

Klonierung und funktionelle Charakterisierung des Aktinreorganisators p150-Spir

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ines Maria Otto

Dr.med.

aus Zwickau

Würzburg 2001

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

Gutachter:.....

Gutachter:.....

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

1. Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Zusammenfassung	5
Summary	6
3. Einleitung	7
3.1. MAPKinase Kaskaden und intrazelluläre Signaltransduktion	7
3.2. Die JNK/SAPK Proteinkinasekaskade	15
3.2.1. Aufbau und Funktion der JNK-Kaskade in Säugetieren	15
3.2.2. Aufbau und Funktion der JNK-Kaskade in <i>Drosophila melanogaster</i>	21
3.3. Gegenstand der Arbeit	25
4. Material	26
4.1. Geräte	26
4.2. Chemikalien und Reagenzien (Chemikalienverzeichnis)	27
4.2.1. Chemikalien	27
4.2.2. Enzyme	28
4.2.3. Molekulargewichtsmarker	29
4.2.4. Reagenziensätze (Kits)	29
4.3. Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien	29
4.4. Plasmide	30
4.5. Medien zur Aufzucht von Bakterien und Hefen	32
4.5.1. Bakterienmedien	32
4.5.2. Hefemedien	33
4.5.3. Zellkulturmedien	33
4.6. Verbrauchsmaterialien	34
4.7. Puffer und Lösungen	34

4.8. Sonstiges	38
5. Methoden	39
5.1. Bakterien	39
5.1.1. Aufzucht von Bakterien in Flüssigmedien (Übernachtskulturen)	39
5.1.2. Herstellung von ultrakompetenten Bakterien	39
5.1.3. Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmiden	40
5.1.4. Glyceroldauerkulturen	40
5.2. DNA und RNA	40
5.2.1. Konstruktion von Expressionsplasmiden	40
5.2.2. Plasmidisolierung aus Escherichia coli	42
5.2.3. Automatische DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377 Integrated Thermal Cycler	42
5.2.4. Einbringen von Punkt-oder Deletionsmutationen mit Hilfe des Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit	42
5.2.5. RNA-Extraktion	43
5.2.6. Northern Blot	43
5.3. Proteine	44
5.3.1. Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	44
5.3.2. Färben von Proteingelen mit Comassie-Blau	45
5.3.3. Western-Blot	45
5.3.4. Gewinnung von Proteinen aus Zell-Lysaten	46
5.3.5. Isolierung von Proteinextrakten aus Hefezellen	47
5.3.6. Präzipitation und Koimmunopräzipitation	47
5.3.7. Kinaseassay	47
5.4. Zellkultur	48
5.4.1. Aufzucht von NIH3T3-Mausfibroblastenzellen	48

5.4.2. Transiente Transfektion mit Lipofectamin	48
5.4.3. Immunfluoreszenz	48
5.5. Hefe-Two-Hybrid-System	49
5.5.1. Yeast-Two-Hybrid-Screen	50
5.5.2. Titerbestimmung und Amplifikation der c-DNA-Bibliothek	52
5.5.3. Transformation und Two-Hybrid-Tests	52
5.5.4. X-Gal-Filter-lift-Assay	53
5.5.5. Bait-Elimination/Cycloheximid-Gegenselektion	54
5.5.6. DNA-Gewinnung, Sequenzierung und Identifikation	54
6. Ergebnisse	55
6.1. Klonierung der Two-Hybrid-Konstrukte, Test auf Expression in der Hefe und Funktionalität im Two-Hybrid-Assay	55
6.2. Screen einer embryonalen <i>Drosophila melanogaster</i> cDNA-Expressionsbibliothek	55
6.3. Identifikation der Exon-Intron-Struktur des <i>spir</i> -Gens	56
6.4. Domänenstruktur von p150-Spir	59
6.5. Expression der <i>spir</i> -mRNA in <i>Drosophila</i>	61
6.6. Klonierung der <i>spir</i> -cDNA und Laufverhalten in der Proteingelektrophorese	62
6.7. <i>spir</i> ist evolutionär hoch konserviert	63
6.8. p150-Spir JBD wird von JNK <i>in vitro</i> phosphoryliert	67
6.9. p150-Spir wird von JNK <i>in vivo</i> phosphoryliert	68
6.10. p150-Spir und JNK kolokalisieren in NIH3T3-Mausfibroblasten	70
6.11. p150-Spir und JNK koimmunopräzipitieren in NIH3T3-Zellen	71
6.12. Überexpression von p150-Spir in NIH3T3-Zellen induziert Aktinclusterbildung	72

6.13.	Die modifizierte FYVE-Domäne und die Spir-Box beeinflussen die zelluläre Lokalisation von p150-Spir	73
7.	Diskussion und Ausblick	76
7.1.	p150-Spir ist ein neues <i>Drosophila</i> -Protein, welches mit DJNK interagiert	76
7.2.	p150-Spir fungiert als Aktinorganisor	77
7.3.	p150-Spir als Bindeglied zwischen JNK-Signalen und Regulation des Zytoskeletts	82
7.4.	p150-Spir als Verbindung zwischen MAPK-Signalen und zellulären Transportprozessen	85
7.5.	Ausblick und zukünftige Fragestellungen	91
8.	Literaturverzeichnis	92
Anhang		100
	Abkürzungen	101
	Sequenzen von p150-Spir und hu-Spir-1	104
	Danksagung	109
	Curriculum vitae	110
	Publikationen aus dieser Arbeit	111
	Erklärung	112

2. Zusammenfassung

Die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), ein Mitglied der Familie der MAP-Kinasen (Mitogen Activated Protein Kinases), wirkt als signalübertragender Effektor, der den kleinen GTPasen der Rho-Familie Rac und Cdc42 nachgeschaltet ist. Rho-GTPasen spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation von zellulären Aktinstrukturen und steuern Prozesse in der Zelle, die Änderungen der Aktinstruktur erfordern, wie z.B. Änderungen der Zellmorphologie, Zellmigration, Wachstum und Differenzierung.

Genetische Studien an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* konnten eine Rolle des *Drosophila*-JNK-Homologs DJNK(*basket*) in der Regulation von Zellbewegungen und Zellmorphologieänderungen während der *Drosophila*-Embryogenese zeigen. Inhibierung der Funktion von DJNK auf allen Stufen der DJNK-Signaltransduktionskaskade führt zum sogenannten *dorsal closure*-Phänotyp der Embryonen mit fehlender Zellstreckung und fehlender Migration dorsaler Epithelzellen.

Der molekulare Mechanismus, mit dessen Hilfe Rho-GTPasen Aktinstrukturen regulieren und wie JNK Einfluss auf Zellmorphologie und Zellbewegung nimmt, ist bisher nicht bekannt. Die Identifizierung neuer, mit JNK interagierender Proteine könnte zum besseren Verständnis der Funktion und Regulation von JNK führen.

In dieser Arbeit wurde ein *Yeast-Two-Hybrid-Screen* mit dem *Drosophila*-Homolog DJNK/*basket* durchgeführt, der zur Entdeckung des *Drosophila*-Proteins p150-Spir als Interaktionspartner von DJNK führte. Der C-terminus des p150-Spir-Proteins enthält eine JNK-Interaktionsdomäne, ein DEJL-Motiv (*Docking Site for Erk and JNK, LxL*) und wird von aktivierten JNK-Proteinkinasen phosphoryliert.

p150-Spir ist ein Multi-Domänen-Protein, das in seiner aminoterminalen Hälfte eine Aufeinanderfolge von vier WH2-Domänen (*Wiskott Aldrich Homology Domain 2*) enthält. WH2-Domänen binden monomeres Aktin, Proteine mit WH2 Domänen, wie z.B. WASP oder WAVE sind Aktinreorganisatoren. Die transiente Überexpression von p150-Spir in NIH3T3-Mausfibroblasten führt ebenfalls zu einer Aktinreorganisation. Eine weitere Domäne in p150-Spir ist eine modifizierte FYVE-Zinkfinger-Struktur (mFYVE) im zentralen Bereich des Proteins, die für die subzelluläre Lokalisation von p150-Spir von Bedeutung ist. Mutationen, welche die Zinkfingerstruktur zerstören, führen bei Überexpression in NIH3T3-Zellen zu einer zytoplasmatischen Lokalisation der mutierten p150-Spir-Proteine, während Wildtyp-p150-Spir perinukleär akkumuliert. Spir-Proteine sind evolutionär hoch konserviert. Es konnten Spir-ähnliche Sequenzen auf den humanen Chromosomen 16 und 18, in der Maus und in der Seescheide *Ciona savignyi* gefunden werden. Der höchste Grad an Konservierung besteht im Bereich der funktionellen Proteindomänen. Ein in allen Spir-Proteinen enthaltenes, als Spir-Box bezeichnetes hoch konserviertes Sequenzmotiv befindet sich unmittelbar vor dem mFYVE-Zinkfinger. Die Spir-Box zeigt Strukturverwandschaft zur Rab-GTPase-Bindungsregion in Rabphilin 3A, einem Protein, das ebenfalls eine FYVE-Domäne besitzt. Rab-GTPasen sind wie FYVE-Domänenproteine in die Regulation zellulärer Vesikeltransportprozesse involviert. Das Vorhandensein beider Domänen in p150-Spir deutet auf eine Rolle des Proteins in zellulären Transportprozessen hin. Ein denkbare Modell wäre, daß p150-Spir unter der Kontrolle von JNK-Signalen zelluläre Aktinstrukturen reguliert, die für Transportprozesse in der Zelle von Bedeutung sind; p150-Spir fungiert damit möglicherweise als direktes Bindeglied zwischen MAPK-Signaltransduktionskaskaden und dem Aktinzytoskelett.

Summary

c-Jun-N-terminal kinases (JNKs) are members of the MAPK family (mitogen activated protein kinases) and act as downstream effectors of Rho family-GTPases, Rac and Cdc42. Rho family GTPases are involved in the regulation of cellular actin structures and control cellular processes which require remodelling of the actin skeleton, such as morphological changes, migration, growth and differentiation.

A role for the *Drosophila* JNK-homolog DJNK/basket in the regulation of cell movement and cell shape changes during *Drosophila* embryogenesis arises from its function in the process of *dorsal closure*. Inhibition of the DJNK-cascade results in a mutant phenotyp, where the dorsal elongation and migration of the epithelial cells fails. However, a direct link between JNK signaling and actin reorganization has not yet been established.

A *Yeast-Two-Hybrid-Screen* using DJNK as a bait led to the discovery of the new *Drosophila* protein p150-Spir. p150-Spir is a multi-domain protein with a stretch of acidic amino acids, a cluster of 4 WH2-domains (Wiskott Aldrich Homology Domain 2), a Spir-Box and a modified FYVE zinc-finger motif (mFYVE). In addition, the C-terminus of p150-Spir harbors a docking site for ERK and JNK, LXL (DEJL-motif) and is phosphorylated by JNK in vitro and in vivo. When coexpressed with p150-Spir in NIH3T3 cells, JNK translocates to and colocalizes with p150-Spir at discrete spots around the nucleus.

In its N-terminal part p150-Spir possesses 4 WH2-Domains. WH2-domains bind monomeric actin and WH2-family proteins, such as WASP and WAVE are involved in actin reorganization. We can show that in NIH3T3 mouse fibroblasts, p150-Spir colocalizes with F-actin and its overexpression induces clustering of filamentous actin around the nucleus.

A modified FYVE zinc-finger structure (mFYVE) is located in the central region of the protein. FYVE-fingers mediate cell membrane localization of proteins. Disruption of the p150-Spir mFYVE-structure by deletion mutagenesis or cysteine/serine substitutions shows that the mFYVE-domain determines the subcellular localisation of p150-Spir. In contrast to the perinuclear distribution of the wild type p150-Spir, the mutated protein exhibits a uniform cytoplasmic distribution.

Spir-family proteins are highly conserved among different species. Comparison of *Drosophila* p150-Spir sequences to EST data bases identified similar sequences in human (on chromosomes 16 and 18), mouse and the ascidian *Ciona savignyi*. A conserved sequence motif found in all Spir proteins - called Spir-Box - is located in the N-terminus, next to the mFYVE domain. Close inspection of the Spir-Box sequence revealed homology to the GTPase binding region of Rabphilin 3A, a FYVE domain containing protein which binds the small GTPase Rab3a. Rab-GTPases are involved in the regulation of cellular vesicle trafficking processes. The presence of a mFYVE domain in p150-Spir protein and a Spir-Box - a possible Rab-GTPase binding motif - suggests a potential function of Spir proteins in vesicel transport. In a possible model Spir initiates remodelling processes of the actin cytoskeleton, necessary for cellular transport processes under the control of JNK signals and thereby provides a direct link between MAPK-signaling and the actin cytoskeleton.

3. Einleitung

3.1. MAPKinase Kaskaden und intrazelluläre Signaltransduktion

Jede Zelle in einem vielzelligen Organismus ist einer Vielzahl von Signalen aus ihrer Umgebung ausgesetzt. Neben Veränderungen durch Umwelteinflüsse wie beispielsweise Nährstoffangebot, Osmolarität, pH-Wert, Temperatur wird sie mit den verschiedensten molekularen Botenstoffen wie Wachstumsfaktoren, Hormonen, Cytokinen, Neurotransmittern in Kontakt kommen. Die Reaktion auf diese Signale erfordert einerseits eine Antwort, die spezifisch für die jeweilige Zelle ist, wie die Entscheidung zwischen Zellteilung oder Ruhephase, Überleben oder Apoptose, Wachstum oder Differenzierung. Gleichzeitig muß die Reaktion der Zelle aber auch in Koordination mit den Aktivitäten der anderen Zellen in Geweben und Organen erfolgen, um so komplexe physiologische Prozesse wie Wachstum, Entwicklung, Differenzierung, Reizverarbeitung, Motorik, Immunantwort und letztendlich das Überleben des Gesamtorganismus zu gewährleisten.

Signale, die von außen an die Zellmembran gelangen, müssen in die Zelle aufgenommen und verarbeitet, d.h. zu den spezifischen Zielproteinen und Zielgenen geleitet werden, damit eine adäquate Antwort auf den externen Reiz erfolgen kann, ein Prozess, den man als intrazelluläre Signaltransduktion bezeichnet. Einige Signalmoleküle, wie beispielweise Steroidhormone oder Retinoide, sind hydrophob und klein. Sie können direkt durch die Plasmamembran diffundieren und intrazelluläre Zielproteine aktivieren. Die meisten extrazellulären Botenstoffe, wie beispielsweise Peptidhormone, Wachstumsfaktoren oder Immunglobuline sind hydrophil und können die Zellmembran nicht durchdringen. Sie müssen ihre Signale über die Bindung an Oberflächenrezeptoren auf der Zellmembran vermitteln. Jeder Zelltyp verfügt dabei über eine spezifische Rezeptorausstattung, was eine erste Selektion der Signale bedeutet. Man unterscheidet verschiedene Typen von Zellmembranrezeptoren, die extrazelluläre Signale auf unterschiedliche Weise übertragen. Ionenkanalgekoppelte Rezeptoren spielen eine Rolle bei der Signalübertragung durch Neurotransmitter. Sie regulieren über Konformationsänderungen von Ionenkanalproteinen die Öffnung oder Schließung von Ionenkanälen. Die daraus resultierenden Veränderungen der extra-

und intrazellulären Ionenkonzentrationen bewirken eine Veränderung des Membranpotentials der Zelle und die Ausbildung eines Aktionspotentials, durch das beispielsweise in Nervenzellen oder im Myokard Signale weitergeleitet werden.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. der Glucagon- oder Serotoninrezeptor, führen nach Ligandenbindung zur Aktivierung eines G-Proteins über die Bindung von GTP. Die auch als heptamere oder Serpentin-Rezeptoren (STMR) bezeichneten Rezeptoren besitzen sieben Transmembrandomänen und sind mit heterotrimeren G-Proteinen assoziiert. Die aus je einer α , β und γ Untereinheit bestehenden G-Proteine binden im inaktiven Zustand GDP (Guanosindiphosphat) an die α -Untereinheit, das nach Aktivierung des Rezeptors gegen GTP (Guanosintriphosphat) ausgetauscht wird, wobei ein α -Monomer vom $\beta\gamma$ -Dimer dissoziiert. Die α -Untereinheit aktiviert ein Zielprotein, meist ein membrangebundenes Enzym, wie beispielsweise eine Adenylatzyklase, die das Signal über sekundäre Botenstoffe (*second messenger*), wie cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) oder Ca^{2+} weiterleitet. Aktivierte G-Proteine können in einigen Fällen auch zur Konformationsänderung von Ionenkanälen führen und auf diese Weise Signale vermitteln.

Eine weitere Gruppe von Membranrezeptoren sind die enzymassoziierten Rezeptoren. Enzymassoziierte Membranrezeptoren können entweder selbst intrinsische Enzymaktivität in ihrer zytoplasmatischen Domäne besitzen oder ohne eigene intrinsische katalytische Aktivität mit einem Enzym assoziiert arbeiten. Bei den Enzymen handelt es sich meist um Proteinkinasen. Proteinkinasen übertragen Phosphatgruppen auf die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin und werden dementsprechend als Serin/Threonin- oder Tyrosinkinase bezeichnet. Bei den meisten Wachstumsfaktorrezeptoren, wie dem Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*), dem Plättchenwachstumsfaktor PDGF (*platelet derived growth factor*), dem neuronalen Wachstumsfaktor NGF (*neuronal growth factor*) oder auch dem Insulinrezeptor handelt es sich um Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität in ihrer zytoplasmatischen Domäne: Rezeptortyrosinkinase (RTK). RTK dimerisieren durch Ligandenbindung, was zur Autophosphorylierung bestimmter zytoplasmatischer Tyrosinreste durch die intrinsische Proteinkinaseaktivität führt. Diese spezifischen Phosphotyrosine bilden Erkennungssequenzen für Adapterproteine, die SH2-Domänen (*src homology domain*) enthalten und über Proteinkomplexbildung aktivierte Wachstumsfaktorenrezeptoren mit intrazellulären Signaltransduktionswegen verbinden.

Rezeptoren ohne eigene Kinaseaktivität, wie die meisten Cytokinrezeptoren, können über Assoziation mit intrazellulären Tyrosinkinase zur Aktivierung von Zielproteinen führen. Dazu werden häufig Adaptermoleküle, die keine katalytische Aktivität besitzen, auf Serin/Threonin-Kinasen oder Nicht-Rezeptortyrosinkinase übertragen.

Proteinkinase können Proteine durch die Übertragung von Phosphatresten aktivieren, ein Mechanismus, der bei Signaltransduktionsprozessen in eukaryotischen Zellen sehr häufig zum Einsatz kommt. [Hunter 1995] Es wird vermutet, daß mehr als 1% der menschlichen Gene für Proteinkinase kodieren. Eine einzige Säugetierzelle kann mehr als 100 verschiedene Proteinkinase besitzen. [Alberts et al. 1994] Die Zelle verfügt damit über ein breites Repertoire von Proteinkinase, die Signale auf ihre jeweiligen spezifischen Substrate übertragen können. Bei den Zielproteinen handelt es sich dabei oft ebenfalls um Proteinkinase, die nach Aktivierung das Signal wiederum an eine nachgeschaltete Substratkinase weiterleiten und Signaltransduktionskaskaden bilden. Die Kaskaden führen meist zur Modifizierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die eine Veränderung des Genexpressionsmusters der Zelle zur Folge haben kann und so die Reaktion auf das empfangene Signal einleiten.

Die Zahl der charakterisierten Signalwege in Zellen hat in den letzten Jahren ständig zugenommen. Die Identifikation immer neuer Signalkomponenten und die Aufdeckung zahlreicher Interaktionen der beteiligten Proteine untereinander zeigt eine starke Verflechtung der verschiedenen Signalwege, was eine Vielzahl von hochregulierten zellulären Reaktionen ermöglicht.

Eine stark vereinfachte Übersicht der am besten charakterisierten Signalwege, die in den folgenden Kapiteln noch näher erläutert werden, ist in Abb. 1 dargestellt.

Die Signalweiterleitung durch MAPKinasekaskaden

Zu den am besten charakterisierten intrazellulären Signalkaskaden zählen die MAP-Kinase (*mitogen activated protein kinases*). MAPK werden durch verschiedene Signale, wie mitogene Stimuli in Form von Wachstumsfaktoren, Cytokinen oder Umweltstressfaktoren, wie UV-Strahlung, Hitze oder toxische Substanzen vorwiegend über enzymgekoppelte oder G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren aktiviert und

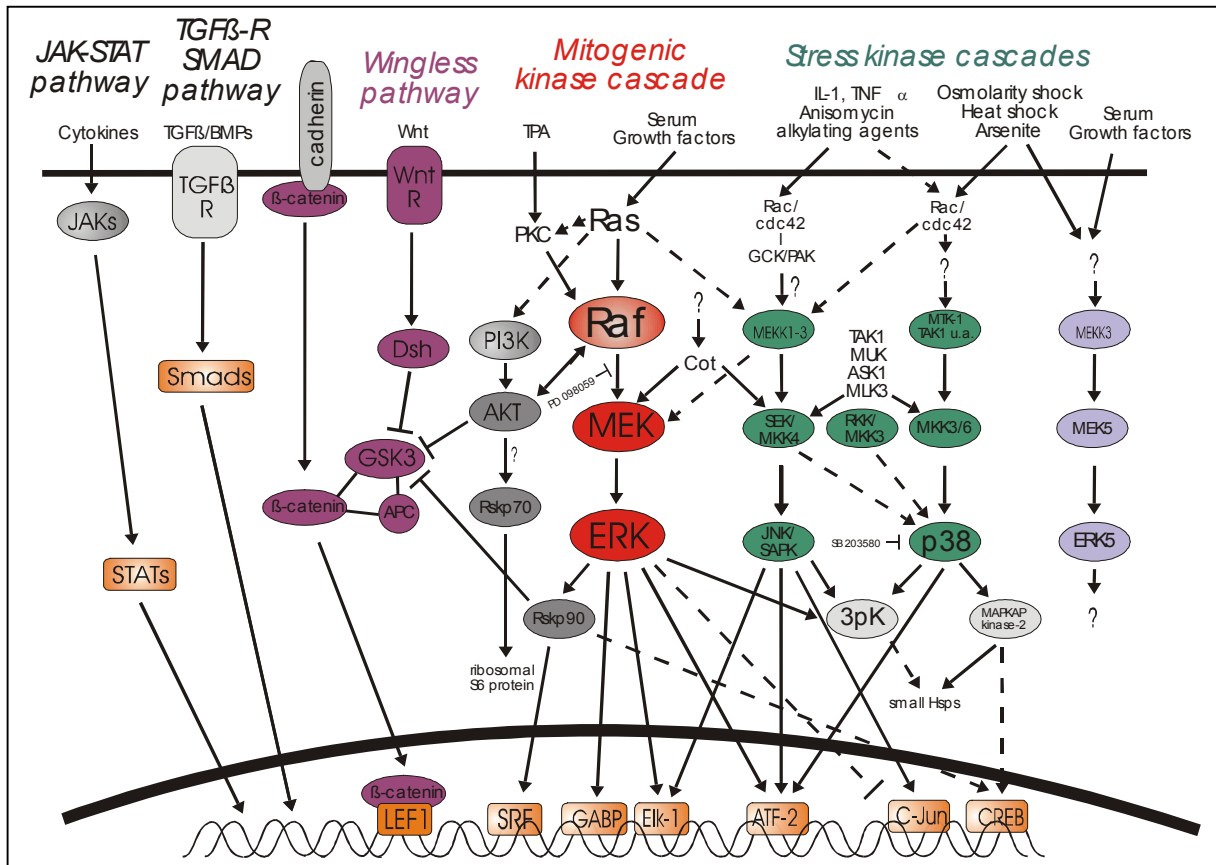


Abb.1: Schematische Darstellung einiger Signaltransduktionswege (nach S.Ludwig,MSZ)

Diese vereinfachte Übersicht zeigt eine Auswahl bisher charakterisierter Signalmoleküle, die, z.T. in Kaskaden organisiert, Signale von der Plasmamembran in den Zellkern weiterleiten. Die verschiedenen Signalwege sind durch zahlreiche Quervernetzungen miteinander verknüpft.

sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie Migration, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Reaktion auf Umwelteinflüsse beteiligt. Es sind evolutionär hoch konservierte zytoplasmatische Proteinkinasen, die hierarchisch in Form einer Kaskade angeordnet sind und die Weiterleitung von Signalen durch Phosphorylierung ihrer Substrate an Serin- und Threonin-Aminosäureresten, die zu einem Prolinrest C-terminal benachbart sind, (S/T-P-Motive), vermitteln. [Jacobs et al. 1999; Alvarez et al. 1991; Davis 1993; Hanks und Hunter 1995] Dabei phosphoryliert und aktiviert eine Serin/Threonin-Kinase (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*, MKKK oder *membrane shuttle kinase*) die nachfolgende MKK (*dual specificity kinase*), die Signale über Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung auf die MAPK (*nuclear shuttle kinase*) überträgt, die entweder direkt in den Zellkern transloziert und dort

Transkriptionsfaktoren aktiviert oder weitere Zielproteine, oft ebenfalls Kinasen, aktiviert. (→ Abb.2)

Bisher wurden mindestens drei Gruppen von MAP-Kinasen gefunden: ERK (*extra-cellular signal regulated kinase*), JNK/SAPK (*Jun-N-terminal kinase/stress activated protein kinase*), wobei JNK das humane und SAPK das murine Homolog bezeichnet und CSBP/p38 (*CSAIDTM/ cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein / Protein von 38 kDa*), mit CSBP als humanem und p38 als murinem Homolog. [Schaeffer und Weber 1999; Widmann et al. 1999]

Der Prototyp eines mitogen-aktivierten Signalweges, auch als klassische zytoplasmatische Kaskade bezeichnet, da als erste MAPK-Kaskade in Säugern beschrieben [Daum et al. 1994], ist die Ras-Raf-MEK-Erk-Kaskade, die zu Aktivierung der MAPK-Erk führt, was in Abhängigkeit von Stärke und Signaldauer Proliferation, Schutz vor Apoptose oder Wachstumsinhibierung und Differenzierung der Zielzelle bewirkt.

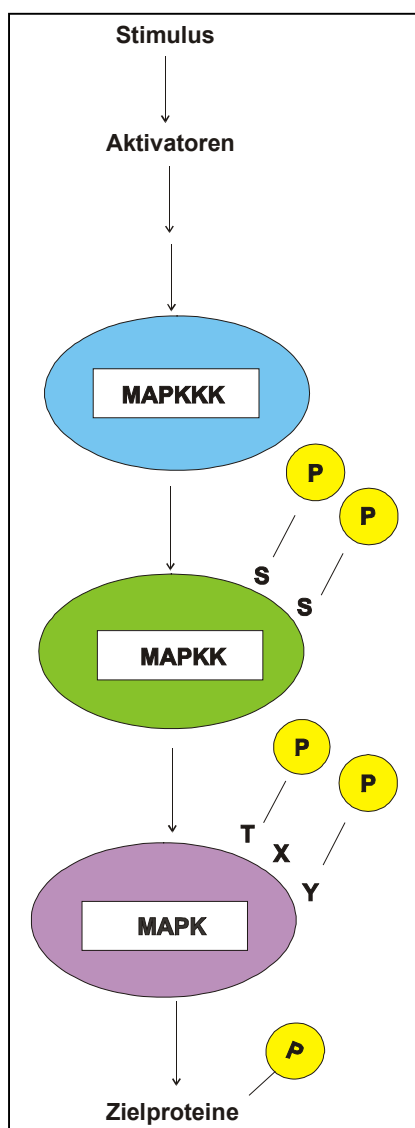


Abb.2: Schema einer MAP-Kinase-kaskade.

Kinasen werden durch die Übertragung von Phosphatresten auf die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin aktiviert. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren nachgeschaltete Substrate, oft ebenfalls Kinasen, die dadurch aktiviert werden und so das Signal an ihre Zielproteine weitergeben.

Phosphorylierungsmotive:

Erk, p38 : Thr-Glu-Tyr
Thr-Gly-Tyr

JNK : Thr-Pro-Tyr

[Davis 2000]

Initiiert wird diese Kaskade beispielsweise durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, wie EGF, NGF oder PDGF an eine RTK, was zur Aktivierung der Rezeptoren durch Oligomerisierung und Autophosphorylierung führt. Die dadurch entstehenden Phosphotyrosine dienen als Bindestelle für die SH2-Domäne des Adapterproteins Grb2, welches über seine SH3-Domänen an prolinreiche Regionen des GDP-Austauschfaktors Sos (*Son of sevenless*) bindet und so an die Plasmamembran rekrutiert wird, wo es das ebenfalls membranständige kleine G-Protein Ras durch den Sos katalysierten Guanosinnukleotidaustausch aktiviert. [McCollam et al. 1992; Buday und Downward 1993; Koretzky 1997; Schlessinger 1993] Kleine G-Proteine der Ras-Familie agieren als molekulare Schalter, die zwischen einer aktiven, GTP gebundenen und einer inaktiven, GDP gebundenen Form wechseln können. [Katz und McCormick 1997; Koide et al. 1993; Kolch et al. 1992] Ras bindet die zytosolische Serin/Threonin-Kinase c-Raf-1 (MKKK) [Avruch et al. 1994; Stokoe et al. 1994; Rapp 1991; Rapp et al. 1985; Rapp et al. 1983] an die Plasmamembran und aktiviert diese vermutlich in Kooperation mit verschiedenen weiteren Faktoren, wie z.B. Src und PKC (*Phosphokinase C.*) [Marais et al. 1995, Marais und Marshall 1996, Marquardt et al. 1994] Raf selber phosphoryliert und aktiviert dann die dualspezifische Kinase MEK (MAPK/Erk Kinase), die wiederum ihr Substrat, die MAPK Erk (Erk1/p44; Erk2/p42), an Serin/Threonin und Tyrosinresten (Thr-Glu-Tyr-Motiv) phosphoryliert. [Davis 2000; Alessi et al. 1996; Zheng und Guan 1994; Huang et al. 1993; Dent et al. 1992; Kyriakis et al. 1992; Rapp 1991] Aktiviertes Erk gelangt in den Zellkern und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren wie z. B. Elk-1, ATF-2 und SAP-1, was die Transkription spezifischer Gene einleitet [Davis 1993; Thomas 1992; Boulton et al. 1991], oder auch Substrate im Zytoplasma wie z.B. die Serin/Threonin Kinasen 3pK, MK2, RSK1^{p90} (*ribosomal S6 kinase* oder MAPKAP Kinase1), Phospholipase A2, welche wiederum eigene Zielproteine aktivieren. [Ludwig et al. 1996; Hill und Treisman 1996; Sithanandam et al. 1996, Daum et al. 1994; Blenis 1993] Neben dem vorwiegend durch mitogene Signale stimulierten Erk-Signalweg sind mindestens zwei weitere, ähnlich aufgebaute Signalkaskaden bekannt, die zur Aktivierung der MAPK JNK/SAPK und CSBP/p38 führen. Diese sogenannten Stress-aktivierten Kaskaden werden durch proinflammatorische Cytokine, wie den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Interleukine oder Streßinduktoren, wie ultraviolettes Licht, osmotischen- oder Hitzeschock oder zytotoxische Substanzen, wie Anisomycin oder Arsenit akti-

viert und zeigen als Effekte Apoptose, Transformation, Differenzierung, Immunreaktion oder Adaptation an veränderte Umweltbedingungen. [Ip und Davis 1998; Raingenaud et al. 1996] Die p38-Kaskade führt vermutlich über die kleinen GTPasen Rac und Cdc42 über eine noch nicht charakterisierte MKKK zur Aktivierung von MKK6 (MKK), deren Substrat, die MAPK p38, von der bisher vier Isoformen isoliert wurden, an Threonin-Glycin-Tyrosin-Motiven phosphoryliert wird. [Davis 2000] Aktivierte p38 aktiviert im Zellkern unter anderen die Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF2, SRF und CREB, hat aber auch zahlreiche zytoplasmatische Zielproteine (→ Abb.1 und 4), die ebenfalls von anderen MAPK aktiviert werden können. [Kumar et al. 1997; Jiang et al. 1997; Han et al. 1996; Lee et al. 1994] Die JNK/SAPK-Kaskade wird im nächsten Kapitel (→ 3.2.) beschrieben.

Die Vielzahl beschriebener Proteininteraktionen zwischen den Signalwegen zeigt, daß es sich bei den MAPK-Signalkaskaden keineswegs um lineare Wege handelt, sondern um Netzwerke von Proteininteraktionen. Während auf der Ebene der MKK und MAPK in Relation weniger Proteine gefunden wurden, (→ Abb.1 und 4), zeigt sich eine große Divergenz an Proteinen und Interaktionen auf Ebene der MKKK und ebenfalls auf Ebene der Substrate der MAPK. Die Zahl der bekannten MKKK und MKK übertrifft die der MAPK, auch wenn man berücksichtigt, daß von den MAPK verschiedene Isoformen isoliert wurden, die zellspezifisch exprimiert werden. [Garlington und Johnson 1999; Widmann et al. 1999; Ip und Davis 1998; Jiang et al. 1993] Es existieren zahlreiche Quervernetzungen in Form von Proteinen, deren Substrate in verschiedenen Kaskaden liegen. So kann z.B. MLK3/SPRK (*mixed lineage kinase 3/ SH3-domain-containing proline-rich kinase*) oder Cot/Tpl (*cancer osaka thyroid/ tumor progression lokus 2*) sowohl MEK in der Erk-Kaskade als auch SEK/MKK4 im JNK-Signalweg aktivieren. [Hagemann et al. 1999; Fanger et al. 1997; Rana et al. 1996] Trotzdem führt die Aktivierung eines MAPK-Signalweges normalerweise nicht zur Aktivierung anderer MAPK-Wege, spezifische Signale bewirken also spezifische Zellantworten. Es wird angenommen, daß die Vernetzung der Signalkaskaden dabei wichtige regulatorische Funktionen erfüllt. Eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Signalweiterleitung spielen Interaktionen der Kaskadenkomponenten mit sogenannten Brücken- oder Gerüstproteinen (*scaffolds*). Scaffoldproteine wurden für verschiedene Kaskadenmitglieder gefunden und scheinen diese Isoform-spezifisch zu binden, in räumliche Nähe zu bringen und so Multiproteinkomplexe auszubilden. Durch diese Proteinkomplexbildung ist eine gezielte Aktivierung

der Kaskaden und damit Weiterleitung der Signale zu den Effektoren möglich, die Signale werden sozusagen gebahnt. (→ Abb.3)

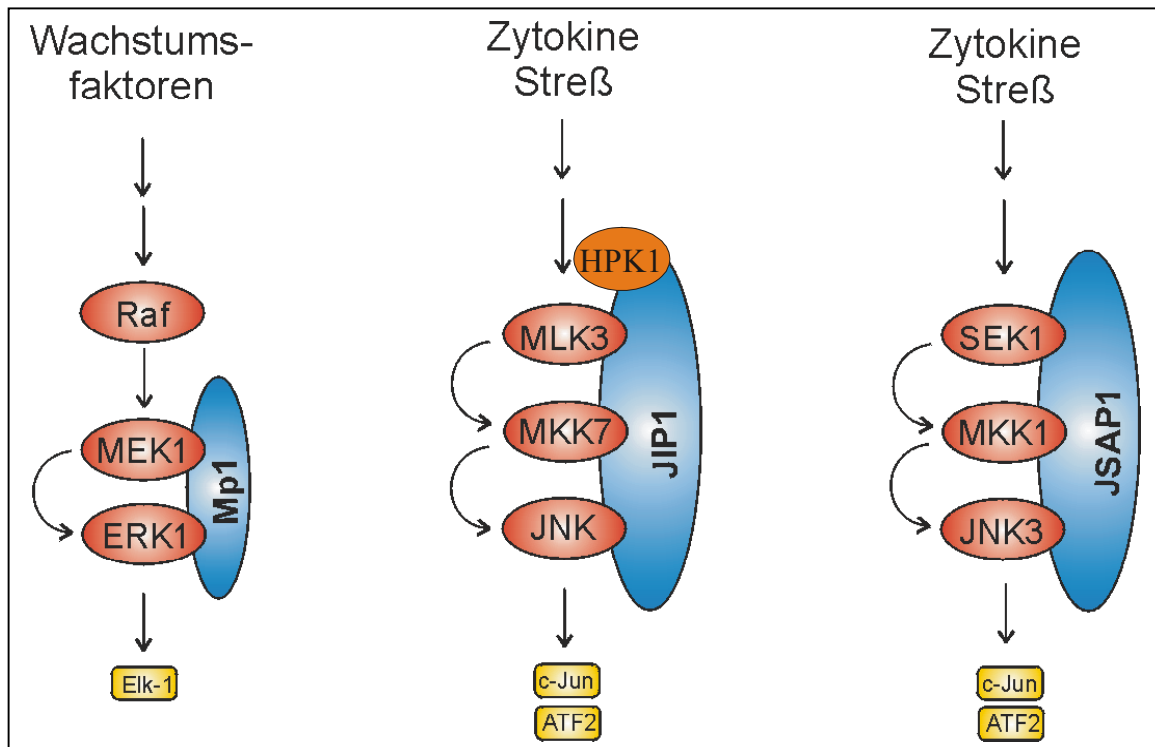


Abb3: Brückenproteine (Scaffolds) binden spezifisch Komponenten der Signalkaskade und bilden Multiproteinkomplexe. Dadurch wird die Signaleffizienz verstärkt.

