

Abstract

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-assozierten Proteins 1A (MAP1A), als LC2-F bezeichnet, das murine SNARE-assozierte Protein Snapin und das murine Ran Binding Protein im MTOC (RanBPM) als neue, bisher nicht in der Literatur beschriebene Protein-Interaktionspartner von CK1 δ identifiziert und hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit CK1 δ charakterisiert. Die identifizierten Protein-Interaktionspartner interagierten im YTH System reproduzierbar mit der als „Köder“-Protein verwendeten CK1 δ rev, die eine reduzierte Kinaseaktivität besass, sowie mit der Wildtyp-Kinase CK1 δ wt. LC2-F zeigte darüber hinaus eine Wechselwirkung mit CK1 ϵ , während Snapin und RanBPM im YTH System jeweils eine Interaktion mit CK1 ϵ und CK1 α aufwiesen.

Eine *in vivo* Assoziation von CK1 δ 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 δ 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 δ 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 δ 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 δ mit LC2-F waren die AS 76-103 in der Kinasedomäne und die AS 350-375 im C-Terminus von CK1 δ notwendig. Der Hauptanteil der phosphorylierten AS von Snapin wurde in der Region zwischen den AS 37 und 78 lokalisiert. Eine oder mehrere CK1 δ 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 δ essentiell. Eine weitere Bindungsdomäne lag im N-Terminus von CK1 δ zwischen den AS 200-304. Bei LC2-F und Snapin überlappten damit die phosphorylierten Regionen mit den Bindungsdomänen dieser Proteine für CK1 δ . 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 δ . Die Bindungsstudien im YTH System liessen auf das Vorhandensein von zwei unabhängigen Interaktionsdomänen für RanBPM55 jeweils in der Kinasedomäne und im C-Terminus von CK1 δ schliessen.

Snapin kolokalisierte in verschiedenen Zelllinien im perinukleären Bereich partiell mit CK1 δ , 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 δ enger mit einer funktionellen Rolle in der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik sowie von Vesikel- und Membrantransportprozessen und stellt eine Verknüpfung von CK1 δ mit dem in verschiedene physiologische Prozesse involvierten RanBPM her.

Das virale Tumorentigen SV40 T-Ag wurde in dieser Arbeit als weiteres Substrat von CK1 δ charakterisiert. T-Ag wurde *in vitro* durch eine C-terminal trunkierte CK1 δ phosphoryliert. Der Einfluss von CK1 δ auf die Transformationskompetenz und den Phosphorylierungsstatus von T-Ag wurde im SV-52/Rev2 Zellsystems 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 δ waren in SV-52 und Rev2 Zellen vergleichbar. Dagegen war die Kinaseaktivität von CK1 δ in Rev2 Zellen um 60% reduziert im Vergleich zu der Kinaseaktivität SV-52 Zellen. Die aus Rev2 Zellen isolierte CK1 δ rev wies sechs Punktmutationen in der kodierenden Sequenz auf. Aufgrund dieser Mutationen besass die aufgereinigte rekombinante GST-CK1 δ rev eine reduzierte *in vitro* Kinaseaktivität im Vergleich zu GST-CK1 δ wt. Durch die stabile Überexpression der mutierten CK1 δ rev in SV-52 Zellen wurde ein dominant-negativer Effekt von CK1 δ rev detektiert, der sich in einer partiellen Reversion des Phänotyps der stabil transfizierten Zellen und einer Reduktion der CK1 δ Kinaseaktivität äusserte. Daher scheint CK1 δ massgeblich an der Ausbildung des maximal transformierten Phänotyps in SV-52 Zellen beteiligt zu sein, wahrscheinlich über die Regulation des Phosphorylierungsstatus von T-Ag.