseaktivität um mehr als die Hälfte im Vergleich zur CK1 Kinaseaktivität in SV-52 Zellen detektiert. Als Substrat wurde neben SV40 T-Ag auch das GST-Fusionsprotein FP267 verwendet, das die Aminosäurereste 1-64 von murinem p53 umfasst. Durch die Verwendung von FP267 als Substrat wurde die Spezifität der Phosphorylierung von T-Ag durch die Kinase(n) in den Zellextrakten von SV-52 und Rev2 Zellen eingegrenzt auf die p53 N-terminalen Kinasen. FP267 enthält die N-terminalen Phosphorylierungsstellen, von denen einige durch CK1 $\delta$  phosphoryliert werden (Knippschild *et al.*, 1997, Dumaz *et al.*, 1999). Die Kinaseaktivität der Peakfraktionen beider Zelllinien konnte durch die Zugabe des CK1 $\delta$  spezifischen Inhibitors IC261 in verschiedenen Konzentrationen drastisch reduziert werden. Darüber hinaus wurde in Western Blot Analysen CK1 $\delta$  in den Peakfraktionen mit der höchsten CK1 *in vitro* Kinaseaktivität detektiert. Somit korrelierten die phänotypischen Veränderungen, die in Rev2 Zellen beobachtet worden waren (Deppert *et al.*, 1991), nicht nur mit der beschriebenen Unterphosphorylierung des transformationsinkompetenten T-Ag in diesen Zellen, sondern auch mit einer reduzierten CK1 Kinaseaktivität in Rev2 Zellen. Die Inhibition dieser CK1 Kinaseaktivität durch IC261, die bereits bei niedrigen Konzentrationen von IC261 bei Verwendung nicht nur von T-Ag, sondern auch von FP267 als unter anderem für CK1 $\delta$  spezifisches Substrat, erreicht wurde, liess die Schlussfolgerung zu, dass CK1 $\delta$  als zelluläre Proteinkinase durch Phosphorylierung die Transformationskompetenz des in Rev2 Zellen exprimierten, transformationsdefekten SV40 T-Ag möglicherweise beeinflusste.

Die Reduktion der Kinaseaktivität in Rev2 Zellen war nicht auf eine allgemein geringere Expression von CK1 $\delta$  in Rev2 Zellen im Vergleich zu SV-52 Zellen zurückzuführen. Die Lokalisation von CK1 Isoformen beeinflusst die Aktivität und Funktion dieser Kinasen oft massgeblich (zur Übersicht: Gross & Anderson, 1998). In SV-52 Zellen und in Rev2 Zellen wurde die gleiche in der Literatur beschriebene, perinukleäre Verteilung von CK1 $\delta$  beobachtet (Behrend *et al.*, 2000a), sodass die Unterschiede in der Kinaseaktivität nicht auf eine unterschiedliche Sequestrierung der Kinasen CK1 $\delta$ wt aus SV-52 und CK1 $\delta$ rev aus Rev2 Zellen und eine damit einhergehende, möglicherweise unterschiedliche Regulation durch zelluläre Faktoren zurückgeführt werden konnte. Ob die detektierten Unterschiede der elektrophoretischen Mobilität von CK1 $\delta$ wt und CK1 $\delta$ rev in SV-52 bzw. Rev2 Zellen auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen der exprimierten Kinasen zurückzuführen waren, die kausal zur Reduktion der Kinaseaktivität betrogen oder durch diese bedingt wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt.

Die Verminderung der Kinaseaktivität in Rev2 Zellen korrelierte mit dem Auftreten von insgesamt sieben Punktmutationen in der kodierenden Sequenz von CK1 $\delta$ rev. Eine dieser Mutationen, die den Austausch eines basischen Lysins gegen ein ebenfalls basisches Arginin in der Kinasedomäne bewirkte, wurde in SV-52 Zellen ebenfalls detektiert. Von den in Rev2 Zellen entdeckten Aminosäuresubstitutionen entfielen vier auf den Bereich der Kinasedomäne und zwei auf den regulatorischen C-Terminus, der eine Funktion bei der Substraterkennung (Xu *et al.*, 1995; Longenecker *et al.*, 1998) und der Regulation der Kinaseaktivität (Graves & Roach, 1995; Cegielska *et al.*, 1998; Gietzen & Virshup, 1999) ausübt. Der Austausch Tyr<sup>124</sup>→Cys liegt in der Kinasedomäne im Bereich der  $\beta$ 1-Turn- $\beta$ 2 ATP-Bindungsschleife (Xu *et al.*, 1995; Longenecker *et al.*, 1996) und beeinflusst möglicherweise die Bindung von ATP in dieser Region oder den Phosphattransfer. Die Aminosäuresubstitution an Position 172, Asn→Asp, führt zur Einführung eines negativ geladenen, sauren Aminosäurerestes in die Aktivierungsschleife L-9D. Der Aktivierungsschleife L-9D wird aufgrund von Daten der Röntgenkristallstrukturanalyse eine Funktion bei der Regulation der Substratbindung und Aktivität von CK1 $\delta$  und Cki1 zugesprochen. In diesem durch das Vorliegen zahlreicher positiv geladener, basischer Aminosäurereste ausgezeichneten Bereich konnte eine Anionenbindungsstelle lokalisiert werden, an die möglicherweise phosphorylierte Bereiche von CK1 $\delta$  bzw. Cki1 binden (Xu *et al.*, 1995; Longenecker *et al.*, 1996). Es wurde postuliert, dass diese Bindung über eine Konformationsänderung eine geschlossene Konfiguration des Kinasemoleküls induziert, die den Zugang von Substraten zum katalytischen Zentrum verhindert und damit die Kinasen in eine inaktive Konformation überführt. Die Einführung eines sauren Aminosäurerestes in diese Region führt möglicherweise über die Bindung basischer Aminosäurereste im gleichen Bereich des Moleküls ebenfalls zu einer Konformationsänderung, die sich inhibitorisch auf die Kinaseaktivität auswirkt

und die verminderte Aktivität von CK1 $\delta$ rev erklärt. Im C-Terminus von CK1 $\delta$  wurden die Autophosphorylierungsstellen Ser<sup>323</sup>, Thr<sup>325</sup>, Thr<sup>334</sup>, Thr<sup>337</sup>, Ser<sup>368</sup>, Ser<sup>405</sup>, Thr<sup>407</sup> und Ser<sup>408</sup> identifiziert (Graves & Roach, 1995; Gietzen & Virshup, 1999). Die Autophosphorylierung des C-Terminus von CK1 $\delta$  reduziert die Kinaseaktivität (Graves & Roach, 1995; Cegielska *et al.*, 1998; Gietzen & Virshup, 1999), möglicherweise durch das kompetitive Blockieren des aktiven Zentrums durch den in der phosphorylierten Form als Pseudosubstrat wirkenden C-Terminus (Longenecker *et al.*, 1996; Longenecker *et al.*, 1998). Der Austausch des Aminosäurerestes Gly $\rightarrow$ Ser an Position 332 in der Aminosäure-Sequenz von CK1 $\delta$ rev führt eine zusätzliche putative Autophosphorylierungsstelle in den C-Terminus ein, die unter Umständen das autoinhibitorische Potential des C-Terminus erhöht. Die Substitutionen an den Positionen 47 (Pro $\rightarrow$ Ser), 172 (Asn $\rightarrow$ Asp) und 202 (Val $\rightarrow$ Ala) betreffen konservierte AS der Subdomänen II, VIII und IX (Longenecker *et al.*, 1996) und haben unter Umständen weitergehende Auswirkungen auf die Konformation von CK1 $\delta$ rev.

Die aus Rev2 Zellen isolierte und als GST-Fusionsprotein aufgereinigte CK1 $\delta$ rev wies im Vergleich zu CK1 $\delta$ wt aus SV-52 Zellen *in vitro* eine reduzierte Kinaseaktivität bei Verwendung von FP267 als Substrat auf. Die Reduktion der CK1 *in vitro* Kinaseaktivität, die in den Zell-extrakten von Rev2 Zellen detektiert wurde und durch die Verwendung des CK1 Substrats FP267 sowie die Inhibition durch den CK1 $\delta$  Inhibitor IC261 spezifiziert werden konnte, korrelierte daher nicht nur mit der Ausbildung des minimal transformierten Phänotyps und dem Auftreten von Mutationen in der kodierenden Sequenz von CK1 $\delta$ rev, sondern auch mit einer Verminderung der *in vitro* Kinaseaktivität der aus Rev2 Zellen isolierten CK1 $\delta$ rev. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angenommen, dass CK1 $\delta$  als zellulärer Faktor die Erhaltung des maximal transformierten Phänotyps von SV-52 Zellen beeinflusst und Mutationen in der kodierenden Sequenz von CK1 $\delta$ rev zur Reversion des Phänotyps von minimal transformierten Rev2 Zellen beitragen könnten.