Für die Erk-Kaskade wurde das Scaffoldprotein MP1 (MEK-Partner-1) gefunden, welches MEK-1 und Erk-1 binden und so deren Aktivierbarkeit durch Raf erhöhen kann. Die Isoformen MEK2 und Erk2 werden nicht von MP1 gebunden. Auch für die JNK/SAPK-Kaskade wurden mehrere Scaffoldproteine beschrieben. [Garrington und Johnson 1999; Schaeffer und Weber 1999; Yasuda et al. 1999; Ito et al. 1999; Whitmarsh et al. 1998; Elion 1998; Dickens et al. 1997; Xu und Cobb 1997] Die Zahl der beschriebenen an den MAPK-Signalwegen beteiligten Proteine und Proteininteraktionen wächst ständig und deutet auf eine fast unerschöpfliche Komplexität und Kombinationsvielfalt in der Vernetzung der verschiedenen Signalwege hin. Die Frage, wie die Zelle aus der Vielzahl von Möglichkeiten der Signalübertragung auf einen bestimmten Stimulus die adäquate Reaktion wählt, bleibt Gegenstand intensiver Forschung.

3.2. Die JNK/SAPK-Proteinkinasekaskade

3.2.1. Aufbau und Funktion der JNK-Kaskade in Säugetieren

Der auch als Stress-aktivierte Kaskade bezeichnete JNK/SAPK (*c-jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*) Signalweg ist ebenfalls hierarchisch aufgebaut. Zur Aktivierung der Kaskade führen zelluläre Stressinduktoren (proinflammatorische Cytokine, Interleukine, $\text{TNF}\alpha$, LPS), apoptotische Signale (Ceramide), Umweltstress (UV-Strahlung, Scherkräfte, osmotischer Schock, Hitze) und toxische Agentzien (Proteinsynthesehemmer, wie Anisomycin, Arsenit), sie kann aber auch durch mitogene Stimuli, wie Wachstumsfaktoren erfolgen. [Tibbles et al. 1999; Garrington und Johnson 1999, Kyriakis et al. 1992] Als Rezeptoren der JNK-Kaskade fungieren sowohl G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren als auch enzymgekoppelte Rezeptoren. Das Signal wird von den kleinen GTPasen der Rho-Familie Rac und Cdc42 weitergeleitet; es wurden aber auch Verbindungen zu Ras-initiierten Signalwegen gezeigt. [Minden et al. 1994] Rac/Cdc42 binden in ihrer GTP-beladenen Form die MKKKK PAK (*p21-activated kinase*) oder GCK (*germinal center kinase*) über deren CRIB-Domäne (*cdc/rac interactiv binding region*). [Burbelo et al. 1995; Zhang et al. 1995; Minden et al. 1994] PAK kann dann sowohl den JNK als auch den p38-Signalweg aktivieren, während GCK JNK-spezifisch ist. [Fanger et al. 1997] PAK und GCK gehören zur Gruppe der Ste20 Kinasen (*steril 20 kinase*), und führen zur JNK-Aktivierung, wobei der genaue Mechanismus nicht bekannt ist, da keine direkte Aktivierung und Phosphorylierung der MKKK MEKK (*mitogen-activated protein/ERK kinase kinase*) gezeigt werden konnte und wahrscheinlich noch zusätzliche Proteine an der JNK-Aktivierung über diesen Weg beteiligt sind. Für die Aktivierung durch Cytokine, wie den TNF-Rezeptor, nimmt man beispielsweise eine Signalvermittlung über Adapterproteine der TRAF-Familie (*TNF-receptor associated factors*) an. [Davis 2000, Ip und Davis 1998] Aktiviertes Rac/Cdc42 ist in der Lage, die MEKK-Isoformen MEKK1 und MEKK4 direkt zu aktivieren [Ip und Davis 1998]. In der JNK-Kaskade können mehrere Proteine als MKKK fungieren. Bisher wurden 11 verschiedene Proteine beschrieben [Davis 2000; Widmann et al. 1999]: MEKK-1 [Lange-Carter et al. 1993], MEKK2 und MEKK3 [Blank et al. 1996], MEKK4/MTK1 [Gerwins et al. 1997; Takekawa et al. 1997], Tpl1/Cot [Hagemann et al. 1999; Salmeron et al. 1996; Aoki et al. 1991],

MUK/ DLK/ ZPK [Hirai et al. 1997; Holzmann et al. 1994; Reddy et al. 1988], MLK-2/MST [Hirai et al. 1997; Dorow et al. 1995], MLK-3/SPRK/PTK-1 [Rana et al. 1996; Gallo et al. 1994; Ing et al. 1994], TAK1 [Yamaguchi et al. 1995], ASK1/MKKK5/MEKK5 [Wang et al. 1996, Ichijo 1997], ASK2/MAPKKK6 [Wang et al. 1998], wobei zahlreiche Verbindungen zur Erk- und p38-Kaskade bestehen. (→ Abb.4). Ob alle beschriebenen Proteine physiologische Bedeutung haben bzw. relevant für spezifische Stimuli sind, ist dabei umstritten, da die meisten Daten auf Überexpressionsstudien in Zellsystemen beruhen. [Davis 2000] Die genannten MKKK phosphorylieren und aktivieren im JNK-Signalweg die Kinasen MKK4/JNKK/SEK-1 (*SAPK/Erk-kinase*) und MKK7. MKK7 bindet spezifisch JNK, während MKK4 auch als Aktivator von p38 fungieren kann. [Ip und Davis 1998] Man nimmt an, daß MKK4 primär durch Umweltstress aktiviert wird und die Aktivierung der JNK-Kinase über eine Interaktion von MKK4 mit ABP 280 (*actin binding protein 280*) erfolgt. MKK7 dient überwiegend als Überträger von Signalen nach Cytokineinwirkung, wie $TNF\alpha$ oder Interleukin-1. [Davis 2000] MKK4 und MKK7 phosphorylieren JNK im TPY-Motiv an Threonin- und Tyrosinresten, die benachbart zu Prolinen liegen. (→ Abb.2) [Whitmarsh und Davis 1996; Derijard et al. 1994]. Aktiviertes JNK wird in den Zellkern transportiert und kann dort verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Bekannte Substrate für JNK sind z.B. die Transkriptionsfaktoren c-Jun, Jun-D, ATFa, ATF2, Elk-1 und Sap-1, aber auch zytoplasmatische Proteine, wie z.B. die Kinase 3pK können von JNK aktiviert werden. [Ip und Davis 1999; Ludwig et al. 1996; Livingstone et al 1995; van Dam et al. 1995] Bisher wurden 3 JNK-Gene (*jnk1*, *jnk2*, *jnk3*) beschrieben. Während JNK1 und JNK2 ubiquitär exprimiert werden, ist JNK3 in Gehirn, Herz und Testis nachweisbar. Durch alternatives Spleißen können von jedem der 3 JNK-Gene unterschiedliche Isoformen ($JNK1_{\alpha,\beta,\gamma,\delta}$; $JNK2_{\alpha,\beta,\gamma,\delta}$ und $JNK3_{\alpha,\beta}$) als Proteine von 46 bzw. 55 kDa Molekulargewicht existieren, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden und gewebsspezifisch vorkommen. [Tibbles und Woodgett 1999; Schaeffer und Weber 1999; Ip und Davis 1998] Die starke Vernetzung der JNK-Kaskade mit verschiedenen Signalwegen, wie den anderen Kaskaden der MAPK-Gruppe oder mit Regulatoren des Zytoskeletts, wie Rac, Cdc42, PAK, ABP wirft wiederum Fragen bezüglich der Regulation dieses komplexen Netz-

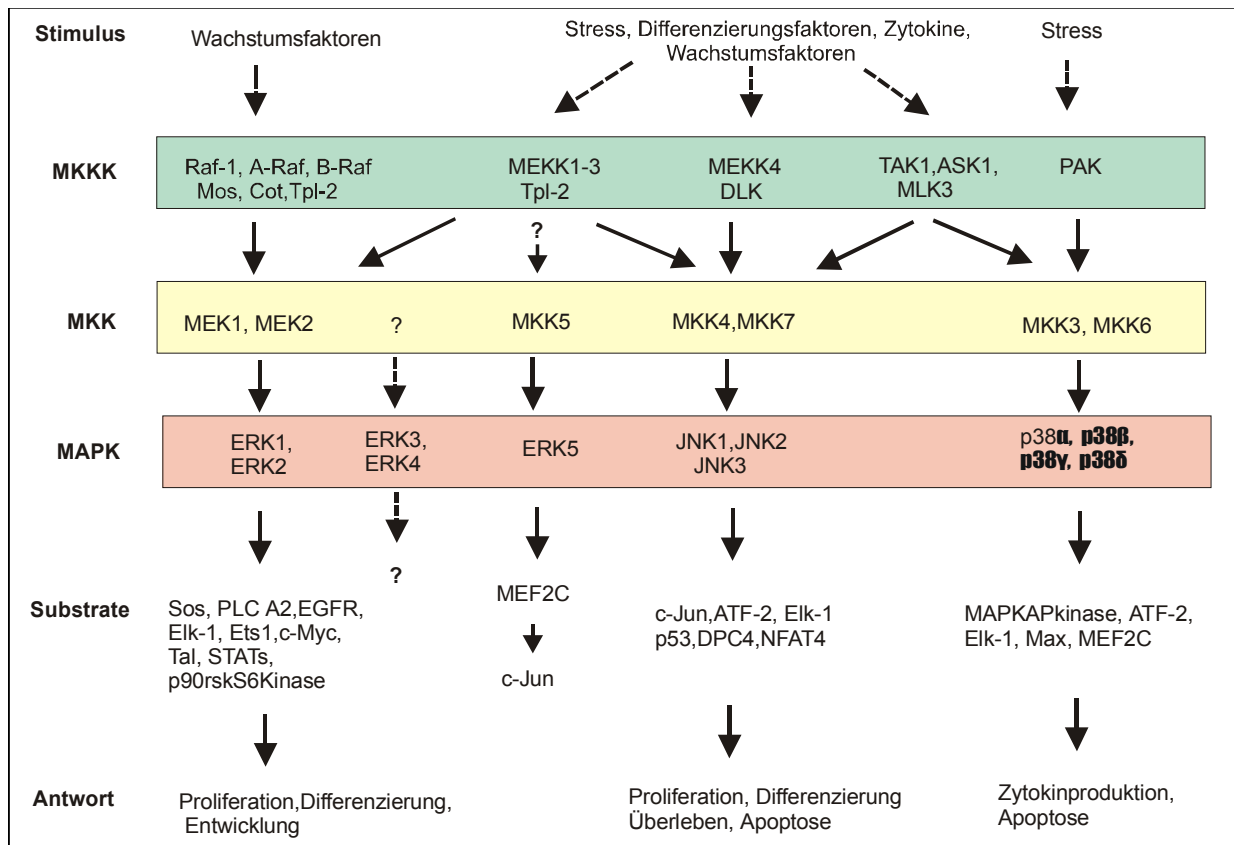


Abb.4: Übersicht über die MAPK-Kaskaden

werkes und der physiologischen Relevanz der verschiedenen Wege auf. Auch für die JNK-Kaskade wurden Scaffold-Proteine identifiziert, die spezifische Komponenten der Kaskade binden und so die Signalweiterleitung auf bestimmte Stimuli regulieren: die JIP-Proteine (*JNK-interacting protein*) JIP1, JIP2 und JIP3 und JSAP (*JNK/SAPK-associated protein 1*), welches vermutlich eine Spleißvariante von JIP3 darstellt. [Davis 2000; Yasuda et al. 1999; Garrington und Johnson 1999; Ito et al. 1999; Whitmarsh et al. 1998; Dickens et al. 1997] JIP-Proteine vermitteln und verstärken spezifisch die Signale von MLK, aber nicht die von MEK Kinasen. JIP1 bindet HPK1 (*hematopoietic progenitor kinase 1*) eine Ste20 Kinase, MLK3, MKK7 und JNK. JSAP1 bindet MEKK1, MKK4 und bevorzugt JNK3, JNK1 und JNK2 werden wesentlich schwächer gebunden. Für MEKK1 selbst konnte zusätzlich zu seiner Kinasefunktion als Aktivator von MKK4 eine Komplexbildung mit MKK4 und JNK gezeigt werden, die zur Verstärkung des JNK-Signals führt. [Garrington und Johnson 1999; Xu und Cobb 1997] (→ Abb.3) Als weiteres mögliches Scaffold-Protein wurde kürzlich

Filamin, ein aktinbindendes Protein beschrieben, das Signale von Cytokinrezeptoren an JNK überträgt und MKK4 und das Adaptorprotein TRAF 2 bindet. [Davis 2000]

Funktionen der JNK-Kaskade

JNK-Signale sind in zahlreiche zelluläre Reaktionen integriert. Es wurden Effekte bei der Regulation von Proliferation, Wachstum, Immunantwort, Apoptose und onkogener Transformation, bei Veränderungen von Zelloberflächenstrukturen mit Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts, aber auch eine Rolle bei Prozessen in der Embryonalentwicklung beobachtet.

JNK phosphoryliert zahlreiche Transkriptionsfaktoren, wodurch deren transkriptionelle Aktivität erhöht wird. Ein Substrat von JNK ist der Transkriptionsfaktor c-Jun, der an den Serinresten S63 und S73 in seiner Aktivierungsdomäne phosphoryliert wird, was zur Stabilisierung und Verlängerung seiner Halbwertszeit führt. [Ip und Davis 1998; Pulverer et al 1991] C-Jun ist Bestandteil des AP-1 (*activator protein-1*) Komplexes, der die Expression vieler früher Gene der Stressantwort (*immediated early genes*) steuert. Neben Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, ATF2, ATFa, JunD, Elk-1 und Sap-1 konnte auch eine Repressor-Funktion von JNK für den NFAT-4 Transkriptionsfaktor (*nuclear factor for activated T-cells*) in T-Zellen gezeigt werden, was allerdings nur für diese Isoform von NFAT zutrifft. Da die Expression der Isoformen gewebspezifisch erfolgt, wäre eine zellspezifische Regulation der JNK-Funktion auf transkriptioneller Ebene zu postulieren. [Ip und Davis 1998].

Es gibt eine Reihe von Hinweisen auf eine mögliche Relevanz von JNK in der Tumorentstehung. Die Aktivierung des an malignen Transformationen beteiligten Transkriptionsfaktors AP-1 über die c-Jun Phosphorylierung durch JNK lässt eine mögliche Verbindung zwischen JNK-Kaskade und onkogener Zelltransformation annehmen. C-Jun ist für die Ras-induzierte Zelltransformation notwendig, Ras induziert die Phosphorylierung von c-Jun an den Phosphorylierungsstellen von JNK. Werden diese Phosphorylierungsstellen mutiert, wird die Ras-induzierte Transformation der Zellen unterdrückt. [Davis 2000] JNK ist in verschiedenen Tumorzelllinien konstitutiv aktiv, die transformierende Wirkung einiger Onkogene ist JNK-abhängig. Beobachtet wurden JNK-Aktivierung bei onkogener Transformation durch das *met*-Onkogen und in mit HTLV-1 (*human T cell-leukemia virus 1*) transformierten Zellen. Weiterhin wird in der Literatur eine mögliche Beteiligung von JNK bei der Transformation von NIH3T3-Zellen durch *v*-CRK (*v-crack-like*), die durch dominant negatives MKK4 ver-

hindert werden kann, sowie eine konstitutiv erhöhte JNK-Aktivität in *bcr-abl*-transformierten leukämischen prä-B-Lymphozyten beschrieben. Durch Gabe von dominant-negativem c-Jun kann die *bcr-abl* vermittelte Zelltransformation inhibiert werden. [Ip und Davis 1998, Tanaka et al. 1997; Raitano et al. 1995] Den selben Effekt zeigt die Überexpression von JIP1, die zur Retention von JNK im Zytoplasma führt. [Ip und Davis 1998; Dickens et al. 1997] Das Vorhandensein von Mutationen des MKK4-Gens in zahlreichen humanen Tumoren, wie z.B. homozygote Deletionen von MKK4 in Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien könnten Hinweise auf eine mögliche Funktion von Mitgliedern der JNK-Kaskade als Tumorsuppressorgene darstellen zumal der Genlocus von MKK4 auf Chromosom 17 nahe dem Locus des Tumorsuppressorgens p53 liegt. [Ip und Davis 1998; Teng et al. 1997] Es ist unklar, ob JNK eine generelle Rolle in der onkogenen Transformation spielt oder ob es sich um zelltypspezifische und vom biologischen Kontext abhängige Effekte handelt. Es gibt Hinweise auf unterschiedliche Wirkung von JNK-Signalen in Tumorzellen und normalen Zellen. JNK-Aktivierung kann in Tumorzellen, die die Tumorsuppressorgene p53 oder Rb (*retinoblastoma protein*) verloren haben, antiapoptotisch und wachstumsfördernd wirken. Ebenso wäre denkbar, daß ein Verlust der JNK-Funktion zur Transformation führen kann, da JNK im Zusammenhang mit der Induktion apoptotischer Reaktionen beschrieben wird und transformierte Zellen, in denen diese JNK-Funktion fehlt, überleben könnten. [Davis 2000] Die Daten über einen Zusammenhang zwischen JNK und Apoptose (programmierter Zelltod) sind allerdings widersprüchlich. JNK wird durch Stressreize und Cytokine wie beispielsweise $TNF\alpha$ aktiviert, die zur Apoptose der Zelle führen können. In einigen Zelltypen scheint JNK proapoptotisch zu wirken, in anderen Fällen antiapoptotische Signale auszusenden. Eine proapoptotische Funktion von JNK-Signalen wurde in PC12-Zellen und in Neuroblastomazellen beschrieben, auch zeigen für hirnspezifisch exprimiertes JNK3 homozygot defiziente Mäuse eine stark verminderte neuronale Apoptose in Reaktion auf neuronale Stressereignisse. In Jukat-T-Zellen spielt JNK eine Rolle bei über Cdc42 und Rac-Aktivierung induzierter Apoptose, während die Fas-vermittelte Apoptose in diesen Zellen durch Hemmung des JNK-Signalweges nicht geblockt wird. Auch für eine $TNF\alpha$ vermittelte Apoptose ist eine JNK-Aktivierung nicht essentiell. [Ip und Davis 1999; Yang et al. 1997; Whitmarsh und Davis 1996] Neuere Studien vermuten eine Rolle von JNK sowohl in der Aktivierung von bestimmten Apoptose induzierenden Signalwegen als auch in der Stimulierung von Überlebens-Signalwegen wie z.B. über

NF κ B, Akt/PKB und ERK jeweils in Abhängigkeit vom biologischen Kontext, d.h. z. B. von der Dauer und Intensität des Signals, der Art der Stimulation und vom Zelltyp. So scheint JNK für stress-induzierte Apoptosesignale z.B. nach UV-Bestrahlung notwendig zu sein, die über den mitochondrialen und Caspase 9 vermittelten Signalweg übertragen werden. Auch ist JNK für normale Apoptosevorgänge während der Embryonalentwicklung in Mäusen erforderlich. [Davis 2000; Chen und Tan 2000]

Die JNK-Kaskade scheint auch eine Rolle in der Immunantwort der Zelle und den damit verbundenen Reaktionen wie Entzündung und Wundheilung zu spielen. Eine JNK-Aktivierung wurde bei Kostimulation von T-Lymphozyten, Thymozytenproliferation und Interleukin-2 und TNF α -Sekretion beschrieben. In Endothelzellen, die nach Cytokinexposition mit TNF α -Sekretion reagieren, ist diese Immunreaktion mit der Expression von E-Selectin, einem die Leukozytenadhäsion vermittelnden Stoff, verbunden. Im Promotor des E-Selectin-Gens findet man AP-1-Bindungssequenzen für Dimere aus ATF2 und c-Jun, deren Bildung JNK-abhängig ist, was die Notwendigkeit des JNK-Signals für diese Immunreaktion zeigt. [Ip und Davis 1998; Read et al. 1997; Whitmarsh und Davis 1996]

In verschiedenen Arbeiten wurde die Notwendigkeit von JNK-Signalen für Prozesse in der Embryonalentwicklung in *Drosophila melanogaster* gezeigt, die mit der Bewegung von embryonalen Epithelzellschichten und dem Umbau des Aktinzytoskeletts einhergehen. Es ist bekannt, daß die kleinen GTPasen Rac und Cdc 42 Aktinfilament-Rearrangements vermitteln und entscheidend an der Organisation und Regulation von zellulären Aktinstrukturen beteiligt sind, die Veränderungen der Zellmorphologie und Zellbewegungen bewirken. Die Überexpression von Rac induziert in adherenten Säugerzellen die Ausbildung von zellmembrannahen Aktin-Ansammlungen (*membrane ruffles*) und Lamellopodien (Ausstülpungen der Plasmamembran), während Cdc42-Überexpression zur Filopodienbildung (*Mikrospikes*) führt. [Hall 1998, van Aelst und D`Souza-Schorey 1997] Da Rac und Cdc42 Mitglieder der JNK-Kaskade aktivieren, [Garrington und Johnson 1999; Fanger et al. 1997; Minden et al. 1995; Coso et al. 1995] liegt die Schlußfolgerung nahe, daß JNK-Signale an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind. Konstitutiv aktive Mutanten von Rac und Cdc42, die keine JNK-Aktivierung mehr vermitteln können, induzieren immer noch Aktinreorganisation in Zellen. Diese Prozesse laufen innerhalb von Minuten ab, zu schnell, um allein durch Signale, die über Veränderung der Genexpression zur Proteinsynthese führen, wie sie MAPK bewirken, erklärt werden zu können. [Nobes et

Hall 1995; Ridley et al. 1992] Vermutlich existieren noch andere Möglichkeiten einer schnelleren Übermittlung dieser Signale in der Zelle, z.B. über im Zytoplasma vorliegende Proteine, die durch JNK aktiviert werden und zu Zellmorphologieänderungen nach Stressignalen führen.

3.2.2. Aufbau und Funktion der JNK-Kaskade in *Drosophila melanogaster*

Die JNK-Kaskade ist zwischen verschiedenen Spezies evolutionär hoch konserviert. Die JNK-Signaltransduktionskaskade in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zeigt einen hohen Grad an Homologie zu den Vertebraten-Proteinen sowohl im hierarchischen Aufbau des Signalweges als auch in den DNA- und Protein-sequenzen der einzelnen Kaskadenbestandteile. Für nahezu alle Mitglieder des JNK-Signalweges mit Ausnahme von MEKK1 wurden Homologe in der Fliege gefunden. (→ Abb.5) Das *Drosophila*-JNK-Homolog DJNK (*basket*) zeigt beispielsweise über 80% Sequenzhomologie zur Säuger-JNK, ähnliches gilt für DJun und andere Kaskadenmitglieder. Der hohe Grad an evolutionärer Konservierung im Kaskadenaufbau läßt gleiches für die Funktion vermuten und bietet an, *Drosophila* als Modell für genetische und molekularbiologische Studien der JNK-Signalkaskade zu nutzen, um die zahlreichen, oft widersprüchlich erscheinenden Effekte der JNK-Signalweiterleitung zu analysieren, zu erklären und die Ergebnisse auf Vertebraten zu übertragen. [Noselli und Agnes 1999; Goberdhan und Wilson 1998; Ip und Davis 1998; Noselli 1998; Holland et al. 1997; Sluss et al. 1996; Riesgo-Escovar et al. 1996; Glise et al. 1995] *Drosophila melanogaster* bietet dabei den Vorteil eines gut charakterisierten Modellorganismus, in dem über zahlreiche etablierte Verfahren wie z.B. Mutantanalysen, transgene Tiere oder genetische Screens die Beteiligung der Signalkaskaden in bestimmten Entwicklungsprozessen untersucht werden kann. So konnte beispielsweise murines MKK7 in Fliegenembryonen, denen Hep (*hemipterous*), das MKK7-homologe Protein fehlte, dessen Funktion übernehmen und den mutanten Phänotyp verdrängen. [Ip und Davis 1998; Goberdhan und Wilson 1998] JNK-Signale steuern in der *Drosophila*-Embryogenese den Prozess der dorsalen Schließung (*dorsal closure, DC*), der mit morphologischen Umbauprozessen im Embryo die die Bewegung embryonaler Epithelzellschichten erfordern und mit der

Umorganisation des Zytoskeletts in den betreffenden Zellen einhergeht. Mutationen in den *Drosophila*-Homologen MKK7/Hep, DJNK/Bsk und DJun führen im *Drosophila* Embryo alle zu ähnlichen rezessiv-letalen Phänotypen. In Embryonen, in denen die genannten Gene nicht funktionstüchtig sind, führen die lateral und ventral gelegenen ektodermalen Epithelzellen, die sich bei normalem Verlauf der Embryogenese nach dorsal verlagern, strecken und die darunterliegenden Amnioserosazellen bedecken, diese morphologischen Veränderungen nicht aus; die betroffenen Embryonen zeigen dorsal ein Loch. Die Expression von dominant inhibitorischen Mutanten von DRac und DCdc42 führt ebenfalls zu diesem als „*dorsal open*“ bezeichneten Phänotyp. Die dorsale Schließung des Embryos wird durch spezifische Aktivierung der JNK in einer Zellreihe am Rand des lateralen Ektoderms, den Saumzellen (*leading edge*, LE-Zellen) eingeleitet, die als erste Zellreihe beginnt, sich dorsoventral zu strecken. Welches Signal zur JNK-Aktivierung und damit zur Differenzierung der LE-Zellen führt, ist nicht bekannt. Einige Autoren vermuten einen Zusammenhang mit Signalproteinen der Zellpolarität, wie dem Serpentin-Rezeptor Frizzled, der Signale an die JNK-Kaskade in *Drosophila* übertragen kann. [Noselli und Agnes 1999; Ip und Davis 1998; Noselli 1998] JNK aktiviert in den LE-Zellen die Expression der Transkriptionsfaktoren D-Jun, D-Fos und Aop/yan (*anterior open*), eines ETS-Domänen-Proteins, die alle für DC essentiell sind, wie Experimente mit Mutanten zeigten. Während D-Jun und D-Fos den DC-Prozess fördern, inhibiert Aop die JNK-Aktivität und wird von DJNK durch Phosphorylierung inaktiviert. Die LE-Zellen sind durch die spezifische Expression von zwei DJun-abhängigen Proteinen, Puc (*puckered*) und Dpp (*decapentaplegic*) gekennzeichnet. Die MAPK-Phosphatase Puc wird nur in den LE-Zellen exprimiert, während Dpp, ein Mitglied der TGF β (*transforming growth factor β*) Superfamilie und Homolog des Vertebraten-BMP-4 (*bone morphogenetic protein 4*) auch in den angrenzenden lateralen Epidermiszellen exprimiert wird und dort die Zellstreckung einleitet. [Ip und Davis 1998; Noselli 1998; Goberdhan und Wilson 1998] Die Kontrolle und Regulation der komplexen Prozesse von gerichteter Zellstreckung und Migration während des DC scheint im Zusammenspiel zwischen JNK-Kaskade und anderen Signalen zu erfolgen. Die dualspezifische Phosphatase Puc, deren auf die LE-Zellen begrenzte Expression durch DJun gesteuert wird, kann im Sinne einer negativen Rückkopplung JNK inaktivieren und so die Signalintensität kontrollieren. Die JNK-abhängige Expression von Dpp, dessen Konzentration in den LE-Zellen am höchsten ist und in den benachbarten lateralen Epithelzellschichten

abnimmt, [Noselli 1998] scheint wichtig für die Elongation und die gerichtete Migration dieser Zellen nach dorsal zu sein und eine Kooperation zwischen JNK-Kaskade und TGF β -Weg darzustellen. Bei Fehlen oder Verlust der Dpp Expression während des DC werden morphologische Veränderungen der LE-Zellen beschrieben, die auf Defekte im Zytoskelett deuten. [Martin-Blanco 1997] Dpp überträgt Signale an die TGF β -Rezeptoren Tkv (*thick veins*) und Punt.

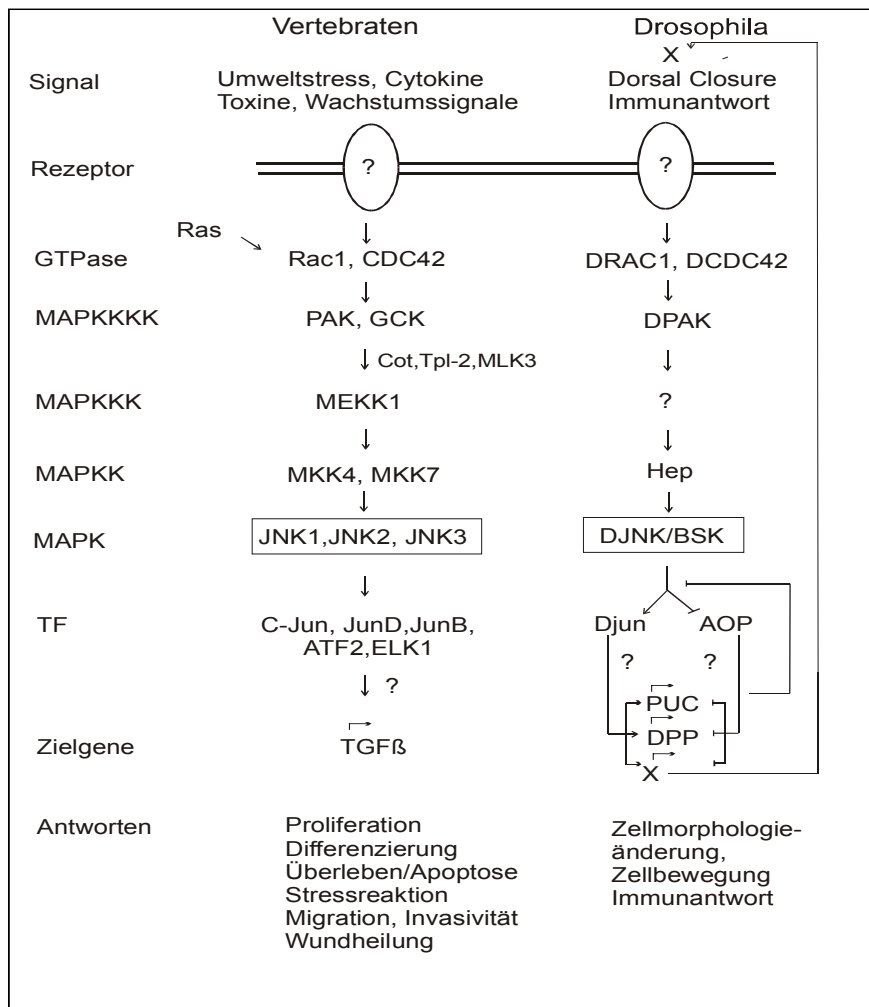


Abb. 5: Die JNK-Kaskade ist in Vertebraten und *Drosophila* konserviert. Übersicht über den Aufbau und einige physiologische Prozesse, in denen JNK-Signale eine Rolle spielen

Der Mechanismus, über den Dpp die Zellmigration steuert, ist unklar, vermutet wird eine Modulation der Zelladhäsion über den Umbau von Zell-Matrix-Kontakten, da in den Zellen Filopodienbildungen mit Aktinbrücken nachweisbar sind. Dabei zeigen sich Parallelen zu Prozessen in Vertebraten, wie Wundheilung und Invasivität bei epithelialen Karzinomen, die ebenfalls TGF β und JUN/AP1-Signalabhängigkeit zeigen. Die Migration humaner Keratinozyten im Prozess der Hautregeneration nach

Verletzungen beispielsweise zeigt starke Analogie zu den Vorgängen beim DC, so daß dieses als Modell für die Untersuchung normaler und pathologischer Epithelmigration in Vertebraten genutzt werden kann. [Stronach und Perrimon 1999; Noselli 1998] Es scheinen noch zahlreiche weitere Proteine an dem komplexen Prozess des DC beteiligt zu sein. Mutationen in Membranstrukturproteinen und Zytoskelett assoziierten Proteinen wie z.B. *I (1) myospheroid* (β -integrin), *zipper* (non muscle myosin heavy chain) und *coracle* (4-1-Protein an Zell-Zell-Verbindungen), oder den PDZ-Domänen-Proteinen Canoe und ZO1, die DJNK an die Plasmamembran rekrutieren, führen ebenfalls zu einem *dorsal open*-Phänotyp, was auf eine Funktion dieser Proteine beim DC hindeutet. [Noselli und Agnes 1999; Stronach und Perrimon 1999; Ip und Davis 1998] Neben Zytoskelett und Zelladhäsivität scheinen JNK-Signale auch die Determination der Zellpolarität in Epithelzellen zu beeinflussen. In den LE-Zellen findet man eine apikale Akkumulation von F-Aktin, Myosin, DPAK, Phosphotyrosinen, Fascilin III und *coracle*. Die asymmetrische Lokalisation dieser Proteine könnte eine Rolle bei der Elongation der LE-Zellen zu spielen. Bei Mutanten des JNK-Weges, die beispielsweise DJun und Puc betreffen, bei denen die betroffenen LE-Zellen keine Elongation zeigen, fehlt die Akkumulation dieser Proteine. [Tateno et.al. 2000; Stronach und Perrimon 1999; Ip und Davis 1998] Auch zeigen Experimente zur Augen- und Flügelentwicklung bei *Drosophila*, daß DJNK-Signale die Determination der Zellpolarität in Epithelzellen beeinflussen. [Mlodzik 1999]

3.3. Gegenstand der Arbeit

Wie in den vorhergegangenen Kapiteln dargestellt, beeinflusst die JNK-Kaskade eine Vielzahl von zellulären Funktionen, wie Stressreaktion, Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Immunantwort, Wundheilung, Zelladhäsion, Polarität und morphologische Umgestaltungsprozesse während der Embryonalentwicklung. Diese Prozesse sind fast immer mit Zellbewegungen und Zellmorphologieänderungen assoziiert, also letztendlich mit der Reorganisation des Zytoskeletts und dessen Bestandteilen, wie z.B. Aktin und Mikrotubuli, verbunden. Obwohl viele Hinweise auf eine Rolle von JNK-Signalen bei Umbauvorgängen des Zytoskeletts deuten und die Aktivatoren der JNK-Kaskade, die kleinen G-Proteine der Rho-Familie Rac und Cdc 42, zu Schlüsselproteinen in der Regulation des Zytoskellets gehören, wurde eine direkte Verbindung zwischen JNK und dem Zytoskelett bisher nicht gefunden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nach weiteren Bindegliedern im JNK-Signalweg, d.h. nach neuen Interaktionspartnern der JNK-Kinase zu suchen.

Dabei wurde das Yeast-Two-Hybrid-System als Methode zur Identifikation unbekannter Protein-Interaktionen genutzt. Als Modellsystem wurde die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gewählt. Struktur und Funktion der JNK-Kaskade liegen in *Drosophila* hoch konserviert vor und der bereits gut charakterisierte Prozess des *dorsal closure* in der Embryonalentwicklung erleichtert es, neue Proteine funktionell *in vivo* zu untersuchen. Der hohe Konservierungsgrad der Kaskade läßt vermuten, daß neue gefundene Proteine ebenfalls konserviert sind und zur Identifikation der Vertebraten-Homologe führen könnten.

4. Material

4.1. Geräte

Artikel	Firma	Artikel	Firma
Analysenwaage	Sartorius	Mikroskop	Leica
Autoklav	Webeco	Mikrowelle	Siemens
Blottingkammer	Hofer	Netzgeräte	Bio-Rad
Brutschränke	Memmert	Orbitalschüttler	Bellco Biotechnology
Computer	Vobis	PCR Gerät	Perkin Elmer
Eismaschine	Scotsman	pH-Meter	WTW
Elektrophorese- kammern	Institutswerkstatt, Bio-Rad	Phospho-Imager BAS 2000	Fuji
Exponierkassetten	Dr. Goos-Suprema	Photometer	Hitachi
Feinwaage	Mettler	Pipetten	Gilson
Filmentwickler	Kodak	Wasserbad	GFL
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr	Sequencer	ABI PRISM 377
Gefrierschrank -80 °C	Nunc	Sterilbank	Heraeus
Gewebekulturschrank	Heraeus	Tischzentrifuge	Eppendorf
Grobwaage	Satorius	Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel
Heizblöcke	Gebr. Liebisch	UV-Crosslinker	Hofer
Hybridisierungsofen	MWG-Biotech	UV-Fotoanlage	Herolab, Kaiser, Sony
Kühlschrank	Liebherr	Vibrax VX2	Janke und Kinkel
Kühlzentrifuge	Heraeus	Vortex-Gerät	Scientific Industries
Luftschüttler	New Brunswick Scientific	Wecker	Roth
Magnetrührer	GLW	Zählkammer	Neubauer (improved)
Microlumat LB96P	EG&G Berthold	Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0R, J2-HS Beckmann

4.2. Chemikalien und Reagenzien (Chemikalienverzeichnis)

4.2.1 Chemikalien

Artikel	Firma	Artikel	Firma
Aceton	Merck	Essigsäure	Applichem
Acrylamid/Bisacrylamid19:1 und 37.5:1	Bio-Rad	Ethanol, abs.	Aplichem
Adenin	Sigma	Ethidiumbromid	Gibco-BRL
Agar select	Sigma	Fettfreie Trockenmilch	Nestlé
Agarose, ultra pure	Gibco-BRL	Fötales Kälberserum	PAN Systems
3AT:3Amino1,2,4-triazol	Sigma	Formaldehyd	Sigma
Ammoniumacetat	Merck	GSH-Sepharose	Böhringer
Ammoniumpersulfat	Fluka	D (+)-Glucose-Monohydrat	Merck
Ampicillin	Sigma	Glycin	Sigma
Anisomycin	Sigma	Glycerol	Sigma
Antipain	Boehringer	Hefe-Stickstoff (Basis) ohne Aminosäuren	GibcoBRL
Aprotinin	Boehringer	Hefe-Extrakt	Gibco-BRL
L-Arginin	Sigma	HEPES	Sigma
Arsenit	Sigma	L-Histidin	Sigma
ATP	Sigma	L-Isoleucin	Sigma
[α - ³² P]dATP	Amersham	IPTG	Sigma
Bacto-Agar	Difco	Kaliumacetat	Merck
Benzamidin	Sigma	Kaliumchlorid	Sigma
Borsäure	Sigma	Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Bromphenol Blau	Sigma	Kaliumhydroxid	Merck
Calciumchlorid	Sigma	Lachssperma-DNA	Sigma
Chloroform	Merck	LB-Broth Base	Sigma
Coomassie-Blue G	Sigma	L-Leucin	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma	Leupeptin	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma	Lipofectamine™ Reagent	Gibco-BRL
DTT (Dithiothreitol)	Sigma	Lithiumacetat	Sigma
DMF (Dimethylformamid)	Sigma	L-Lysin	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM	Gibco-BRL	Magnesiumacetat	Sigma
EDTA	Sigma	Magnesiumchlorid	Merck
EGTA	Sigma	Magnesiumsulfat	Sigma
Eisessig	Sigma	β -Mercaptoethanol	Sigma
		Methanol	Rühl AG

L-Methionin	Sigma	2-Propanol	Merck
MOPS-Säure	Sigma	Protein A-Agarose	Boehringer
Natriumacetat	Sigma	Protein G-Agarose	Boehringer
Natriumchlorid	Sigma	Phenylalanin	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	Saccharose	Merck
Natriumhydroxid	Sigma	Salzsäure, rauchend	Merck
Natriumfluorid	Sigma	SDS ultra pure	Roth
Natrium Orthovanadat	Sigma	TB-Broth	Sigma
Natrium Pyrophosphat	Sigma	TEMED	Sigma
Nonidet P40 (NP40)	Sigma	L-Threonin	Sigma
dNTPs	Peqlab	Tris Base	Sigma
PBS	Gibco-BRL	Triton X-100	Sigma
Ponceau S	Sigma	Trizma Hydrochlorid	Sigma
Bacto-Pepton	Difco	Trypsin/EDTA	Gibco-BRL
ProteinA-Agarose	Böhringer	Bacto-Trypton	Gibco-BRL
Phenol:Chloroform:Iso- amylalkohol	ApliChem	L-Tryptophan Tryzol	Sigma LifeTechnol
Polyethylenglykol 4000 (PEG)	Roth	Tyrosin	Sigma
Quick-Hybe	Stratagene	Tween 20	Sigma
Pipes	Sigma	Uracil	Sigma
Pepstatin	Sigma	X-Gal	MBI
PMSF	Sigma	Xylencyanolblau	
Ponceau S	Sigma		Sigma

4.2.2 Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen, die verwendet wurden, stammten von den Firmen MBI-Fermentas und NEB (New England Biolabs).

Sonstige Enzyme :

Enzym	Firma
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	NEB, MBI
Klenow Fragment	NEB
RNAse A	Sigma
Pwo-DNA-Polymerase	Peqlab
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene
T4-DNA-Ligase	NEB, MBI-Fermentas
T4-DNA-Polymerase	NEB, MBI-Fermentas

4.2.3 Molekulargewichtsmarker

Molekulargewichtsmarker für Proteine:

Prestained Molecular Weight Standard Mixture (Amersham RPN 800)
(gefärbtes Molekulargewichts-Standard Gemisch)

Molekulargewichtsmarker für DNA:

1 kb Ladder (Gibco-BRL)

1 kb Ladder (Peqlab)

4.2.4 Reagenziensätze (Kits)

Kit	Firma
ECL Western Blotting Detection	Amersham
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Plasmid Mini Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Quick Change™ Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
dNTP(ATP, CTP, GTP, TTP)	Peqlab
Random-DNA-labeling-Kit	Boehringer

4.3. Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien

Escherichia coli; DH5 α

Subcloning Efficiency DH5 α ™ Competent Cells (Gibco BRL), oder selbst hergestellt,

(→ 5.1.2)

Saccharomyces cerevisiae; Y190 [Clontech, Yeast Protocols Handbook, Appendix F]

MATa ura 3-52 his 3-200 ade 2-101 lys 2-801 trp 1-901 leu 2-3, 112, gal 4 Δ , gal 80 Δ , cyh^r2,
LYS2::GAL1_{UAS}-HIS-TATA-HIS3, URA3::GAL1_{1UA}-GAL1-TATA-LacZ,

Reporter HIS3, lacZ, Transformations-Marker trp1, leu2, cyh^r2

Herkunft: Clontech

NIH3T3-Zellen [Jainchill et al. 1969]

Bei den NIH3T3-Zellen (ATCC [America Type Culture Collection] CRL-1711) handelt es sich um immortalisierte, embryonale, kontakt-inhibierte Maus-Fibroblasten. Sie wachsen bei einer Temperatur von 37°C als Monolayer

4.4.Plasmide

pBluescript KS

bakterieller Klonierungsvektor mit Ampicillin-Resistenz, (Stratagene)

pCDNA3

eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV Promotor, (Invitrogen)

pEBG

eukaryotischer Expressionsvektor, GST-Epitop, (S. Ludwig, MSZ)

pGEX4T1, 4T2, 4T3

bakterieller Expressionsvektor mit GST-Fusionsprotein in 3 verschiedenen Leserahmen (Amersham Pharmacia)

pAS2-1

Two-Hybrid -Klonierungsvektor mit GAL4-DNA-Bindungsdomäne, TRP1-Defizienz, ColE1 origin, Ampicillinresistenz, (Clontech)

pACT-2

Two-Hybrid -Klonierungsvektor mit GAL4-DNA- Aktivierungsdomäne, LEU2-Defizienz, ColE1 origin, Ampicillinresistenz, (Clontech)

Es wurden folgende Expressionskonstrukte in den Experimenten verwendet:

pAS2-1 ERK2	(U. Rennefahrt, MSZ)
pAS2-1JNK2	(U. Rennefahrt, MSZ)
pAS2-1p38	(U. Rennefahrt, MSZ)
pACT2-JIP1JBD	(U. Rennefahrt, MSZ)
pCMV5 MLK3	(J. Hartkamp, MSZ)
pCMV5Cot Δ C	(D. Matenia, MSZ)
pCMV5 Myc-Erk2-MEK-1-LA	(M.H. Cobb, Southeastern University Texas)
pCDNA3 JNK/MKK7	(U. Rennefahrt, MSZ)
pEBG-GST-JNK2	(S. Ludwig, MSZ)
pBS-DJNK	(E.Hafen, Zürich)

pAS2-1 DJNK

DJNK wurde mit PCR (aus pBS-DJNK) mit den artefiziellen Restriktionsenzymststellen NcoI und BamHI amplifiziert und in pAS2-1 subkloniert

forward Primer : 5`CGT ACC ATG GAG ATG ACG ACA GCT CAG CAC CAA 3`

reverse Primer : 5`GCG GAT CCT TAG CTC CTT CCA CTG CTC CAC AG 3`

BJ4-myc-Spir

Die vollständige p150-Spir-cDNA wurde aus den Drosophila-EST-Klonen GH 10380 und LD 37577 zusammengesetzt. Dazu wurden die Nukleotide 1- 670 aus GH 10380 mit PCR amplifiziert, dabei mit Restriktionsschnittstellen für BamHI und Accl versehen und mit einem myc-Epitop fusioniert

(forward Primer: 5`GCG GAT CCG CCG CCA TGG AGC AGA AGC TGA TCT CCG AGG AGG ACC TGA CGG AGC ACC AGG CCG AGG AG 3`

reverse Primer: 5`GCA CTC CTC GTC CTC CGG CAG ATT 3`)

Die Nukleotide 671–3060 wurden aus LD 37577 mit Accl und ClaI ausgeschnitten. Beide Fragmente wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor BJ4 kloniert .

pcDNA3-p150-Spir-MT

Die p150-Spir cDNA wurde einschließlich des myc-Epitops mit HindIII ausgeschnitten und in pcDNA3 subkloniert

pEBG-p150-Spir

p150Spir wurde aus pcDNA3-p150-Spir-MT mit BamHI ausgeschnitten und in pEBG subkloniert.

pGEX4T3-Spir-JBD (Klon1)

Die JBD von p150-Spir (AA902-1020) wurde aus pACT2 (im Two-Hybrid-Screen gefundene Sequenz Klon 1) mit BamHI und XhoI ausgeschnitten und in pGEX4T3 subkloniert.

pcDNA3-MT Spir ΔC-term (Deletionsmutante der mFYVE-Domäne)

Die Aminosäuren 2-777 wurden aus pcDNA3-p150-Spir-MT mit BamHI und EcoRI ausgeschnitten und in pcDNA3 subkloniert.

Die folgenden Mutanten der mFYVE-Domäne wurden aus pcDNA3-p150-Spir-MT mittels *site-directed-in-vitro-mutagenesis* (→ 5.2.4) hergestellt. Darunter sind die für die Mutagenese der jeweiligen Cysteine in Serine verwendeten PCR-Primersequenzen aufgeführt. Die verglichen zur Wildtypsequenz veränderten Nukleotide sind unterstrichen

pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 1,2 S

forward Primer : 5`GTC GCG TCT CCT TCC TGT CCC TGC GCA CTC 3`
reverse Primer : 5`GAG TGC GCA GGG ACA GGA AGG AGA CGC GAC 3`

pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 3,4 S

oberer Primer : 5`CAT TCA GTC CAA GTT GTC CCA GCG CAC GGT C 3`
reverse Primer : 5`GAC CGT GCG CTG GGA CAA CTT GGA CTG AAT G 3`

pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 5,6 S

forward Primer: 5`CGC ACG GTC TCC GCC AAG TCC TAT ACC AAG 3`
reverse Primer : 5`CTT GGT ATA GGA CTT GGC GGA GAC CGT GCG 3`

pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 7,8 S

oberer Primer: 5`GTG ACC GTG TCC AAC GAC TCC CAG GGA CTG 3`
reverse Primer: 5`CAG TCC CTG GGA GTC GTT GGA CAC GGT CAC 3`

Folgende Konstrukte mit jeweils vier mutierten Cysteinen wurden mit Hilfe der oben genannten Primer aus den Doppel-Cysteinmutanten hergestellt:

pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 1,2,3,4 S**pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 3,4,5,6 S****pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 5,6,7,8, S****pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 1,2,5,6 S****pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 1,2,7,8 S****pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 3,4,7,8 S****pcDNA3-p150Spir-MT ΔF,F/A,A**

forward Primer: 5`CTC GGT TCT CGG CCG CCG GTC CCT GGG 3`
reverse Primer : 5`CCC AGG GAC CGG CGG CCG AGA ACC GAG 3`

pcDNA3-p150-Spir-MT Δ WH2 (AS 369-480)

oberer Primer: 5`CGA CTG GGC ACG CAC CCC GCC AGA AG 3`

reverse Primer: 5`CTT CTG GCG GGG TGC GTG CCC AGT CG 3`

es wurden folgende EST-Klone für Klonierungen bzw. in Experimenten verwendet :

Drosophila-EST GH 10380; AI 113886

Drosophila-EST LD 37577; AI 5118150

4.5. Medien zur Aufzucht von Bakterien und Hefen

4.5.1. Bakterienmedien

LB-Medium

22 g LB Broth wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Sollten LB-Bodenagarplatten gegossen werden, wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 11 g Agar Select zugegeben. Nach Abkühlen des Mediums auf 50-60°C wurde 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben.

SOC-Medium

2% (w/v) Bacto Trypton (20 g), 0,5% (w/v) Hefeextrakt (5 g), 10 mM NaCl (0,58 g), 2,5 mM KCl (0,186 g), 10 mM MgCl₂ (10 ml 1M MgCl₂) und 10 mM MgSO₄ (10 ml 1M MgSO₄) wurden in 980 ml Aqua bidest. gelöst, mit NaOH auf pH 6,7-7,0 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 20 ml einer sterilen 1M Glucose-Lösung zugegeben und vermischt.

TB-Medium

47 g TB Broth und 8 ml Glycerin wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Vor Gebrauch wurde 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben.

2x TY+Amp.-Medium

16 g Bacto Trypton, 10 g Hefe-Extrakt und 5 g NaCl wurden in 1 l Aqua bidest. gelöst, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurde 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben. Sollten Platten gegossen werden, wurde vor dem Autoklavieren 15 g Agar Select zugegeben.

4.5.2. Hefe-Medien

Aminosäure-Dropout-Lösung (100× Stock)

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

wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Die im jeweiligen Dropout nicht benötigten Aminosäuren wurden weggelassen.

20 % (w/v) Glucose

200g D (+) Glucose wurde in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert.

Selektionsmedium

8 g Difco Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 55 mg Tyrosin, 55 mg Uracil und 55 mg Adenin wurden in 1 l Aqua bidest. gelöst, autoklaviert, auf 50-60 °C abkühlen gelassen und mit 100 ml 20 % Glucose und 10 ml der benötigten Aminosäure-Dropout-Lösung versetzt.

Für die Herstellung von Kulturplatten wurde vor dem Autoklavieren 22 g Agar eingewogen.

Vollmedium (YEPD)

11 g Hefe-Extrakt, 22 g Bacto-Pepton und 55 mg Adenin wurden in 1 l Aqua bidest. gelöst, autoklaviert und auf 50-60°C abkühlen gelassen. Anschließend wurden 100 ml 20% Glucose zugegeben.

Für die Herstellung von Kulturplatten wurde vor dem Autoklavieren 22 g Bacto-Agar eingewogen.

4.5.3. Zellkulturmedium

NIH3T3-Zellen Medium

Zu 500 ml DMEM wurden 50 ml FCS (Hyclone), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml) und 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) gegeben.

4.6. Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
Blottingpapier, 3 MM, 190 g/m ²	Schleicher & Schuell
Bottle Top Filter 0,22 µm	Nalge Nunc International
ECL-Hyperfilm	Amersham
Eppendorf Combitips	Eppendorf
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml	Hartenstein
Frischhaltefolie	alio
Gewebekulturflaschen	Sarstedt
Gewebekultur-Roller-Bottles	Sarstedt
Gewebekulturschalen	Sarstedt
Glasperlen 0,45-0,5 mm	Sigma
Greiner-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner
Hybond™-C extra 82 mm	Amersham
Hyperfilm™-MP	Amersham
Kulturschalen 9 cm	Sarstedt
Kulturschalen 15 cm	Greiner
Mullbinden	Apotheke
Parafilm	Hartenstein
Poly Screen PVDF Transfer Membran	NEN™ Life Science Products
Polystyrenröhrchen 5 ml	Sarstedt
Protran Nitrozellulose Transfer-Membran	Schleicher & Schuell
Sterilfilter Millex®-GS 0,22 µm	Millipore
Whatman-Rundfilter 8,5 cm	Whatman
Zahnstoßer	Denta

4.7. Puffer und Lösungen (alphabetisch)

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

1g Ammoniumpersulfat wurde in Aqua bidest. gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde als 1ml Aliquots bei -20°C gelagert.

10 % (w/v) Ampicillin

1 g Ampicillin wurde in 10 ml Aqua bidest. gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und eingefroren.

1M 3 AT (3-Amino-(2,3,4)-triazol)

8.4g 3-AT wurden in 100 ml sterilem Aqua bidest gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

Blocking-Puffer für Western-Blots

5 % (w/v) Trockenmilchpulver (5 g) wurde in 1× PBS/Tween (100 ml) gelöst.

Coomassie Färbung und Entfärbelösung

0.5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
5 g Coomassie Brilliant Blue G wurden zu einer Mischung aus 500 ml Methanol und 100 ml Essigsäure (99%) gegeben. Für die Entfärbelösung wurde die selbe Zusammensetzung ohne Coomassie BrilliantBlue G verwendet.

1000x Cycloheximid Stocklösung

50 mg Cycloheximid wurden in 50 ml sterilem Aqua bidest gelöst, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

DEPC-behandeltes Wasser

1000 ml Wasser wurden mit 500 µl DEPC versetzt und über Nacht auf einem Magnetrührer bei 25°C gerührt, danach autoklaviert.

DNA Probenpuffer

9 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,45 mM EDTA, 46 % (v/v) Glycerol, (0,005 % (w/v)) Bromphenolblau und (0,005 % (w/v)) Xylencyanolblau
4.5 ml TE-Puffer pH7.4, 4.6 ml Glycerin, 0.2 ml 10% SDS-Lösung, 50µl 1% Bromphenolblau (w/v) und 50µl 1% Xylencyanolblau (w/v) wurden zusammengegeben und mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt.

1 M DTT-Lösung

1.545 g DTT wurde in 10 ml sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) und in 1 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

0.5 M EDTA-Lösung pH 8.0

18.6 g EDTA wurden in 50 ml sterilem Aqua dest. gelöst, mit 1M NaOH auf pH 8.0 eingestellt und auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Ethidiumbromid-Stammlösung

400 mg Ethidiumbromid wurden in 40 ml Wasser gelöst und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

10x FGRB (Formamid Gel-Running-Puffer), Laufpuffer für RNA-Gele

3.4 g Natriumacetat, 1.9 g EDTA, 20.9 g MOPS-Säure wurden in 450 ml DEPC-behandeltem Wasser gelöst, der pH mit 2N NaOH auf 7.0 eingestellt und mit DEPC-Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

ICKA Kinasepuffer (Immuno-Complex-Kinase-Assay-Buffer)

50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 1% Triton X100 und 10% (v/v) Glycerol wurden in Aqua bidest. gelöst. Kurz vor Verwendung des Puffers wurden 1mM DTT, 2µg/ml Leupeptin, 2µg/µl Aprotinin, 1mM PMSF, 10 mM NaF, 0,2mM Na₃VO₄ und 100 µM ATP zugegeben.

1 M IPTG

2.38 g IPTG wurden in 8 ml sterilem Wasser gelöst, auf 10 ml aufgefüllt, steril filtriert und als 1ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

1x Lämmli-Puffer (Protein-Probenpuffer)

60 mM Tris-base (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 3% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,005% (w/v) Bromphenolblau
0.6 ml 1M Tris-HCl-Puffer pH 6.8, 1ml Glycerin, 0.5 ml β-Mercaptoethanol, 1.5 ml 20% (w/v) SDS-Lösung und 50 µl 1% (w/v) Bromphenolblau wurden in 10 ml Aqua bidest. gelöst und als 1ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

5x Lämmli-Puffer (Protein-Probenpuffer)

300 mM Tris-base (pH 6,8), 50% (v/v) Glycerin, 15% (w/v) SDS, 25% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,025% (w/v) Bromphenolblau
3 ml 1M Tris-HCl-Puffer pH 6.8, 5 ml Glycerin, 2.5 ml β-Mercaptoethanol, 7,5 ml 20% (w/v) SDS-Lösung und 250 µl 1%Bromphenolblau wurden in 10 ml Aqua bidest. gelöst und als 1ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

1 M Lithium-Acetat (10× Stammlösung)

10.2 g LiAc wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst und auf pH 7,5 eingestellt.

PBS/Tween

0,05% (v/v) Tween 20 (250 µl) wurden mit PBS (500 ml) vermischt.

50 % PEG (w/v)

500 g PEG 4000 wurden in Aqua bidest. gelöst, auf 1000 ml aufgefüllt und dann sterilfiltriert.

Plate-Mixture

Zu 89 ml 45% PEG 4000 (225 g in 500 ml Aqua bidest. gelöst, steril filtriert), wurden 10 ml 1 M Lithiumacetat, 1ml 1 M Tris-Cl (pH 7,5) und 0,2 ml 0,5 M EDTA gegeben.

Ponceau S-Lösung

0.2% (w/v) Ponceau-S in 3% (w/v) Trichloressigsäure
1g Ponceau-S und 15 g Trichloressigsäure wurden in 500 ml Wasser gelöst.

10x Proteingel-Laufpuffer (SDS-Page)

190 mM Glycin, 25 mM Tris und 0,1% SDS (w/v)
60 g Tris, 287,5 g Glycin und 20 g SDS wurden in 2000 ml Aqua bidest. gelöst.

Protein-Lysis-Puffer (TPE)

1% Triton X 100, 100 mM EDTA
2 ml Triton X 100 und 40 ml 0.5 M EDTA wurden in 1x PBS gelöst, auf 200 ml Endvolumen aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Vor Einsatz wurden folgende Proteinaseinhibitoren frisch dazugegeben: 1% Aprotinin, 5 µg/ml Antipain, 0.5 µg/ml Leupeptin, 0.7 µg/ml Pepstatin A, 1 mg/ml PMSF.

Protein-Transferpuffer (Western-Transfer)

25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol
6 g Tris, 28,8 g Glycin und 400 ml Methanol wurden zusammengegeben und mit Aqua bidest auf 2000 ml aufgefüllt.

Protein-Waschpuffer

50 mM Tris pH7.5, 100 mM EDTA pH 7.5 und 0.1 % Tween 20
25 ml 1M Tris, 2.5 ml 20% Tween und 100 ml 0.5 M EDTA pH 7.5 wurden in 400 ml kaltem Aqua bidest. gelöst, auf ein Endvolumen von 500 ml aufgefüllt und bei 4°C gelagert.

RNA-Probenpuffer

0.4 ml 37% Formaldehyd, 1.4 ml Formamid, 0.2 ml 10x FGRB, 0.12 ml 0.5% Bromphenolblau-Lösung

10% SDS-Lösung

50 g SDS wurden in 400 ml Aqua bidest gelöst und auf 68°C erwärmt, der pH mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure auf 7.2 eingestellt und das Volumen mit Aqua bidest auf 500 ml aufgefüllt.

20x SSC-Lösung

175,3 g NaCl, 88.2 g Na-Citrat wurden in 800 ml Aqua bidest gelöst, der pH auf 7.0 eingestellt, auf ein Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

STET-Puffer

8 % (w/v) Saccharose (8 g), 50 mM EDTA (10 ml 0,5M EDTA), 50 mM Tris-Cl pH 8 (5 ml 1M Tris-Hcl pH 8) und 5 % (v/v) Triton X-100 (5 ml) wurden in Aqua bidest. gelöst und auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt.

TAE-Puffer

40 mM Tris-Cl, 40 mM Eisessig, 2 mM EDTA pH 7,8
 4,84 g Tris-Cl, 1 ml Eisessig, 2 ml 0,5M EDTA pH 8,0 wurden zu 800 ml Aqua bidest geben, der pH auf 7,8 eingestellt und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt.

50xTAE-Puffer

2 M Tris-Cl, 2 M Eisessig, 100 mM EDTA pH 7,8
 242 g Tris-Cl, 57,1ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 wurden zu 800 ml Aqua bidest geben, der pH auf 7,8 eingestellt und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt.

TB-Puffer

10 mM PIPES (1,5 g), 15 mM CaCl₂ (1,1 g) und 250 mM KCl (9,3 g) wurden in 400 ml Aqua bidest. gelöst und mit KOH auf pH 6,7 eingestellt. Anschließend wurden 55 mM MnCl₂ (x 2 H₂O) zugegeben (5,4 g), auf ein Endvolumen von 500 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt und steril filtriert (0,22 µm).

10xTBE-Puffer

1 M Tris-Base, 20 mM EDTA und 0,9 M Borsäure
 108g Tris, 55 g Borsäure und 40 ml 0.5M EDTA (pH 8.0) wurden in Aqua bidest. gelöst, auf pH 8,3 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt.

TE-Puffer

20 mM Tris-Base pH 7.4, 1mM EDTA
 2.42 g Tris und 0.37 g EDTA wurden in 900 ml Aqua bidest gelöst, mit konz. HCl ein pH-Wert von 7.4 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert.

TE-Puffer (100× Stock-Lösung)

1 M Tris-Cl (121 g) wurde in 800 ml Aqua bidest. gelöst, mit HCl auf pH 7.4eingestellt, 100 mM EDTA (100 ml 0,5 M EDTA) wurden zugegeben, der pH nachreguliert und auf ein Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert, bevor sie in einer Verdünnung von 1:100 verwendet wurde.

1M Tris-HCl-Puffer pH 9.5, 8.0, 7.4, 6.8

121.1 g Tris wurden in 900 ml Wasser gelöst, der entsprechende pH mit konzentrierter HCl eingestellt, die Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

X-Gal Stock-Lösung

20 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid) wurde in DMF gelöst, aliquotiert und bei -20°C in Dunkelheit gelagert.

Z-Puffer

60 mM Na₂HPO₄ × 7H₂O, 40 mM NaH₂PO₄ × H₂O, 10 mM KCl und 1 mM MgSO₄ × 7H₂O
 16.1 g Na₂HPO₄ × 7H₂O, 5.5 g NaH₂PO₄ × H₂O, 750 mg KCl und 250 MgSO₄ × 7H₂O wurden in 800 ml Aqua bidest. gelöst, der pH auf 7,0 eingestellt, das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Z-Puffer/X-Gal-Mix

10 ml Z-Puffer wurden mit 27 µl β-Mercaptoethanol und 500 µl X-Gal Stocklösung vermischt, so daß sich eine Endkonzentration von 1 mg X-Gal pro 1 ml Puffer ergab. Diese Mixtur wurde immer erst kurz vor ihrer Verwendung angesetzt.

4.8. Sonstiges

Antikörper

anti-cMyc 9E10-Antikörper (monoklonaler anti-Maus-Antikörper,MSZ)
 TRITC-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper, Dianova
 FITC-gekoppelter anti-Phalloidin-Antikörper, Molucular Probes
 FITC-gekoppelter anti-cMyc 9E10-Antikörper, Santa Cruz
 anti-GST-4H3-Antikörper (monoklonaler anti-Maus-Hybridoma-Überstand, nanotools)
 anti-HA-Antikörper (polyklonaler anti-Maus-Antikörper, MSZ)
 anti-hu-JNK1FL sc571 (polyklonaler anti-Kaninchen-Antikörper, Santa Cruz)

Sekundäre Antikörper

Die verwendeten sekundären Antikörper waren Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper (Amersham), die gegen Kaninchen- oder Maus-Antikörper gerichtet sind. Sie wurden in der Western-Blot-Detektion 1:5000 verdünnt verwendet.

rekombinante Proteine

GST-c-Jun, MBP

Bakteriell exprimiertes MBP und c-Jun werden routinemäßig im MSZ hergestellt und gereinigt.

Bakteriell exprimiertes GST-p150-Spir-JBD wurde wie unter (→ 5.3.1) beschrieben hergestellt und gereinigt.

Säuregewaschene Glasperlen

Die Glasperlen wurden über Nacht unter leichtem Schwenken in 1 N HCl und anschließend mehrmals mit Aqua bidest. gewaschen. Die Perlen wurden bei 80°C im Trockenschrank getrocknet.

cDNA-Bibliothek für den Yeast-Two-Hybrid-Screen

Drosophila melanogaster embryo (21h Canton S.Embryos) MATCHMAKER cDNA Bibliothek, Clontech, IL4003AH

Primersequenzen für die Sequenzierung der EST-Klon-DNA-Sequenzen u.Two-Hybrid-Klone

GH 10380

5'(1) CAA CTG CAG CAG CAG CAG ATC
 3'(1) CAA GAT CAT GGC GTG GGC ATC

pACT-2 AD

TAA TAC CAC TAC AAT GGA TGA TG

LD 37577

5'(1) GAT CAA GGC GTC GGA ATC ATC
 3'(1) CTG CAT ACA ACC GCC CAC

pACT-2 rueck

GTG CAC GAT GCA CAG TTG AAG TG

T7

AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AC

T3

ATT AAC CCT CAC TAA AG

Methoden

Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Methoden den Laborhandbüchern "Molecular cloning: a laboratory manual" von Sambrook et al., "Current Protocols in Molecular Biology" von Ausubel et al. und "Gentechnische Methoden von Gassen und Schimpf entnommen.

5.1.Bakterien

5.1.1. Aufzucht von Bakterien in Flüssigmedien (Übernachtkulturen)

Alle verwendeten Plasmide enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion in Bakterien. Plasmid-transformierte Bakterien (→ 5.1.3.) wurden auf LB+Amp.-Platten über Nacht bei 37°C selektioniert. Für Übernachtskulturen wurde eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Impföse in LB+Amp.- oder TB+Amp.-Medium (2 ml) über Nacht bei 37°C im Luftschüttler aufgezogen (Vorkultur). Die Kultur wurde dann benutzt, um Glyceroldauerkulturen (→ 5.1.4.) anzulegen oder Plasmid-DNA im kleinen oder großen Maßstab zu präparieren (→ 5.2.2). Zum Animpfen der Übernachtskultur wurde der Glycerolstock von außen an der Oberfläche soweit angetaut, daß mit einer ausgeglühten Impföse etwas von der Kultur aufgenommen und in LB-Amp.- oder TB-Amp.-Medium überführt werden konnte. Die Glyceroldauerkultur wurde dann sofort wieder bei -80°C gelagert.

5.1.2. Herstellung von ultrakompetenten Bakterien [Inoue et al. 1990]

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5 α verwendet. Diese Bakterien können durch Behandlung mit einem Calciumchlorid enthaltenden Puffer (TB-Puffer) kompetent gemacht werden, d.h. dazu gebracht werden, Plasmid-DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden DH5 α aus einem bei -80°C gelagerten Glycerolstock auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 500 ml SOB-Medium in einem 2-l-Kolben wurden mit ca. 25 großen DH5 α Kolonien angeimpft und bei 18°C im Wasserbadschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde 10 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend 10 Minuten bei 1600×g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 160 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Es folgten 10 Minuten Inkubation auf Eis und danach 10 Minuten Zentrifugation. Das Pellet wurde in 40 ml TB-Puffer aufgenommen. Unter leichtem Schwenken wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% (2,8 ml) zugegeben, um die Bakterien einfrieren zu können. Nach 10 Minuten Inkubation der Zellsuspension auf Eis wurde sie à 50 µl für Plasmid-Transformationen und à 200 µl für Ligations-Transformationen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Die Kompetenz der Bakterien wird in Anzahl der transformierten Bakterien (= Klone) pro eingesetzte DNA (µg) angegeben und lag durchschnittlich bei 10⁸ Klonen pro 1 µg verwendeter Plasmid-DNA.

5.1.3. Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmiden

25-50 µl Aliquots der ultrakompetenten DH5 α (\rightarrow 5.1.2 oder Gibco) wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 5 µl Plasmid-DNA/Ligationsansatz vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und erneut 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Flüssigmedium wurden die Zellsuspensionen für 1 h bei 37°C in einem Luftschüttler geschüttelt, um sicherzustellen, daß sich die Plasmide etablieren und z.B. eine Ampicillinresistenz phänotypisch ausprägen können. Dann wurden sie à 200 µl auf LB+Amp.-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

5.1.4. Glyceroldauerkulturen

Für die Lagerung der Bakterien wurden diese in glycerolhaltiges Medium überführt. Hierzu wurden 800 µl einer frischen Bakterienübernachtskultur und 200 µl Glycerol in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, gut durchmischt und bei -80°C eingefroren.

5.2. DNA und RNA

5.2.1. Konstruktion von Expressionsplasmiden

Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine Abfolge mehrerer Zyklen von Denaturierung der DNA in Einzelstränge bei 94°C, abkühlen der Reaktion auf die sogenannte Annealing-Temperatur (T_a), die für jeden Primer spezifisch und abhängig von seiner Nukleotidsequenz und Schmelztemperatur ist. Dabei lagern sich die Primer an homologe Sequenzen der Einzelstrang-DNA an. Die Annealing-Temperatur richtet sich nach der niedrigsten Schmelztemperatur der beiden Primer und sollte 2-5°C unterhalb dieser liegen. Es folgt die Elongationsphase bei 72°C, bei der die DNA-Polymerase die Neusynthese der komplementären DNA an den 3'-OH-Enden der Primern durchführt. Die Elongationszeit richtet sich dabei nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes und der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten DNA-Polymerase.

Für die Reaktion wurden pro Ansatz 10 µl 10 \times Reaktionspuffer der Polymerase, 1,5 µl MgCl₂ (25 mM-Stock), sofern es nicht bereits im Puffer enthalten war, 8 µl dNTP (10 mM-Stock), jeweils 1 µl der beiden Primer (10 pM-Stock), 1-5 µl DNA (50-100ng) und Aqua bidest auf ein Endvolumen von 97.5 µl eingesetzt. Die DNA wurde bei einer Temperatur von 94°C für 60 Sekunden in der PCR-Maschine denaturiert und dann 2,5 µl Pwo-Polymerase zugegeben. Da bei den zur Klonierung entworfenen Primern überhängende nicht homologe DNA-Enden, die Erkennungssequenzen für den späteren Restriktionsverdau, synthetisiert werden sollen und deshalb die Primersequenz nicht völlig mit der Sequenz der Ausgangs-DNA übereinstimmt, wurde die PCR mit 5 Zyklen eines unspezifischen Annealingschrittes für jeweils 90 Sekunden mit einer Temperatur 10°C unterhalb der eigentlichen T_a des Primers begonnen. In einem zweiten PCR-Schritt mit der höheren, nun für das Annealing der Primer an die Fragmente passenden T_a sollte die Spezifität der Reaktion erhöht werden. Dieser Zyklus wurde 25-30 mal wiederholt. Die Elongation erfolgte in beiden PCR-Schritten bei 72°C und dauerte abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der verwendeten Polymerase, wobei die z.B. Pwo-Polymerase ca. 2 Minuten pro kb DNA benötigte. Ein Aliquot der amplifizierten DNA wurde zur Kontrolle der PCR mit 5 µl DNA-Probenpuffer vermischt und je nach erwarteter Produktgröße auf ein entsprechend prozentiges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel eluiert, sofern die PCR ein Fragment der richtigen Größe amplifiziert hatte.

Restriktionsverdau von DNA (präparativ und analytisch)

Folgende Reaktionsansätze wurden standardmäßig verwendet:

- analytischer Verdau (20 μ l): 3-5 μ l Plasmid-DNA (0,1-1 μ gDNA), 2 μ l Reaktionspuffer, 1 μ l Restriktionsenzym, mit Aqua bidest. auf 20 μ l Gesamtvolumen auffüllen
- präparativer Verdau (20 μ l): 5-10 μ l Plasmid-DNA (1-5 μ g DNA), 2 μ l Reaktionspuffer, 1 μ l Restriktionsenzym, mit Aqua bidest. auf 20 μ l Gesamtvolumen auffüllen

Der Ansatz wurde für 1 bis 3 Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die Vollständigkeit des Verdauens durch elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel kontrolliert .

Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen.

Je nach aufzutrennender DNA-Fragmentgröße wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Z.B. wurde für die Herstellung eines 1%igen Geles 1 g Agarose zusammen mit 100 ml 0,5 \times TAE in der Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde 1 μ l Ethidiumbromid-Stammlösung pro 100 ml hinzugefügt. Die Agaroselösung wurde in abgedichtete Gelschlitzen gegossen und ein Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisierung bei Raumtemperatur konnte der Gelschlitzen dann in eine Elektrophoresekammer eingelegt und mit 0,5 \times TAE überschichtet werden. Die Taschen wurden mit den DNA-Proben (1-20 μ l DNA + 1-5 μ l DNA-Probenpuffer) beladen. In eine Tasche wurden 0,5 μ g eines standardisierten DNA-Längenmarkers (1 kb Ladder) gegeben, mit dessen Hilfe die Fragmentgrößen der aufgetrennten DNA abgeschätzt werden konnten. Das Gel lief bei konstanter Spannung von 80 V für 30-60 Minuten und wurde anschließend unter UV-Licht (λ = 365 nm) photographiert.

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Ethidiumbromid-Interkalierung unter UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden wurden auf einem UV-Lichtkasten (λ = 365 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die in den Gelstücken eingeschlossene DNA wurde mit Hilfe des *QIAquick Gel-Extraktions-Kits* dem Herstellerprotokoll folgend extrahiert.

Herstellung von blunt-end-Fragmenten

Für das Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden wurde das Enzym DNA-Polymerase I Large Fragment (Klenow, NEB) verwendet. Zum Restriktionsansatz wurde 1 μ l einer 10 mM dNTP-Lösung und 2 μ l Klenow gegeben. Dann wurde er für 1½ h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Hilfe des *QIAquick PCR-Purification Kits* nach Herstellerprotokoll aufgereinigt

Das Enzym T4-DNA-Polymerase wurde für das Entfernen von 3'-überhängenden DNA-Enden verwendet. Zum Restriktionsansatz wurden 1 μ l einer 10 mM dNTP-Lösung und 2 μ l T4-Polymerase (NEB) gegeben. Dann wurde er für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Hilfe des *QIAquick PCR-Purification Kits* aufgereinigt.

Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase

Direkt im Anschluß an den Restriktionsverdau wurden 10-20 μ l Aqua bidest., 5 μ l 10 \times CIP-Puffer und 1 μ l CIP (10 U, NEB) hinzugefügt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch eine Inkubation für 10 min bei 75°C gestoppt. Anschließend wurde die DNA nach elektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe des *QIAquick-Gelextraktions-Kits* oder der Restriktionsverdau direkt mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification-Kits* aufgereinigt

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Aufzureinigende DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des *QIAquick PCR-Purification-Kits* dem Herstellerprotokoll folgend über Säulen aufgereinigt und mit 30 μ l Elutionspuffer (10 mM Tris pH 8,5) aus der Säulenmatrix eluiert.

5.2.2. Plasmidisolaton aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* (kleiner Maßstab, Miniprep)

1,5 ml einer 2ml Übernachtskultur transformierter Bakterien in LB+Amp.-Flüssigmedium wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt. In der Tischzentrifuge wurden die Bakterien bei 12.000 ×g für 1 Minute pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Puffer 1 (Quiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer 2 (Quiagen) wurde das Eppendorf-Gefäß mehrmals vorsichtig gewendet und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor 200 µl Puffer 3 (Quiagen) zugegeben wurden. Nach erneutem Durchmischen folgten 5 Minuten Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 20 Minuten bei 12.000×g. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 500 µl 100% Isopropanol gefällt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12.000×g wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und für 10 Minuten getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 30 µl 1×Tris Puffer gelöst.

Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* (großer Maßstab, Maxiprep)

Die für Anwendungen, wie Sequenzierung oder Transfektion von Säugerzellen benötigten größeren Mengen an gereinigter Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid Maxi Kits* isoliert. Dabei wurden Bakterienkulturvolumen von 100 ml oder 500 ml verwendet und im weiteren nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Die isolierten DNA-Pellets wurden je nach Pelletgröße in 300–500 µl 1×Tris-Puffer gelöst und bei -20°C eingefroren. Zuvor wurden 3 µl der DNA-Lösung für eine Konzentrationsbestimmung abgenommen (s.u.).