### **Die Expression der mutanten CK1 $\delta$ rev trägt zur Reversion des Phänotyps von minimal transformierten Rev2 Zellen bei, und die Transformationskompetenz von SV40 T-Ag in Rev2 Zellen kann durch die zelluläre Proteinkinase CK1 $\delta$ moduliert werden**

Die stabile Expression von CK1 $\delta$ rev in SV-52 Zellen führte zu einer partiellen Reversion des Phänotyps in den etablierten, CK1 $\delta$ rev überexprimierenden SV-CK Zellen. Die Expression des exogenen Faktors CK1 $\delta$ rev in SV-52 Zellen führte damit zu einem dominant-negativen Effekt in dieser Zelllinie, der durch die Veränderungen der Morphologie und des Wachstumsverhaltens von SV-CK Zellen widerspiegelt wurde. Der dominant-negative Charakter der zellulären Mutation(en) in Rev2 Zellen wurde bereits durch Experimente mit zellulären Fusionen aus SV-52

und Rev2 Zellen dokumentiert (W. Deppert *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). In diesen Fusionszellen konnte, im Gegensatz zur erwarteten Komplementation der postulierten Mutation(en) in Rev2 Zellen, das Einbringen der korrespondierenden Wildtyp-Gene aus SV-52 Zellen den Transformationsdefekt von T-Ag und die damit einhergehende Verminderung des Transformationsgrades nicht beheben. Die Expression katalytisch inaktiver Kinasen übt häufig einen dominant-negativen Effekt im Hinblick auf die Aktivität der korrespondierenden Wildtyp-Kinase aus (He *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1999; Sakanaka *et al.*, 1999), und auch die mutierte CK1 $\delta$ rev übte einen solchen dominant-negativen Effekt im zellulären Hintergrund von Rev2 Zellen aus. Eine mögliche Erklärung dieses Effekts kann aus der Analyse der Kristallstrukturdaten einer an der Position 342 trunkierten CK1 $\delta$  abgeleitet werden. Diese Daten zeigen das Vorliegen eines intermolekularen Kontaktes in der Kristallstruktur auf, der auf die Kristallisation von CK1 $\delta$  als Dimer schliessen lässt (Longenecker *et al.*, 1998). Eine solche postulierte Dimerisierung würde die Aktivität des Moleküls durch den Verschluss des katalytischen Zentrums inhibieren und neben der Bindung von phosphorylierten Aminosäureresten in der Anionenbindungsstelle des katalytischen Zentrums einen weiteren Mechanismus für die Regulation der Kinaseaktivität darstellen. Die in der kodierenden Region von CK1 $\delta$ rev detektierten Mutationen führten eventuell zur Expression einer mutanten Kinase, die präferentiell solche Dimere ausbildet und über die Komplexierung von CK1 $\delta$ wt im Dimer die beobachtete dominant-negative Wirkung ausübt. In solchen dimeren Komplexen ist möglicherweise die Kinetik einer Substratumsetzung insgesamt stark reduziert gegenüber der Wildtyp-Kinase. Alternativ könnte die Dimerisierung zur Bildung einer Konformation führen, die keine oder nur wenig Substratbindung und –umsetzung erlaubt. In beiden Fällen würde komplexierte CK1 $\delta$ wt im Dimer durch CK1 $\delta$ rev „inaktiviert“ werden. Die Dimerisierung ist ein Mechanismus der Regulation der Kinaseaktivität, der für einige Rezeptor-Tyrosinkinasen beschrieben wurde (Ullrich & Schlessinger, 1990). Ob eine solche Dimerisierung, wie sie aufgrund der Kristallstruktur von CK1 $\delta$ 342 postuliert wurde, bei der Serin/Threoninkinase CK1 $\delta$  *in vivo* auftritt, ist bisher nicht bekannt.

Der direkte Effekt der Phosphorylierung spezifischer Phosphorylierungsstellen von T-Ag auf die Interaktion mit zellulären Strukturen im Hinblick auf die Replikation der viralen DNA infolge der Virusvermehrung im lytischen Zyklus ist gut dokumentiert und wird durch die koordinierte Aktion zahlreicher Kinasen und Phosphatasen vermittelt (zur Übersicht: (Prives, 1990). Die koordinierte Phosphorylierung sowohl N- als auch C-terminaler Phosphorylierungsstellen scheint notwendig zu sein, um T-Ag in einer biologisch aktiven Konformation zu erhalten (Scheidtmann, 1986; Scheidtmann *et al.*, 1991b; Schneider & Fanning, 1988 ; Hoss *et al.*, 1990). Die Phosphorylierung von Thr<sup>124</sup> z. B. ist essentiell für die Bindung von T-Ag an oriII Sequenzen von SV40 und die Aktivierung der Replikation der viralen DNA. Thr<sup>124</sup> wird durch p34<sup>cdc2</sup> *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert (McVey *et al.*, 1989), und diese Modifikation ist essentiell für das komplette

Aufschmelzen des SV40 Replikationsursprung (McVey *et al.*, 1996; McVey *et al.*, 1993). Die Phosphorylierung von Ser<sup>120</sup> und Ser<sup>123</sup> durch CK1 $\alpha$  wirkt sich dagegen inhibitorisch auf die Funktion von T-Ag in der viralen DNA-Replikation aus (Cegielska & Virshup, 1993; Cegielska *et al.*, 1994). An diesen Serinresten phosphoryliertes, in Bezug auf die Initiation der Replikation inaktives T-Ag wird infolge einer Dephosphorylierung durch Protein Phosphatase 2A (PP2A) aktiviert (Scheidtmann *et al.*, 1991a; Virshup *et al.*, 1989; Virshup *et al.*, 1992). Im Vergleich zu der detailreichen Kenntnis im Hinblick auf den Einfluss des Phosphorylierungsstatus von T-Ag auf die Replikation des viralen Genoms und die Virusvermehrung in permissiven Zellen ist wenig darüber bekannt, wie sich die Phosphorylierung spezifischer Serin- oder Threoninreste von T-Ag in der zellulären Immortalisierung und Transformation durch SV40 auswirkt. Die transformierende Aktivität von T-Ag wird durch die Bindung und Manipulation der Funktion der Tumorsuppressoren bzw. Zellzyklusregulatoren pRB, p107, p130/pRB2 und p53 vermittelt (zur Übersicht: Ali & DeCaprio, 2001). Die Bindung der transkriptionellen Koaktivatoren und putativen Tumorsuppressoren p300 und CBP trägt über die Beeinflussung des mdm2-vermittelten Abbaus von p53 und der p53-abhängigen Transaktivierung von Genen wie z. B. *mdm-2*, *p21* und *bax* zum transformierenden Potential von T-Ag bei (Avantaggiati *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997). In Rev2 Zellen wirkt sich die Unterphosphorylierung von T-Ag nicht auf die Komplexierung von p53 durch T-Ag oder die metabolische Stabilisierung von p53 infolge der zellulären Transformation aus (Deppert *et al.*, 1991), und auch die transformationsrelevante Bindung von pRB wird nicht beeinflusst (Avantaggiati *et al.*, 1996). Allerdings konnte in Rev2 Zellen eine Hyperphosphorylierung von p300 detektiert werden im Vergleich zu SV-52 Zellen, die zu einem Verlust der Interaktion von T-Ag mit dieser Population von p300 führte. Dieser Verlust der Bindung von T-Ag ging mit einer Reduktion der transkriptionellen Repression von CRE Promotoren einher, wie sie in den maximal transformierten SV-52 Zellen stattfindet (Avantaggiati *et al.*, 1996). Die Komplexierung von p300 durch das Adenovirus E1A Tumorantigen wurde durch diese Überphosphorylierung von p300 dagegen nicht beeinflusst.

Die Hyperphosphorylierung von p300 scheint im ersten Moment widersprüchlich im Hinblick auf die Reduktion der CK1 $\delta$  Kinaseaktivität, wie sie in dieser Arbeit für Rev2 Zellen beschrieben wurde. Eine gesteigerte Phosphorylierung wird entweder durch die verminderte Aktivität von Phosphatasen oder die gesteigerte Aktivität von Kinasen oder durch die Modulation dieser Aktivitäten durch weitere zelluläre Faktoren hervorgerufen. Die Aktivität von Kinasen und Phosphatasen kann durch Phosphorylierung reguliert werden, und auch Faktoren, die modulierend in Prozesse der Phosphorylierung und Dephosphorylierung eingreifen, können wiederum durch diese posttranslationale Modifikation in ihrer Funktion beeinflusst werden. Es ist denkbar, dass CK1 $\delta$ rev auf diese Weise indirekt die in Rev2 Zellen detektierte Hyperphosphorylierung von p300 beeinflusst und damit die Interaktion dieses Faktors mit T-Ag inhibiert. CK1 $\delta$  wurde im Rahmen

dieser Arbeit als ein Modulator der transformierenden Aktivität des SV40 T-Ag identifiziert. Die Ausprägung des minimal transformierten Phänotyps in Rev2 Zellen könnte zumindest teilweise auf die Expression der mutierten CK1 $\delta$ <sub>rev</sub> mit reduzierter Kinaseaktivität zurückzuführen sein. Das Auftreten einer hyperphosphorylierten Form von p300 deutet dagegen an, dass in Rev2 Zellen möglicherweise Defekte in mehr als einem Signaltransduktionsweg vorliegen und zusätzliche Mutationen zellulärer Gene zur Reversion des Phänotyps in Rev2 Zellen beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit der leichten Kette LC2 von MAP1A, dem SNARE-assoziierten Protein Snapin und dem mit der Ran GTPase assoziierten Ran Binding Protein im MTOC (RanBPM) drei neue Interaktionspartner der Proteinkinase CK1 $\delta$  beschrieben. Die Phosphorylierung von LC2 durch CK1 $\delta$  könnte auf eine Rolle von CK1 $\delta$  bei der Beeinflussung der Mikrotubuli-Dynamik in der Interphase und in der Mitose hinweisen. Snapin als ein Protein, das in Prozesse des Vesikeltransports und der Membranfusion, insbesondere der synaptischen Transmission, involviert ist, stellt eine weitere Verbindung von CK1 $\delta$  mit diesen zellulären Funktionen her. Die Verknüpfung von RanBPM mit diversen physiologischen Prozessen lässt vermuten, dass CK1 $\delta$  als ein Interaktionspartner von RanBPM in einige dieser Prozesse involviert ist. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CK1 $\delta$  massgeblich an der Ausbildung des maximal transformierten Phänotyps in SV-52 Zellen beteiligt ist und die Expression einer funktionell aktiven CK1 $\delta$  notwendig ist, um SV40 T-Ag in einem transformationskompeten Status zu halten.