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (entspricht dem Absorptionsmaximum) und 280 nm. Der Quotient aus diesen beiden Meßdaten (OD_{260}/OD_{280}) erlaubt eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA. Er sollte zwischen 1,8 und 2,4 liegen. Eine optische Dichte von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA und RNA von 40 µg/ml.

Die Konzentration der DNA wurde folgendermaßen berechnet:

$$C = OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

C: Konzentration in mg/ml

OD: Optische Dichte

5.2.3. Automatische DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377 Integrated Thermal Cycler

Für jede Reaktion wurden folgende Reagentien gemischt:

1 µg DNA *template*
 1,0 µl *Primer* (10 pmol)
 ddH₂O ad 16 µl Endvolumen

Die Sequenzierreaktion, Probenaufbereitung und Probenanalyse wurde von R. Krug (MSZ, Würzburg) durchgeführt

5.2.4. Einbringen von Punkt-oder Deletionsmutationen mit Hilfe des Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit

Der *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene ist ein auf der PCR-basierender Kit, mit dessen Hilfe Punktmutationen in bekannte, in ein Plasmid hineinklonierte DNA-Sequenzen eingefügt werden oder auch DNA-Abschnitte deletiert werden können. Für Punktmutationen wurden Primer generiert, die homolog zu der zu mutierenden DNA-

Sequenz sind, zusätzlich aber eine oder mehrere der gewünschten Punktmutationen tragen. Für Deletionsmutationen wurden Primer entworfen, deren halbe Nukleotidsequenz homolog zur Sequenz vor dem zu deletierenden Abschnitt und deren andere Hälfte homolog zur Sequenz nach dem zu deletierenden Abschnitt ist. In einer PCR-Reaktion wurde dann das komplette Plasmid amplifiziert und die Mutation inseriert. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

5.2.5. RNA-Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben erfolgte nach der optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Extraktionsmethode mittels TRIzol™ Reagent (Life Technologies) oder peqGOLD TriFast™ (Peqlab) nach dem Herstellerprotokoll. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mittels photometrischer OD-Messung bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt, wobei der $A_{260/280}$ -Quotient zwischen 1.6 und 1.8 liegen sollte. (→ 5.2.2.)

5.2.6. Northern Blot

Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurde ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel benutzt. (1% Agarose, 6,1% Formamid) Dazu wurden 1 g Agarose in 73,4 ml DEPC-behandeltem dest. Wasser durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, nach Abkühlen der Lösung auf 50°C 16.6 ml 37% Formaldehyd-Lösung und 10 ml 10x FGRB-Puffer zugegeben und das Gel in der über Nacht in 1% SDS und 0,01 M NaOH inkubierten Gelform unterm Abzug gegossen.

Jeweils zwischen 10 und 15 µg Gesamt-RNA wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Endvolumen von 15 µl ergänzt und 5 µl RNA-Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden 15 min bei 65°C inkubiert, für 3 min auf Eis gestellt, 3 µl Ethidiumbromidlösung für RNA zugegeben und für 5 sec herunterzentrifugiert.

Nach Auspolymerisierung wurde das Gel in 1x Formaldehyd-Gellaufpuffer für 5 min bei einer Spannung von 5V/cm vorlaufen gelassen und dann mit den RNA-Proben beladen. Die Elektrophorese bei einer Spannung von 3-4V/cm wurde für etwa 2 h fortgesetzt, bis die Bromphenolblau-Lauffront etwa 8 cm gelaufen war. Das Gel wurde dann für 20 min in 0,05N NaOH-Lösung eingelegt, mit RNasefreiem Wasser gespült und für 45 min in 20 x SSC inkubiert.

Transfer der RNA auf die Membran

Für den Transfer der RNA auf die Membran wurde ein Sockel, der etwas größer als das Gel war, in eine Glasschale gelegt und mit einem Stück 3 mm starkem Whatmann-Papier so bedeckt, das die Papierenden Kontakt zum Pufferreservoir in der Glasschale hatten und eine Brücke über den Sockel bildeten. Die Glasschale wurde mit 20 x SSC gefüllt, so daß die Papierbrücke sich mit der Lösung vollsaugen konnte und sorgfältig alle Luftblasen zwischen Unterlage und Papier entfernt. Eine Nylonmembran, deren Ränder etwa 1mm über die Ränder des Gels hinausreichten, wurde mit dest. Wasser benetzt und für 5 min in 20x SSC eingelegt. Das Gel wurde mit der Unterseite nach oben auf das Papier gelegt, mit Parafilmstreifen umrandet und mit der feuchten Nylonmembran luftblasenfrei bedeckt. Auf diesen Stapel wurden nun nochmals zwei Whatmannpapierstücke in Gelgröße, die vorher in SSC getaucht wurden, gelegt und ca. 10 cm hoch mit Papierlagen bedeckt, die mit einem 500 g Gewicht beschwert und fixiert wurden. Der Transfer erfolgte für 6-18 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran nach Lufttrocknung in Haushaltsfolie gewickelt und die RNA durch 5 min Bestrahlung in einem UV-Transluminator kovalent an die Membran gebunden.

Radioaktive Markierung der DNA-Sonde durch "random priming"

Die DNA, die als Sonde zur Detektion der mRNA auf der Northern-Blot-Membran verwendet werden sollte, wurde mit Hilfe eines random-primed-DNA-labeling-Kits (Böhringer) radioaktiv markiert. Dazu wurden zwischen 50-200 ng doppelsträngiger DNA von einer Länge von 200 bis 1000 bp in 9 μ l Endvolumen TE-Puffer gelöst und bei 100°C für 10 min denaturiert. Unmittelbar danach wurde die Probe für 5 min auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation wurden je 1 μ l dATP, dGTP und dTTP, 2 μ l 10x Reaktionspuffer, 50 μ Ci α -³²-P-dCTP und 1 μ l Klenow-Enzym zugegeben und die Probe für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 1 μ l 0,5 M EDTA pH 8 abgestoppt. Nach Zugabe von 100 μ l salmon-sperm-carrier-DNA wurde die Probe nochmals 2 min gekocht und dann mit 500 μ l vorgewärmter Quick-Hybe-Hybridisierungslösung (Stratagene) vermischt.

Hybridisierung

Die Quick-Hybe-Lösung (Stratagene) wurde nach kurzem Schütteln für 20 min im Wasserbad bei 63°C vorgewärmt und dann 15-20 ml in eine Hybridisierungsröhre gefüllt. Nach kurzem Anfeuchten der Membran mit destilliertem Wasser wurde diese eingerollt und in die Röhre mit der Quick-Hybe-Lösung gegeben, die die Membran überall benetzen sollte. Die Röhre wurde für 30 min bei 65°C im Rollerofen prähybridisiert und dann die denaturierte radioaktiv markierte Sonde (siehe oben) zugegeben. Es folgte die Hybridisierung für 4 Stunden bei 63°C. Nach Waschen der Membran für 2x 15 min in Waschpuffer 1 (2x SSC, 0,1% SDS) wurde die Membran in Waschpuffer 2 (0,1x SSC, 0,1% SDS) 2x 15 min im Rollerofen inkubiert und schließlich in die Filmexpositions-kassette gelegt. Durch Autoradiografie konnten nun die Signale ausgewertet werden.

5.3. Proteine

5.3.1. Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurden Bakterien des Stammes *E.coli* DH5 α verwendet. Die für die Expression von GST-Proteinen benutzten pGEX-Vektoren (Pharmacia) besitzen einen *LacZ*-Promoter, der die Transkription des GST-Fusions-Gens kontrolliert. Die Expression wird durch IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid) induziert. Die Aufreinigung aus den Bakterienlysaten erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Pharmacia, wobei die GST-Fusionsproteine durch Bindung an eine Glutathion-Sepharose-Matrix (Glutathion-Sepharose 4B) von den anderen bakteriellen Proteinen separiert und dann von der Matrix durch Zugabe von freiem Glutathion eluiert werden

Die das Plasmid mit dem GST-Konstrukt enthaltenden Bakterien wurden in 50 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 220 UpM wachsen gelassen. Diese Übernachtskultur wurde dann in einen Erlenmeyerkolben in 600 ml LB-Medium mit Ampicillin überimpft und für ca. 4 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 weiterwachsen gelassen. Nach Erreichen der gewünschten Dichte der Bakterienkultur erfolgte die Induktion der Transkription des vom *lac-Z*-Promotor kontrollierten GST-Konstrukts durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Nach Wachsen der Bakterien für 4-8 Stunden (abhängig vom gewünschten Protein) bei 25°C und 220 UpM wurde die Kultur für 30 Minuten bei 4°C und 4000UpM in einer Beckmann-Zentrifuge abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 15 ml Lysepuffer (TPE) versetzt mit Proteinseinhemmern (\rightarrow 4.7.) resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, um eine Degradation der Proteine zu vermeiden. Das Lysat wurde dreimal für eine Minute in Intervallen sonifiziert, um die Bakterienwand völlig aufzuschließen und die DNA zu fragmentieren. Die Zellfragmente wurden in der Beckmann-Zentrifuge im SS34 Rotor bei 14000 UpM und 4°C für 30 Minuten herunterzentrifugiert und der Überstand, welcher die löslichen GST-

Fusionsproteine enthielt, mit Glutathion-Sepharosebeads (300-500 µg Beadvolumen) über Nacht bei 4°C auf einem Nutator inkubiert. Die so an der Sepharose immobilisierten Proteine wurden dann einmal mit Lysepuffer und zweimal mit Protein-Waschpuffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung als 1:1 Suspension in Waschpuffer bei 4°C gelagert. Die Integrität, Konzentration und Spezifität der aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurde durch SDS-PAGE (→ 5.3.3.) mit anschließender Coomassie-Blaufärbung (→ 5.3.2.) im Vergleich zu BSA-Standards und mittels Immunodetektion im Westernblot (→ 5.3.3.) verifiziert.

5.3.2. Färben von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine können durch Anfärbung mit Coomassie-Blau auf dem Gel sichtbar gemacht werden. Das Proteingel wurde dafür für 30 min in Coomassie-Blau-Färbelösung gelegt und im Anschluss für 4 h bis über Nacht auf dem Schüttler in Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechseln des Entfärbers gewaschen, bis der überschüssige Farbstoff entfernt und die einzelnen Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

5.3.3. Western-Blot

Der Nachweis exprimierter Proteine wird in Western-Blot-Experimenten geführt. In Zell-extrakten (→ 5.3.4) enthaltene Proteine werden durch SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen (Blotting) und dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dabei wird der Antikörper-Antigen-Komplex durch Zugabe eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht, der an ein Enzym (HRP, horseradish-peroxidase) gekoppelt ist, welches ein Substrat zur Lichtemission anregen kann.

Auftrennung von Proteinen durch eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden Trenngel zwischen 6,5 und 12% Polyacrylamidgehalt mit einem pH-Wert von 9 verwendet. Das 3,75%ige Sammelgel hatte einen pH-Wert von 6,8. Die gewählte Prozentigkeit des Trenngels richtete sich nach der Größe des nachzuweisenden Proteins. Je kleiner das Protein war, um so höherprozentig wurde das Trenngel gewählt. Trenn- und Sammelgelen wurden aus einer 33,9% bzw. 21% Acrylamid/ Bisacrylamid Stammlösung durch Zugabe entsprechender Mengen an Tris-Cl, Wasser, SDS, TEMED und APS gemischt:

	Trenngel				Sammelgel
	6 %	10 %	12 %		
Acrylamid-Bisacrylamid (37.5:1)	5,85ml	9,3ml	11,16 ml	Acrylamid-Bisacrylamid (19:1)	2,25 ml
3 M Tris-Cl pH 9	3,8ml	3,8 ml	3,8 ml	1 M Tris-Cl pH 6,8	1,25 ml
Aqua bidest	19,15 ml	15,7 ml	13,84 ml	Aqua bidest.	6,25 ml
20 % SDS	150 µl	150 µl	150 µl	20 % SDS	50 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	TEMED	15 µl
10 % APS	150 µl	150 µl	150 µl	10 % APS	100 µl

Die Gele wurden zwischen zwei aufrecht stehenden Glasplatten (Grundplatte 18x11,5cm, Ohrenplatte 18 x 9,5 cm), die durch Spacer an den Seiten und unten getrennt waren, gegossen. Die Trenngellösung wurde bis 2 cm unter den oberen Rand der Ohrenplatte gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung und Entfernung des 2-Propanols wurde das Sammelgel gegossen und ein Gelkamm luftblasenfrei eingesetzt, der nach Auspolymerisation des Sammelgels wieder herausgezogen wurde. Anschließend wur-

de das Gel in die Gel-Elektrophoresekammer (Sigma) eingespannt und mit 1× SDS-Page-Laufpuffer befüllt.

Die Proteinproben wurden in 1xLämmli-puffer gelöst und für 5 Minuten bei 100°C gekocht. Jede Kammtasche wurde mit 10-20 µl Probe bzw. mit 10 µl Proteinmarker beladen. Das Gel wurde bei einer konstanten Stromstärke von 36 mA ca. 2,5 h laufen gelassen, bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Elektrophoretischer Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)

Das Blotten erfolgte mit einer Elektroblokkammer von Sigma, die mit SDS-Transferpuffer gefüllt war. Eine Nitrozellulosemembran und 4 3MM-Whatmann-Filterpapierstücke wurden auf Größe des Geles zugeschnitten. Whatmannpapier und 2 Schaumstoffschwämme aus der Blotapparatur wurden in SDS-Transferpuffer äquilibriert, die Nitrozellulosemembran für eine Minute mit destilliertem Wasser befeuchtet. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge im Plastikeinsatz der Blotapparatur luftblasenfrei gestapelt: Schaumstoffschwamm, 2 Lagen Whatmannpapier, Gel, Membran, 2 Lagen Whatmanpapier, Schaumstoffschwamm. Der Blot im Plastikeinsatz wurde in die Blottingkammer in den Transferpuffer so eingesetzt, das die Nitrozellulosemembran in Richtung Anode und das Gel zur Katode zeigte. Der Transfer fand unter konstanter Stromstärke von 560 mA ($0.8A/cm^2$) für 1,5 h statt.

Färbung der Membran mit Ponceau S

Um den Transfer zu kontrollieren, wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min in Ponceau S Lösung geschwenkt und anschließend unter fließendem Wasser solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde die Membran mit PBS-Tween-Puffer wieder entfärbt.

Immundetektion von Proteinen (Immunoblot)

Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Hierzu wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation des Nitrozellulosefilters für mindestens 1 h in Blockingpuffer abgesättigt. Anschließend wurde der erste Antikörper, verdünnt in der gewünschten Konzentration in Blockingpuffer, auf die Membran gegeben. Nach 1- 3 h Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur wurde mit PBST 3 × 10 Minuten gewaschen. Es folgten 45 Minuten Inkubation mit dem sekundären, Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper (1:5000 in PBS-Tween/Blockingpuffer 3:1 v/v verdünnt). Danach wurde der Blot erneut wie oben beschrieben gewaschen und eine ECL (Enhanced Chemoluminescence) Nachweisreaktion durchgeführt. Dazu wurden für 1 Minute 1-5 ml der beiden 1:1 vermischten ECL-Lösungen über den Filter gegeben, dieser anschließend getrocknet, mit Klarsichtfolie umhüllt und in einer ECL-Expositionskassette plaziert. Die Proteinbanden konnten durch Auflegen eines ECL-Hyperfilms autoradiografisch dokumentiert werden.

5.3.4.Gewinnung von Proteinen aus Zell-Lysaten

Um exprimierte Proteine untersuchen zu können, wurden die Zellen durch Wahl entsprechender Lysis-puffer (wie z.B. IKCA-Lysis-puffer) aufgebrochen und größere unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert. Die Zell-Lysate konnten dann verwendet werden, um Proteinexpression nachzuweisen (→5.3.2), in Koimmunpräzipitationsexperimenten Komplexbildung zweier oder mehrerer Proteine zu zeigen (→ 5.3.6.) oder in Kinase-Assays funktionelle Beziehungen zwischen interagierenden Faktoren zu untersuchen (→ 5.3.7.).

Sollten Totalproteinlysate aus Zellen ohne weitere Zwischenexperimente direkt auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert werden, wurde wie folgt vorgegangen:

NIH3T3-Zellen, konfluent oder subkonfluent gewachsen, wurden nach einmaligem Waschen mit PBS mit einer adäquaten Menge 1x Lämmli-puffer versetzt (100 µl Lämmli-puffer pro Ver-

tiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte). Die lysierten Zellen wurden in Eppendorfgefäße pipettiert, für 5 Minuten bei 100°C gekocht, kurz zentrifugiert und anschliessend auf ein Proteingel geladen bzw. bei -20°C gelagert.

5.3.5. Isolierung von Proteinextrakten aus Hefezellen

1ml einer Hefe-Übernachtskultur wurden 1:50 verdünnt in 10 ml frischem YPD-Medium angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 kultiviert. Die Hefezellkultur wurde kurz auf Eis gestellt, zentrifugiert (2300 UpM, 4°C, 3 min), das Pellet zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in ein Eppendorf-Cap überführt. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoffschockgefroren und nach Zugabe von etwa der 5-fachen Menge des Pelletvolumens an Lämmli Puffer für 10 min aufgekocht. Zwischenzeitlich wurde die Probe durch kräftiges Vortexen durchmischt und anschliessend auf Eis gestellt. Zum Aufbrechen der Zellwände wurden säuregewaschene Glasperlen zugegeben und die Caps für 10 min im Vibrax-Schüttler geschüttelt. Nach nochmaligem Aufkochen für 5 min wurden die Lysate erneut zentrifugiert (5000 Upm, 4°C, 3min) und die Überstände mit den gelösten Proteinen in ein neues Cap überführt. Die Proben konnten nun auf ein SDS-Gel geladen oder bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert werden.

5.3.6. Präzipitation- und Koimmunopräzipitation

800 µl Zellysat (→ 5.3.4) (die Proteinkonzentrationen zu vergleichender Ansätze wurden aus identisch ausgesäten Zellkulturansätzen isoliert) wurden in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt und 1 µg Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein zugefügt. Die Proben wurden für 1.5 h auf Eis gestellt, um die Immunpräzipitation löslicher Antigen-Antikörperkomplexe zu ermöglichen. Anschließend wurden 20 µl Protein-A- oder G-Agarose hinzugegeben und die Mixtur für 2 h bei 4 °C auf einem Rotarimischer inkubiert. In dieser Zeit konnten sich unlösliche Komplexe zwischen Fc-Epitop des Antikörpers und den Agarose-Perlen bilden, die durch 1 minütige Zentrifugation bei 150× g sedimentiert wurden. Der Bodensatz wurde 2× mit 1 ml Lysispuffer gewaschen, bevor 30-50 µl 2× Lämmli zugegeben und 5 Minuten bei 100°C gekocht wurde. Die Proben wurden dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und in Western-Blots (→ 5.3.3) auf kopräzipitierte Proteine untersucht.

5.3.7. Kinaseassay

Je nachdem, ob in Zellen selbst überexprimierte Kinasen und Substrate untersucht oder bakterielle GST-Fusionsproteine als Substrate angeboten werden, unterscheidet man *in vivo* und *in vitro*-Kinaseassays. Nach der Zellyse mit dem entsprechendem Lysispuffer (→ 4.7.) und Immunpräzipitation der Kinase (→ 5.3.6.) wurden radioaktiv markiertes ATP und für die *in vitro*-Untersuchung Substrate zugegeben. Je nach Aktivierungszustand ist die Kinase in der Lage, ihr Substrat unter Verwendung des radioaktiven Phosphates zu phosphorylieren. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (→ 5.3.3) kann der Phosphorylierungsgrad des Substrates durch Autoradiografie oder am Phosphoimager qualitativ und quantitativ ausgewertet werden.

Die ersten Schritte bei einem Kinase-Assay waren identisch mit jenen in der Koimmunopräzipitation. Zellen wurden mit IKCA-Lysispuffer lysiert und die zu untersuchenden Proteine mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert (→ 5.3.6.). Das Präzipitat wurde 2× mit 1ml Lysispuffer und 1× mit Kinasepuffer gewaschen. Die Pellets wurden mit 30 µl Kinasepuffer, der die entsprechenden Substrate und pro Reaktion 10 µCi [³²P]-dATP enthielt, vermischt und 30 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 10 µl 5x Protein-Probenpuffer gestoppt, die Proben bei 95°C 5 Min. erhitzt, die Agarosepartikel pelle-

tiert und der Überstand mittels Immunblot mit spezifischen Antikörpern gegen die immunpräzipitierten Proteine analysiert.

5.4. Zellkultur

5.4.1. Aufzucht von NIH3T3 Mausfibroblastenzellen

Bei NIH3T3-Zellen handelt es sich um immortalisierte, embryonale Maus-Fibroblasten. NIH3T3-Zellen können gut mit eukaryotischen Expressionsplasmiden transfiziert werden und exprimieren dann transient bzw. stabil die kodierten Proteine.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Die adhären wachsenden Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS als Monolayerkulturen in T75 Kulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ im Gewebekulturbrutschrank vermehrt. Sobald die Zellen nahezu Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und sie wurden vorsichtig mit 5 ml PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen. Es folgte eine Behandlung mit 3-5 ml Trypsin/EDTA für 2-5 Minuten im Brutschrank. Dadurch lösen sich die Zellen vom Untergrund ab. Durch Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen 1:5 bis 1:10 gesplittet und in neue Kulturflaschen überführt. Nach 24 h in Kultur hatten sich die Zellen angeheftet und das Medium wurde erneuert.

5.4.2. Transiente Transfektion mit Lipofectamin

Für Transfektionsexperimente wurden $0,25 \times 10^6$ Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. In Transfektionsröhrchen wurden pro Ansatz 100 µl DMEM-Medium ohne Serum mit insgesamt 1,5 µg DNA vorgelegt. Diesem Gemisch wurden jeweils 100 µl DMEM mit 6 µl Lipofectamin zugefügt und 30 min stehen gelassen, um das Eindringen der DNA in die Liposomen zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurden die Zellen in den 6-Loch-Platten zweimal mit serumfreien DMEM-Medium gewaschen, um sämtliche Serumrückstände zu beseitigen, die die Transfektionseffizienz erniedrigen können. Schließlich wurden auf die Zellen die 200 µl Lipofektionsgemisch und 800 µl serumfreies DMEM-Medium pro Loch gegeben und die Platten für 5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 5 h Transfektionszeit wurde die Transfektionslösung abgesaugt, die Zellen mit 2ml frischem DMEM-Medium mit Serum pro Loch gefüttert und für 48 h kultiviert.

5.4.3. Immunfluoreszenz

NIH3T3-Zellen wurden wie oben beschrieben in 6-Loch-Platten mit Lipofectamin transfiziert. Um eine für die Immunfluoreszenz zu hohe Zelldichte zu vermeiden wurden die Zellen nach 24 h in Kultur mit 800 µl Trypsin/EDTA trypsinisiert. (→ 5.4.1) 200 µl der Zellsuspension wurden in eine neue 6-Lochplatte auf sterile Deckgläschen (rund, Durchmesser 8 mm) ausgesät und für weitere 24 h kultiviert. Die restlichen 600 µl Zellsuspension wurden nach Zugabe von 2 ml frischem DMEM-Vollmedium pro Loch ebenfalls für 24 h weiterkultiviert, um Proteinlysate zur Kontrolle der Transfektionseffizienz herzustellen. Zur immunzytochemischen Anfärbung intrazellulärer Proteine wurden die Zellen auf den Deckgläschen in den 6-Loch-Platten nach Absaugen der Mediums zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschliessend mit 800 µl 3,7% Paraformaldehyd in PBS für 20 min bei 4°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen durch Inkubation für 4 min mit

800 μ l 0,2% TritonX-100 in PBS. Nach nochmaligem Wiederholen des Waschschrittes und sorgfältigem Absaugen des PBS rund um die Deckgläschen wurden auf jedes Deckgläschen 50 μ l vom spezifischen Antikörper (in der gewünschten Konzentration in PBS mit 1% FCS verdünnt, meist in Konzentrationen zwischen 1-2.5 μ g/ml) pipettiert und die Platten für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Handelte es sich dabei um einen mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper (z.B. anti-Myc-FITC) erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Wurde ein sekundärer, fluoreszenzfarbstoffmarkierter Antikörper verwendet, der spezifisch das Fc-Epitop des primären Antikörpers erkennt, erfolgte nach Abwaschen des primären Antikörpers mit PBS der Einsatz wie oben beschrieben und eine Inkubation für 1 h im Dunkeln.

Dann wurde dreimal mit PBS und einmal mit bidestilliertem Wasser gewaschen, um Salzablagerungen zu entfernen. Objektträger wurden mit jeweils einem Tropfen Moviol (Harlow and Lane, 1988) benetzt, die Deckgläschen kopfüber mit den Zellen nach unten daraufgegeben und so in das Kunstharz eingebettet. Das Moviol härtete über Nacht aus und die Objektträger wurden bei 4°C im Dunkeln bis zur Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop gelagert. Durch die Einbettung im Kunstharz Moviol und das darin enthaltene DABCO, welches das Ausbleichen der Färbung reduziert, sind die Objekte so für Monate stabil.

5.5. Hefe-Two-Hybrid-System

Das *Yeast-Two-Hybrid-System* (YTH-System) ist ein hochsensitives *in vivo* Assay, um Protein-Protein-Interaktionen im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* zu detektieren. Das Prinzip des erstmals von Fields und Song beschriebenen Systems [Fields und Song 1989] beruht auf der Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transaktivierungsdomäne, was zur Expression von Reportergenen in der Hefe führt. (→ Abb.6) [Fields und Sternglanz 1994; Licitra und Liu 1996; Leanna und Hannink 1996; Shih et al.1996; Vidal et al. 1996 1 und 2; Broder et al.1998]. Die cDNAs der auf ihre Interaktion zu testenden Proteine (*Bait* und *Prey*) müssen in Hefeexpressionsplasmide kloniert sein und nach Transformation in den *Two-Hybrid* Hefestamm als Fusionsproteine mit der DNA-bindenden Domäne (DB) oder der Transaktivierenden Domäne (TA) des Gal-4 Transkriptionsfaktors exprimiert werden. (→ Abb.7) Der Two-Hybrid-Hefestamm enthält die Reportergene *lacZ* (β -Galaktosidase) und *HIS3* unter der Kontrolle eines Gal4-responsiven Promotors (*UAS, upstream activating sequence*). Bei Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* wird der Gal4-Transkriptionsfaktor durch Interaktion seiner Aktivierungs- und Bindungsdomäne wieder funktionstüchtig und kann an den Promotor binden, was zur Expression von β -Galaktosidase (LacZ) und Histidin führt

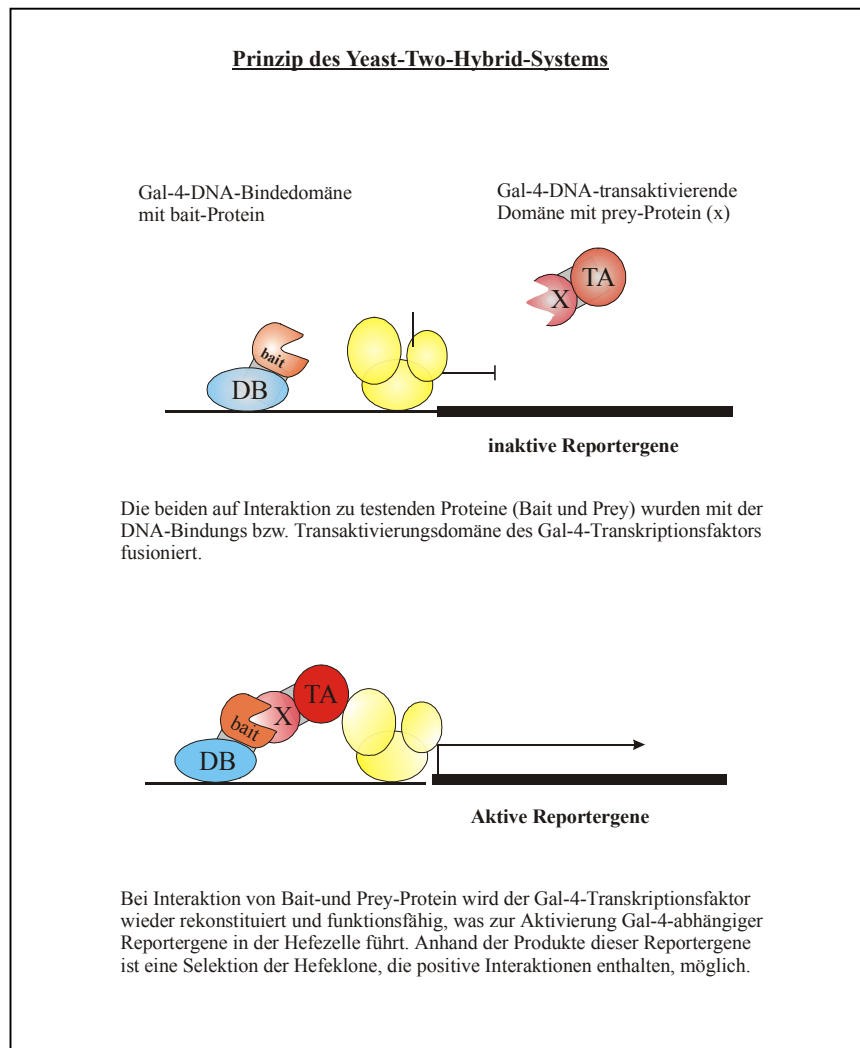


Abb 6: Prinzip des *Yeast-Two-Hybrid-Systems* [nach C.Hagemann 1999]

5.5.1. *Yeast-Two-Hybrid-Screen*

Mit Hilfe des YTH-Systems ist es möglich, cDNA-Expressionsbibliotheken zu durchsuchen um in der Hefe neue Proteine (*Prey*- oder Beute-Proteine) zu identifizieren, die mit einem *Bait*- (Köder)-Protein in Wechselwirkung treten können (Abb.6). In YTH-Screens verwendete Hefestämme sind für die Synthese verschiedener Aminosäuren auxotroph, die als Selektionsmarker dienen, d.h. die entsprechenden Gene, um auf Mangelmedien wachsen zu können, fehlen dem Wildtyp-Hefestamm und müssen ihm nach Transformation vom *Bait*- bzw. *Prey*-Plasmid zur Verfügung gestellt werden. Der Hefestamm Y190 z.B. ist auxotroph für die Synthesen der Aminosäuren Leucin und Tryptophan. Das *Bait*-Plasmid pAS2-1 trägt als Selektionsmarker ein Gen, das den defekten Tryptophan-Syntheseweg von Y190 repariert, das *Prey*-Plasmid pACT-2 das entsprechende Gen für den Leucin-Syntheseweg. Durch entsprechende Wahl der Kulturmedien kann man so nach Transformation der Hefe mit den Plasmiden auf das Vorhandensein beider Plasmide in der Hefezelle selektieren. Im Hefestamm Y190 ist auch das endogene HIS3-Gen zerstört, erst nach Aktivierung des GAL-4 abhängigen HIS3-Reportergens nach Interaktion beider jeweils mit DB und TA fusionierten Proteine können die Hefen auf Histidin-Mangelmedium wachsen. So lassen sich durch Wachstumsselektion Hefeklonen mit Protein-Protein-Interaktionen detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das *Bait*-Plasmid (pAS2-1 DJNK) und die *Prey*-Plasmide einer cDNA-Bibliothek (Clon-

tech *Matchmaker* embryonale *Drosophila melanogaster* c-DNA Expressionsbibliothek) im Hefe-Expressionsplasmid pACT-2) in die Hefe (Hefestamm Y190) transformiert. Hefezellen, die das *Bait* oder *Prey*-Protein exprimieren, können entsprechend dem im jeweiligen Plasmid kodierten Selektionsmarker auf -Leu oder -Trp-Mangelmedium wachsen, auf -Leu/-Trp/-His-Mangelmedium jedoch nur, wenn die exprimierten Fusionsproteine miteinander interagieren, weil nur dann das Histidin-Reportergen exprimiert wird.

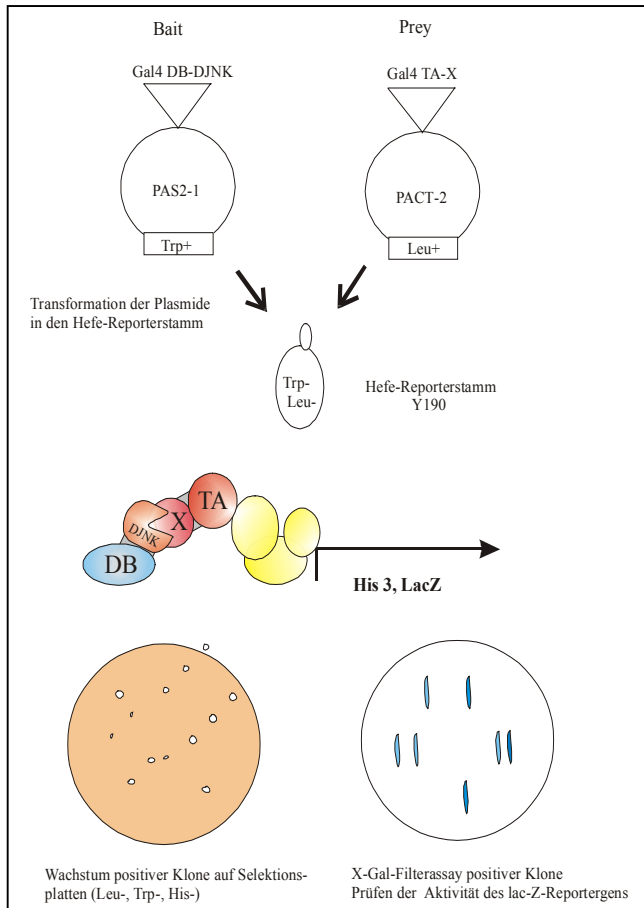


Abb.7: Schema eines *Yeast-Two-Hybrid-Screens*.

Die auf Interaktion zu testenden Proteine (*Bait* und *Prey*) werden in Hefe-Expressionsplasmiden in Fusion mit der DNA-Bindungs-Domäne (DB) bzw. Transaktivierenden Domäne (TA) des Gal4-Transkriptionsfaktors in den Hefestamm (Y190) transformiert. Nur bei Interaktion beider Proteine kommen DB und TA in räumliche Nähe, der Gal4-TF wird rekonstituiert und funktionsfähig, was zur transkriptionellen Aktivierung der Gal4 abhängigen Reportergene *His3* und *LacZ* führt. Wird das Hefegen *His3* exprimiert, können die positiven Transformanten auf Selektionsmedien ohne Histidin wachsen, bei Expression des *E.coli*-Gens *LacZ* (β -Galactosidase) kann x-Gal gespalten werden, was durch der Blaufärbung der positiven Klone nach Substratgabe (X-Gal-Filter-Assay) nachweisbar ist.

Dazu wurde zunächst das *Bait* pAS2-1 DJNK in Y190 transformiert und auf Selektionsplatten (-Trp) wachsen gelassen. Ein erster X-Gal Assay der gewachsenen Hefeklone (\rightarrow 5.5.4.) zeigt, ob das *Bait*-Protein exprimiert wird. Gleichzeitig wird so kontrolliert, ob es allein eine Reporteragenaktivierung hervorrufen kann, was zu falsch positiven Ergebnissen führen würde. Bleibt die Kontrolle negativ, kann der eigentliche Screen durchgeführt werden.

Der das *Bait*-Protein exprimierende Hefestamm wird mit einer cDNA-Bibliothek transformiert (\rightarrow 5.5.3) und auf Selektionsmedium (-Trp,-Leu,-His) gegeben. Die wachsenden Klone werden mit dem X-Gal Filterassay (\rightarrow 5.5.4) auf Aktivität des β -Galctosidase-Reporters getestet. Anschließend läßt man die positiven Klone das *Bait*-Plasmid verlieren (\rightarrow 5.5.4). Da es möglich ist, daß das *Prey* auch ohne *Bait* die Reportergene aktivieren kann, schließt sich nun ein weiterer X-Gal-Test an, bei dem alle in dem Falle falsch positiven Klone aussortiert werden. Die cDNAs der *Prey*-Proteine können dann durch Sequenzierung identifiziert werden (\rightarrow 5.2.3.). In direkten Two-Hybrid Tests (\rightarrow 5.5.3.) wird die Interaktion von *Bait* und *Prey* noch einmal bestätigt, bevor durch Koimmunpräzipitationsexperimente, Kinase-Assays (\rightarrow 5.3.6.) oder andere Methoden die Interaktion durch eine andere biochemische Methode verifiziert und versucht werden kann, die physiologische Funktion der identifizierten Wechselwirkung aufzuklären

5.5.2.Titerbestimmung und Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Um eine cDNA-Expressionsbibliothek mit einem *Two-Hybrid Screen* durchsuchen zu können, müssen die enthaltenen cDNAs meist, um genug Material vorliegen zu haben, durch Transformation in *E.coli* amplifiziert werden. Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C wird zunächst der Titer (cfu (*colonie forming units*)/ml), die Zahl der in der Bibliothek enthaltenen unabhängigen Klone der cDNA-Bibliothek bestimmt. Für einen *Two-Hybrid Screen* sollte dieser etwa $< 10^8$ cfu/ml betragen. Zur Titerbestimmung werden zwei Verdünnungen der Originalglycerinkultur der Bibliotheken hergestellt: A) 1:10³ und B) 1:10⁶. 1 µl der Verdünnung A und 50 bzw. 100 µl der Verdünnung B wurden in 50 µl Medium auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte ausgestrichen. Um bei der Amplifikation 2-3 x die Anzahl der unabhängigen Klone in der Bibliothek zu erhalten, wurde entsprechend dem Titer ein bestimmtes Volumen der Glyceroldauerkulturen so mit LB-Medium verdünnt, daß auf jeder der etwa 150 Agarplatten von 150 mm Durchmesser ca. 50000 Kolonien/Platte wuchsen (20 h, 37°C).