## 7. Literatur

- Aaronson, S. A. & Todaro, G. J. (1968).** Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol* **72**, 141-148.
- Agostinis, P., Vandenheede, J. R., Goris, J., Meggio, F., Pinna, L. A. & Merlevede, W. (1987).** The ATP,Mg-dependent protein phosphatase: regulation by casein kinase-1. *FEBS Lett* **224**, 385-390.
- Agostinis, P., Pinna, L. A., Meggio, F., Marin, O., Goris, J., Vandenheede, J. R. & Merlevede, W. (1989).** A synthetic peptide substrate specific for casein kinase I. *FEBS Lett* **259**, 75-78.
- Agostinis, P., Marin, O., James, P., Hendrix, P., Merlevede, W., Vandenheede, J. R. & Pinna, L. A. (1992).** Phosphorylation of the phosphatase modulator subunit (inhibitor-2) by casein kinase-1. Identification of the phosphorylation sites. *FEBS Lett* **305**, 121-124.
- Ali, S. H. & DeCaprio, J. A. (2001).** Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* **11**, 15-23.
- Avantaggiati, M. L., Carbone, M., Graessmann, A., Nakatani, Y., Howard, B. & Levine, A. S. (1996).** The SV40 large T antigen and adenovirus E1a oncoproteins interact with distinct isoforms of the transcriptional co-activator, p300. *Embo J* **15**, 2236-2248.
- Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S. & Kelly, K. (1997).** Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**, 1175-1184.
- Bai, D., Chen, H. & Huang, B. R. (2003).** RanBPM is a novel binding protein for p75NTR. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 552-557.
- Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R. & Vousden, K. H. (1990).** The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *Embo J* **9**, 153-160.
- Bauer, M., Guhl, E., Graessmann, M. & Graessmann, A. (1987).** Cellular mutation mediates T-antigen-positive revertant cells resistant to simian virus 40 transformation but not to retransformation by polyomavirus and adenovirus type 2. *J Virol* **61**, 1821-1827.
- Bazenet, C. E., Brockman, J. L., Lewis, D., Chan, C. & Anderson, R. A. (1990).** Erythroid membrane-bound protein kinase binds to a membrane component and is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* **265**, 7369-7376.
- Behrend, L., Stoter, M., Kurth, M., Rutter, G., Heukeshoven, J., Deppert, W. & Knippschild, U. (2000a).** Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. *Eur J Cell Biol* **79**, 240-251.
- Behrend, L., Milne, D. M., Stoter, M., Deppert, W., Campbell, L. E., Meek, D. W. & Knippschild, U. (2000b).** IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. *Oncogene* **19**, 5303-5313.
- Bioukar, E. B., Marricco, N. C., Zuo, D. & Larose, L. (1999).** Serine phosphorylation of the ligand-activated beta-platelet-derived growth factor receptor by casein kinase I-gamma2 inhibits the receptor's autophosphorylating activity. *J Biol Chem* **274**, 21457-21463.
- Brockman, J. L. & Anderson, R. A. (1991).** Casein kinase I is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in native membranes. *J Biol Chem* **266**, 2508-2512.

- Buxton, P., Zhang, X. M., Walsh, B., Sriratana, A., Schenberg, I., Manickam, E. & Rowe, T. (2003).** Identification and characterization of Snapin as a ubiquitously expressed SNARE-binding protein that interacts with SNAP23 in non-neuronal cells. *Biochem J* **375**, 433-440.
- Carmel, G., Leichus, B., Cheng, X., Patterson, S. D., Mirza, U., Chait, B. T. & Kuret, J. (1994).** Expression, purification, crystallization, and preliminary x-ray analysis of casein kinase-1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **269**, 7304-7309.
- Cegielska, A. & Virshup, D. M. (1993).** Control of simian virus 40 DNA replication by the HeLa cell nuclear kinase casein kinase I. *Mol Cell Biol* **13**, 1202-1211.
- Cegielska, A., Moarefi, I., Fanning, E. & Virshup, D. M. (1994).** T-antigen kinase inhibits simian virus 40 DNA replication by phosphorylation of intact T antigen on serines 120 and 123. *J Virol* **68**, 269-275.
- Cegielska, A., Gietzen, K. F., Rivers, A. & Virshup, D. M. (1998).** Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J Biol Chem* **273**, 1357-1364.
- Chheda, M. G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J. & Sheng, Z. H. (2001).** Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat Cell Biol* **3**, 331-338.
- Chijiwa, T., Hagiwara, M. & Hidaka, H. (1989).** A newly synthesized selective casein kinase I inhibitor, N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide, and affinity purification of casein kinase I from bovine testis. *J Biol Chem* **264**, 4924-4927.
- Christmann, J. L. & Dahmus, M. E. (1981).** Phosphorylation of rat ascites tumor non-histone chromatin proteins. Differential phosphorylation by two cyclic nucleotide-independent protein kinases and comparison to in vivo phosphorylation. *J Biol Chem* **256**, 3326-3331.
- Cobb, M. H. & Rosen, O. M. (1983).** Description of a protein kinase derived from insulin-treated 3T3-L1 cells that catalyzes the phosphorylation of ribosomal protein S6 and casein. *J Biol Chem* **258**, 12472-12481.
- Dahmus, M. E. (1981).** Purification and properties of calf thymus casein kinases I and II. *J Biol Chem* **256**, 3319-3325.
- Darnay, B. G., Singh, S. & Aggarwal, B. B. (1997).** The p80 TNF receptor-associated kinase (p80TRAK) associates with residues 354-397 of the p80 cytoplasmic domain: similarity to casein kinase. *FEBS Lett* **406**, 101-105.
- de Groot, R. P., den Hertog, J., Vandenhede, J. R., Goris, J. & Sassone-Corsi, P. (1993).** Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *Embo J* **12**, 3903-3911.
- Decottignies, A., Owsianik, G. & Ghislain, M. (1999).** Casein kinase I-dependent phosphorylation and stability of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem* **274**, 37139-37146.
- DeMaggio, A. J., Lindberg, R. A., Hunter, T. & Hoekstra, M. F. (1992).** The budding yeast HRR25 gene product is a casein kinase I isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7008-7012.
- Denti, S., Sirri, A., Cheli, A., Rogge, L., Innamorati, G., Putignano, S., Fabbri, M., Pardi, R. & Bianchi, E. (2004).** RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J Biol Chem* **279**, 13027-13034.
- Deppert, W., Haug, M. & Steinmayer, T. (1987).** Modulation of p53 protein expression during cellular transformation with simian virus 40. *Mol Cell Biol* **7**, 4453-4463.
- Deppert, W., Steinmayer, T. & Richter, W. (1989).** Cooperation of SV40 large T antigen and the cellular protein p53 in maintenance of cell transformation. *Oncogene* **4**, 1103-1110.

- Deppert, W., Kurth, M., Graessmann, M., Graessmann, A. & Knippschild, U. (1991).** Altered phosphorylation at specific sites confers a mutant phenotype to SV40 wild-type large T antigen in a flat revertant of SV40-transformed cells. *Oncogene* **6**, 1931-1938.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B. & Martinou, J. C. (2001).** Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* **8**, 601-611.
- Desdouts, F., Siciliano, J. C., Greengard, P. & Girault, J. A. (1995).** Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32: phosphorylation of Ser-137 by casein kinase I inhibits dephosphorylation of Thr-34 by calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2682-2685.
- Dhillon, N. & Hoekstra, M. F. (1994).** Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *Embo J* **13**, 2777-2788.
- Diaz-Nido, J., Serrano, L., Mendez, E. & Avila, J. (1988).** A casein kinase II-related activity is involved in phosphorylation of microtubule-associated protein MAP-1B during neuroblastoma cell differentiation. *J Cell Biol* **106**, 2057-2065.
- Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. (1997).** MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* **89**, 297-308.
- Dubois, T., Kerai, P., Learmonth, M., Cronshaw, A. & Aitken, A. (2002).** Identification of syntaxin-1A sites of phosphorylation by casein kinase I and casein kinase II. *Eur J Biochem* **269**, 909-914.
- Dubois, T., Rommel, C., Howell, S., Steinhussen, U., Soneji, Y., Morrice, N., Moelling, K. & Aitken, A. (1997).** 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction. *J Biol Chem* **272**, 28882-28888.
- Dubois, T., Kerai, P., Zemlickova, E., Howell, S., Jackson, T. R., Venkateswarlu, K., Cullen, P. J., Theibert, A. B., Larose, L., Roach, P. J. & Aitken, A. (2001).** Casein kinase I associates with members of the centaurin-alpha family of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding proteins. *J Biol Chem* **276**, 18757-18764.
- Dumaz, N., Milne, D. M. & Meek, D. W. (1999).** Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. *FEBS Lett* **463**, 312-316.
- Dumont, D. J., Marcellus, R. C., Bayley, S. T. & Branton, P. E. (1993).** Role of phosphorylation near the amino terminus of adenovirus type 5 early region 1A proteins. *J Gen Virol* **74** ( Pt 4), 583-595.
- Ebnet, A., Drewes, G., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. (1999).** Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **44**, 209-224.
- Eder, P. S., Soong, C. J. & Tao, M. (1986).** Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin. *Biochemistry* **25**, 1764-1770.
- Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A. & Virshup, D. M. (2002).** The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* **277**, 17248-17254.
- Elias, L., Li, A. P. & Longmire, J. (1981).** Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent and -independent protein kinase in acute myeloblastic leukemia. *Cancer Res* **41**, 2182-2188.
- Emes, R. D. & Ponting, C. P. (2001).** A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Hum Mol Genet* **10**, 2813-2820.