Das Wachsen der Transformanten auf festem Medium soll die ungleichmäßige Amplifikation einzelner Klone minimieren. Pro Platte wurden 2 ml LB-Medium zugegeben und die Klone mit einem Zellschaber abgekratzt. Sie wurden in eisgekühlten Zentrifugenbechern gesammelt. Insgesamt betrug das Volumen der Bakteriensuspension 2 l, welche nach dem Abschaben noch 2 bis 4 h bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde eine Plasmid-DNA-Präparation im großen Maßstab (Quiagen-Mega-Plasmid-Purification-Kit) durchgeführt, wobei die Volumina der verwendeten Lösungen dem großen Volumen des hier vorliegenden Zellpellets angepaßt wurden. Die DNA wurde mit Tris (10 mM, pH 8) gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde der Reinheitsgrad der DNA und das Vorkommen eventuell noch enthaltener RNA überprüft.

5.5.3. Transformation und Two-Hybrid-Tests

Transformation mit Plasmiden (small scale)

Eine Hefekolonie wurde für eine Übernachtkultur in 50 ml YEPD Medium inokuliert und im Wasserbadschüttler bei 30°C kultiviert. Jeweils 1 ml dieser Zellkultur wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß gegeben und 5 Sekunden in der Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 50-100 µl abgenommen. Im verbliebenen Medium wurde das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl Carrier-DNA und ca. 1 µg Plasmid-DNA (~1-3 µl) hinzugefügt und gut gevortext. Bei Carrier-DNA handelt es sich um unspezifische, einzelsträngige DNA aus Lachs-Sperma (Gibco), die im Transformationsansatz die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Hefezellen unterstützt. Es folgte die Zugabe von 0,5 ml Plate-Mixture und von 20µl DTT (1M), zwischendurch wurde der Transformationsansatz immer wieder gemischt. Die Eppendorf-Gefäße wurden anschließend für 6-8 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 10 minütigen Hitzeschock von 42°C wurden 200 µl Zellen in Bodennähe des Reaktionsgefäßes entnommen und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30°C, bis nach ca. 3 Tagen Klone sichtbar wurden.

Direkte Two-Hybrid-Tests

Bait- und *Prey-*Plasmide zweier bekannter Proteine wurden gemeinsam in Y190 transformiert.(→ 5.5.3) Die Transformanten wurden zunächst auf -Leu/-Trp-Kulturplatten herangezogen, bevor Nitrozellulosefilter für X-Gal Filtertests auf -Leu/-Trp/-His Kulturplatten gelegt wurden. Auf diese Filter wurden dann mit sterilen Zahnstochern einzelne Kolonien linienförmig ausgestrichen. Die Kulturschalen mit den Filtern wurden über Nacht bei 30°C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag war Wachstum (Protein-Protein-Interaktion) gut von Nichtwachstum (keine Wechselwirkung) unterscheidbar und es wurde zur Absicherung der Ergebnisse ein X-Gal Assay durchgeführt.

3-AT-Titration

Der verwendete Hefestamm Y190 gilt zwar als auxotroph für das Histidin-Reportergen, kann aber teilweise trotzdem in Histidinmangelmedium wachsen. Um Histidin als Selektionsmarker verwenden zu können gibt man daher den kompetitiven Inhibitor des Hefe HIS3-Proteins 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) ins Selektionsmedium. In bestimmter Konzentration unterdrückt 3-AT das Hintergrundwachstum nichttransformierter Y190-Klone auf –His-Platten. Da die optimale 3-AT-Konzentration vom transformierten Plasmid im Hefestamm abhängt und eine zu hohe Konzentration frisch transformierte Hefezellen abtöten kann, muß die optimale 3-AT-Konzentration für jedes in Y190 transformierte *Bait*-Plasmid ermittelt werden. Dafür wurden mit pAS21DJNK transformierte Y190 Hefezellen auf -Trp/-His-Selektionsmedium-Platten, die jeweils 3-AT in den Konzentrationen von 25, 35, 45, 55 und 60 mM enthielten ausplattiert und bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Die niedrigste 3-AT Konzentration, bei der nach 1 Woche Inkubationszeit nur kleine Kolonien unter 1mm Durchmesser wachsen konnten, wurde als optimale Konzentration für das jeweilige *Bait* Protein im weiteren für die Selektion verwendet, im Falle von DJNK betrug die optimale 3-AT-Konzentration 35 mM.

Transformation von Y190 für YTH-cDNA-Bibliothek Screens (large scale)

Die Transformation erfolgte nach Anleitung des "Clontech Matchmarker GAL4 Two-Hybrid User Manuals". Die Transformation des *Bait*-Plasmids und der Bibliotheksplasmide erfolgte sequenziell, d.h. der Hefestamm Y 190 wurde zuerst mit dem pAS21DJNK transformiert (*small scale*, → 5.5.3). Selektionierte Transformanten wurden herangezogen und dann in einem zweiten Transformationsschritt mit den Bibliotheks-*Prey*-Plasmiden transformiert. Kolonien, die mögliche Wechselwirkungen zwischen *Bait* und *Prey* anzeigen, erschienen nach ca. 6-10 Tagen Inkubation im 30°C Brutschrank.

Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 10 µl, 20 µl und 50 µl Aliquots der transformierten Zellsuspension auf -Leu/-Trp-Platten ausgestrichen und bei 30°C für 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Hefekolonien wurden gezählt und auf das Volumen des Gesamtansatzes sowie auf die Menge der insgesamt eingesetzten Bibliotheks-cDNA hochgerechnet. Diese Werte geben die Zahl der insgesamt gescreenten Transformanten bzw. die Transformationseffizienz pro µg DNA an.

5.5.4. X-Gal-Filter-lift-Assay (Lac-Z-Assay)

Nitrozellulosefilter (Hybond™-C Extra, Amersham) wurden auf die entsprechenden Selektionskulturschalen gelegt und zu testende Y190-Kolonien auf ihnen ausgestrichen. Die Hefen wurden über Nacht bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Filter mit nach oben weisender Kolonieseite in flüssigen Stickstoff getaucht, wodurch die Zellen aufbrachen und dann bei Raumtemperatur kurz aufgetaut.

In leere Kulturschalen wurde je 1,8 ml Z-Puffer/X-Gal-Mix gegeben. Ein Whatman-Rundfilter wurde hineingelegt und auf seine Oberfläche mit nach oben zeigender Kolonieseite der aufgetaute Nitrozellulosefilter aufgelegt. Die Petrischale wurde mit Parafilm abgedichtet und bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Nach 30 Minuten, 4 h und 12 h wurde auf Blaufärbung kontrolliert. Dabei gibt der Zeitpunkt des Auftretens einer ersten Blaufärbung einen groben Hinweis auf die Stärke der Wechselwirkung (30 Minuten = starke, 4 h = mittlere und 12 h = schwache Interaktion). Die Filter wurden unter dem Abzug getrocknet und aufbewahrt.

5.5.5. *Bait*-Elimination/Cycloheximid-Gegenselektion

Unter im lacZ-Test positiven Kolonien können sich falsch Positive befinden, wenn das *Prey*-Protein beispielsweise allein an die DNA binden kann und dadurch auch ohne Wechselwirkung mit dem *Bait*-Protein die Reportergene zur Expression angeregt werden. Falsch positive Zellen können identifiziert werden, indem man durch geeignete Selektionsbedingungen die Hefe veranlaßt, das *Bait*-Plasmid zu verlieren und nur noch das *Prey*-Protein zu exprimieren. Alle Kolonien mit wirklicher Wechselwirkung zwischen *Bait*- und *Prey*-Protein sollten im lacZ-Assay nach Zugabe von X-Gal weiß bleiben, die falsch positiven weiter blaue Färbung zeigen. Hefestämme wie CG-1945 und Y190 tragen das *cyh*^r2 Mutantenallel und sind damit Cycloheximid resistent. Das Wildtyp-Gen *CYH*^S2 ist *cyh*^r2 gegenüber dominant. Wird ein solcher Hefestamm mit einem Plasmid wie pAS2.1 transformiert, welches das Wildtyp-Gen *CYH*^S2 kodiert, wird der Stamm Cycloheximid-sensitiv. So kann man Hefezellen selektieren, die spontan das *CYH*^S2-tragende *Bait*-Plasmid verloren, das *Prey*-Plasmid aber behalten haben, indem man die Kotransformanten auf Cycloheximid-haltigen Selektionsplatten ohne Leucin ausstreicht. Von jedem zu testenden Kotransformanten (*Cyh*^S) wurde eine 1-3 mm große Kolonie gepickt und in 200 µl sterilen Wasser resuspendiert. 100 µl davon sowie 100 µl einer 1:100 Verdünnung wurden auf -Leu/+Cycloheximid Platten (10 µg/ml für Y190) ausgestrichen und die Platten für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert, bis individuelle *Cyh*^R-Kolonien erschienen. Zur Kontrolle wurden die Klone nochmals auf -Trp und -Leu Selektionsplatten aufgetragen. Klone, die nur noch das *Prey*-Protein enthielten, sollten nur noch auf Tryptophanmangelmedium, aber nicht mehr auf Leucinmangelplatten wachsen können und im lacZ-Färbetest weiß bleiben. Von diesen sogenannten echt positiven *Cyh*^R-Segreganten konnte das *Prey*-Plasmid isoliert werden.

5.5.6. DNA-Gewinnung, Sequenzierung und Identifikation

Plasmid-DNA-Gewinnung aus Hefe

1,5 ml einer Hefe-Übernachtskultur wurden 10 Sekunden bei 12.000 × g in der Tischzentrifuge sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 100 µl Glasperlen für 5 Minuten im IKA-Vibrax geschüttelt. Nach erneuter Zugabe von 100 µl STET-Puffer wurde der Ansatz gevortext und für 3 Minuten bei 100°C gekocht. Nach Abkühlung auf Eis und 10 minütiger Zentrifugation bei 4°C (12.000 × g) wurden 100 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt, welches bereits 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat enthielt. Es folgten 30 Minuten Inkubation bei -20°C und 10 Minuten Zentrifugation (12.000 × g) bei 4°C. 100 µl des Überstandes wurden zu 400 µl vorgekühltem 100%igem Ethanol gegeben, gemischt, 5 Minuten auf Eis gestellt und dann 10 Minuten mit 12.000 × g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 10-20 µl 1× TE gelöst. Zur weiteren Amplifikation wurden auf diese DNA-Lösung 200 µl ultrakompetente DH5α gegeben und mit den Hefepiasmiden transformiert. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurden Plasmidpräparationen durchgeführt.

Identifikation von cDNA-Sequenzen durch computergestützten Datenbankvergleich

DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der Blast-Search-Funktion des



im World Wide Web des Internet identifiziert.

6. Ergebnisse

6.1. Klonierung der *Two-Hybrid*-Konstrukte, Test auf Expression in der Hefe und Funktionalität im *Two-Hybrid-Assay*

Als Köderprotein (*Bait*) für den *Two-Hybrid-Screen* wurde die *Drosophila melanogaster* c-Jun-N-terminale Kinase DJNK (*basket*) verwendet. Dazu wurde die vollständige cDNA mittels PCR in das Gal-4-BD-Plasmid pAS2-1 kloniert (→ 4.4.) und die Korrektheit der Klonierung durch Sequenzierung kontrolliert. Die Expression des DJNK-Proteins in Y190-Hefezellen wurde mittels Westernblot analysiert und in direkten *Two-Hybrid*-Tests durch Interaktionstests zwischen DJNK und dem murinen Scaffold-Protein JIP-1 (JNK-interacting-Protein1) getestet. (→ 6.3., vgl. Abb.8, Positivkontrolle)

6.2. Screen einer embryonalen *Drosophila melanogaster* cDNA-Expressionsbibliothek

Die beschriebenen Effekte des DJNK-Signalweges in *Drosophila*, die zum sogenannten „*dorsal closure*“ Phänotyp führen, zeigen sich während der Embryonalentwicklung der Fliegen. Aus diesem Grund wurde für die Suche nach neuen Interaktionspartnern für DJNK eine embryonale *Drosophila melanogaster* cDNA Expressionsbibliothek verwendet.

Insgesamt wurden 8.23×10^6 Klone gescreent. Von ursprünglich 172 Histidin- und LacZ-positiven Klonen wurden 44 Klone als positiv gewertet, da der Histidin- und LacZ- positive Phänotyp in Abhängigkeit von der Präsenz des DJNK enthaltenden *Bait*-Plasmids in der Hefezelle bestand.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Analyse von Gen- und Proteinstruktur und Funktion des als p150-Spir (→ 6.3.) bezeichneten identifizierten neuen Interaktionspartners von DJNK.

6.3. Identifizierung der Exon-Intron- Struktur des *spir*-Gens

Vier der im *Two-Hybrid-Screen* gefundenen Klone, die mit DJNK interagierten, hatten identische Nukleotidsequenzen, die sich nur in der Länge der isolierten cDNA-Sequenz unterschieden. Alle 4 Klone zeigten eine stark positive Reaktion in *lac-Z*-Reportergentest auf die Fähigkeit, x-Gal zu spalten. (→ 5.5.4.) Eine Blaufärbung trat bereits nach 30 Minuten auf. Diese Interaktion war mit DJNK und Säuger-JNK- (getestet an Ratten-JNK2) und in geringerer Stärke auch mit Säuger-p38 nachweisbar, aber nicht mit Säuger-ERK2. (→ Abb. 8)

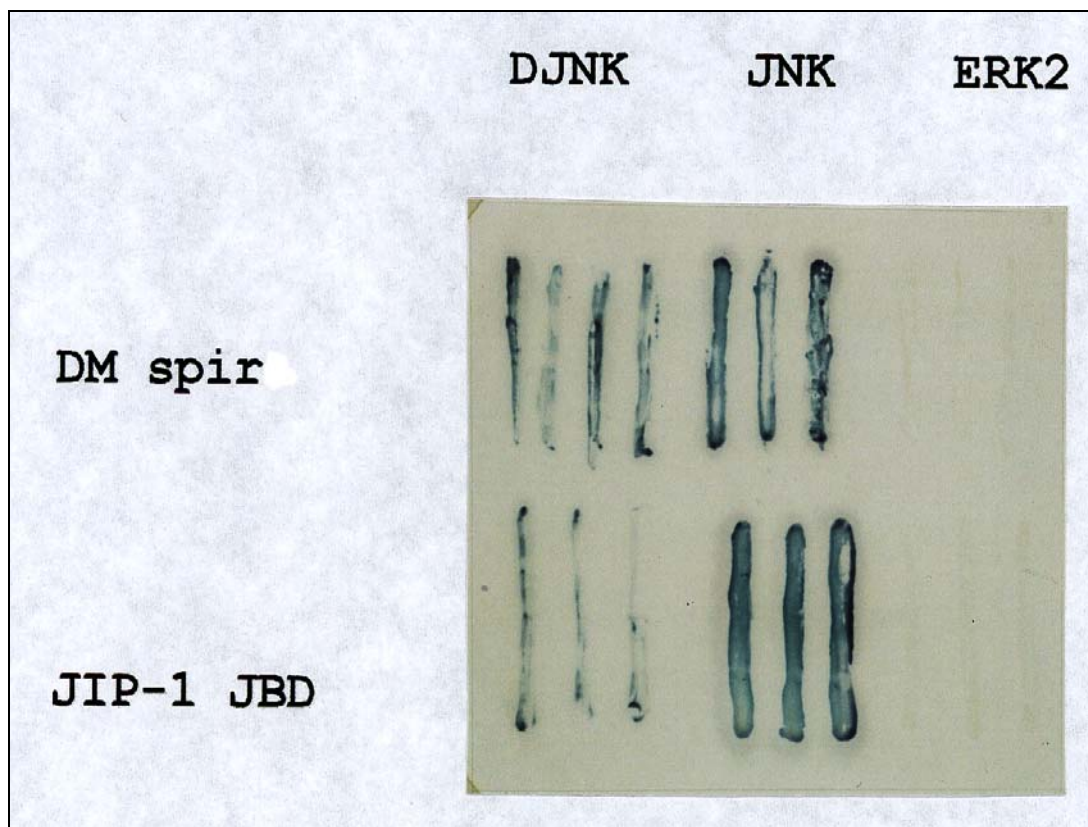


Abb.8 : LacZ-Assay: Abgebildet ist ein Filter mit Hefeklonen, in denen die Interaktionen von einem der isolierten cDNA-Klone, hier als Spir bezeichnet, mit verschiedenen Proteinen getestet wurde. Bei Interaktion zwischen den Proteinen kommt es zur Aktivierung des *lac-Z*-Reportergens, was sich in der Blaufärbung der positiven Klone nach Gabe des Substrats x-Gal zeigt. Spir (DM spir) interagiert mit DJNK (pAS2-1DJNK), JNK-2 (pAS2-JNK2), aber nicht mit ERK2 (pAS2-ERK2). Als Positivkontrolle wird die Interaktion von DJNK (pAS2-DJNK) und JNK2 (pAS2-JNK2) mit der JNK-bindenden Domäne (JBD) von murinem JIP-1 (pACT-2JIP-1) gezeigt.

Zeitgleich fand die Arbeitsgruppe von Lynn Manseau (University of Arizona) einen cDNA-Klon identischer Sequenz. Die loss-of-function-Mutation des Gens *spire* (*spir*) führt in Fliegenembryonen zu einem letalen Phänotyp, weshalb der im Two-Hybrid-Screen gefundene Interaktionspartner für DJNK im folgenden als p150-Spir bezeichnet wird. [Wellington et al 1999] Bei den im Two-Hybrid Screen isolierten cDNA-Klonen handelte es sich nicht um die vollständige für p150-Spir codierende Sequenz, sondern um eine Teilsequenz, die bis zum Stopcodon reichte, der aber das Startcodon am 5'-Ende fehlte. Nach Sequenzierung der DNA und Translation in die Aminosäuresequenz zeigten die Klone offene Leserahmen von 171, 119, 60 bzw. 53 Aminosäuren. Der kodierende Bereich des kürzesten cDNA-Klons, dessen Protein noch mit JNK interagiert, umfasste die letzten carboxyterminalen 53 Aminosäuren von p150-Spir.

Vergleiche der isolierten cDNA-Sequenzen mit genomischen DNA-Datenbanken führten zur Identifikation des genomischen *Drosophila*- P1-Phagenklons DS05187. Eine computergestützte Exon-Intron-Analyse der Sequenz des genomischen Klones ließ mit hoher Wahrscheinlichkeit die Lokalisation der gefundenen Klone in einem Exon vermuten. Auf Grund des Vergleichs der genomischen Sequenz mit EST (expressed-sequence-tags)-Datenbanken wurden 4 cDNA-Klone gefunden, welche möglicherweise den vollständigen offenen Leserahmen des Gens enthalten. Die Klone wurden bestellt und ihre DNA-Sequenzen analysiert. Sequenzvergleiche zwischen den cDNA-Sequenzen und der genomischen Sequenz zeigten, daß die cDNA-Klone die gesamte kodierende Sequenz des p150-*spir*-Gens umfassten. So konnte die komplette Exon-Intron-Struktur des Gens ermittelt und in die Aminosäuresequenz des p150-Spir-Proteins translatiert werden. Das p150-*spir*-Gen besteht aus 17 Exons und besitzt einen offenen Leserahmen von 1020 Aminosäuren. (→ Abb.9) Die komplette DNA und Proteinsequenz befindet sich im Anhang.

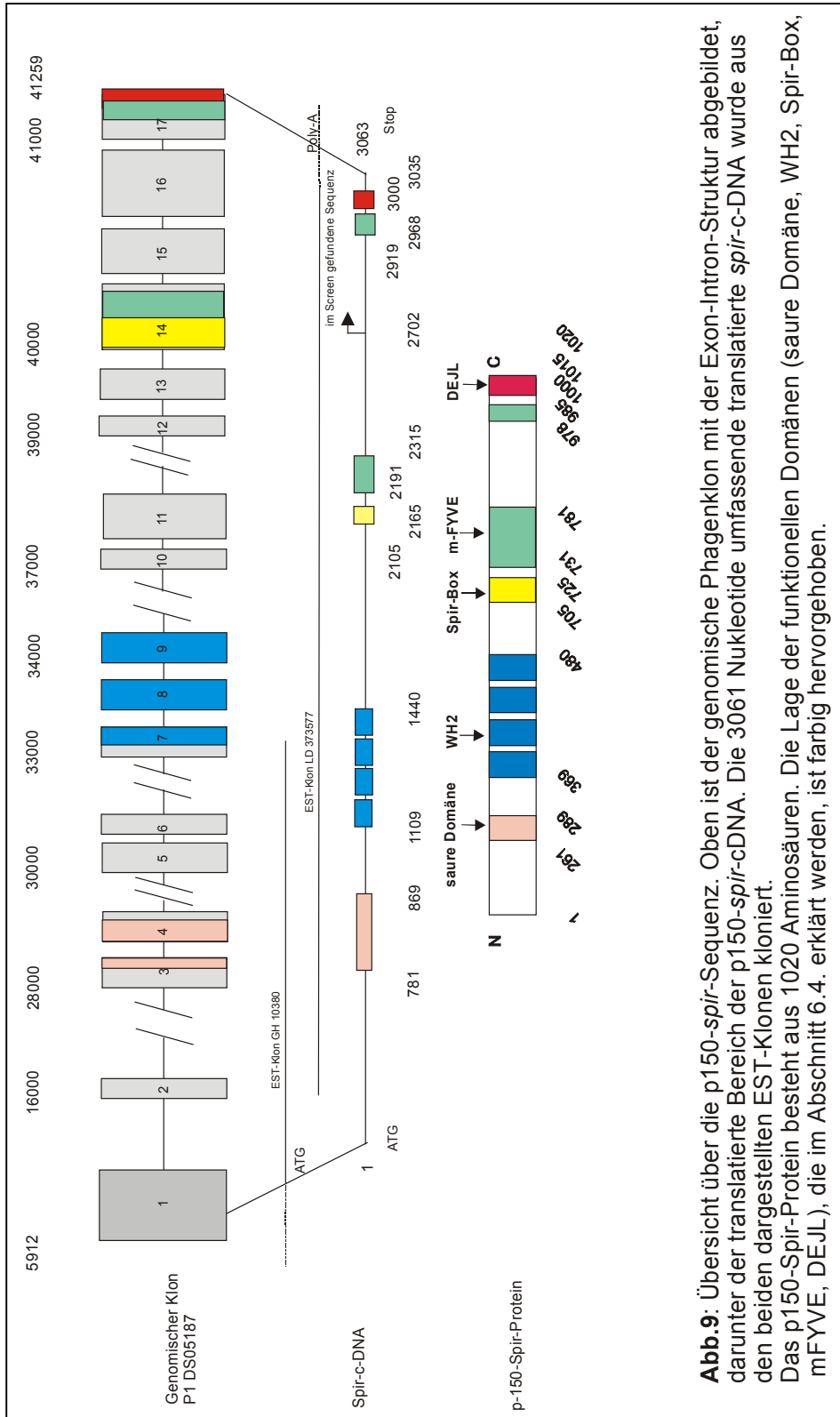


Abb.9: Übersicht über die p150-*spir*-Sequenz. Oben ist der genomische Phagenklon mit der Exon-Intron-Struktur abgebildet, darunter der translatierte Bereich der p150-*spir*-cDNA. Die 3061 Nukleotide umfassende translatierte *spir*-c-DNA wurde aus den beiden dargestellten EST-Klonen kloniert. Das p150-Spir-Protein besteht aus 1020 Aminosäuren. Die Lage der funktionellen Domänen (saure Domäne, WH2, Spir-Box, mFYVE, DEJL), die im Abschnitt 6.4. erklärt werden, ist farblich hervorgehoben.

6.4. Domänenstruktur von p150-Spir

p150-Spir ist ein Multidomänenprotein, das in seiner aminoterminalen Hälfte vier aufeinanderfolgende WH2 (*Wiskott Aldrich Protein Homology Domain 2*) Domänen besitzt. (→7.2.) WH2-Domänen binden monomeres Aktin. Proteine der sogenannten WH2-Protein-Familie wie WASP (*Wiskott Aldrich Syndrom Protein*) oder WAVE sind an der Reorganisation von Aktinstrukturen beteiligt.

Eine weitere im Protein enthaltene Domäne ist eine modifizierte FYVE-Zinkfinger-Struktur (mFYVE) mit 8 Cysteinen im zentralen Bereich des Proteins. FYVE-Zinkfinger (der Name leitet sich von den ersten beschriebenen Proteinen mit diesen Domänen Fab1, YGLO23, Vsp27 und EEA1 ab) binden das Membranlipid Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns-3-P) und vermitteln so eine Interaktion zwischen FYVE-Domänen enthaltenden Proteinen und Membranstrukturen. FYVE-Domänen-Proteine sind in zelluläre Vesikeltransportprozesse involviert. Die FYVE-Domänenstruktur in p150-Spir zeigt im Vergleich zu den bekannten FYVE-Domänen einige Unterschiede, weshalb sie als modifizierte FYVE-Domäne (mFYVE) bezeichnet wird. Neben einer Insertion von 197 Aminosäuren zwischen dem 6. und 7. Cystein, die in variierender Länge in allen Spir-Proteinen vorkommt (→ vgl. 7.4., Abb.27), fehlt im FYVE-Zinkfingermotiv der Spir-Proteine eine in der klassischen FYVE-Domäne enthaltene Folge von basischen Aminosäuren, die für die Bindung von PtdIns-3-P essentiell sind. Vermutlich bindet die mFYVE-Domäne in p150-Spir andere Substrate. (→ 7.3.).

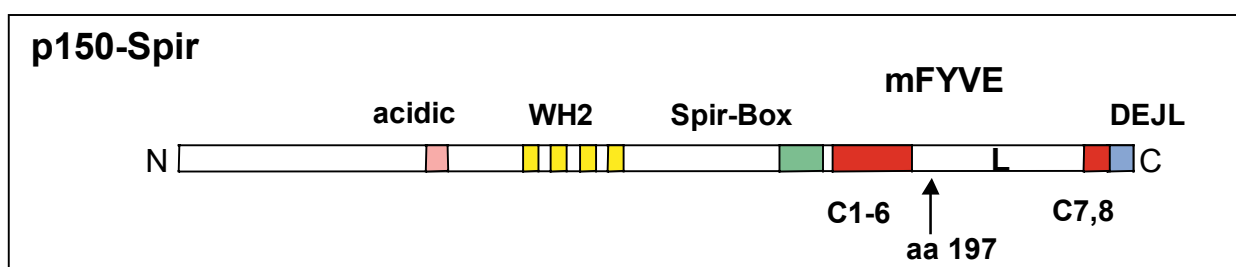


Abb.10: Proteindomänenstruktur von p150-Spir. Das Protein besitzt ein N-terminales saures Sequenzmotiv (acidic domain), vier WH2-Domänen, eine in allen Spir-Proteinen konservierte Spir-Box, eine modifizierte FYVE-Domäne (-FYVE) mit einer Insertion (L) von 197 AS zwischen den Cysteinen 6 und 7 und ein C-terminales DEJL-Motiv. (→ 7.4.)

Weitere auffällige Sequenzmotive sind eine Folge saurer Aminosäuren vor den WH2-Domänen (*acidic domain*, AD) und eine Domäne, die für alle bisher gefundenen Spir-Proteine charakteristisch ist, bezeichnet als Spir-Box, siehe dazu Kapitel 7.4.

Am C-terminalen Ende von p150-Spir befindet sich die in den im Screen gefundenen Klonen enthaltene Sequenz, ein DEJL-Motiv (*Docking Site for Erk and Jnk, LxL*) DEJL-Motive bestehen aus einer aminoterminal gelegenen Folge basischer Aminosäuren, der sich eine L/I-X-L/I-Sequenz anschließt. (→ Abb.11) Sie wurden als Bindungsdomänen für MAPkinasen, wie JNK und Erk beschrieben, die die Interaktion der Kinasen mit Regulatorproteinen oder ihren Substraten vermitteln (→ 7.1.) [Jacobs et al.1999] In p150-Spir bilden die carboxyterminalen Aminosäuren 997-1014 mit der Sequenz KQKRSSARNRTIQNLTD das DEJL-Motiv.

p150-Spir	990	NEITSSVKQRSSA <u>R</u> <u>N</u> <u>R</u> TIQN - <u>L</u> <u>T</u> <u>L</u> DLTPVWK	1020
d-MEK		MS <u>K</u> <u>N</u> <u>K</u> LN - - - <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> PP	
h-JNK1		QG <u>K</u> <u>R</u> <u>K</u> A - - - - <u>L</u> <u>K</u> <u>L</u> NF	
sp-BYR1		MF <u>K</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>R</u> NP <u>K</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> NP	
sc-Ste7		LQ <u>R</u> <u>R</u> <u>R</u> N <u>L</u> KG - - <u>L</u> <u>N</u> <u>L</u> NL	
DEJL-Konsensus: K/R-X-X-K/R-X ₍₁₋₄₎ -L/I-X-L/I			

Abb.11: DEJL-Konsensussequenz von p150-Spir im Vergleich mit anderen dieses Motiv enthaltenden Proteinen

6.5. Expression der *spir* mRNA in *Drosophila*

Um eine Aussage über die Größe der Messenger-RNA von p150-*spir* und das Expressionsmuster in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila* treffen zu können, wurde eine Northern-Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus Embryonen, Larven und adulten Fliegen (Männchen und Weibchen) isoliert (→ 5.2.5.), auf einem 1%igen denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. (→ 5.2.6.) Pro Gelspur wurden 15µg RNA eingesetzt. Als Sonde wurde ein p150-Spir cDNA Fragment verwendet. In der Autoradiografie war ein Transkript von ca 4000 bp Länge detektierbar. Das stärkste Signal zeigte die RNA aus adulten Fliegen, wobei das Signal in der RNA der Weibchen deutlich stärker war als in der der Männchen. Eine Erklärung dafür könnte sein, das Spir als Maternaleffektgen in größere Menge in den Ovarien vorhanden ist.

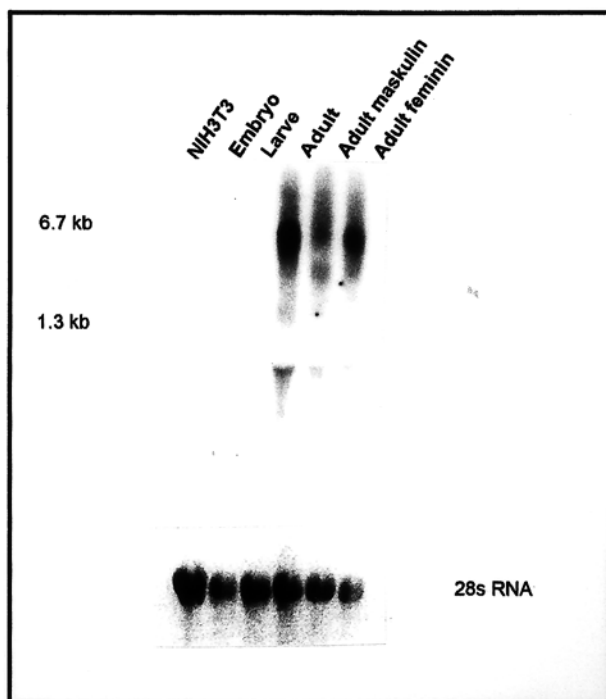


Abb.12 : Northern-Blot

Dargestellt ist die Expression der p150-Spir-mRNA in *Drosophila*-Embryonen, Larven, adulten Fliegen und in erwachsenen männlichen und weiblichen Tieren, als Kontrolle befindet sich ganz links Total-RNA aus NIH3T3-Mausfibroblastenzellen.

6.6. Klonierung der *spir*- cDNA und Laufverhalten in der Proteingelelektrophorese

Nach Aufklärung der Exon-Intron-Struktur des p150-*spir*-Gens war es nötig, die p150-Spir-cDNA in geeignete Expressionsplasmide zu klonieren, um weitere Experimente durchführen zu können. Die vollständige p150-Spir-cDNA wurde aus 2 *Drosophila*- cDNA-Klonen (GH 10380 und LD 37577, → 4.4. und Abb.9) zusammengesetzt. Dazu wurden die Nukleotide 1 (entspricht ATG) bis 670 aus GH 10380 mittels PCR mit Restriktionsschnittstellen für BamHI und Accl versehen und mit einem myc-Epitop fusioniert, die Nukleotide 671–3060 wurden aus LD 37577 mit Accl und ClaI ausgeschnitten. Beide Fragmente wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor BJ4 über die Restriktionsschnittstellen BamHI und Cla I kloniert. Zur Analyse des Laufverhaltens des p150-Spir-Proteins wurden Mausfibroblasten (NIH3T3) mit dem BJ4-myc-p150-Spir-Plasmid transient transfiziert (→5.4.2.), die Zellen zur Gewinnung der enthaltenen Proteine mit Proteinprobenpuffer lysiert (→5.3.4.) und mittels SDS-Proteingelelektrophorese auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Proteine durch Detektion mit einem gegen den Myc-Epitop gerichteten Antikörper nachgewiesen. (→ 5.3.3.). Das Spir-Protein läuft bei etwa 150 kDa und wurde deshalb als p150-Spir bezeichnet. (→ Abb.13).

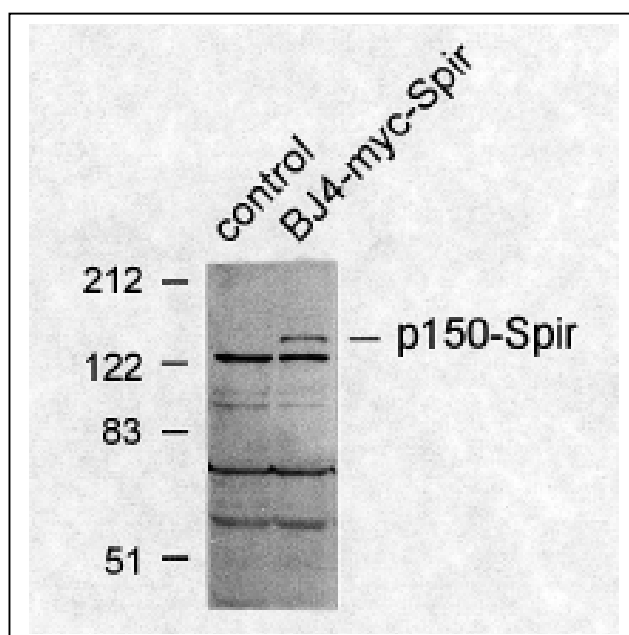


Abb.13: Western Blot

NIH3T3-Zellen wurden transient mit p150-Spir (BJ4-myc-Spir) transfiziert, die Proteinlysate auf einem 10%SDS-Gel aufgetrennt und p150-Spir mit einem anti-cMyc-Antikörper nachgewiesen. Die Probe links zeigt die Negativkontrolle, mit leerem BJ4-Plasmid transfizierte Zellen, die rechte Probe zeigt cMyc-Epitop-markiertes p150-Spir Protein. p150-Spir läuft in der SDS-Proteingelelektrophorese mit einem Molekulargewicht von 150 kDa.

6.7. *Spir* ist evolutionär hoch konserviert

Bei Sequenzvergleichen in Proteindatenbanken fanden sich *Spir*-Sequenzen in verschiedenen Spezies. So zeigt die p150-*Spir*-Proteinsequenz Ähnlichkeit zu Pem-5 (*posterior endmark gene*), einem Gen unbekannter Funktion im Ascidien *Ciona savignyi*, dessen mRNA im Ascidien-Embryo am posterioren Pol lokalisiert ist. [Satou und Satoh 1997] *Spir*-Sequenzen konnten in humanen und murinen-EST-Datenbanken gefunden werden, die allerdings noch keine vollständige cDNA ergeben. (→ Abb.14) Die Herkunft der EST-Klone deutet auf ein breites Expressionsspektrum von *Spir*-Proteinen in Säugergeweben hin, die humanen EST-Sequenzen stammen aus neuroendokrinen Tumoren (Lungencarcinoid, AA928857, 1e-30), aktivierten T-Lymphozyten (EST95010, 8e-30), Testis (AA383439, 7 e-09), Cervixcarcinom (HeLa-Zellen, AA085502, 1e-07), fetaler Leber und Milz (R06205, 7e-05), die Maus-EST-Klone aus Mausföten (W54692, 8e-15), Hirn (AU035598, 2e-04) und Hypothalamus (AA982706, 2e-08). [Wellington et al 1999, Kazusa DNA Research Institute]

Die humanen *spir*-Sequenzen sind auf den Chromosomen 16 und 18 lokalisiert. Es handelt sich dabei um 2 humane *spir*-Gene: *spir 1* auf Chromosom 18p11.2 und *spir 2* auf Chromosom 16q24.3.

In Northern-Blot Analysen mit RNA aus humanen Zelllinien konnte für humanes *spir-1* eine Expression eines ca 4.5 kb großen Transkripts in HeLa-Zellen (humanes Cervixcarcinom), GM251 (humane Fibroblastenzelllinie), HUVEC-Zellen (humanes Nabelschnurepithel), HEK 293 (humane embryonale Nierenzellen), A301 (B-Zell-Lymphom-Zellen), U937 (histiozytäres Lymphom) und TF-1-Zellen (erythropoetische Leukämiezellen), aber nicht in Jurkat-T-Zell-Leukämiezellen detektiert werden. (→ Abb.14a) Die Experimente sollen mit *hu-spir 2* wiederholt werden, sobald der entsprechende cDNA-Klon im Labor zur Verfügung steht.

Auch im Maus-Genom konnten EST-Klon-Sequenzen gefunden werden, die Homologie zu den humanen *spir-1* und *spir-2* Genen zeigen und auf die Existenz von ebenfalls mindestens 2 murinen *spir*-Genen (*m-spir 1* und *m-spir 2*) hindeuten. Northern-Blot Analysen mit RNA aus Mausgeweben zeigten für *m-spir 1* eine Expression in Hirngewebe (ca 4,7 kb großes Transkript) und für *m-spir 2* in Colon, Hirn und Testis (ca. 3 kb großes Transkript). (→ Abb.14b und 14c)

Abb.14a-c: Northernblots in humanen Zelllinien und Mausgeweben

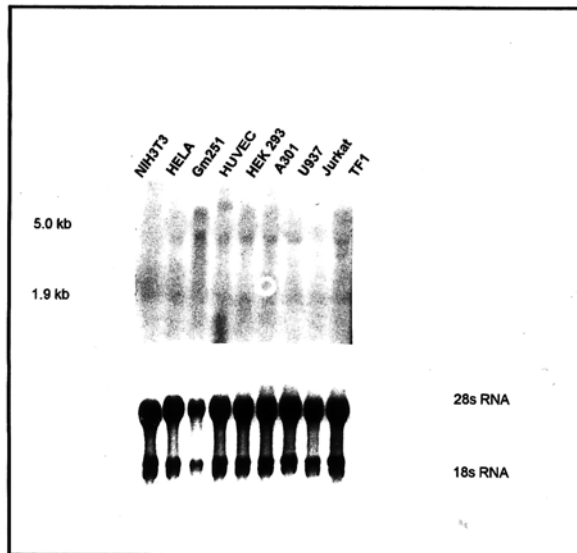


Abb.14a: Expression der humanen *spir-1* mRNA in verschiedenen humanen Zelllinien.

In der ersten Spur ist als Kontrolle RNA aus NIH3T3-Mausfibroblasten aufgetragen. Weitere Proben sind RNA aus HeLa-Zellen (humanes Cervixcarcinom), GM251 (humane Fibroblasten), HUVEC-Zellen (humanes Nabelschnurepithel), HEK 293 (humane embryonale Nierenzellen), A301 (B-Zelllymphom), U937 (histiozytäres Lymphom), Jurkat (T-Zell-Leukämie) und TF1-Zellen (erythroide Leukämiezellen)

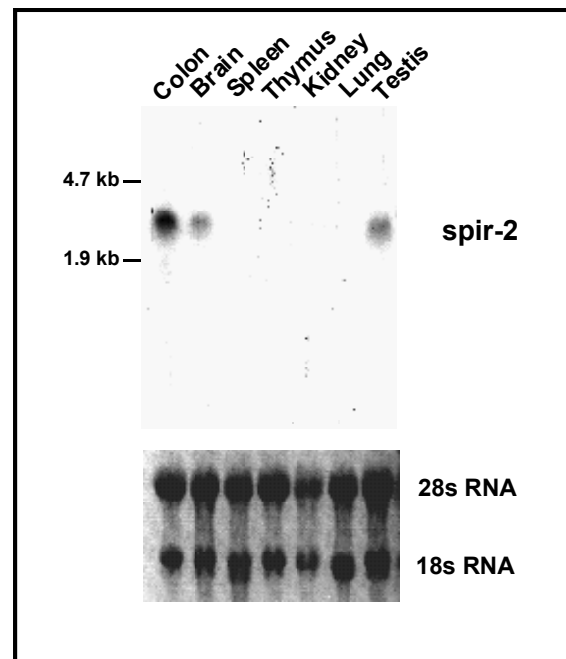
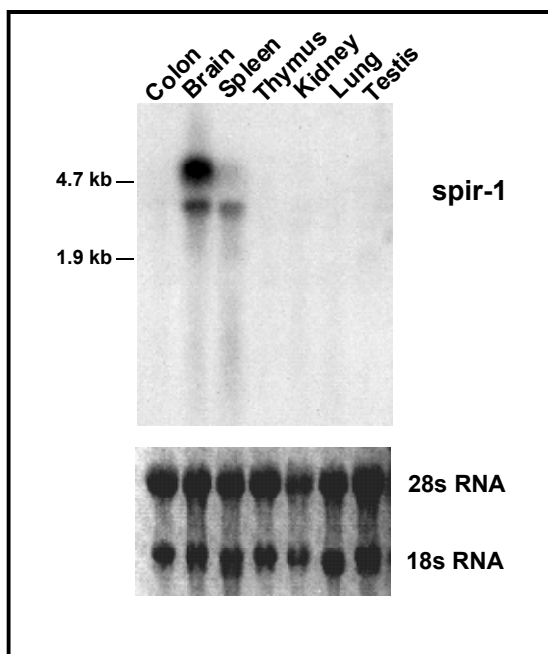


Abb.14 b und c: Northern Blot-Analysen mit RNA aus Mausgeweben hybridisiert mit *m-spir 1* und *m-spir-2*. Murines *spir-1* zeigt eine Expression eines ca 4.7 kb großen Transkripts in Hirn und etwas schwächer in der Milz, *m-spir-2* wird in Colon, Testis und Hirn exprimiert.

Der Grad der Konservierung der Spir-Proteine zwischen den verschiedenen Spezies ist in einigen Bereichen besonders hoch, man findet dort zwischen 25 % und 57% identische bzw. bis zu 95% ähnliche Aminosäuren. Stark konserviert Sequenzabschnitte bilden häufig funktionelle Domänen in Proteinen. Untersuchungen der Spir-Proteinsequenzen mittels computergestützten Analyseverfahren in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Peer Bork (EMBL, Heidelberg) identifizierten in den Proteinen mehrere funktionelle Domänen, deren Sequenzen in allen Spir-Proteinen

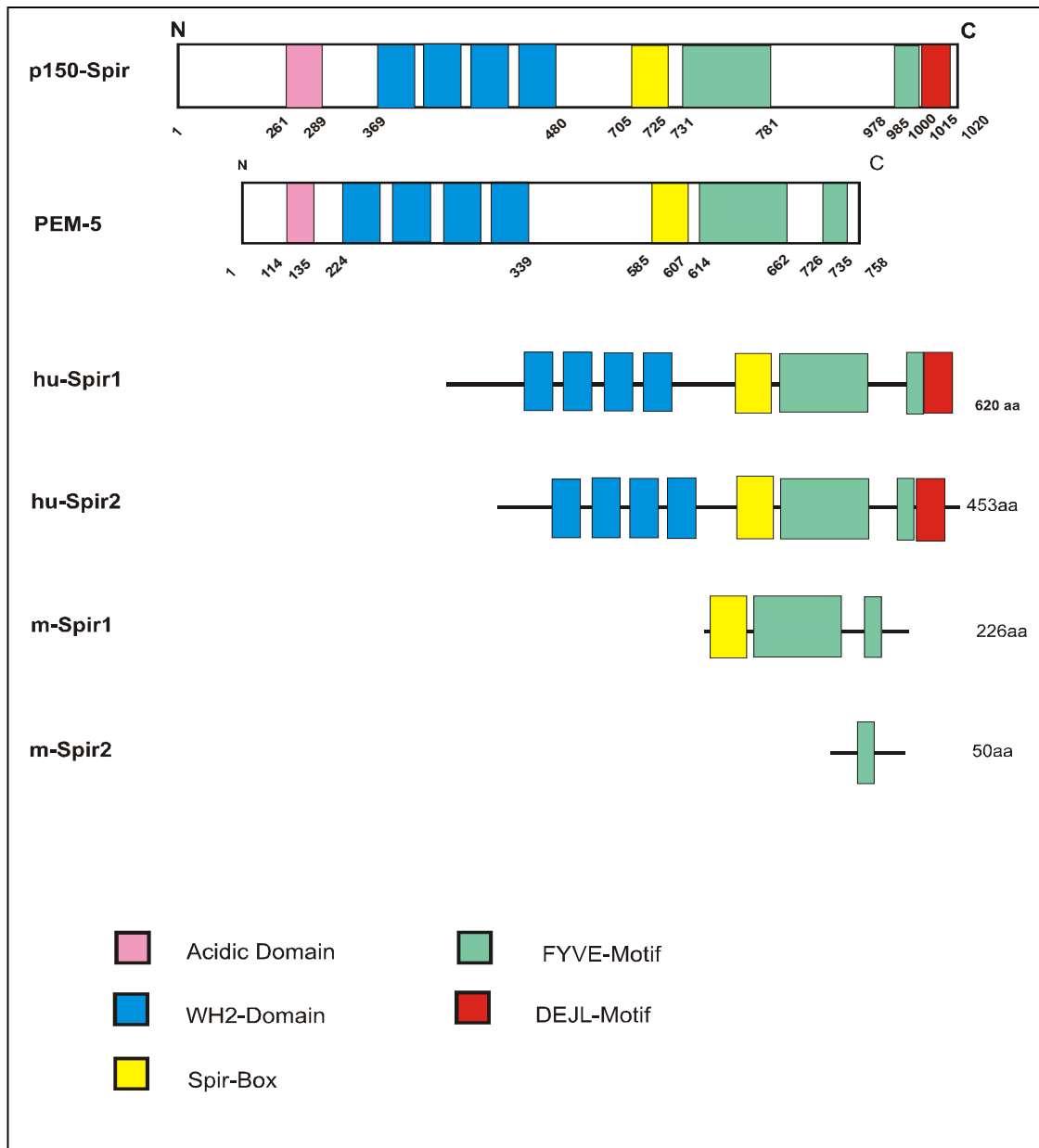


Abb.15: Übersicht über die Domänenstrukturen der bisher identifizierten Spir-Proteine p150-Spir (*Drosophila melanogaster*), PEM-5 (*Ciona savignyi*), und der teilweise bekannten Sequenzen von humanem Spir1, humanem Spir2, murinem Spir1, murinem Spir2.

stark konserviert vorliegen (→ Abb.15) und auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird. In Abbildung 16 ist am Beispiel eines N-terminalen Sequenzausschnittes die Ähnlichkeit der Spir-Proteine im Bereich der sauren Domäne (AD) und der WH2-Domänen veranschaulicht.



Abb.16: Sequenzen von Spir-Proteinen verschiedener Spezies: ein N-terminaler Sequenzausschnitt der Spir-Proteine im Vergleich. Die markierten Abschnitte zeigen Bereiche mit besonders hoher Ähnlichkeit der Sequenzen, die als funktionelle Domänen identifiziert wurden. Abgebildet sind die in Spir-Proteinen konservierten Motive saurer Aminosäuren (*acidic domain*) und das WH2-Domänen-Motiv (*Wiskott Aldrich Homology Domain*) mit einer potentiellen JNK-Phosphorylierungsstelle (TPY-Motiv).

6. 8. p150-Spir JBD wird von JNK *in vitro* phosphoryliert

Erk und JNK MAP-Kinasen können mit Hilfe von Bindemotiven, wie dem DEJL-Motiv, mit ihren Substratproteinen interagieren und benachbart zu Prolinen gelegene Serine und Threonine (S/TP-Motive) phosphorylieren. Die C-terminale Sequenz von p150-Spir enthält neben dem DEJL-Motiv zahlreiche potentielle Phosphorylierungsstellen (S/TP-Motive) für die Serin-Threonin-Kinase JNK. Um festzustellen, ob zwischen JNK und p150-Spir eine funktionelle Verbindung besteht, wurde die Phosphorylierung von p150-Spir-JBD (JNK-Bindungsdomäne) im *in vitro*-Komplex-Kinaseassay getestet. Die C-terminalen, die JBD enthaltenden Aminosäuren 902-1020 wurden im bakteriellen Expressionsvektor pGEX4T3 an Gluthathion-S-Transferase (GST) fusioniert. Das rekombinante Protein GST-p150-Spir JBD sowie als Kontrolle GST-Protein ohne Fusionsanteil wurden aus *E. coli* isoliert, gereinigt und zu Totallysaten aus NIH3T3-Zellen gegeben, die zum Teil mit Arsenit (0.5 mM für 30 Minuten) behandelt wurden, um die endogene JNK-Kinase zu aktivieren. JNK1 wurde mit einem JNK-1 spezifischen Antikörper immunopräzipitiert und die Immunkomplexe für die Kinasereaktion mit radioaktivem (γ - ^{32}P)ATP im entsprechendem Kinasepuffer inkubiert. Die Protein-komplexe wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen geblottet und die Phosphorylierung durch Autoradiografie getestet. p150-Spir-JBD wurde durch aktivierte JNK1 phosphoryliert. (→ Abb.17).

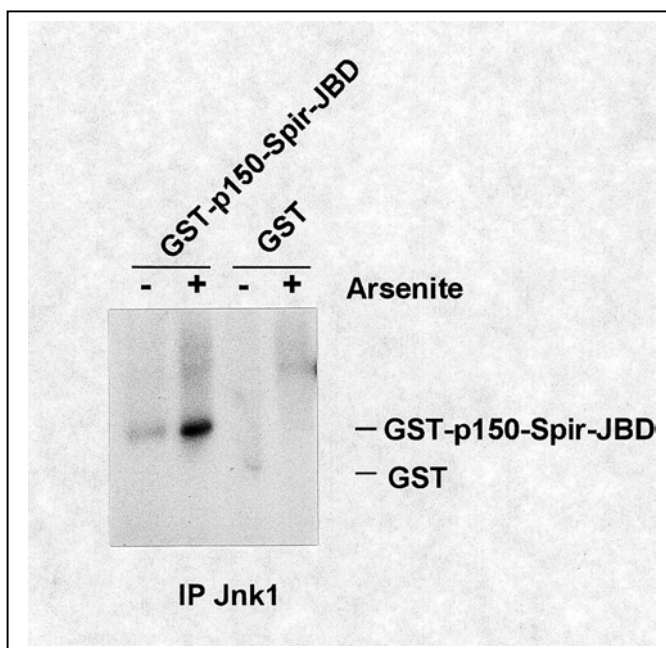


Abb.17: *In-vitro*-Komplex-Kinase-assay:

Dazu wurde aus NIH3T3-Zellen die endogene JNK1-Kinase immunopräzipitiert. Die Zellen waren teils unbehandelt (-), teils mit Arsenit (+) 0,5 mM für 30 Minuten stimuliert worden, um die JNK-Kaskade zu aktivieren. GST-Spir-JBD wurde als Substrat zugesetzt und die Kinaseaktivität der Immunkomplexe nach Zugabe von radioaktivem ATP gemessen. GST bezeichnet die Negativkontrolle, in der GST als Substrat eingesetzt wurde.

6.9. p150-Spir wird von JNK *in vivo* phosphoryliert

Um zu testen, ob aktivierte JNK-Kinase p150-Spir auch *in vivo*, in der Zelle, phosphorylieren kann, wurden NIH3T3-Mausfibroblastenzellen mit Myc-Epitop-markierten p150-Spir-Expressionsvektoren (pcDNA3-Myc-p150-Spir) allein oder in Kombination mit Maus-JNK2 (pcDNA3 Jnk2) und Ratten-Mlk3 (pCMV5Mlk3), einem Aktivator von JNK; mit JNK-MKK7 (pcDNA3-Myc-JNK-MKK7), einer konstitutiv aktiven Mutante der Kinase, mit der Kinase inaktiven Mutante JNK-MKK7-KD (pDNA3-Myc-JNK-MKK7-KD) und einer konstitutiv aktiven Mutante der ERK2-Kinase (pCMV5-Myc-ERK2-MEK1-LA, Maus) transfiziert. (→ 5.4.2.) Die Zellysate (→ 5.3.4) wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen geblottet und p150-Spir mittels Antikörperreaktion mit dem anti-Myc-9E10 monoklonalem Mausantikörper nachgewiesen. (→ 5.3.3.)

In mit dem JNK-MKK7-Fusionsprotein bzw. mit Jnk2/MLK3 kotransfizierten Zellen zeigt p150-Spir ein anderes Laufverhalten als in den Kotransfektionen mit inaktiver JNK (JNK-MKK7-KD). In Anwesenheit von aktivierter JNK-Kinase sind mehrere langsamer laufende Proteinbanden von p150-Spir sichtbar, was auf einen phosphorylierungsbedingten Mobilitätsshift des Proteins und multiple Phosphorylierungsstellen hindeutet. p150-Spir scheint dabei ein JNK-spezifisches Substrat zu sein, da in mit aktivierter Erk-2 kotransfizierten Zellen (pCMV5-Myc-ERK2-MEK1-LA) ein im Vergleich nur schwacher Mobilitätsshift induziert wurde. (→ Abb.18, rechtes Bild)

Behandelt man die aus den Zellysaten mit anti-myc 9E10 immunpräzipitierten p150-Spir-Proteinkomplexe mit alkalischer Phosphatase, wird der Mobilitätsshift deutlich reduziert, was seine Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus des Proteins zeigt. (→ Abb.19)

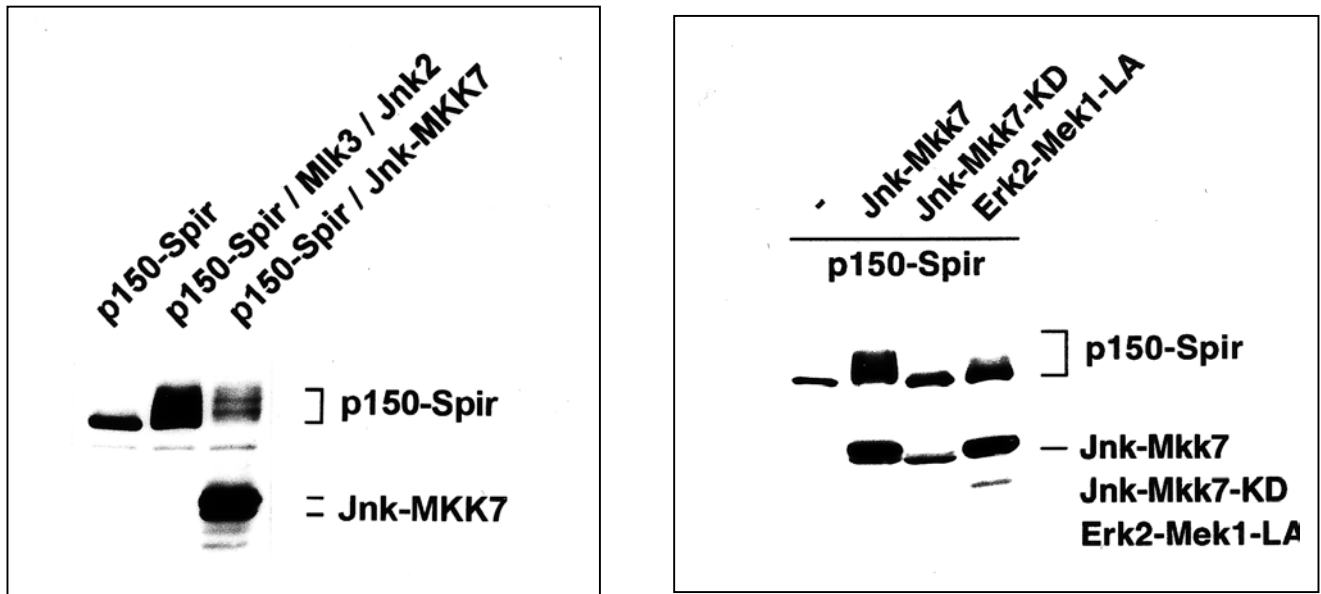


Abb.18: p150-Spir wird *in vivo* von aktivierter JNK phosphoryliert
 Immunoblot mit Proteinlysaten von mit p150-Spir zusammen mit JNK2 und Milk3, konstitutiv aktiver JNK-MKK7, kinase-inaktiver JNK-MKK7-KD oder konstitutiv aktiver Erk2-Mek-LA ko-transfizierten NIH3T3-Zellen. In Anwesenheit von aktivierter JNK zeigt sich ein phosphorylierungsbedingter Mobilitätsshift von p150-Spir.

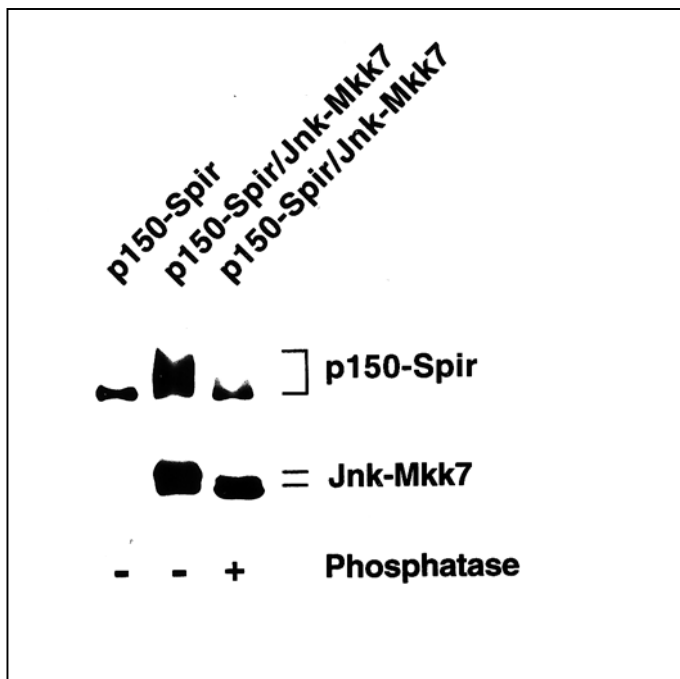


Abb.19: Abhängigkeit des Mobilitätsshifts von p150-Spir vom Phosphorylierungszustand des Proteins.
 Immunoblot mit Proteinlysaten von NIH3T3-Zellen, die mit p150-Spir und p150-Spir und JNK-MKK7 transfiziert wurden.
 In Anwesenheit von konstitutiv-aktiver JNK-MKK7 shiftet das p150-Spir-Protein. Bei Behandlung mit alkalischer Phosphatase (80 Einheiten calf intestinale phosphatase, NEB) ist dieser Shift nicht mehr nachweisbar.

6.10. p150-Spir und JNK kolokalisieren in NIH3T3-Mausfibroblasten

p150-Spir wurde als JNK interagierendes Protein im *Yeast-Two-Hybrid-Screen* gefunden. Um diese Interaktion unabhängig vom *Two-Hybrid-System* nachzuweisen, wurde die Lokalisation beider Proteine in NIH3T3- Zellen analysiert. NIH3T3-Zellen wurden mit dem eukaryotischen GST-JNK-Fusionsplasmid pEBG-GST-JNK (JNK2) allein oder zusammen mit pcDNA3-Myc-p150-Spir kotransfiziert. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert (→ 5.4.3.) und mit anti-GST Antikörper (Maus anti Ziege) und TRITC-markierten anti-Maus-Antikörper und FITC-markiertem anti-myc-9E10 angefärbt. Wie in Abb.20 (unteres Bild) sichtbar, akkumuliert p150-Spir punktförmig um den Zellkern. Bei Koexpression von p150-Spir und JNK in NIH3T3-Zellen kolokalisieren beide Proteine. Während JNK allein auch im Zellkern lokalisiert ist (→ Abb.20, oberes Foto) transloziert die Kinase in Anwesenheit von p150-Spir ebenfalls in das Zytoplasma um den Zellkern. (→ Abb.20, Mitte) Diese Translokation und Kolokalisation weisen auf eine Interaktion beider Proteine *in vivo* hin. Die Kolokalisation beider Proteine wurde nur in Zellen beobachtet, die mit beiden Konstrukten transfiziert waren und nicht in den Kontrollen, in denen GST-Protein (pGEX4T3-Plasmid) zusammen mit p150-Spir exprimiert wurde. (nicht gezeigt)

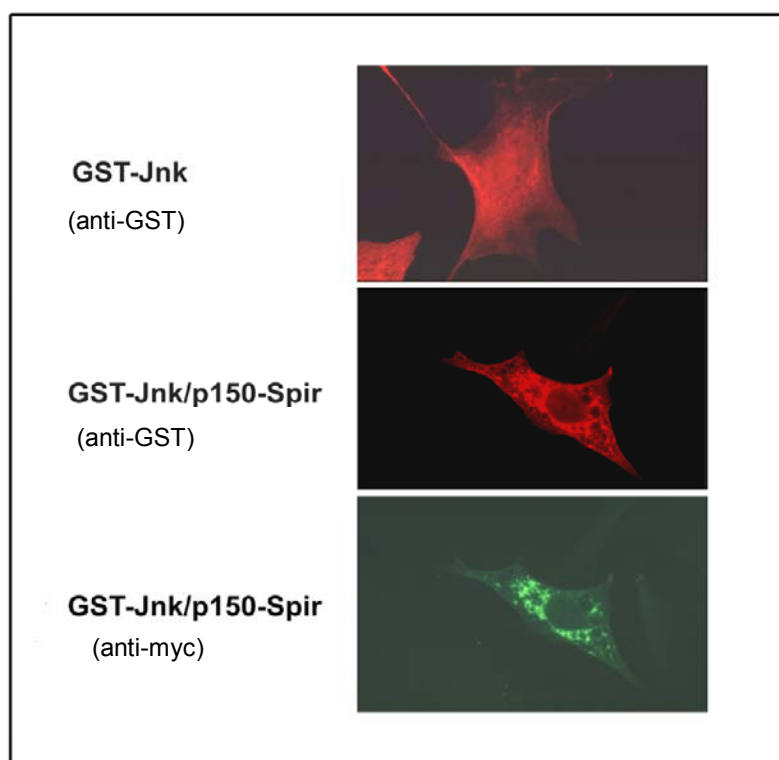


Abb.20: Immunfluoreszenz von mit p150-Spir und GST-JNK transfizierten NIH3T3-Zellen

Das obere Foto zeigt eine mit GST-JNK (TRITC-markiert, rot fluoreszierend) transfizierte Zelle, in der Mitte eine mit GST-JNK und p150-Spir kotransfizierte Zelle mit Färbung von GST-JNK (rot), im unteren Foto die selbe Zelle Färbung von p150-Spir (FITC-markierter Antikörper, grüne Fluoreszenz) Beide Proteine kolokalisieren in den kotransfizierten Zellen.

6.11. p150-Spir und JNK koimmunopräzipitieren in NIH3T3-Zellen

Um eine *in-vivo*-Interaktion zwischen p150-Spir und JNK zu zeigen, wurden NIH3T3-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3-Myc-p150-Spir und pcDNA3-HA-JNK2 kotransfiziert (→ 5.4.2.) und nach 36 Stunden Koimmunopräzipitationen durchgeführt. (→ 5.3.6.) HA-JNK2 wurde mit einem murinen monoklonalen anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Im anschliessenden Immunoblot der Proteinkomplexe wurde p150-Spir durch den 9E10 anti-Myc-Antikörper detektiert. Wie in Abb.19 zu sehen, zeigt die Autoradiografie bei 150 KDa ein schwaches Signal von p150-Spir, welches an HA-JNK gebunden hatte, was die Interaktion beider Proteine bei Koexpression in NIH3T3-Zellen bestätigt .

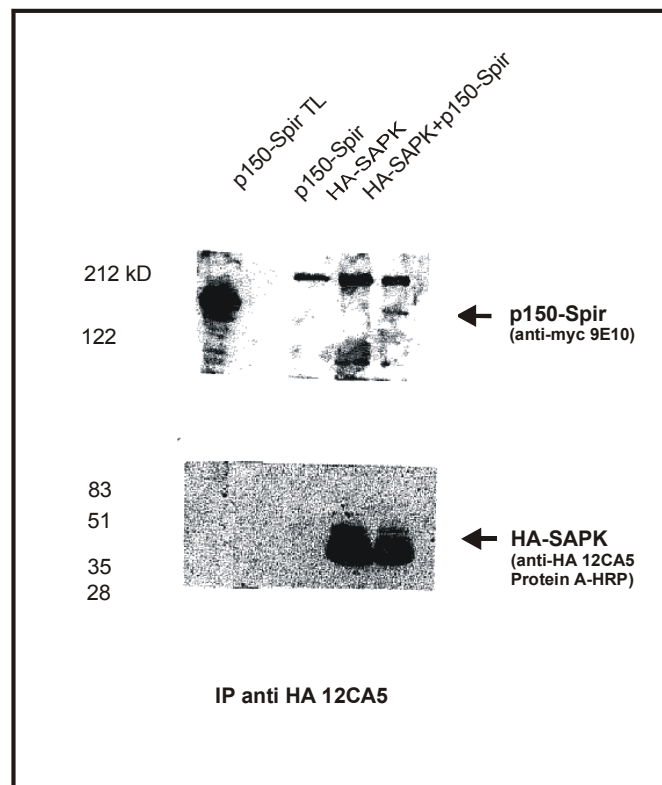


Abb.21: Koimmunopräzipitation. NIH3T3-Zellen wurden mit p150-Spir, HA-markierter JNK2 (SAPK) und mit beiden Konstrukten zusammen kotransfiziert. p150-Spir wurde mit anti-Myc (9E10) Antikörpern immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im anschließenden Immunoblot auf die Anwesenheit von interagierender JNK (SAPK) untersucht, die über die Fusion der Kinase mit dem Hämagglutinin-Epitop mit einen anti-HA-Antikörper (12CA5) nachgewiesen wurde. (TL=Totallysate; IP=Immunpräzipitation)

6.12. Überexpression von p150-Spir in NIH3T3-Zellen induziert

Aktinclusterbildung

p150-Spir gehört zur Familie der WH2-Domänen enthaltenden Proteine und besitzt eine bisher von keinem anderen Protein bekannte Struktur, in der 4 WH2 Domänen direkt aufeinanderfolgend angeordnet sind. Eine WH2-Domäne kann ein Aktinmonomer binden (\rightarrow 7.2), p150-Spir könnte demnach 4 Aktinmonomere gleichzeitig binden. Die Zusammenlagerung von 3 Aktinmonomeren zu einem Trimer führt zu einer erhöhten Stabilität der Aktinstruktur und ein Prozess, der als Aktinnukleation bezeichnet wird, setzt ein, der zur Aktinpolymerisation führt. Um den Einfluß von p150-Spir auf das zelluläre Aktinskelett zu testen, wurden NIH3T3-Mausfibroblasten transient mit pcDNA3-Myc-p150-Spir transfiziert (\rightarrow 5.4.2.) und in einer Doppel-Immunfluoreszenz das Aktinzytoskelett mit FITC-Phalloidin und Myc-p150-Spir mit einem gegen den Myc-Epitop gerichteten Antikörper angefärbt. Mit p150-Spir transfizierte Zellen zeigten neben der für p150-Spir typischen perinukleären Akkumulation des Proteins Anhäufungen (Cluster) von F-Aktin rund um den Zellkern. Überlagert man die Anfärbungen, zeigt sich eine Kolo-kalisation von p150-Spir und den F-Aktin-Clustern. Diese Daten zeigen, daß in den p150-Spir bei Überexpression in NIH3T3-Zellen die Bildung von Aktinclustern induziert.

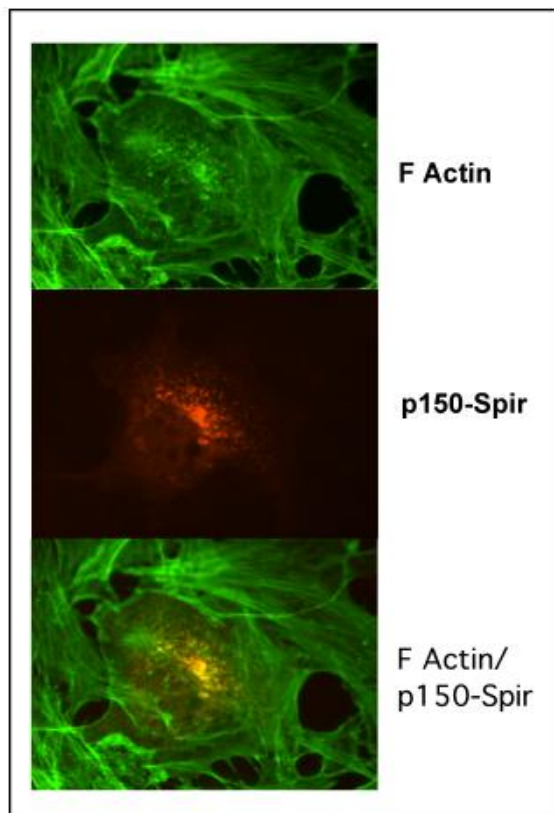


Abb.22: Immunfluoreszenz. Überexpression von p150-Spir in NIH3T3-Zellen induziert die Bildung von Aktinclustern.

NIH3T3-Zellen wurden mit Myc-p150-Spir transfiziert, das Aktinzytoskelett mit FITC-Phalloidin angefärbt (grün, oberes Bild) und p150-Spir mit einem gegen den Myc-Epitop gerichteten TRITC markierten Antikörper angefärbt (rot, mittleres Bild). Die F-Aktin-Färbung zeigt perinukleäre Aktincluster, die mit den Spir-Akkumulationen kolo-kalisieren, wie die Überlagerung beider Färbungen zeigt (gelb, unteres Bild)

6.13. Die modifizierte FYVE- Domäne und die Spir-Box beeinflussen die zelluläre Lokalisation von p150-Spir

Die Spir-Proteinsequenz enthält in ihrer C-terminalen Hälfte eine putative Zinkfingerstruktur mit hoher Homologie zu FYVE-Finger-Motiven. FYVE-Domänen sind Zink-Ringfingerstrukturen, die spezifisch Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns-3-P) binden. PtdIns-3-P ist in Zellmembranen integriert, die FYVE-Domänen enthaltenden Proteine werden über die Interaktion ihrer FYVE-Domäne mit PtdIns-3-P an die Zellmembranen gebunden und so die Lokalisation der Proteine in der Zelle bestimmt. FYVE-Domänen-Proteine besitzen eine bezüglich der FYVE-Domäne N-terminal gelegene Folge basischer Aminosäuren, die wichtig für die Bindung von PtdIns-3-P ist. Diese basische Region fehlt in der Spir-FYVE-Domäne, weshalb sie als modifizierte FYVE-Fingerstruktur (mFYVE) bezeichnet wird. (→ Abb.23)

Um die Funktion der mFYVE Domäne für die zelluläre Lokalisation von p150-Spir zu untersuchen, wurden verschiedene Punkt- und Deletionsmutanten innerhalb der mFYVE-Domäne hergestellt (→ 4.4.), in denen die Integrität der Domäne zerstört wurde. Für die Punktmutanten wurden alle 8 Cysteine einzeln mittels *in vitro* – Mutagenese (→ 5.2.4.) durch Serine ersetzt (pcDNA3-MTp150-Spir Δ C^{X,Y}S; X und Y bezeichnen die Position des mutierten Cysteins). In einer weiteren Punktmutante wurden zwei Phenylalanine in der FYVE-Konsensussequenz, die als hydrophobe Aminosäuren ebenfalls unspezifisch Membranverankerung vermitteln können (→ 7.3.), in Serine mutiert (pcDNA3-MT p150-Spir Δ FA/FA). Für die Deletionsmutante wurden die Aminosäuren 2-777 von p150-Spir mit einem Myc-Epitop fusioniert (pcDNA3 Δ C-term). (→ Abb.23 unten) Die Plasmide wurden in NIH3T3-Zellen transfiziert (→ 5.4.2.) und die Lokalisation von p150-Spir in den Zellen mit dem anti-Myc-Antikörper mittels Immunfluoreszenz analysiert (→ 5.4.3.). Während das nicht mutierte p150-Spir-Protein eine perinukleäre Verteilung in der Zelle zeigt, befanden sich die mutierten Proteine gleichmässig im Zytoplasma. Dabei zeigten alle Mutanten, sowohl die Punktmutationen der einzelnen Cysteine als auch die Deletionsmutante der mFYVE-Domäne, den selben Phänotyp. Die durch Zerstörung der mFYVE-Domäne gezeigte Veränderung des für p150-Spir charakteristischen Lokalisationsmusters in der Zelle läßt auf eine Funktion dieser Domäne bei der intrazellulären Lokalisation des Proteins schliessen. (→ Abb.24)

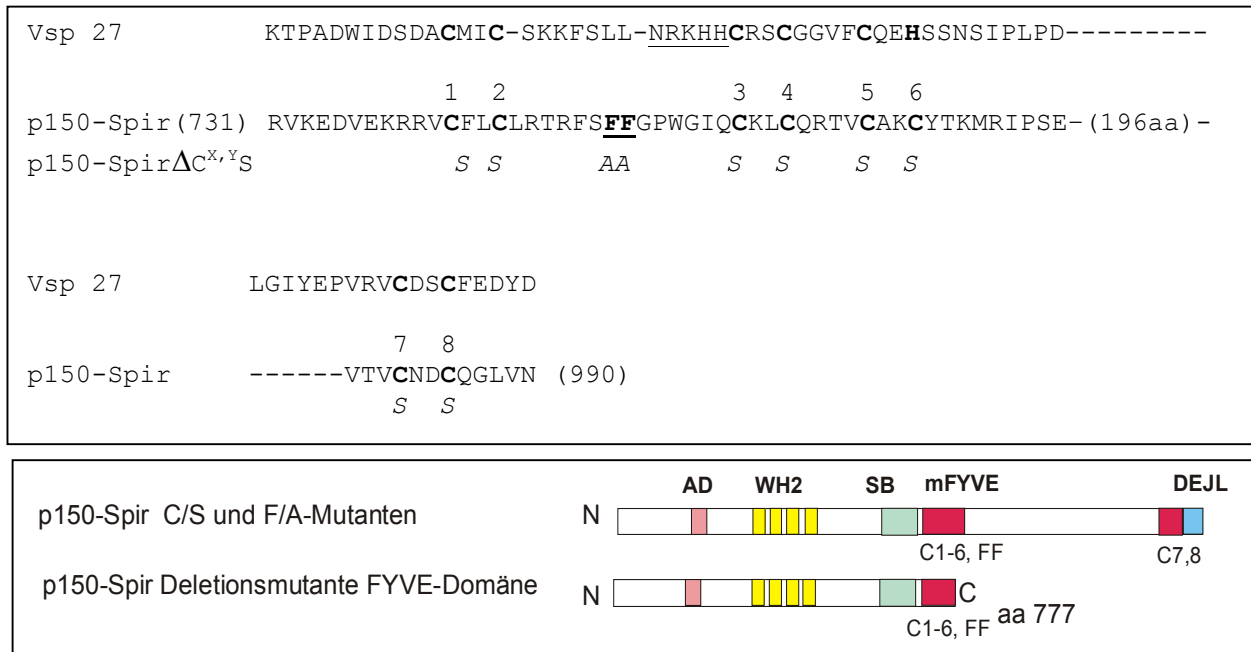


Abb.23: Proteinsequenz der mFYVE-Domäne von p150-Spir im Vergleich mit Vsp27. Die Cysteine 1-8 sind markiert, die Folge basischer Aminosäuren zwischen C2 und 3 in der FYVE-Domäne von Vsp27 unterstrichen. Unter der p150-Spir-Wildtypsequenz sind die Aminosäuren bezeichnet, die in der mFYVE-Domäne von p150-Spir mutiert wurden, darunter sind die mutierten Proteine schematisch abgebildet.