- Faundez, V. V. & Kelly, R. B. (2000).** The AP-3 complex required for endosomal synaptic vesicle biogenesis is associated with a casein kinase Ialpha-like isoform. *Mol Biol Cell* **11**, 2591-2604.
- Feng, Y. & Davis, N. G. (2000).** Akr1p and the type I casein kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **20**, 5350-5359.
- Fields, S. & Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fink, J. K., Jones, S. M., Esposito, C. & Wilkowski, J. (1996).** Human microtubule-associated protein 1a (MAP1A) gene: genomic organization, cDNA sequence, and developmental- and tissue-specific expression. *Genomics* **35**, 577-585.
- Firzloff, J. M., Luscher, B. & Eisenman, R. N. (1991).** Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5187-5191.
- Firzloff, J. M., Galloway, D. A., Eisenman, R. N. & Luscher, B. (1989).** The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein kinase II. *New Biol* **1**, 44-53.
- Fish, K. J., Cegielska, A., Getman, M. E., Landes, G. M. & Virshup, D. M. (1995).** Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. *J Biol Chem* **270**, 14875-14883.
- Flotow, H. & Roach, P. J. (1989).** Synergistic phosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by cyclic AMP-dependent protein kinase and casein kinase I. Implications for hormonal regulation of glycogen synthase. *J Biol Chem* **264**, 9126-9128.
- Flotow, H. & Roach, P. J. (1991).** Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J Biol Chem* **266**, 3724-3727.
- Floyd, C. C., Grant, P., Gallant, P. E. & Pant, H. C. (1991).** Principal neurofilament-associated protein kinase in squid axoplasm is related to casein kinase I. *J Biol Chem* **266**, 4987-4994.
- Freeman, A. E., Igel, H. J. & Price, P. J. (1975).** I. In vitro transformation of rat embryo cells: correlations with the known tumorigenic activities of chemicals in rodents. *In Vitro* **11**, 107-116.
- Fu, Z., Green, C. L. & Bennett, G. S. (1999).** Relationship between casein kinase I isoforms and a neurofilament-associated kinase. *J Neurochem* **73**, 830-838.
- Fu, Z., Chakraborti, T., Morse, S., Bennett, G. S. & Shaw, G. (2001).** Four casein kinase I isoforms are differentially partitioned between nucleus and cytoplasm. *Exp Cell Res* **269**, 275-286.
- Fujii, T., Watanabe, M. & Nakamura, A. (1996).** Characterization of microtubule-associated protein 1-associated protein kinases from rat brain. *Neurochem Int* **28**, 535-544.
- Gao, Z. H., Metherall, J. & Virshup, D. M. (2000).** Identification of casein kinase I substrates by in vitro expression cloning screening. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 562-566.
- Gavet, O., Ozon, S., Manceau, V., Lawler, S., Curmi, P. & Sobel, A. (1998).** The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *J Cell Sci* **111 ( Pt 22)**, 3333-3346.
- Gietzen, K. F. & Virshup, D. M. (1999).** Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. *J Biol Chem* **274**, 32063-32070.

- Goldberg, J., Nairn, A. C. & Kuriyan, J. (1996).** Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell* **84**, 875-887.
- Gradin, H. M., Larsson, N., Marklund, U. & Gullberg, M. (1998).** Regulation of microtubule dynamics by extracellular signals: cAMP-dependent protein kinase switches off the activity of oncoprotein 18 in intact cells. *J Cell Biol* **140**, 131-141.
- Graessmann, M. & Graessmann, A. (1983).** Microinjection of tissue culture cells. *Methods Enzymol* **101**, 482-492.
- Grasser, F. A., Scheidtmann, K. H., Tuazon, P. T., Traugh, J. A. & Walter, G. (1988).** In vitro phosphorylation of SV40 large T antigen. *Virology* **165**, 13-22.
- Graves, P. R. & Roach, P. J. (1995).** Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J Biol Chem* **270**, 21689-21694.
- Graves, P. R., Haas, D. W., Hagedorn, C. H., DePaoli-Roach, A. A. & Roach, P. J. (1993).** Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. *J Biol Chem* **268**, 6394-6401.
- Greenspan, D. S. & Carroll, R. B. (1981).** Complex of simian virus 40 large tumor antigen and 48,000-dalton host tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 105-109.
- Gross, S. D. & Anderson, R. A. (1998).** Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* **10**, 699-711.
- Gross, S. D., Loijens, J. C. & Anderson, R. A. (1999).** The casein kinase Ialpha isoform is both physically positioned and functionally competent to regulate multiple events of mRNA metabolism. *J Cell Sci* **112** ( Pt 16), 2647-2656.
- Gross, S. D., Hoffman, D. P., Fiset, P. L., Baas, P. & Anderson, R. A. (1995).** A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I alpha associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. *J Cell Biol* **130**, 711-724.
- Gu, W., Shi, X. L. & Roeder, R. G. (1997).** Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**, 819-823.
- Haas, D. W. & Hagedorn, C. H. (1991).** Casein kinase I phosphorylates the 25-kDa mRNA cap-binding protein. *Arch Biochem Biophys* **284**, 84-89.
- Hammarback, J. A., Obar, R. A., Hughes, S. M. & Vallee, R. B. (1991).** MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain. *Neuron* **7**, 129-139.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1988).** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- Hathaway, G. M. & Traugh, J. A. (1979).** Cyclic nucleotide-independent protein kinases from rabbit reticulocytes. Purification of casein kinases. *J Biol Chem* **254**, 762-768.
- He, X., Saint-Jeannet, J. P., Woodgett, J. R., Varmus, H. E. & Dawid, I. B. (1995).** Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in *Xenopus* embryos. *Nature* **374**, 617-622.
- Hicke, L., Zanolari, B. & Riezman, H. (1998).** Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* **141**, 349-358.

- Ho, Y., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M. & Andrews, B. (1997).** Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 581-586.
- Hoekstra, M. F., Liskay, R. M., Ou, A. C., DeMaggio, A. J., Burbee, D. G. & Heffron, F. (1991).** HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science* **253**, 1031-1034.
- Hoekstra, M. F., Dhillon, N., Carmel, G., DeMaggio, A. J., Lindberg, R. A., Hunter, T. & Kuret, J. (1994).** Budding and fission yeast casein kinase I isoforms have dual-specificity protein kinase activity. *Mol Biol Cell* **5**, 877-886.
- Hoss, A., Moarefi, I., Scheidtmann, K. H., Cisek, L. J., Corden, J. L., Dornreiter, I., Arthur, A. K. & Fanning, E. (1990).** Altered phosphorylation pattern of simian virus 40 T antigen expressed in insect cells by using a baculovirus vector. *J Virol* **64**, 4799-4807.
- Hu, S. H., Parker, M. W., Lei, J. Y., Wilce, M. C., Benian, G. M. & Kemp, B. E. (1994).** Insights into autoregulation from the crystal structure of twitchin kinase. *Nature* **369**, 581-584.
- Ideguchi, H., Ueda, A., Tanaka, M., Yang, J., Tsuji, T., Ohno, S., Hagiwara, E., Aoki, A. & Ishigatsubo, Y. (2002).** Structural and functional characterization of the USP11 deubiquitinating enzyme, which interacts with the RanGTP-associated protein RanBPM. *Biochem J* **367**, 87-95.
- Ilardi, J. M., Mochida, S. & Sheng, Z. H. (1999).** Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nat Neurosci* **2**, 119-124.
- Illenberger, S., Drewes, G., Trinczek, B., Biernat, J., Meyer, H. E., Olmsted, J. B., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. (1996).** Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110mark. Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J Biol Chem* **271**, 10834-10843.
- James, P., Halladay, J. & Craig, E. A. (1996).** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Jat, P. S. & Sharp, P. A. (1986).** Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J Virol* **59**, 746-750.
- Jat, P. S., Cepko, C. L., Mulligan, R. C. & Sharp, P. A. (1986).** Recombinant retroviruses encoding simian virus 40 large T antigen and polyomavirus large and middle T antigens. *Mol Cell Biol* **6**, 1204-1217.
- Jiang, Y., Rossi, G. & Ferro-Novick, S. (1993).** Bet2p and Mad2p are components of a prenyltransferase that adds geranylgeranyl onto Ypt1p and Sec4p. *Nature* **366**, 84-86.
- Kataoka, M., Kuwahara, R., Iwasaki, S., Shoji-Kasai, Y. & Takahashi, M. (2000).** Nerve growth factor-induced phosphorylation of SNAP-25 in PC12 cells: a possible involvement in the regulation of SNAP-25 localization. *J Neurochem* **74**, 2058-2066.
- Kearney, P. H., Ebert, M. & Kuret, J. (1994).** Molecular cloning and sequence analysis of two novel fission yeast casein kinase-I isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* **203**, 231-236.
- Keegan, L., Gill, G. & Ptashne, M. (1986).** Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**, 699-704.
- Klimczak, L. J. & Cashmore, A. R. (1993).** Purification and characterization of casein kinase I from broccoli. *Biochem J* **293** ( Pt 1), 283-288.

**Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1991).** Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-414.

**Knighton, D. R., Pearson, R. B., Sowadski, J. M., Means, A. R., Ten Eyck, L. F., Taylor, S. S. & Kemp, B. E. (1992).** Structural basis of the intrasteric regulation of myosin light chain kinases. *Science* **258**, 130-135.

**Knippschild, U., Kiefer, J., Patschinsky, T. & Deppert, W. (1991).** Phenotype-specific phosphorylation of simian virus 40 tsA mutant large T antigens in tsA N-type and A-type transformants. *J Virol* **65**, 4414-4423.

**Knippschild, U., Milne, D. M., Campbell, L. E., DeMaggio, A. J., Christenson, E., Hoekstra, M. F. & Meek, D. W. (1997).** p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene* **15**, 1727-1736.

**Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H. & Reppert, S. M. (1999).** mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205.

**Kuret, J., Woodgett, J. R. & Cohen, P. (1985).** Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Identification of the sites phosphorylated by casein kinase-I. *Eur J Biochem* **151**, 39-48.

**Kuret, J., Johnson, G. S., Cha, D., Christenson, E. R., DeMaggio, A. J. & Hoekstra, M. F. (1997).** Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* **69**, 2506-2515.

**Kuznetsov, S. A., Rodionov, V. I., Nadezhdina, E. S., Murphy, D. B. & Gelfand, V. I. (1986).** Identification of a 34-kD polypeptide as a light chain of microtubule-associated protein-1 (MAP-1) and its association with a MAP-1 peptide that binds to microtubules. *J Cell Biol* **102**, 1060-1066.

**Lamond, A. I. & Spector, D. L. (2003).** Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 605-612.

**Lander, E. S., *et aliteri*, (2001).** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.

**Lane, D. P. (1992).** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.

**Langkopf, A., Hammarback, J. A., Muller, R., Vallee, R. B. & Garner, C. C. (1992).** Microtubule-associated proteins 1A and LC2. Two proteins encoded in one messenger RNA. *J Biol Chem* **267**, 16561-16566.

**Lee, E., Salic, A. & Kirschner, M. W. (2001).** Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. *J Cell Biol* **154**, 983-993.

**Lerch, K., Muir, L. W. & Fischer, E. H. (1975).** Purification and properties of a yeast protein kinase. *Biochemistry* **14**, 2015-2023.

**Li, G., Yin, H. & Kuret, J. (2004).** Casein kinase 1 delta phosphorylates tau and disrupts its binding to microtubules. *J Biol Chem* **279**, 15938-15945.

**Lill, N. L., Grossman, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J. & Livingston, D. M. (1997).** Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**, 823-827.

**Lin, R., Beuparlant, P., Makris, C., Meloche, S. & Hiscott, J. (1996).** Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Mol Cell Biol* **16**, 1401-1409.

**Link, W. T., Dosemeci, A., Floyd, C. C. & Pant, H. C. (1993).** Bovine neurofilament-enriched preparations contain kinase activity similar to casein kinase I--neurofilament phosphorylation by casein kinase I (CKI). *Neurosci Lett* **151**, 89-93.

**Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. & He, X. (2002a).** Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**, 837-847.

**Liu, F., Virshup, D. M., Nairn, A. C. & Greengard, P. (2002b).** Mechanism of regulation of casein kinase I activity by group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* **277**, 45393-45399.

**Liu, W., Xu, Z. H., Luo, D. & Xue, H. W. (2003).** Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. *Plant J* **36**, 189-202.

**Longenecker, K. L., Roach, P. J. & Hurley, T. D. (1996).** Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for phosphate recognition. *J Mol Biol* **257**, 618-631.

**Longenecker, K. L., Roach, P. J. & Hurley, T. D. (1998).** Crystallographic studies of casein kinase I delta toward a structural understanding of auto-inhibition. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54 ( Pt 3)**, 473-475.

**Loor, R., Nowak, N. J., Manzo, M. L., Douglass, H. O. & Chu, T. M. (1982).** Use of pancreas-specific antigen in immunodiagnosis of pancreatic cancer. *Clin Lab Med* **2**, 567-578.

**Lu, P. W., Soong, C. J. & Tao, M. (1985).** Phosphorylation of ankyrin decreases its affinity for spectrin tetramer. *J Biol Chem* **260**, 14958-14964.

**Luzio, J. P., Brake, B., Banting, G., Howell, K. E., Braghetta, P. & Stanley, K. K. (1990).** Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38). *Biochem J* **270**, 97-102.

**Mackie, K., Sorkin, B. C., Nairn, A. C., Greengard, P., Edelman, G. M. & Cunningham, B. A. (1989).** Identification of two protein kinases that phosphorylate the neural cell-adhesion molecule, N-CAM. *J Neurosci* **9**, 1883-1896.

**Mandelkow, E. & Mandelkow, E. M. (1995).** Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 72-81.

**Mann, S. S. & Hammarback, J. A. (1994).** Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem* **269**, 11492-11497.

**Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002).** The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934.

**Manteuil, S., Pages, J., Stehelin, D. & Girard, M. (1973).** Replication of simian virus 40 deoxyribonucleic acid: analysis of the one-step growth cycle. *J Virol* **11**, 98-106.

**Marchal, C., Haguenaer-Tsapis, R. & Urban-Grimal, D. (2000).** Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease. *J Biol Chem* **275**, 23608-23614.

**Marchal, C., Dupre, S. & Urban-Grimal, D. (2002).** Casein kinase I controls a late step in the endocytic trafficking of yeast uracil permease. *J Cell Sci* **115**, 217-226.

**Marin, O., Meggio, F., Sarno, S., Andretta, M. & Pinna, L. A. (1994).** Phosphorylation of synthetic fragments of inhibitor-2 of protein phosphatase-1 by casein kinase-1 and -2. Evidence that phosphorylated residues are not strictly required for efficient targeting by casein kinase-1. *Eur J Biochem* **223**, 647-653.

- Marin, O., Bustos, V. H., Cesaro, L., Meggio, F., Pagano, M. A., Antonelli, M., Allende, C. C., Pinna, L. A. & Allende, J. E. (2003).** A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10193-10200.
- Maritzen, T., Lohler, J., Deppert, W. & Knippschild, U. (2003).** Casein kinase I delta (CKIdelta) is involved in lymphocyte physiology. *Eur J Cell Biol* **82**, 369-378.
- Marklund, U., Larsson, N., Gradin, H. M., Brattsand, G. & Gullberg, M. (1996).** Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *Embo J* **15**, 5290-5298.
- Mashhoon, N., DeMaggio, A. J., Tereshko, V., Bergmeier, S. C., Egli, M., Hoekstra, M. F. & Kuret, J. (2000).** Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J Biol Chem* **275**, 20052-20060.
- Massimi, P. & Banks, L. (2000).** Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. *Virology* **276**, 388-394.
- Massimi, P., Pim, D., Kuhne, C. & Banks, L. (2001).** Regulation of the human papillomavirus oncoproteins by differential phosphorylation. *Mol Cell Biochem* **227**, 137-144.
- Masuda, K., Ono, M., Okamoto, M., Morikawa, W., Otsubo, M., Migita, T., Tsuneyoshi, M., Okuda, H., Shuin, T., Naito, S. & Kuwano, M. (2003).** Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. *Int J Cancer* **105**, 803-810.
- Matsumura, S. & Takeda, M. (1972).** Phosphoprotein kinases from rat liver cytosol. *Biochim Biophys Acta* **289**, 237-241.
- McClure, D. B., Hightower, M. J., Topp, W. C. (1982).** Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation **9**, 345-364
- McKay, R. M., Peters, J. M. & Graff, J. M. (2001a).** The casein kinase I family in Wnt signaling. *Dev Biol* **235**, 388-396.
- McKay, R. M., Peters, J. M. & Graff, J. M. (2001b).** The casein kinase I family: roles in morphogenesis. *Dev Biol* **235**, 378-387.
- McVey, D., Woelker, B. & Tegtmeyer, P. (1996).** Mechanisms of simian virus 40 T-antigen activation by phosphorylation of threonine 124. *J Virol* **70**, 3887-3893.
- McVey, D., Brizuela, L., Mohr, I., Marshak, D. R., Gluzman, Y. & Beach, D. (1989).** Phosphorylation of large tumour antigen by cdc2 stimulates SV40 DNA replication. *Nature* **341**, 503-507.
- McVey, D., Ray, S., Gluzman, Y., Berger, L., Wildeman, A. G., Marshak, D. R. & Tegtmeyer, P. (1993).** cdc2 phosphorylation of threonine 124 activates the origin-unwinding functions of simian virus 40 T antigen. *J Virol* **67**, 5206-5215.
- Meggio, F., Perich, J. W., Reynolds, E. C. & Pinna, L. A. (1991).** A synthetic beta-casein phosphopeptide and analogues as model substrates for casein kinase-I, a ubiquitous, phosphate directed protein kinase. *FEBS Lett* **283**, 303-306.
- Mei, X., Sweatt, A. J. & Hammarback, J. A. (2000).** Regulation of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) subunit composition. *J Neurosci Res* **62**, 56-64.
- Melander Gradin, H., Marklund, U., Larsson, N., Chatila, T. A. & Gullberg, M. (1997).** Regulation of microtubule dynamics by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase IV/Gr-dependent phosphorylation of oncoprotein 18. *Mol Cell Biol* **17**, 3459-3467.