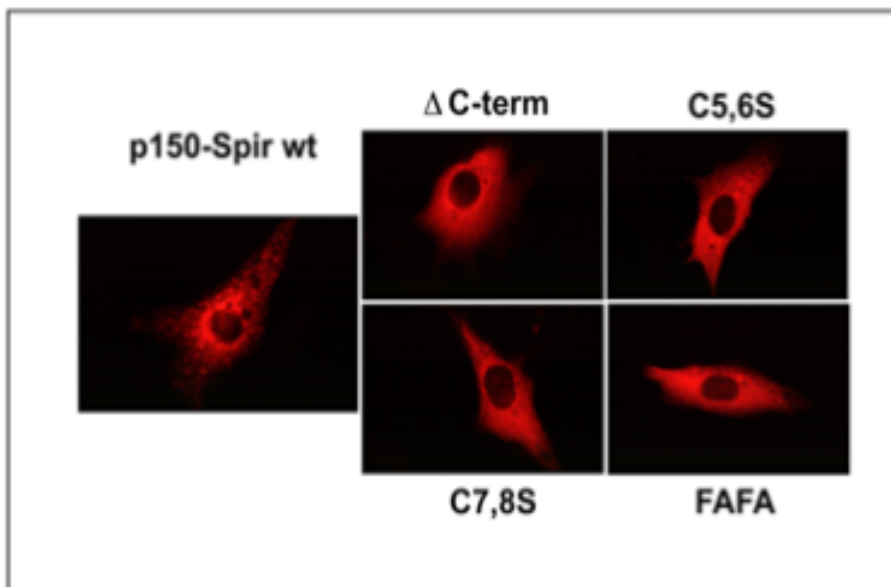


Abb.24: Immunfluoreszenz. p150-Spir Mutanten, in denen die mFYVE-Domäne durch Deletion (Δ C-term) oder Austausch der Cysteine gegen Serine (hier als Beispiel die Mutanten C5,6S, C7,8S abgebildet, die anderen Cysteinmutanten zeigten eine identische Lokalisation) oder Ersatz der Phenylalanine durch Alanine (FAFA) zerstört war, zeigen ein verändertes Lokalisationsmuster im Vergleich zum Wildtyp-Protein (p150-Spir wt).

Unmittelbar vor der FYVE-Domäne besitzen alle bisher gefundenen Spir-Proteine ein hoch konserviertes Strukturmotiv von 20 AS, das als Spir-Box bezeichnet wird. Die Spir-Box zeigt Sequenzhomologie zu Rabphilin 3A, einem FYVE-Domänen-Protein, das mit der GTPase Rab3A interagiert und dadurch ebenfalls an die Zellmembran transloziert wird. (→ 7.4) Um der Fragestellung nachzugehen, ob die Spir-Box in p150-Spir ebenfalls die Lokalisation des Proteins in der Zelle beeinflusst, wurde die Spir-Box in p150-Spir mit *in-vitro*-Mutagenese deletiert (pcDNA3MTp150spir Δ SB) und die Lokalisation des mutierten Proteins in transfizierten NIH3T3-Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Das Verteilungsmuster der Spir-Box-Deletionsmutante war dabei ähnlich wie das der Cysteinmutanten, woraus abzuleiten ist, daß die Spir-Box ebenfalls eine Rolle bei der Lokalisation von Spir in der Zelle spielt. (→ Abb. 25)

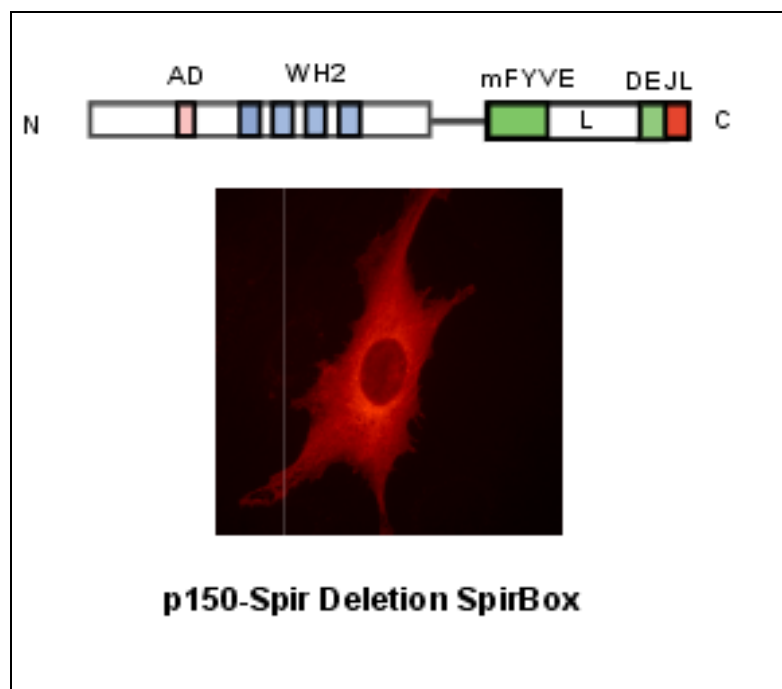


Abb.25: Immunfluoreszenz. Überexpression einer Mutante des p150-Spir-Proteins, in dem die Spir-Box deletiert ist (siehe Schema oben), in NIH3T3-Zellen. Das mutierte Protein zeigt ein zytoplasmatisches Lokalisationsmuster ähnlich von Spir-Mutanten mit defekter mFYVE-Domäne.

7. Diskussion und Ausblick

7.1. p150-Spir ist ein neues *Drosophila*-Protein, welches mit DJNK interagiert

Die zur Familie der MAP-Kinasen gehörende c-Jun-N-terminale Kinase JNK wird durch verschiedene externe Stimuli wie Stress, Cytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und dient der Signalübermittlung bei zellulären Reaktionen wie Stressantwort, Apoptose, Wachstum, Entwicklung und Differenzierung. Aufbau und Funktion dieses Signalweges zeigen einen hohen Grad an evolutionärer Konservierung zwischen verschiedenen Spezies, unter anderen zwischen Mensch und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Biochemische und genetische Studien haben JNK in der Signalübertragungskaskade unterhalb der Rho-GTPasen Rac und Cdc 42 definiert. Aktivierung von Rac und Cdc 42 führt zur Aktivierung der JNK-Proteinkinase. Rho-GTPasen sind an der Organisation von zellulären Aktinstrukturen beteiligt und steuern Prozesse, die eine Regulation des Aktinzytoskeletts der Zelle erfordern wie beispielsweise Morphologieänderungen, Bewegung oder Wachstum. Genetische Studien in *Drosophila* zeigen eine Funktion der JNK-Kaskadenkomponenten DRac, DMKK7/*hep* und DJNK/*bsk* in der Regulation von Zellbewegungen und Zellmorphologieänderungen während der dorsalen Schließung (*dorsal closure*; DC) des *Drosophila*-Embryos. Der genaue Mechanismus, wie JNK mit dem Zytoskelett in Verbindung steht und Einfluss auf Zellmorphologieänderung und Zellbewegung nimmt, ist dabei noch nicht aufgeklärt. Auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern der JNK-Kinase zur Analyse ihrer Regulation und Funktion wurde deshalb im Rahmen dieser Dissertation mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems ein Screen nach JNK-interagierenden Proteinen durchgeführt, der zur Entdeckung des neuen *Drosophila*-Proteins p150-Spir führte. [Otto et al 2000] Dieses aus 1020 Aminosäuren bestehende Multidomänenprotein zeigt einen charakteristischen Aufbau aus verschiedenen Strukturmotiven. In der aminoterminalen Hälfte besitzt p150-Spir vier aufeinanderfolgende WH2-Domänen (*Wiskott Aldrich Homology Domain 2*) und eine zentrale Zinkfingerdomäne, die als modifizierte FYVE-Finger-Struktur (mFYVE) einzuordnen ist. Am Carboxyterminus befindet sich eine JNK-Interaktionsdomäne, die ein DEJL (*Docking Site for Erk and JNK, LxL*)-Motiv enthält. p150-Spir interagiert sowohl mit DJNK

als auch mit Säuger-JNK und wird von aktivierten JNK-Proteinkinasen phosphoryliert, wie durch *in vitro* und *in vivo*-Immunkomplex-Kinaseassays gezeigt werden konnte. (→ 6.8, 6.9., Abb.17-19) In Anwesenheit der aktivierten JNK-Proteine zeigt das p150-Spir Protein einen phosphorylierungsabhängigen Mobilitätsshift in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Es werden mehrere Banden des phosphorylierten p150-Spir Proteins detektiert, was auf multiple Phosphorylierungsstellen hindeutet und im Einklang mit in der Proteinsequenz vorhandenen S/TP-Motiven steht, die als JNK-Phosphorylierungssequenzen bekannt sind. [Alvarez et al. 1991] P150-Spir scheint dabei ein JNK-spezifisches Substrat zu sein, da in den gleichen Experimenten durch aktivierte Erk 2 MAPK ein vergleichsweise nur sehr schwacher Mobilitätsshift induziert wurde. (→ 6.9, Abb.17) Exprimiert man p150-Spir in NIH3T3-Mausfibroblastenzellen, zeigt sich eine charakteristische Akkumulation des Proteins um den Zellkern. Bei Koexpression von JNK kolokalisieren beide Proteine im p150-Spir-typischen Muster, während JNK in Abwesenheit von p150-Spir im Zellkern lokalisiert ist, was einen weiteren Hinweis auf die Interaktion beider Proteine darstellt. (→ 6.10., Abb.20)

7.2. p150-Spir fungiert als Aktinorganisator

Bei Expression von p150-Spir in NIH3T3-Zellen zeigt das Protein eine charakteristische perinukleäre Verteilung. In diesen Proteinakkumulationen läßt sich immunhistochemisch F-Aktin nachweisen, die Expression von p150-Spir in den Mausfibroblastenzellen induziert die Bildung von Aktinclustern um den Zellkern. (→ 6.12., Abb.22) Ein ähnlicher Phänotyp wurde bei Expression der WH2-Domänen Proteine WASP und WAVE in adhärennten Säugerzellen beschrieben, wo ektopische Aktinpolymerisation induziert wird und eine Reorganisation des Zytoskeletts in den transfizierten Zellen stattfindet. [Miki et al. 1998; Symons et al.1996] WASP wurde ursprünglich als mutiertes Gen bei Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom identifiziert, einer X-chromosomalen hereditären Immunschwäche die durch eingeschränkte Motilität der Lymphozyten charakterisiert ist. Von Wiskott-Aldrich-Syndrom-Patienten isolierte T- Lymphozyten zeigen auffällige Morphologieveränderungen die auf Defekte in der Zytoskelettorganisation hinweisen. [Ramesh et al. 1999; Snapper und Rosen

1999] Der identische Phänotyp bei Expression beider Proteine in adhärenen Säugerzellen läßt neben der strukturellen Ähnlichkeit auf Grund der in p150-Spir vorhandenen WH2-Domänen auch auf eine enge funktionelle Verwandtschaft zwischen der WASP-Proteinfamilie und p150-Spir schließen.

WH2-Domänen, auch als Ver(*Verprolin*)-Domänen bezeichnet, binden monomeres Aktin. [Bi und Zigmond 1999; Welch 1999] Die Gruppe von Lynn Manseau konnte für die WH2-Domänen von p150-Spir *in vitro* und *in vivo* eine Interaktion mit monomeren Aktin zeigen. [Wellington et al.1999] Die Polymerisation von monomeren Aktin zu Aktinfilamenten in der Zelle stellt eine Gleichgewichtsreaktion in Abhängigkeit von der vorhandenen Konzentration an Aktinmonomeren dar. Während Aktindimere instabil sind und sehr langsam polymerisieren, kommt es zu spontaner Polymerisation, sobald sich Aktintrimere bilden, da diese stabil sind. Die Bildung von Aktintrimeren wird als Aktinnukleation bezeichnet. [Alberts et al. 1994] WH2-Familien-Proteine, wie WASP oder WAVE fungieren durch ihre Fähigkeit, mindestens drei monomere Aktinproteine zu binden als Aktinnukleationskerne. Sie besitzen neben 2 WH2-Domänen, die jeweils ein Aktinmonomer binden können, aminoterminal eine prolinreiche Region, die mit Profilin interagiert, einem Protein, das ebenfalls Aktinmonomere bindet. Carboxyterminal befindet sich eine Region saurer Aminosäuren (*acidic domain*, AD), über die eine Interaktion mit den Proteinen des Arp2/3-Komplex (*actin related protein complex*) erfolgt, der die Aktinpolymerisation induzieren kann. [Otto et al. 2000; Bi und Zigmond 1999] (→ Abb.26) Arp2/3 ist ein Komplex, der aus sieben Proteinen besteht: den aktinähnlichen Proteinen Arp2 und Arp 3 und den Proteinen p41-Arc, p34-Arc, p21-Arc, p20-Arc, p16-Arc. *In vitro* stimuliert der Arp2/3 Komplex die Nukleation von Aktinfilamenten, *in vivo* induziert er die Bildung von verzweigten polymerisierten Aktinstrukturen. [Mullins 2000; Welch 1999; Machesky und Gould 1999; Machesky und Insall 1998] Im *Yeast-two-Hybrid-System* konnte eine direkte Interaktion zwischen der p21-Arc Untereinheit des Arp2/3-Komplexes und WASP oder Scar1, einem anderen WH2-Familien Protein gezeigt werden, wobei die zu den WH2-Domänen benachbarte Region saurer Aminosäuren für die Interaktion notwendig ist. [Machesky und Insall 1998]. Machesky und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Überexpression der C-terminalen Abschnitte von WASP und Scar1 in Säugerzellen dominant inhibitorisch wirkt und die Wachstumsfaktor induzierte Aktinreorganisation hemmt, wobei Arp2/3 dislokalisiert wird. [Mullins 2000; Machesky und Insall

1998] Für eine effiziente Induktion der Aktinnukleation durch den Arp2/3-Komplex sind neben der Interaktion mit der sauren Region die WH2-Domänen notwendig. p150-Spir besitzt neben vier aufeinanderfolgenden WH2-Domänen, die per se fähig sein sollten, durch die Bindung von 4 Aktinmonomeren die Aktinpolymerisation zu induzieren, ebenfalls eine saure Region (AD) in Nähe seiner WH2-Domänen. Jedoch ist diese im Unterschied zu den WASP Familienproteinen aminoterminal angeordnet. (→ Abb.26)

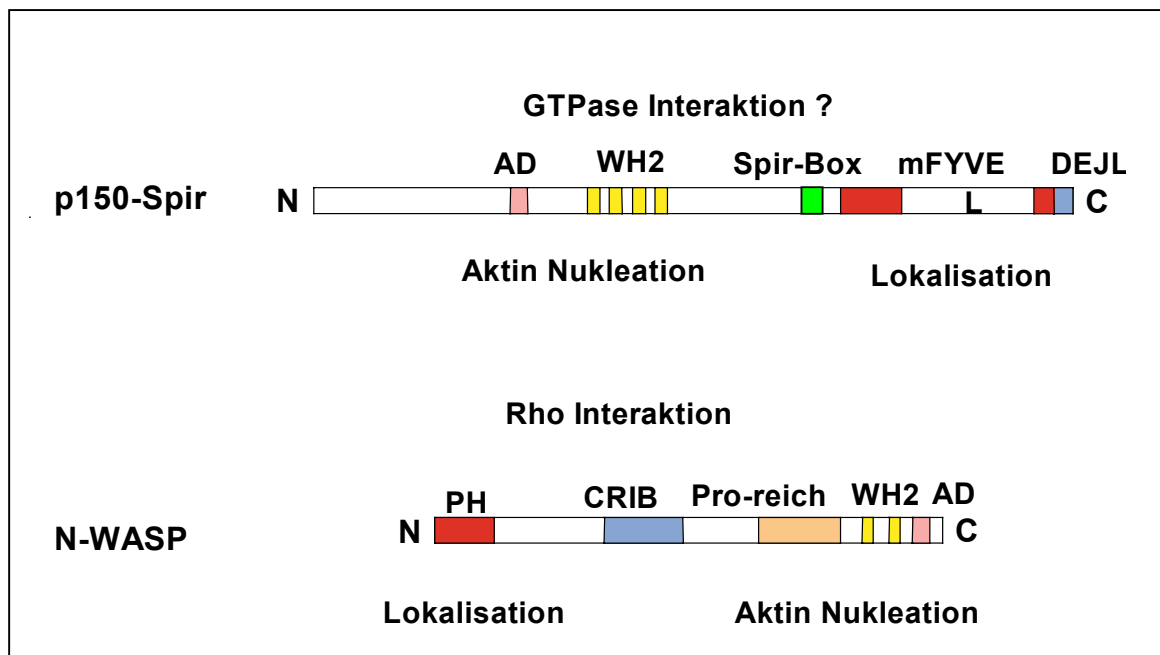


Abb.26: Vergleich der Domänenstruktur von p150-Spir mit dem WH2-Familien-Protein N-WASP mit Angabe der Funktion der Domänen. P150-Spir besitzt N-terminal eine saure Domäne (AD), vier WH2-Domänen (Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein Homolgy Domain 2), eine in allen Spir-Proteinen konservierte Spir-Box, eine modifizierte FYVE-Domäne (m-FYVE) und ein C-terminales DEJL (docking site for Erk and JNK,LXL) Motiv, N-WASP eine N-terminale PH-Domäne (Pleckstrin-Homology-Domain), ein CRIB-Motiv (Cdc/rac interacting and binding region), eine prolinreiche Sequenz (Pro rich), zwei WH2-Domänen und eine C-terminale saure Domäne (AD).

Unveröffentlichte Ergebnisse von *in vitro* Aktin-Polymerisationsassays, die von unseren Kooperationspartnern im Labor von Dyché Mullins in San Francisco durchgeführt wurden, zeigen, daß p150-Spir *in vitro* nach Zusatz von monomerem Aktin die Aktinpolymerisation induziert. Bei Zugabe von p150-Spir zu monomerem Aktin zusammen mit Komponenten des Arp2/3-Komplexes wird die Aktinpolymerisation deutlich ver-

stärkt. Ob dieses Verhalten für p150-Spir auch *in vivo* zutrifft, bleibt in weiteren Experimenten zu klären.

Erste eigene Immunfluoreszenzexperimente mit p150-Spir transfizierten NIH3T3-Zellen deuten auf eine Kolo-kalisation des Arp2/3-Komplexes und p150-Spir hin. In zukünftigen Arbeiten soll die Funktion der WH2-Domänen und der benachbarten sauren Region (AD, *acidic domain*) in p150-Spir für die Aktinbindung und Interaktion mit Arp2/3 untersucht werden. Die entsprechenden Deletionsmutanten pcDNA3-MTp150-Spir Δ WH2 und pcDNA3-MTp150-Spir Δ WH2 Δ AD wurden bereits kloniert. [Otto, unveröffentlichte Daten]

Die bisher vorhandenen Daten deuten darauf hin, daß es sich bei p150-Spir um ein für Regulation und Organisation des Zytoskeletts wichtiges Protein handelt. Einen weiteren Hinweis darauf gibt der Phänotyp von *spir* Mutanten *Drosophila*-Embryonen. *Spir* wurde als maternales Effektgen in der *Drosophila*-Embryogenese charakterisiert, das für die dorso-ventrale und anterior-posteriore Achsenfestlegung im *Drosophila*-Embryo und für die Lokalisation von posterior determinierenden Komponenten, wie *gurken*, *oskar* und *staufer* notwendig ist. Im Gegensatz zu PEM5 (*posterior endmark gene 5*), einem p150-Spir sehr ähnlichen Protein unbekannter Funktion in *Ciona savignii*, dessen mRNA am posterioren Pol des *Ascidien*-Embryos lokalisiert ist [Satou und Satoh 1997], ist die *spir*-mRNA nicht am posterioren Pol des *Drosophila*-Embryos, sondern in den Follikelzellen und den Nährzellen nachweisbar. [Wellington et al. 1999] *Spir*-mutante Embryonen zeigen eine vorzeitige Bündelung von Mikrotubuli am Oozytencortex und eine ebenfalls vorzeitig ausgelöste Mikrotubuli-abhängige Zytoplasmaströmung. [Wellington et al. 1999; Manseau und Schüpbach 1989] Mikrotubuli legen die äußere Zellform fest, dienen als Gleitschienen für den intra-zellulären Vesikeltransport und bilden als Aggregate Zellorganellen wie Centriol, Basalkörper und Kernteilungsspindel aus. Behandelt man Wildtyp-Embryonen mit Cytochalasin D, einem die Aktinpolymerisation hemmenden Agens, läßt sich der *Spir*-Phänotyp imitieren, was auf eine Verbindung zwischen Aktin- und Mikrotubulizytoskelett hindeutet. Eine Hypothese wäre, daß Aktin die Mikrotubulibündelung reguliert und bis zu einem bestimmten Signal in der Embryonalentwicklung unterdrückt. [Wellington et al. 1999] p150-Spir wäre ein denkbare Bindeglied für diesen Mechanismus, die Regulation könnte durch JNK-Signale erfolgen. Es konnte gezeigt werden, daß nicht nur externe Signale Zellantworten in Form von Umbauprozessen des

Zytoskeletts bewirken, sondern auch umgekehrt Veränderungen in der Zytoskelettdynamik Signaltransduktionswege stimulieren und die Expression bestimmter Gene beeinflussen. So führen durch das Spindelgift Taxol ausgelöste Veränderungen im Mikrotubuluszytoskelett zur JNK-Aktivierung über MEKK1, wobei JNK ein Verteilungsmuster punktförmig entlang der Mikrotubuli zeigt. [Yujiri et al. 1999]

Ein Zusammenhang zwischen Mikrotubuli- und Aktinzytoskelett wurde für die Differenzierung von Neuroblasten bei *Drosophila* beschrieben. [Wodarz et al. 1999] Neuroblasten teilen sich asymmetrisch in einen anderen Neuroblasten und in eine kleinere basal gelegene Ganglionmutterzelle. Das *Drosophila*-Protein Insc (*Inscuteable*) kontrolliert in diesem Prozess die Orientierung der Mitosespindel und die asymmetrische Lokalisation bestimmter Proteine und mRNAs wie beispielsweise Prospero und Numb, die für die Determination des Zellschicksals, d.h. die Festlegung, welche Zelle bei der Teilung Neuroblast und welche Ganglionmutterzelle wird, verantwortlich sind. Insc ist am apikalen Cortex des Neuroblasten verankert. Diese Verankerung wird durch das Protein Baz (*Bazooka*) vermittelt und ist zellzyklusabhängig. Baz, das in den Epithelzellen apikal lokalisiert ist, bindet als Gerüstprotein einen Multiproteinkomplex, in dem Insc und andere Zellpolaritätsdeterminanten enthalten sind, an den apikalen Zellpol. Man vermutet, daß eine asymmetrische Zellteilung durch die asymmetrische Verteilung bestimmter Determinanten in der Mutterzelle induziert wird. Baz stellt ein mögliches Kandidatenprotein für dieses asymmetrische Verteilungssignal und für die Vermittlung der Polarität der Epithelzellen dar, Insc kontrolliert die Orientierung und Ausrichtung der Mitosespindel, die für die unterschiedliche Verteilung zytoplasmatischer Komponenten auf die Tochterzellen notwendig ist. Neben der Verbindung zur Mitosespindel und damit zu Mikrotubulistrukturen enthält Insc Ankyrin-ähnliche Bindedomänen und kann damit vermutlich Spektrin, ein Zellmatrixprotein binden, was wiederum mit F-Aktin interagiert. Überexpression von Par-3, einem Baz-Homolog aus *Caenorhabditis elegans*, zeigt ein ähnliches perinukleäres Verteilungsmuster bei Überexpression in adhärennten Säugerzellen, wie p150-Spir. Par-3 bildet mit Par-6 einen Komplex, wobei Par-6 über seine CRIB-Domäne mit aktiviertem Cdc42 interagiert und so die Verbindung zur Regulation des Aktinzytoskeletts darstellt. [Joberty et al. 2000; Kim 2000; Lin et al. 2000]

Resultierend aus diesen Daten und den bei *spir*-Mutanten beobachteten Phänotypen wäre für p150-Spir eine ähnliche Funktion in der Verbindung von Aktinregulation und

Mikrotubulizytoskelett denkbar. Einen weiteren Hinweis geben vorläufige Immunfluoreszenzdaten bei Überexpression von p150-Spir in NIH3T3-Zellen, die eine Kolo-kalisation von p150-Spir mit dem Mikrotubuliprotein Tubulin zeigen.

Ebenso könnte p150-Spir durch seine Interaktion mit JNK eine Rolle in der Zellpolaritätsdetermination in der *Drosophila* Entwicklung beim Prozess der dorsalen Schließung spielen. Polarität ist die Voraussetzung für eine gerichtete Bewegung von Zellen. Viele eukaryotische Zellen, darunter Saumzellen in Gewebsverbänden, bilden ein hochorganisiertes Netzwerk von Aktinfilamenten an ihren Polen aus, in denen Umbauvorgänge am Zytoskelett Veränderungen in den Kontakten zur extrazellulären Matrix bewirken und damit Migration ermöglichen. In den Saumzellen beim *Drosophila*-Embryo akkumulieren beispielsweise F-Actin und Phosphotyrosine am basalen Pol. Diese Verteilung der Proteine geschieht in Abhängigkeit von JNK-Signalen und ist mit der Elongation der Saumzellen assoziiert. (→ 3.2.2.) Die mit Aktinpolymerisationsvorgängen assoziierten Proteine des Arp2/3-Komplexes sind meist ebenfalls in diesen aktinreichen Polen lokalisiert. [Mullins 2000; Welch et al 1997; Svitkina et al. 1999] Es wäre von Interesse, zu untersuchen, ob auch p150-Spir diese Lokalisation zeigt, was einen weiteren Hinweis auf seine Beteiligung an diesen Aktinumbauprozessen darstellen würde.

7.3. p150-Spir als Bindeglied zwischen JNK-Signalen und Regulation des Zytoskeletts

Viele Prozesse in der Zelle sind mit Veränderungen am Aktinskelett verbunden. Die Koordination der Polarisation und Depolarisation von zellulärem Aktin wird dabei im komplexen Zusammenspiel verschiedener Signaltransduktionsenzyme reguliert.

p150-Spir stellt ein Substrat der JNK-Kinase dar. Bei Überexpression in adhären-ten Säugerzellen induziert p150-Spir die Bildung von Aktinclustern. Resultierend daraus liegt die Schlußfolgerung nahe, daß p150-Spir eine Verbindung zwischen JNK-Signalübertragung und Aktinzytoskelett darstellt. Obwohl zahlreiche Hinweise existieren, die auf eine Rolle von JNK-Signalen bei Veränderungen des Aktinzytoskeletts

deuten, konnte der genaue Mechanismus dieser Verbindung bisher nicht aufgeklärt werden.

Die Aktivatoren der JNK-Kaskade, Rac und Cdc42 gehören zur Familie der Rho-GTPasen. Rho-GTPasen sind Regulatoren des Zytoskeletts und bewirken in eukaryotischen Zellen definierte morphologische Veränderungen, die mit Umbauprozessen am Aktinskelett assoziiert sind. So induziert aktiviertes Rho die Bildung von Aktin-Stressfasern (*actin stressfibers*), während aktiviertes Rac zur Bildung von *Lamellipodien* und zellmembrannahen Aktin-*Clustern*, *membrane ruffles*, führt und aktiviertes Cdc42 *Filopodien*-Bildung (Mikroausstülpungen der Zellmembran) bewirkt. [Hall 1998] Koinjektion von fluoreszenzmarkiertem Aktin zusammen mit den einzelnen G-Proteinen zeigt, daß Rac und Cdc42 die *de novo*-Aktinpolymerisation induzieren, während Rho nur die Reorganisation bereits vorhandener Aktinfilamente bewirkt. [Mullins 2000; Ridley et al. 1992; Kozma et al. 1995] Die Mikroinjektion von aktiviertem Rac und Cdc42 induziert Veränderungen von zellulären Aktinstrukturen innerhalb von Minuten, ein Prozess der zu schnell stattfindet, als daß er durch *de-novo*-Proteinsynthese erklärbar wäre, d.h. es muß ein bereits vorhandener Faktor die entsprechenden Signale vermitteln. [Mullins 2000; Machesky und Hall 1997]

Der Mechanismus, wie die GTPasen Aktinstrukturen regulieren, wurde mit der Entdeckung der WASP-Proteine transparenter. Die WASP-Proteine sind als WH2-Familien-Proteine Aktinregulatoren und interagieren mit bestimmten Rho-GTPasen, d.h. stellen deren Substrate dar. [Westphal et al. 2000; Blanchion et al. 2000; Higgs und Pollard 1999; Machesky et al. 1999] Man nimmt an, daß diese Proteine als Adapterproteine Signale von heptameren Rezeptoren oder Wachstumsfaktorrezeptoren zu Orten der Aktinreorganisation in der Zelle durch Assoziationen mit einer Vielzahl von Aktin bindenden Proteinen leiten. [Westphal 2000] WASP besitzt eine CRIB Domäne (*cdc42 and rac interacting and binding domain*), welche die Interaktion mit Rac und Cdc42 vermittelt. [Rudolph et al. 1998; Aspenstrom et al. 1996] Der funktionelle Zusammenhang zwischen N-WASP und Cdc42 konnte dadurch gezeigt werden, daß die Cdc42-induzierte Filopodienbildung durch Koexpression mit NWASP verstärkt wird; ebenso wird eine durch WASP induzierte ektopische Aktinpolymerisation durch dominant negative Cdc42-Mutanten gehemmt. Eine ähnliche funktionelle Verbindung ließ sich für WAVE und Rac nachweisen. Eine dominant-negative Mutante des WAVE-Proteins inhibiert die durch Rac bewirkte Induktion von *membrane ruffles*.

[Miki et al. 1998] Eine mögliche Rolle von MAP-Kinase-Signalen in der Beeinflussung von Aktinstrukturen über die Regulation von WAVE wird diskutiert, da WAVE ein Phosphorylierungssubstrat für MAP-Kinasen darstellt, was auf eine funktionelle Regulation von WAVE durch MAP-Kinasen hindeutet. [Miki et al. 1999]

p150-Spir wird von der MAPK JNK phosphoryliert, wie man annehmen kann, auch reguliert und ist auf Grund seiner WH2-Domänen mit WASP und WAVE verwandt. Obwohl die p150-Spir-Sequenz keine bekannte Bindungsdomäne für Rho-GTPasen enthält, gibt es doch Hinweise auf eine direkte Interaktion durch Ergebnisse von *Yeast-Two-Hybrid*-Experimenten, in denen eine Interaktion von amino-terminalen p150-Spir-Sequenzen mit Rac1, RhoA, und Cdc42 gezeigt werden konnte. [Wellington et al. 1999] Die Relevanz dieser Daten muß in weiteren Experimenten *in vivo* und *in vitro* untersucht werden.

Untersuchungen der *in vivo* Funktion einzelner Proteine des JNK-Signalweges beim Prozess der dorsalen Schließung während der *Drosophila*-Embryogenese zeigen, daß JNK-Signale für diesen mit Umbauvorgängen am Aktinzytoskelett definierter Zellen assoziierten Prozesses essentiell sind. In Wildtyp-Embryonen findet man an den dorsalen Grenzen der Saumzellen (LE-Zellen) Akkumulationen von Aktinfilamenten und Phosphotyrosinen. Ähnliche Verhältnisse findet man in Säugerzellen an Stellen, an denen fokale Adhäsionen, Rho-abhängige Zell-Matrix-Kontakte, ausgebildet werden. Auch eine Akkumulation von DPAK ist in den LE-Zellen nachweisbar, was auf eine Verbindung zu DJNK hindeutet. [Goberdhan und Wilson 1998; Harden et al. 1996] Die Lokalisation dieser Komponenten kann durch dominant inhibitorisches Rac geblockt werden. In den Saumzellen DJNK-defekter Embryos finden diese Rac induzierten Zytoskelettumbauprozesse nicht statt, was auf die Notwendigkeit von DJNK-Signalen für diese Prozesse hinweist. [Tateno et al. 2000; Ip und Davis 1998; Stroman und Perrimon 1999] Es ist nicht bekannt, welche Rolle p150-Spir im Prozess der dorsalen Schließung spielt. Bisher wurden keine dorsal offenen Phänotypen bei *spir*-mutanten Embryonen beschrieben. Vorstellbar wäre eine Funktion des Proteins als Aktinreorganisator während der durch DJNK-Signale regulierten Morphologieveränderungen in den Saumzellen und eine mögliche Rolle bei der Lokalisierung der oben genannten Proteine. Zur Zeit wird ein p150-Spir spezifischer Antikörper hergestellt, der weitere Experimente in *Drosophila* ermöglichen und so Antworten auf diese Fragen geben soll.

Unikawa und Mitarbeiter konnten zeigen, daß Frabin, ein Aktinfilamente bindendes Protein welches wie p150-Spir eine FYVE-Domäne enthält, über diese Domäne in Zusammenarbeit mit einer PH-Domäne (*Pleckstrin-Homology-Domain*) mit dem Zytoskelett interagiert. Beide Domänen sind für die Aktivierung der kleinen GTPase Rac und die Aktivierung von JNK notwendig. [Ono et al. 2000; Unikawa et al. 1999] Möglicherweise haben die modifizierte FYVE-Domäne und die WH2-Domänen in Spir-Proteinen ähnliche Funktionen und verbinden JNK-Signale mit dem Zytoskelett. Denkbar wäre auch eine Bedeutung von p150-Spir für die Lokalisation der JNK-Kinase oder anderer interagierender Komponenten, da p150-Spir über seine WH2-Domänen mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbunden ist und mit der modifizierten FYVE-Fingerstruktur eine Proteindomäne enthält, die Membranlokalisationen vermitteln könnte. (→ 7.4) Die Arbeitsgruppe von J.D. Scott konnte zeigen, daß das WH2-Domänen-Protein WAVE-1 als Gerüstprotein wirkt und durch Interaktion mit den Kinasen PKA (*protein kinase A*) und Abl (*Abelson tyrosine kinase*) einen Aktin-assoziierten Multikinase-Proteinkomplex bildet an dem Aktinreorganisation als Reaktion auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren (PDGF) in humanen Fibroblasten erfolgt. [Westphal et al. 2000]. Das zeigt einen Mechanismus, bei dem eine Serin-Threoninkinase (PKA) und eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase (Abl) durch ein WH2-Domänen-Protein (WAVE) an Orte der Aktinreorganisation in der Zelle rekrutiert werden. Dadurch könnten die schnellen Veränderungen in der Zytoskelettarchitektur nach Aktivierung der kleinen GTPasen wie Rac erklärt werden.