- Mikolajczyk, M., Shi, J., Vaillancourt, R. R., Sachs, N. A. & Nelson, M. (2003).** The cyclin-dependent kinase 11(p46) isoform interacts with RanBPM. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 14-18.
- Milne, D. M., Looby, P. & Meek, D. W. (2001).** Catalytic activity of protein kinase CK1 delta (casein kinase 1delta) is essential for its normal subcellular localization. *Exp Cell Res* **263**, 43-54.
- Milne, D. M., Palmer, R. H., Campbell, D. G. & Meek, D. W. (1992).** Phosphorylation of the p53 tumour-suppressor protein at three N-terminal sites by a novel casein kinase I-like enzyme. *Oncogene* **7**, 1361-1369.
- Mintz, P. J. & Spector, D. L. (2000).** Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. *J Struct Biol* **129**, 241-251.
- Mintz, P. J., Patterson, S. D., Neuwald, A. F., Spahr, C. S. & Spector, D. L. (1999).** Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *Embo J* **18**, 4308-4320.
- Mohr, I. J., Stillman, B. & Gluzman, Y. (1987).** Regulation of SV40 DNA replication by phosphorylation of T antigen. *Embo J* **6**, 153-160.
- Montenarh, M. & Henning, R. (1980).** Simian virus 40 T-antigen phosphorylation is variable. *FEBS Lett* **114**, 107-110.
- Moreland, R. B., Langevin, G. L., Singer, R. H., Garcea, R. L. & Hereford, L. M. (1987).** Amino acid sequences that determine the nuclear localization of yeast histone 2B. *Mol Cell Biol* **7**, 4048-4057.
- Murakami, A., Kimura, K. & Nakano, A. (1999).** The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the sec12 mutant. Implication of negative regulation by the Hrr25 kinase in the vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**, 3804-3810.
- Nakajo, S., Nakaya, K. & Nakamura, Y. (1987).** Phosphorylation of actin-binding proteins by casein kinases 1 and 2. *Biochem Int* **15**, 321-327.
- Nakajo, S., Hagiwara, T., Nakaya, K. & Nakamura, Y. (1986).** Tissue distribution of casein kinases. *Biochem Int* **13**, 701-707.
- Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M. & Nishimoto, T. (1998).** When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* **143**, 1041-1052.
- Nakielny, S., Campbell, D. G. & Cohen, P. (1991).** The molecular mechanism by which adrenalin inhibits glycogen synthesis. *Eur J Biochem* **199**, 713-722.
- Nishitani, H., Hirose, E., Uchimura, Y., Nakamura, M., Umeda, M., Nishii, K., Mori, N. & Nishimoto, T. (2001).** Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene* **272**, 25-33.
- Noh, E. J., Jung, H. J., Jeong, G., Choi, K. S., Park, H. J., Lee, C. H. & Lee, J. S. (2004).** Subcellular localization and transcriptional repressor activity of HBx on p21(WAF1/Cip1) promoter is regulated by ERK-mediated phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 738-745.
- Noiges, R., Eichinger, R., Kutschera, W., Fischer, I., Nemeth, Z., Wiche, G. & Propst, F. (2002).** Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J Neurosci* **22**, 2106-2114.
- Okamura, H., Garcia-Rodriguez, C., Martinson, H., Qin, J., Virshup, D. M. & Rao, A. (2004).** A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* **24**, 4184-4195.

- Okano, M., Yokoyama, T., Miyanaga, T. & Ohtsuki, K. (2004).** Activation of C-kinase eta through its cholesterol-3-sulfate-dependent phosphorylation by casein kinase I in vitro. *Biol Pharm Bull* **27**, 109-112.
- Ospina, B. & Fernandez-Renart, M. (1990).** Characterization of three casein kinases type I from *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* **1052**, 483-488.
- Panek, H. R., Stepp, J. D., Engle, H. M., Marks, K. M., Tan, P. K., Lemmon, S. K. & Robinson, L. C. (1997).** Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *Embo J* **16**, 4194-4204.
- Pedrotti, B. & Islam, K. (1995).** Purification of microtubule associated protein MAP1B from bovine brain: MAP1B binds to microtubules but not to microfilaments. *Cell Motil Cytoskeleton* **30**, 301-309.
- Pedrotti, B. & Islam, K. (1996).** Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *FEBS Lett* **388**, 131-133.
- Peters, J. M., McKay, R. M., McKay, J. P. & Graff, J. M. (1999).** Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* **401**, 345-350.
- Ponting, C., Schultz, J. & Bork, P. (1997).** SPRY domains in ryanodine receptors (Ca<sup>2+</sup>)-release channels). *Trends Biochem Sci* **22**, 193-194.
- Poulter, L., Ang, S. G., Gibson, B. W., Williams, D. H., Holmes, C. F., Caudwell, F. B., Pitcher, J. & Cohen, P. (1988).** Analysis of the in vivo phosphorylation state of rabbit skeletal muscle glycogen synthase by fast-atom-bombardment mass spectrometry. *Eur J Biochem* **175**, 497-510.
- Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B. & Young, M. W. (1998).** double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* **94**, 83-95.
- Prives, C. (1990).** The replication functions of SV40 T antigen are regulated by phosphorylation. *Cell* **61**, 735-738.
- Pulgar, V., Marin, O., Meggio, F., Allende, C. C., Allende, J. E. & Pinna, L. A. (1999).** Optimal sequences for non-phosphate-directed phosphorylation by protein kinase CK1 (casein kinase-1)--a re-evaluation. *Eur J Biochem* **260**, 520-526.
- Pulgar, V., Tapia, C., Vignolo, P., Santos, J., Sunkel, C. E., Allende, C. C. & Allende, J. E. (1996).** The recombinant alpha isoform of protein kinase CK1 from *Xenopus laevis* can phosphorylate tyrosine in synthetic substrates. *Eur J Biochem* **242**, 519-528.
- Rao, M. A., Cheng, H., Quayle, A. N., Nishitani, H., Nelson, C. C. & Rennie, P. S. (2002).** RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **277**, 48020-48027.
- Rapuano, M. & Rosen, O. M. (1991).** Phosphorylation of the insulin receptor by a casein kinase I-like enzyme. *J Biol Chem* **266**, 12902-12907.
- Rena, G., Bain, J., Elliott, M. & Cohen, P. (2004).** D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *EMBO Rep* **5**, 60-65.
- Richter, W. & Deppert, W. (1990).** The cellular chromatin is an important target for SV40 large T antigen in maintaining the transformed phenotype. *Virology* **174**, 543-556.
- Risinger, C. & Bennett, M. K. (1999).** Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms. *J Neurochem* **72**, 614-624.

- Risser, R. & Pollack, R. (1974).** A nonselective analysis of SV40 transformation of mouse 3T3 cells. *Virology* **59**, 477-489.
- Rivers, A., Gietzen, K. F., Vielhaber, E. & Virshup, D. M. (1998).** Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle. *J Biol Chem* **273**, 15980-15984.
- Roach, P. J. (1991).** Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J Biol Chem* **266**, 14139-14142.
- Robinson, L. C., Menold, M. M., Garrett, S. & Culbertson, M. R. (1993).** Casein kinase I-like protein kinases encoded by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis. *Mol Cell Biol* **13**, 2870-2881.
- Robinson, L. C., Hubbard, E. J., Graves, P. R., DePaoli-Roach, A. A., Roach, P. J., Kung, C., Haas, D. W., Hagedorn, C. H., Goebel, M., Culbertson, M. R. & et al. (1992).** Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 28-32.
- Roof, D. M., Meluh, P. B. & Rose, M. D. (1992).** Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *J Cell Biol* **118**, 95-108.
- Rowles, J., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J. & Cobb, M. H. (1991).** Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9548-9552.
- Rubinfeld, B., Tice, D. A. & Polakis, P. (2001).** Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase I epsilon. *J Biol Chem* **276**, 39037-39045.
- Ryan, K. W., Christensen, J. B., Imperiale, M. J. & Brockman, W. W. (1985).** Isolation of a simian virus 40 T-antigen-positive, transformation-resistant cell line by indirect selection. *Mol Cell Biol* **5**, 3577-3582.
- Sakanaka, C. (2002).** Phosphorylation and regulation of beta-catenin by casein kinase I epsilon. *J Biochem (Tokyo)* **132**, 697-703.
- Sakanaka, C., Leong, P., Xu, L., Harrison, S. D. & Williams, L. T. (1999).** Casein kinase I epsilon in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12548-12552.
- Santos, J. A., Logarinho, E., Tapia, C., Allende, C. C., Allende, J. E. & Sunkel, C. E. (1996).** The casein kinase I alpha gene of *Drosophila melanogaster* is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage. *J Cell Sci* **109** ( Pt 7), 1847-1856.
- Sazer, S. & Dasso, M. (2000).** The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J Cell Sci* **113** ( Pt 7), 1111-1118.
- Scheidtmann, K. H. (1986).** Phosphorylation of simian virus 40 large T antigen: cytoplasmic and nuclear phosphorylation sites differ in their metabolic stability. *Virology* **150**, 85-95.
- Scheidtmann, K. H., Virshup, D. M. & Kelly, T. J. (1991a).** Protein phosphatase 2A dephosphorylates simian virus 40 large T antigen specifically at residues involved in regulation of DNA-binding activity. *J Virol* **65**, 2098-2101.
- Scheidtmann, K. H., Buck, M., Schneider, J., Kalderon, D., Fanning, E. & Smith, A. E. (1991b).** Biochemical characterization of phosphorylation site mutants of simian virus 40 large T antigen: evidence for interaction between amino- and carboxy-terminal domains. *J Virol* **65**, 1479-1490.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. & Gey, G. O. (1953).** Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**, 695-710.

- Schneider, J. & Fanning, E. (1988).** Mutations in the phosphorylation sites of simian virus 40 (SV40) T antigen alter its origin DNA-binding specificity for sites I or II and affect SV40 DNA replication activity. *J Virol* **62**, 1598-1605.
- Schwab, C., DeMaggio, A. J., Ghoshal, N., Binder, L. I., Kuret, J. & McGeer, P. L. (2000).** Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* **21**, 503-510.
- Sharma, P., Sharma, M., Amin, N. D., Albers, R. W. & Pant, H. C. (1999).** Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11156-11160.
- Shibata, N., Tsunekawa, N., Okamoto-Ito, S., Akasu, R., Tokumasu, A. & Noce, T. (2004).** Mouse RanBPM is a partner gene to a germline specific RNA helicase, mouse vasa homolog protein. *Mol Reprod Dev* **67**, 1-7.
- Shimazaki, Y., Nishiki, T., Omori, A., Sekiguchi, M., Kamata, Y., Kozaki, S. & Takahashi, M. (1996).** Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release. *J Biol Chem* **271**, 14548-14553.
- Sillibourne, J. E., Milne, D. M., Takahashi, M., Ono, Y. & Meek, D. W. (2002).** Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1delta mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/AKAP450. *J Mol Biol* **322**, 785-797.
- Silver, P., Sadler, I. & Osborne, M. A. (1989).** Yeast proteins that recognize nuclear localization sequences. *J Cell Biol* **109**, 983-989.
- Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1995).** Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state. *J Neurochem* **64**, 1420-1423.
- Singh, T. J., Akatsuka, A., Huang, K. P., Sharma, R. K., Tam, S. W. & Wang, J. H. (1982).** A multifunctional cyclic nucleotide- and Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **107**, 676-683.
- Smith, C. L., Debouck, C., Rosenberg, M. & Culp, J. S. (1989).** Phosphorylation of serine residue 89 of human adenovirus E1A proteins is responsible for their characteristic electrophoretic mobility shifts, and its mutation affects biological function. *J Virol* **63**, 1569-1577.
- Smith, D. S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M. J., Wynshaw-Boris, A. & Tsai, L. H. (2000).** Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol* **2**, 767-775.
- Somers, K. D. & Kirsten, W. H. (1968).** Long-term propagation of a murine erythroblastosis virus in vitro. *J Natl Cancer Inst* **40**, 1053-1065.
- Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L. H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J., DeMaggio, A. J., Hoekstra, M. F., Blenis, J., Hunter, T. & Cantley, L. C. (1996).** A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* **16**, 6486-6493.
- Soong, C. J., Lu, P. W. & Tao, M. (1987).** Analysis of band 3 cytoplasmic domain phosphorylation and association with ankyrin. *Arch Biochem Biophys* **254**, 509-517.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973).** A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**, 1409-1416.

- Sturzbecher, H. W., Montenarh, M. & Henning, R. (1987).** Enhanced protein phosphorylation in SV40-transformed and -infected cells. *Virology* **160**, 445-455.
- Sturzbecher, H. W., Morike, M., Montenarh, M. & Henning, R. (1985).** Relationship of phosphorylation to the oligomerization of SV40 T antigen and its association with p53. *FEBS Lett* **180**, 285-290.
- Takano, A., Isojima, Y. & Nagai, K. (2004).** Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry. *J Biol Chem*.
- Teodoro, J. G. & Branton, P. E. (1997).** Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol* **71**, 3620-3627.
- Tipper, J. P., Bacon, G. W. & Witters, L. A. (1983).** Phosphorylation of acetyl-coenzyme A carboxylase by casein kinase I and casein kinase II. *Arch Biochem Biophys* **227**, 386-396.
- Tobin, A. B., Totty, N. F., Sterlin, A. E. & Nahorski, S. R. (1997).** Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase 1alpha. *J Biol Chem* **272**, 20844-20849.
- Togel, M., Wiche, G. & Propst, F. (1998).** Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J Cell Biol* **143**, 695-707.
- Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptacek, L. J. & Fu, Y. H. (2001).** An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040-1043.
- Topp, W. C., Rifkin, D., Graessmann, A., Chang C. M., Sleight, M. J. (1979).** The role of early SV40 gene products in the maintenance of the transformed state. Hormones and cell culture. Cold Spring harbour conf. Cell proliferation. **6**: 361-370.
- Tuazon, P. T. & Traugh, J. A. (1991).** Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **23**, 123-164.
- Tucker, E. L. & Pignatelli, M. (2000).** Catenins and their associated proteins in colorectal cancer. *Histol Histopathol* **15**, 251-260.
- Ulloa, L., Diaz-Nido, J. & Avila, J. (1993).** Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neuritogenesis in neuroblastoma cells. *Embo J* **12**, 1633-1640.
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990).** Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212.
- Umeda, M., Nishitani, H. & Nishimoto, T. (2003).** A novel nuclear protein, Twa1, and Muskelin comprise a complex with RanBPM. *Gene* **303**, 47-54.
- Umphress, J. L., Tuazon, P. T., Chen, C. J. & Traugh, J. A. (1992).** Determinants on simian virus 40 large T antigen are important for recognition and phosphorylation by casein kinase I. *Eur J Biochem* **203**, 239-243.
- Vaidya, A. B., Lasfargues, E. Y., Sheffield, J. B. & Coutinho, W. G. (1978).** Murine mammary tumor virus (MuMTV) infection of an epithelial cell line established from C57BL/6 mouse mammary glands. *Virology* **90**, 12-22.
- Vancura, A., Sessler, A., Leichus, B. & Kuret, J. (1994).** A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. *J Biol Chem* **269**, 19271-19278.

- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z. H. & Virshup, D. M. (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol* **20**, 4888-4899.
- Virshup, D. M., Kauffman, M. G. & Kelly, T. J. (1989). Activation of SV40 DNA replication in vitro by cellular protein phosphatase 2A. *Embo J* **8**, 3891-3898.
- Virshup, D. M., Russo, A. A. & Kelly, T. J. (1992). Mechanism of activation of simian virus 40 DNA replication by protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* **12**, 4883-4895.
- Vites, O., Rhee, J. S., Schwarz, M., Rosenmund, C. & Jahn, R. (2004). Reinvestigation of the role of snapin in neurotransmitter release. *J Biol Chem* **279**, 26251-26256.
- Walczak, C. E., Anderson, R. A. & Nelson, D. L. (1993). Identification of a family of casein kinases in Paramecium: biochemical characterization and cellular localization. *Biochem J* **296** ( Pt 3), 729-735.
- Walter, J., Grunberg, J., Schindzielorz, A. & Haass, C. (1998). Proteolytic fragments of the Alzheimer's disease associated presenilins-1 and -2 are phosphorylated in vivo by distinct cellular mechanisms. *Biochemistry* **37**, 5961-5967.
- Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G. & Haass, C. (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* **276**, 14634-14641.
- Wang, D., Li, Z., Messing, E. M. & Wu, G. (2002a). Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem* **277**, 36216-36222.
- Wang, P. C., Vancura, A., Mitcheson, T. G. & Kuret, J. (1992). Two genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode a membrane-bound form of casein kinase-1. *Mol Biol Cell* **3**, 275-286.
- Wang, P. C., Vancura, A., Desai, A., Carmel, G. & Kuret, J. (1994). Cytoplasmic forms of fission yeast casein kinase-1 associate primarily with the particulate fraction of the cell. *J Biol Chem* **269**, 12014-12023.
- Wang, X., Hoekstra, M. F., DeMaggio, A. J., Dhillon, N., Vancura, A., Kuret, J., Johnston, G. C. & Singer, R. A. (1996). Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the *gcs1* blockage of cell proliferation from stationary phase. *Mol Cell Biol* **16**, 5375-5385.
- Wang, Y., Marion Schneider, E., Li, X., Duttonhofer, I., Debatin, K. & Hug, H. (2002b). HIPK2 associates with RanBPM. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 148-153.
- Weimbs, T., Low, S. H., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Bucher, P. & Hofmann, K. (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3046-3051.
- Whalen, S. G., Marcellus, R. C., Barbeau, D. & Branton, P. E. (1996). Importance of the Ser-132 phosphorylation site in cell transformation and apoptosis induced by the adenovirus type 5 E1A protein. *J Virol* **70**, 5373-5383.
- Wojda, I., Cytrynska, M., Frajnt, M. & Jakubowicz, T. (1999). Phosphorylation of yeast ribosomal proteins by CKI and CKII in the presence of heparin. *Acta Biochim Pol* **46**, 211-215.
- Wynshaw-Boris, A. & Gambello, M. J. (2001). LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev* **15**, 639-651.
- Xu, R. M., Carmel, G., Sweet, R. M., Kuret, J. & Cheng, X. (1995). Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase. *Embo J* **14**, 1015-1023.

**Yanagawa, S., Matsuda, Y., Lee, J. S., Matsubayashi, H., Sese, S., Kadowaki, T. & Ishimoto, A. (2002).** Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *Embo J* **21**, 1733-1742.

**Yang, P. & Sale, W. S. (2000).** Casein kinase I is anchored on axonemal doublet microtubules and regulates flagellar dynein phosphorylation and activity. *J Biol Chem* **275**, 18905-18912.

**Yasojima, K., Kuret, J., DeMaggio, A. J., McGeer, E. & McGeer, P. L. (2000).** Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. *Brain Res* **865**, 116-120.

**Yeakley, J. M., Tronchere, H., Olesen, J., Dyck, J. A., Wang, H. Y. & Fu, X. D. (1999).** Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol* **145**, 447-455.

**Yun, C. Y., Velazquez-Dones, A. L., Lyman, S. K. & Fu, X. D. (2003).** Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J Biol Chem* **278**, 18050-18055.

**Yunis, A. A., Arimura, G. K. & Russin, D. J. (1977).** Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* **19**, 218-235.

**Zhai, L., Graves, P. R., Robinson, L. C., Italiano, M., Culbertson, M. R., Rowles, J., Cobb, M. H., DePaoli-Roach, A. A. & Roach, P. J. (1995).** Casein kinase I gamma subfamily. Molecular cloning, expression, and characterization of three mammalian isoforms and complementation of defects in the *Saccharomyces cerevisiae* YCK genes. *J Biol Chem* **270**, 12717-12724.

**Zhang, J., Gross, S. D., Schroeder, M. D. & Anderson, R. A. (1996).** Casein kinase I alpha and alpha L: alternative splicing-generated kinases exhibit different catalytic properties. *Biochemistry* **35**, 16319-16327.

**Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J. C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P. & McKeon, F. (1998).** Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* **93**, 851-861.

**Zou, Y., Lim, S., Lee, K., Deng, X. & Friedman, E. (2003).** Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M. *J Biol Chem* **278**, 49573-49581.

## Abkürzungen

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AT	Annealing Temperatur
ATP	Adenosintriphosphat
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Carboxy
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase	Cysteinyl-Aspartat-Protease
CD	C-terminale Domäne
cdk	Cyclin-abhängige Kinase
Ci	Curie
CK	Casein Kinase
cm	Zentimeter
cpm	Impulse (counts) pro Minute
D	Dalton
D	Aspartat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol
dATP	Desoxyadenintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DD	Dimerisierungsdomäne
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMEM	`Dulbecco's Modified Eagle's' Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Glutamat
ECFP	Enhanced cyan fluorescent protein
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatische Retikulum
EYFP	„Enhanced yellow fluorescent protein“
F	Phenylalanin
Fa.	Firma
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm

G	Glycin
GDP	Guanosindiphosphat
Gly	Glycin
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
h	Stunde
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure)
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
I	Isoleucin
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
J	Joule
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
KD	Kinasedomäne
KD	Kilodalton
KHD	Kinesin homologe Domäne
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
μ	mikro
m	milli
m	Meter
M	molar (mol/l)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTOC	Mikrotubuli-Organisations-Zentrum
MW	Molekulargewicht
n	nano
N-	Amino-
NLS	Kerntransportsignal
NP40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
P	Prolin
PAS	Protein A-Sepharose
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Wasserstoffionen
R	Arginin
rev	Revertante
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

---

RT-PCR	Reverse Transkription- Polymerase-Ketten-Reaktion
S	Serin
sek	Sekunde
Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
T	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	trans-Golgi Netzwerk
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
u.a.	unter anderem
UAS	Upstream activating sequence
UTR	untranslatierte Region
V	Valin
V	Volt
Vol.	Volumenanteil
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin
YFP	Yellow fluorescent protein
YTH-System	Yeast Two-Hybrid" System

## **Danksagungen**

*Die vorliegende Dissertation wurde im März 2000 in der Abteilung Tumorstudiologie am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg begonnen und ab September 2002 in der Abteilung Viszeral- und Transplantationschirurgie am Universitätsklinikum Ulm fortgeführt.*

*Für die interessante Themenstellung, die gute wissenschaftliche Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die schnelle Durchsicht des Manuskriptes möchte ich meinem Betreuer Herrn PD Dr. Uwe Knippschild danken.*

*An Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert geht mein Dank dafür, dass ich mehr als zwei Jahre in seiner Abteilung am Heinrich-Pette-Institut arbeiten konnte und er bereit war, als Disputationsgutachter zu fungieren.*

*Liebe Mitarbeiter der Abteilung Tumorstudiologie am Heinrich-Pette-Institut, Euch danke ich für die schöne Zeit in Hamburg! Das positive Arbeitsklima und die vielfältige Unterstützung, die ich bei Euch erfahren habe, haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.*

*Insbesondere waren da die Mitglieder der „alten“ Knippschild-Gruppe in Hamburg, von denen einige den Grundstock der „neuen“ Knippschild-Gruppe in Ulm bildeten, und die Ulmer Neuzugänge. Marion, von Dir habe ich viel Wertvolles gelernt, Tricks und technische Feinheiten der Laborarbeit, aber auch viele Dinge, die über die Arbeit weit hinausgehen. Nadine, es war immer lustig, mit Dir zusammenzuarbeiten, und ich habe mich sehr gefreut, dass Du mit nach Ulm gekommen bist. Deine Unterstützung bei vielen Versuchen hat mir sehr geholfen. Lars, von Dir als Mitdotorand der ersten Stunde konnte ich mir in Hamburg noch einiges abgucken. Du warst immer bereit, mir bei Problemen im Labor zu helfen und es war schön, Dich und Tini in Ulm zu haben. Thorsten und Nadine, nachdem es Euch nach Ulm verschlagen hatte, gab es im Labor einige nette Abende mit Aufläufen und Spaghetti. Nadine, Deine Korrekturen haben dieser Arbeit den Feinschliff gegeben. Thorsten, Deine Hilfe am Mikroskop war unverzichtbar. Arnhild, wieviel LB-Medium hast Du eigentlich für mich produziert? Georgios, Du kannst das hier zwar nicht lesen, aber Du hast Recht, manchmal muss man einfach „what the...“ sagen und alles nicht so ernst nehmen. Und nicht zuletzt Martin, der als Weggefährte auf dem steinigen Pfad zur Promotion fast die ganze Zeit mit mir zusammen pipettiert hat. Ich war sehr froh, als Du mit nach Ulm gekommen bist. Du warst immer hilfsbereit, egal, wann man Dich worum auch immer gebeten hat, und ohne Dich wäre ich im letzten grossen Kraftakt vor der Fertigstellung dieser Arbeit wahrscheinlich verwzweifelt. Danke Euch allen.*

*Meine Eltern Alfred und Heike Wolff und auch meine Großeltern Werner und Liselotte Wolff haben mich immer darin bestärkt, dass zu tun, was ich wollte. Und meine Freunde hatten immer ein offenes Ohr für mich, wenn es mal nicht so leicht voranging. Danke für Eure Unterstützung!*

## Lebenslauf

### Promotion

- 03/2000-09/2002 Durchführung des experimentellen Teils der Doktorarbeit am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Abteilung Tumorstudiologie, an der Universität Hamburg
- 10/2002-07/2004 Fortsetzung des experimentellen Teils der Doktorarbeit am Universitätsklinikum Ulm, Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie

### Hochschulausbildung

- 10/1993-03/1994 Studium Lehramt gymnasiale Oberstufe mit den Fächern Biologie und Latein an der Universität Hamburg
- 04/1994-09/1996 Studium Biologie an der Universität Hamburg
- 10/1996-10/1999 Studium Biologie an der Universität Braunschweig
- Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Adhärenz und Invasion von klinischen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae* an bzw. in humanen Epithelzellen“.
- 2.11.1999 Diplom

### Schulbildung

- 08/1980-07/1984 Grundschule in Büchen
- 08/1984-06/1993 Gymnasium in Schwarzenbek
- 25.6.1993 Abitur