7.4. p150-Spir als Bindeglied zwischen MAPK-Signalen und zellulären Transportprozessen

p150-Spir besitzt in der c-terminalen Hälfte seiner Proteinsequenz ein Zinkfingermotiv, das Homologie zur FYVE-Domänen-Konsensussequenz zeigt. FYVE-Domänen-Proteine sind an zellulären Transportmechanismen beteiligt. In FYVE-Zinkfingermotiven werden zwei Zinkionen durch jeweils 4 Cysteine und/oder Histidine komplexiert ($Cx_2Cx_{9-39} Cx_{1-3} (C/H)x_{2-3} Cx_2Cx_{4-48} Cx_2 C$). [Stenmark et al. 1996] Die Cystein/Histidin-Reste sind paarweise angeordnet; das erste und das dritte Paar

bzw. das zweite und das vierte Paar binden jeweils ein Zinkion. (→ Abb.27) Die Anordnung der Cysteine 1 bis 6 in p150-Spir ist identisch mit der FYVE-Konsensussequenz in den bekannten FYVE-Domänen-Proteinen. Während in diesen Sequenzen auch Cystein 7 und 8 mit geringem Abstand dem 6. Cystein folgen, besteht in der Sequenz von p150-Spir eine Insertion von 195 Aminosäuren zwischen Cystein 6 und 7. Auch in den Spir-Sequenzen in Mensch, Maus und *Ciona* finden sich Insertionen zwischen 57 und 67 Aminosäuren. (→ Abb.27) Die FYVE-Zinkfinger Konsensussequenz enthält außerdem einen Abschnitt basischer Aminosäuren (R/K)(R/K)HHR zwischen Cystein 2 und 3, der durch Ausbildung einer taschenartigen Struktur spezifisch die Bindung von PtdIns-3-P und darüber die Membranlokalisation der FYVE-Finger-Proteine vermittelt. [Hurley und Misra 2000; Misra und Hurley 1999; Gaullier et al.1999] (→ 6.13, Abb.23; 7.3.) Eine weitere Besonderheit der FYVE-Sequenz der Spir-Proteine ist das Fehlen dieser basischen Region, die für die Bindung von PtdIns-3-P essentiell zu sein scheint. [Misra und Hurley 1999] Die FYVE-Domäne in p150-Spir wird deshalb als modifizierte FYVE-Fingerstruktur (mFYVE) bezeichnet. Es ist fraglich, ob p150-Spir PtdIns-3-P binden kann, eine Interaktion mit anderen Substraten ist wahrscheinlicher. FYVE-Zinkfinger vermitteln Membranlokalisation von Proteinen. Experimente mit p150-Spir-Mutanten, in denen die FYVE-Domäne zerstört wurde, zeigten ein verändertes Lokalisationsmuster des Proteins in NIH3T3-Zellen. Das legt die Schlussfolgerung nahe, daß die modifizierte FYVE-Domäne in p150-Spir die intrazelluläre Lokalisation des Proteins beeinflusst. Während Überexpression von Wildtyp-p150-Spir eine perinukleäre Verteilung in der Zelle aufweist, findet man bei p150-Spir-Mutanten in denen die mFYVE-Domäne durch Mutation der Cysteine in Serine zerstört wurde oder nach Deletion der mFYVE-Domäne eine gleichmäßige Verteilung des Proteins im Zytoplasma. (→ 6.13.) Kristallstrukturanalysen der FYVE-Domänen-Konsensussequenzen zeigen zwei konservierte hydrophobe Aminosäurereste, meist Leucin bzw. Methionin, zwischen den Cysteinen 2 und 3, die an der Spitze des FYVE-Fingers exponiert sind. (→ Abb.27, vgl. Rabphilin 3A) Diese hydrophoben Aminosäurereste können mit den hydrophoben Anteilen in Membranlipiden interagieren, dadurch die Membranbindung des Proteins stabilisieren und helfen, die FYVE-Domäne zu orientieren. [Misra und Hurley 2000, Driscoll und Vuidepot 1999] Mutationen dieser Region inhibierten die Mem-

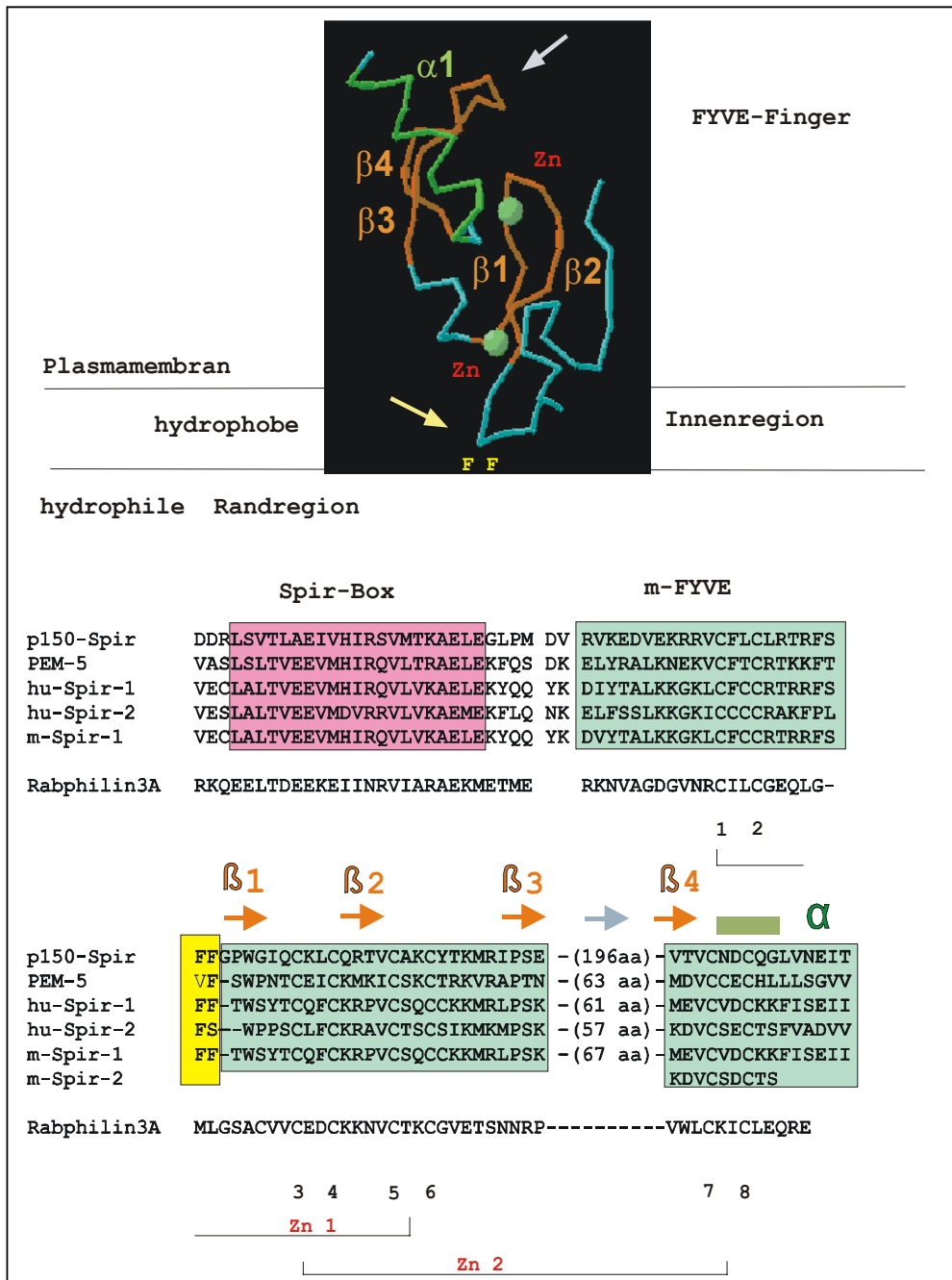


Abb. 27: Spir-Box und mFYVE-Domänen verschiedener Spir-Proteine und Rabphilin 3A im Vergleich. Oben ist die Kristallstruktur des FYVE-Zinkfingers abgebildet, β -Faltblätter, α -Helix und die beiden Zinkionen, die von den Cysteinen 1,2,5 und 6 bzw. 3,4,7 und 8 komplexiert werden, sind farbig markiert, Pfeile weisen auf die Lage der beiden hydrophoben Aminosäurereste (F) im hydrophoben Membrananteil und auf die Insertion zwischen den Cysteinen 6 und 7 hin .

branbindung von EEA1, einem FYVE-Familien-Protein. [Odorizzi et al.2000; Corvera 2000] Im *Drosophila* p150-Spir, ebenso wie im humanen Spir-1, befinden sich hydrophobe Phenylalanine (F) an den entsprechenden Positionen, die ebenfalls Membraninteraktionen vermitteln könnten. Nach Mutation dieser Aminosäuren in der mFYVE-

Regulation der Neurotransmitterfreisetzung im Hirn. [Ostermeier und Brunger 1999] Rabphilin 3A bindet die GTP-beladene Form von Rab3A über zwei α -helikale Kontaktbereiche. Die dreidimensionale Strukturvoraussage für die Spir-Box zeigt ebenfalls eine α -Helix-Struktur, so daß neben der hohen Konservierung auf Aminosäureebene auch die Tertiärstrukturvoraussage des Proteins eine Interaktion von p150-Spir mit GTPasen der Rab-Familie annehmen läßt.

Vorläufige Daten aus Immunfluoreszenz- und Koimmunopräzipitationsexperimenten deuten auf eine Interaktion zwischen der bis jetzt vom humanen Spir-1 bekannten C-terminalen Teilsequenz und der GTPase Rab11 hin. Die Lokalisation von Rab11 wurde in subapikalen Recycling-Endosomen und im trans-Bereich des Golgi-Apparats beschrieben, Rab11-GTPasen scheinen eine Rolle bei Transportvorgängen zwischen Recycling-Endosomen und Plasmamembran zu spielen. [Wang et al. 2000; Leung et al. 2000] Bei Überexpression in Mausfibroblasten zeigt p150-Spir ein perinukleäres Verteilungsmuster, welches einer Lokalisation an subzellulären Membranstrukturen, wie beispielsweise am Golgi-Apparat, ähnelt. Die genaue Lokalisation von p150-Spir in der Zelle soll in zukünftigen Experimenten mit spezifischen Zellorganellenmarkern immunhistochemisch nachgewiesen werden. Weitere Hinweise unterstützen die Hypothese einer Verbindung zwischen p150-Spir und Rab11. Es wurde gezeigt, daß Rab11-haltige Endosomen und Membranstrukturen reich an Aktin sind. [Calhoun et al. 1998; Trischler et al. 1999] Unveröffentlichte Daten von G.L.Dollar et al. (*Drosophila*-Research-Conference Pittsburg 2000) besagen, daß *Drosophila*-Rab11 für die Lokalisation der *oskar*-mRNA am posterioren Oozytenpol von Bedeutung ist. Bei *spir*-mutanten Embryos wird ebenfalls die Lokalisation der posterioren Determinante *oskar* auf mRNA-Ebene beeinflusst. [Wellington et al 1999].

Aus den bisherigen Daten ist folgendes Arbeitsmodell zur Funktion von p150-Spir denkbar: Bestimmte Stimuli bewirken in Zellen die Ausbildung lokaler Aktin-Gerüste, die Proteinen und Vesikeln als Transportwege dienen und auch eine gerichtete Signalweiterleitung von der Membran an nachgeschaltete Proteine gewährleisten. Aktinpolymerisation und Aktindepolarisation als dynamische Prozesse können Signaltransduktionskasaden regulieren und umgekehrt beeinflussen Signalmoleküle das Zytoskelett. p150-Spir könnte dabei als Aktinreorganisator wirken und unter der Kontrolle von kleinen GTPasen und JNK die Aktinpolymerisation initiieren, gleichzeitig über seine modifizierte FYVE-Domäne JNK und andere interagierende Proteine

an Zellmembranstrukturen rekrutieren und so der Aktivierung durch externe Stimuli zugänglich machen. Unter der Kontrolle von MAPK-Signalen könnte p150-Spir durch Ausbildung von Aktinfilamenten in der Zelle bei vielen Prozessen mitwirken, beispielsweise die Weiterleitung von Signalen ermöglichen, über Interaktionen mit Rab-GTPasen an vesikulären Transportprozessen beteiligt sein oder die Lokalisation von die Zellpolarität determinierenden Faktoren in embryonalen Entwicklungsprozessen beeinflussen. (→ Abb.29)

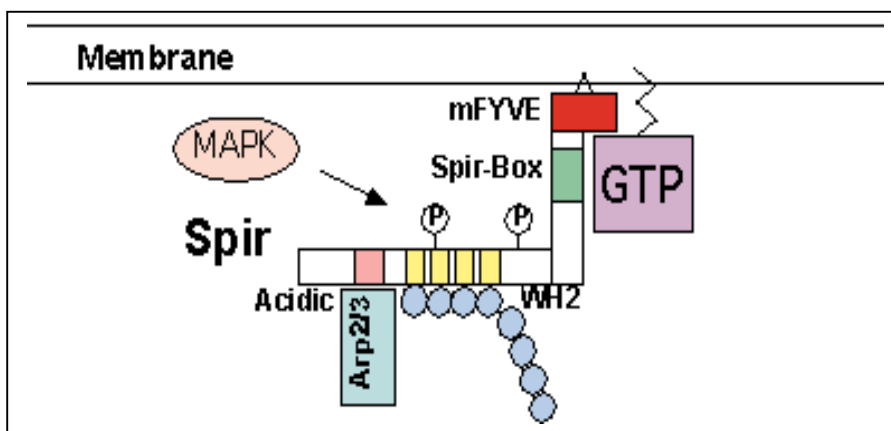


Abb.29: Arbeitsmodell, wie Spir-Proteine Signaltransduktionsmodule an Membranen rekrutieren und mit Aktinregulation koppeln.

7.5. Ausblick und zukünftige Fragestellungen

Die Analyse von EST-Datenbanken hat einen hohen Grad an Konservierung zwischen *Drosophila* p150-Spir Sequenzen und humanen Sequenzen und EST-Klon-Sequenzen aus der Maus gezeigt, wobei in einigen Bereichen auf Proteinsequenzebene, besonders in Bereichen funktioneller Proteindomänen, Identitäten von bis zu 57% der Aminosäuren bestehen.

Zur Analyse der Funktion der endogenen Spir-Proteine in Säugerzellen ist die Klonierung der humanen und der murinen *spir* Gene unerlässlich. Bisher wurden in Datenbankanalysen zwei humane Spir-Gene gefunden, hu-*spir* 1 auf Chromosom 18p 11.2 und hu-*spir* 2 auf Chromosom 16q24.3, wobei die 5'kodierenden Bereiche beider Gene noch nicht vollständig vorliegen. Die Herkunft der EST-Klone deutet auf ein breites Expressionsspektrum von Spir in Säugergewebe hin. Mittels RT-PCR und Northern-Blot Analysen ließ sich die Expression von hu-*spir* 1 in verschiedenen Hirnbereichen, Leber, Kleinhirn, Herz, Lunge, Niere, Muskulatur, Hoden und Ovarien nachweisen, während sie in Pankreas, Milz und fetaler Leber fehlte [Kazusa DNA Research Institute]. Von hu-*spir* 2 liegen bisher keine Expressionsdaten in humanen Geweben vor. Auch in der Maus wurden EST-Klonsequenzen gefunden, die auf die Existenz von zwei murinen *spir*-Genen hindeuten. Im Northern-Blots mit RNAs aus murinen Geweben war eine hohe Expression für m-*spir* 1 in Hirn und für m-*spir* 2 in Colon, Hirn und Testis nachweisbar. (→ 6.7.)

Zur Analyse der Funktion der Säuger Spir-Proteine sollen polyklonale Antikörper in Kaninchen hergestellt werden. Mit Hilfe dieser Antikörper sollen weitere Untersuchungen zur Funktion des endogenen Proteins durchgeführt werden, um z.B. die Fragestellung zu klären, ob die Funktion von p150-Spir durch Rho-GTPasen reguliert wird, wie p150-Spir die Aktinpolymerisation induziert, ob es mit Rab-GTPasen interagiert und ob es eine Rolle beim zellulären Vesikeltransport spielt.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß die Region 24.3 auf dem humanen Chromosom 16, auf dem hu-*spir* 2 lokalisiert ist, bei diversen Brustkrebsarten häufig Mutationen zeigt. [Whitmore et al. 1998 1u.2] Die Analyse, ob in menschlichen Mammakarzinom-Gewebeproben humanes *spir* 2 mutiert vorliegt und ob Spir eine Rolle in der Karzinogenese spielt ist ein weiterer Aspekt, der untersucht werden sollte.

8. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.:** Molecular biology of the cell, 3rd. ed., Garland Publishing, New York, 1994
- Alessi, D.R.; Saito, Y.; Campbell, D.G.; Cohen, P.; Sithanandam, G.; Rapp, U.; Ashworth, A. Marshall, C.J.; Cowley, S;** Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. The EMBO Journal, 13, 1610-1619, 1994
- Alvarez, E., Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Latour, D.A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., Davis, R.J.:** Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. J. Biol. Chem. 266, 15277-15285, 1991
- Aoki, M., Akiyama, T., Miyoshi, J., Toyoshima, K.:** Identification and characterization of protein products of the cot oncogene with serine kinase activity. Oncogene, 6, 1515-1519, 1991.
- Aspenstrom, P., Lindberg, U., Hall, A.:** Two GTPases, Cdc42 and Rac bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. Curr. Biol. 6, 70-75, 1996
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidmann, J.G., Struhl, K. (eds):** Current Protocols in Molecular Biology. Wiley & Sons. New York 1987.
- Avruch, J.; Zhang, X.-F.; Kyriakis, J.M.:** Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. TIBS 19, 279-283, 1994.
- Blanchoin, L., Amann, K., Higgs, H., Marchland, J.B., Kaiser, D., Pollard, T.:** Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. Nature, 404, 1007-1011, 2000
- Blank, J.L., Gerwins, P., Elliott, E.M., Sather, S., Johnson, G.L.:** Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase. J. Biol. Chem., 271, 5361-5368, 1996.
- Bi E., Zigmond S.H.:** Where the WASP stings. Curr Biol . 9, 160-163 , 1999
- Blenis, J.:** Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5889-5892, 1993
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., and Yancopoulos, G. D.:** ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. Cell 65 (4), 663-75, 1991
- Broder, Y.C., Katz, S., Aronheim, A.:** The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. Curr Biol 8(20), 1121-1124, 1998
- Buday, L., Downward, J.:** Epidermal growth factor regulated p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adaptor protein, and sos nucleotide exchange factor. Cell, 73, 611-620, 1993.
- Burbelo, P.D., Drechsel, D., Hall, A.:** A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. J. Biol. Chem., 270, 49, 29071-29074, 1995
- Calhoun, B.C., Lapierre, L.A., Chew, C.S., Goldenring, J.R.:** Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells. Am J Physiol 275, C163-170, 1998
- Chen, Y.R., Tan, T.H. :** The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling. Int. J. Oncol., 16, 651-662, 2000
- Clontech.** MATCHMAKER Library User Manual (PT1020-1) Version PR62562
- Clontech.** Yeast Protocols Handbook (PT3024-1)
- Corvera, S.:** Signal transduction: Stuck with FYVE domains. Science's stke, 37, 1-3, 2000
- Coso, O.A., Teramoto, H., Simonds, W.F., Gutkind, J.S.:** Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1- dependent pathway. J. Biol. Chem. 271, 3963-3966, 1996
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., Gutkind, J.S.:** The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. Cell 81, 1137-1146, 1995
- Daum, G.; Eisenmann-Tappe, I.; Fries, H.-W.; Troppmair, J.; Rapp, U.R.:** Ins and Outs of Raf kinases. TIBS 19, 474-480, 1994.

- Davis, R.J.:** The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.*, 268, 14553-14556, 1993
- Davis, R. J.:** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103, 239-252, 2000
- Dent, P.; Haser, W.; Haysteadt, T.A.J.; Vincent, L.A.; Roberts, T.M.; Sturgill, T.W.:** Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH3T3 cells and in vitro. *Science* 257, 1404-1407, 1992.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J.:** Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, 267, 682-685, 1995.
- Dickens, M., Rogers, J.S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J.R., Greenberg, M.E., Sawyers, C.L., Davis, R.J.:** A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science*, 277, 693-696, 1997.
- Dorow, D.S., Devereux, L., Tu, G.F., Price, G., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Simpson, R.J.:** Complete nucleotide sequence, expression, and chromosomal localisation of human mixed-lineage kinase 2. *Eur. J. Biochem.*, 234. 492-500, 1995.
- Driscoll, P.C., Vuidepot, A.L. :** Peripheral membrane proteins: FYVE sticky fingers. *Curr. Biol.* 9, R857-R860, 1999
- Elion, E.A. :** Routing MAP kinase cascades., *Science* 281, 1625-1626, 1998
- Fanger, G.R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M.B., Johnson, G.L.:** MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs and Tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7, 67-74, 1997.
- Fields, S., Song, O.:** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230), 245-246, 1989
- Fields, S., Sternglanz, R.:** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10(8), 286-92, 1994
- Gallo, K.A., Mark, M.R., Scaden, D.T., Wang, Z., Gu, Q., Godowski, P.J.:** Identification and characterization of SPRK, a novel src-homology 3 domain-containing proline-rich kinase with serine/threonine kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 269, 15092-15100, 1994.
- Gassen, H.G., Schrimpf, G. (Hrsg):** Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 1999, 2. Aufl.
- Garrington TP, Johnson GL:** Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 211-218, 1999
- Gaullier, J.M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H. and Aasland R. :** FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*, 394, 432-433, 1998
- Gerwins, P., Blank, J., Johnson, G.L.:** Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 272, 8288-8295, 1997.
- Glise, B., Noselli, S. :** Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes Dev.* 11, 1738-1747, 1997
- Glise, B., Bourbon, H., Noselli, S. :** *Hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell*, 83, 451-461, 1995
- Goberdhan, D.C.I., Wilson, C.:** JNK, cytoskeletal regulator and stress response kinase? A *Drosophila* perspective., *Bio Essays*, 20, 1009-1019, 1998
- Hagemann, D., Troppmair, J., Rapp, U.R.:** Cot protooncogene, activates the dual specificity kinases MEK-1 and SEK-1 and induces differentiation of PC12 cells. *Oncogene*, 18, 1391-1400, 1999.
- Hagemann C.:** Raf-Isoform spezifische Protein-Protein Wechselwirkungen, detektiert mit dem Hefe Two-Hybrid System, Doktorarbeit am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ) der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg 1999.
- Hall A.:** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279, 509-514, 1998.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., Ulevitch, R.J.:** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265, 808-811, 1996.
- Hanks, S.K., Hunter, T.:** The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.*, 9, 576-596, 1995

- Harden, N., Loh, H.Y., Chia, W., Lim, L.:** A dominant inhibitory version of the small GTP-binding protein Rac disrupts cytoskeletal structures and inhibits developmental cell shape changes in *Drosophila*. *Dev.* 121, 903-914, 1996
- Hill, C.S.; Treisman, R.:** Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell* 80, 199-211, 1995.
- Higgs, H.N., Pollard, T.D. :** Activation by Cdc42 and PIP₂ of Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex., *J.Biol.Chem.*, 150, 6, 1311-1320, 1999
- Hirai, S., Izawa, M., Osada, S., Spyrou, G., Ohno, S.:** Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene*, 12, 641-650, 1996.
- Hirai, S., Katoh, M., Tereda, M., Kyriakis, J.M., Zon, L.I., Rana, A., Avruch, J., Ohno, S.:** Complete nucleotide sequence, expression, and chromosomal localisation of human mixed-lineage kinase 2. *J.Biol.Chem.*, 272, 15167-15173, 1997.
- Holland, P.M., Suzanne, M., Campell, J.S., Noselli, S., Cooper, J.A.:** MKK7 is A stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous. *J. Biol. Chem.*, 272, 24994-24998, 1997.
- Holzman, L.B., Merritt, S.E., Fan, G.:** Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. *J.Biol. Chem*, 269, 30808-30817, 1994.
- Huang, W., Alessandrini, A., Crews, C. M., Erikson, R. L.:** Raf-1 forms a stable complex with MEK-1 and activates MEK-1 by serine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10947-10951, 1993.
- Hunter, T.:** Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80, 225-236, 1995.
- Hurley, J.H., Misra, S.:** Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol.Struct.* 29, 49-79, 2000
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y.:** Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, 275, 90-94, 1997.
- Ing, Y.L., Leung, I.W., Heng, H.H., Tsui, L., Lassam, N.J.:** MLK-3: identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH3 domain and a leucine zipper-basic region domain. *Oncogene*, 9, 1745-1750, 1994
- Inoue H., Nojima H., Okayama H.:** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96 23-28, 1990
- Ip, Y.T., Davis, R.J.:** Signal transduction by the c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10, 205-219, 1998.
- Ito, M., Yoshioka, K., Akechi, M., Yamashita, S., Takamatsu, N., Sugiyama, K., Hibi, M., Nakabeppu, Y., Shiba, T., Yamamoto, K-I.:** JSAP-1, a novel Jun N-terminal protein, kinase (JNK)-binding protein that functions as a scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol.Cell.Biol.*, 19, 11, 7539-7548, 1999.
- Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ, Kornfeld K :** Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAPkinase. *Genes & Dev.* 1999, 126: 5267-5274
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A., Todaro, G.J.:** Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal of contact-inhibited mouse cells, *J.Virol.* 4, 549-553, 1969
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di, P.F., Ulevitch, R.J., Han, J.:** Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J.Biol.Chem.*, 272, 30122-30128, 1997.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., Macara, I.G.:** The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature Cell Biol.*, 2, 531-539, 2000
- Katz, M.E.; McCormick, F.:** Signal transduction from multiple Ras effectors. *Current Opinion in Genetics & Development* 7, 75-79, 1997.
- Kim S.K.:** Cell polarity: New PARTners for Cdc42 and Rac. *Nature Cell Biol.*, 2, 8, 143-145, 2000
- Koide, H., Satoh, T., Nakafuku, M., Kaziro, Y.:** GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: Identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8683-8686, 1993.
- Kolch, W., Bassin, R. H., Rapp, U. R.:** Raf function is required for proliferation of NIH 3T3 cells and transformation by nonnuclear oncogenes. *Heamatology and Blood Transfusion* 35, 208-212, 1992.

- Koretzky, G.A.:** The role of Grb2-associated proteins in T-cell activation. *Immunol. Today*, 18, 8, 401-406, 1997
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., Lim, L.:** The ras-related protein Cdc42-Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1942-1952, 1995
- Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., Young, P.R.:** Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* 235(3), 533-8, 1997
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.-F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., Avruch, J.:** Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417-421, 1992.
- Lange-Carter, C.A., Pleiman, C-M, Gardner, A.M., Blumer, K.J., Johnson, G.L.:** A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science*, 260, 315-319, 1993.
- Leanna, C.A., Hannink, M. :** The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 24(17), 3341-3347, 1996
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Stricker, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.R., Young, P.R.:** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372, 739-746, 1994.
- Leung, S-M., Ruiz, W.G., Apodaca, G.:** Sorting of membrane and fluid at the apical pole of polarized madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 11, 2131-2150, 2000
- Licitra, E.J., Liu, J.O.:** A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(23), 12817-12821, 1996
- Lin, D., Edwards, A.S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D., Pawson, T. :** A mammalian Par-3-Par-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nature Cell Biol.*, 2, 8, 540-547, 2000
- Livingstone, C., Patel, G., Jones, N.:** ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J* 14(8), 1785-97, 1995
- Ludwig, S., Engel, K., Hoffmeyer, A., Sithanandam, G., Neufeld, B., Palm, D., Gaestel, M., Rapp, U.R.:** 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 6687-6697, 1996.
- Machesky, L.M., Gould, K.L.:** The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* , 11, 117-121, 1999
- Machesky, L.M., Insall, R.H. :** Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 8, 1347-1356, 1998
- Machesky, L.M., Hall, A.:** Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac –and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.* 183, 913-926, 1997
- Manseau, L., Schüpbach, T.:** Cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* , 3, 1437-1452, 1989
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., Marshall, C.J.:** Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.*, 14, 3136-3145, 1995
- Marais, R., Marshall, C.J.:** Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv.*, 27, 101-125, 1996.
- Marquardt, B., Frith, D., Stabel, S.:** Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene*, 9, 3213-3218, 1994
- Marshall, C.J.; Cowley, S.:** Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74^{raf-1}. *The EMBO Journal* 13, 1610-1619, 1994
- Martin-Blanco, E.:** Regulation of cell differentiation by the *Drosophila* Jun kinase cascade. *Curr. Op. Genetics Dev.* 7, 666-671, 1997
- McCollam, L., Bonfini, L., Karlovich, C.A., Conway, B.R., Kozma, L.M., Banerjee, U., Czech, M.P.:** Functional roles for the pleckstrin and Dbl homology regions in the Ras exchange factor Son-of-sevenless. *J. Biol. Chem.*, 270, 27, 15954-15957, 1995
- Miki, H., Suetsugu, S., Takenawa, T.:** WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.*, 17, 6932-6941, 1998
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., Takenawa, T.:** Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*, 391, 93-96, 1998

- Miki, H., Fukuda, M., Nishida, E., Takenawa, T.:** Phosphorylation of WAVE downstream of mitogen-activated protein kinase signalling. *J Biol Chem* , 274,27605-27606,1999
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R.J., Johnson, G.L., Karin, M.:** Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, 266, 1719-1723, 1994.
- Mlodzik, M.:** Planar polarity in the *Drosophila* eye: a multifaceted view of signalling specificity and cross-talk. *EMBO J.*18, 6873-6879, 1999
- Misra S., Hurley J.H.:** Crystal structure of a phosphatidylinositol3-phosphate-specific membrane targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell*, 97,657-666, 1999
- Mullins, R.D.:** How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr.Op.Cell Biol.*, 12, 91-96, 2000
- Nobes, C.D., Hall, A.:** Rho, Rac, Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* , 81,53-62, 1995
- Noselli, S.:** JNK signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Trends Genet.*, 14, 33-38, 1998;
- Noselli, S., Agnes, F.:** Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Curr.Op.Genetics Dev.*, 9, 466-472, 1999
- Odorizzi, G., Babst, M., Emr, S.D.:** Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem. Sci.*, 25, 5, 229-235, 2000
- Ono, Y., Nakanishi, H., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takahashi, K., Miyahara, M., Satoh-Horikawa, K., Mandai, K., Takai, Y.:** Two actions of Frabin: Direct activation of Cdc42 and indirect activation of Rac. *Oncogene*, 19, 3050-3058, 2000
- Otto, I.M., Raabe, T., Rennefahrt, U.E.E., Bork, P., Rapp, U.R., Kerkhoff, E.:** The p150-Spir protein provides a link between c-Jun-N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr.Biol.*10, 345-348, 2000
- Ostermeier, C., Brunger, A.T.:** Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* 96, 363-374, 1999
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., Woodgett, J.R.:** Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353,670-674, 1991
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R. J.:** MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen- activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.*, 16(3), 1247-55, 1996
- Ramesh N., Anton I.M., Martinez-Quiles N., Geha R.S.:** Waltzing with WASP. *Trends Cell Biol* . 9,15-19, 1999
- Rana, A., Gallo, K., Godowski, P., Hirai, S., Ohno, S., Zon, L., Kyriakis, J.M., Avruch, J.:** The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1. *J. Biol. Chem.*, 271, 19025-19028, 1996.
- Rapp, U.R.:** Role of Raf-1 serine/threonine protein kinase in growth factor signal transduction. *Oncogene* 6, 495-500, 1991.
- Rapp, U. R., Bonner, T. I., Cleveland, J. L.:** The Raf oncogene. *Retroviruses and Human Pathology*, 449-472, 1985.
- Rapp, U.R., Goldsborough, M.D., Mark, G.E., Bonner, T.I., Groffen, J., Reynolds, F.Jr., Stephenson, J.R.:** Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4218-4222, 1983.
- Read, M.A., Whitley, M.Z., Gupta, S., Pierce, J.W., Best, J., Davis, R.J., Collins, T.:** TNF α induced E-selectin expression is activated by the NF- κ B and JNK/p38MAP kinase pathways. *J.Biol.Chem* 272, 2753-2761, 1997
- Reddy, E. P., Skalka, A. M., Curran, T.:** The oncogene handbook. Elsevier Chapter 14, 213-252, 1988.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., Hall, A.:** The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor induced membrane ruffling. *Cell*, 70, 401-410, 1992
- Riesgo-Escovar JR, Jeni M, Fritz A, Hafen E:** The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* 10,2759-2768, 1996
- Rudolph, M.G., Bayer, P., Abo, A., Kuhlmann, J., Vetter, I.R., Wittinghofer, A.:** The Cdc42/Rac interactive binding region motif of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is necessary but not sufficient for tight binding to Cdc42 and structure formation. *J.Biol.Chem.* 273, 18067-18076, 1998

- Salmerón, A., Ahmad, T.B., Carlile, G.W., Pappin, D., Narshiman, R.P., Ley, S.C.:** Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *EMBO J.*, 15, 817-826, 1996.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.:** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, 2. Aufl.
- Satou Y., Satoh N.:** Posterior end mark 2 (pem-2), pem-4, pem-5, and pem-6: maternal genes with localized mRNA in the ascidian embryo. *Dev Biol*, 192, 467-481, 1997
- Schaeffer, H.J., Weber, M.:** Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2435-2444, 1999
- Schlessinger, J.:** How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* 18, 273-275, 1993
- Shih, H.M., Goldman, P.S., DeMaggio, A.J., Hollenberg, S.M., Goodman, R.H., Hoekstra, M.F.:** A positive genetic selection for disrupting protein-protein interactions: identification of CREB mutations that prevent association with the coactivator CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24), 13896-13901, 1996
- Sithanandam, G., Latif, F., Duh, F.-M., Bernal, R., Smola, U., Li, H., Kuzmin, I., Wixler, V., Geil, L., Shrestha, S., Lloyd, P.A., Bader, S., Sekido, Y., Tartof, K.D., Kashuba, V.I., Zabarovsky, E.R., Dean, M., Klein, G., Lerman, M.I., Minna, J.D., Rapp, U.R., Allikmets, R.:** 3pK, a new mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region. *Mol. Cell. Biol.* 16, 868-876, 1996.
- Sluss, H.K., Han, Z., Barret, T., Goberdhan, D.C.I., Wilson, C., Davis, R.J., Ip, Y.T.:** A JNK signal transduction pathway mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* 1996, 10, 2745-2758.
- Snapper, S.B., Rosen, F.S.:** The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): Roles in signaling and cytoskeletal organization. *Ann. Rev. Immunol.*, 17, 905-929, 1999
- Stenmark, H., Asaland, R., Toh, B., D'Arrigo, A.:** Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J. Biol. Chem.* 271, 24048-24054, 1996
- Stokoe, D., Macdonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M., Hancock, J.F.:** Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264, 1463-1467, 1994.
- Stronach, B.E., Perrimon, N.:** Stress signaling in *Drosophila*. *Oncogene* 18, 6172-6182, 1999
- Svitkina, T.M., Borisy, G.G.:** Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Biol. Chem.* 145, 1009-1026,
- Symons M., Derry J.M., Karlak B., Jiang S., Lemahieu V., McCormick F., Francke U., Abo A.:** Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase cdc42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, 84, 723-734, 1996
- Takekawa, M., Posas, F., Saito, H.:** A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO J.*, 16, 4973-4982, 1997.
- Tateno, M., Nishida, Y., Adachi-Yamada, T.:** Regulation of JNK by Src during *Drosophila* development. *Science*, 287, 324-327, 2000;
- Teng, D.H., Perry, W.L., 3rd, Hogan, J.K., Baumgard, M., Bell, R., Berry, S., Davis, T., Frank, D., Frye, C., Hattier, T. et al.:** Human mitogen-activated protein kinase kinase 4 as a candidate tumor suppressor. *Cancer Res.* 57, 4177-4182, 1997
- Thomas, G.:** MAP Kinase by any other name smells just as sweet. *Cell* 68, 3-6, 1992
- Tibbles, L.A., Woodgett, J.R.:** The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 1230-1254, 1999.
- Trischler, M., Stoorvogel, W., Ulrich, O.:** Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway. *J Cell Sci* 112, 4773-4783, 1999
- Unikawa, M., Obaishi, H., Nakanishi, H., Satoh-Horikawa, K., Takahashi, K., Hotta, I., Matsuura, Y., Takai, Y.:** Association of Frabin with the actin cytoskeleton is essential for microspike formation through activation of Cdc42 small G protein. *J. Biol. Chem.* 274, 36, 25197-25200, 1999
- Van Aelst, L., D'Souza-Schorey, C.:** Rho-GTPases and signalling networks. *Genes Dev.* 11, 2295-2322, 1997
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., and Angel, P.:** ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J* 14(8), 1798-811, 1995.

- Vidal,M., Braun,P., Chen,E., Boeke,J.D., Harlow,E.:** Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(19), 10321-10326, 1996
- Vidal,M., Brachmann,R K., Fattaey,A., Harlow, E.,Boeke,J.D.:** Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions]*Proc Natl Acad Sci USA* 93(19), 10315-10320,1996
- Wang,X., Kumar,R., Navarre,J., Casanova,J.E., Goldenring,J.R.:** Regulation of vesicle trafficking in Madin-Darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25. *J. Biol. Chem.* 275, 29138-29146, 2000
- Wang, X.S., Diener, K., Jannuzzi, D., Trollinger, D., Tan, T.H., Lichenstein, H., Zukowski, M., Yao, Z.:** Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase. *J.Biol.Chem.*,271, 31607-31611, 1996.
- Wang, X.S., Diener, K., Manthey, C.L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C.N., Chan, H.P., Mantlo, N., Lichenstein, H.S., Zukowski, M., Yao, Z.:** Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.*, 272, 23688-23674, 1998.
- Welch, M.D.:** The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex . *Trends Cell Biol.*, 9, 423-427, 1999
- Welch ,M.D., DePace,A.H., Verma,S., Iwamatsa,A., Mitchingson,T.J.:** The human Arp2/3 complex is composed of evolutionary conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly . *J.Biol.Chem.* 138, 375-384, 1997
- Welch, M.D., Iwamatsa, A., Mitchingson, T.J.:** Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385, 265-269, 1997
- Wellington A., Emmons S., James B., Calley ., Grover M., Tolias P., Manseau L.:** Spire contains actin binding domains and is related to ascidian posterior end mark-5. *Development*, 126, 5267-5274, 1999
- Westphal,R.S., Solderling,S.H., Alto,N.M., Langeberg,L.K., Scott,J.D.:** Scar/WAVE-1, a Wiskott Aldrich syndrome protein, assembles an actin-associated multi-kinase scaffold. *The Embo J.*,19, 17, 4589-4600, 2000
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L.:** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.*, 79, 143-180, 1999..
- Whitmarsh, A.J., Davis, R.J.:** Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.*, 74, 589-607, 1996.
- Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., Davis, R.J.:** A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science*, 281, 1671-1674, 1998.
- Whitmore,S.A., Crawford,J., Apostolou,S., Eyre,H., Baker,E., Lower,K.M., Settasian,C., Goldup,S., Seshadri,R., Gibson,R.A., Mathew,C.G., Cleton-Jansen,A.M., Savoia,A., Pronk,J.C., Auerbach,A.D., Doggett,N.A., Sutherland,G.R., Callen,D.F.:** Construction of a high-resolution physical and transcription map of chromosome 16q24.3: A region of frequent loss of heterozygosity in sporadic breast cancer. *Genomics*, 50, 1-8, 1998
- Whitmore,S.A., Settasian,C., Crawford,J., Lower,K.M., McCallum,B., Seshadri,R., Cornelisse,C.J., Moerland,E.W., Cleton-Jansen,A.M., Tipping,A.J., Mathew,C.G., Savnio,M., Savoia,A., Verlander,P., Auerbach,A.D., Van Berkel,C., Pronk,J.C., Doggett,N.A., Callen,D.F.:** Characterization and screening for mutations of the growth arrest-specific 11 (Gas 11) and C16orf3 genes at 16q24.3 in breast cancer.*Genomics*,52, 325-331, 1998
- Wodarz,A., Ramrath,A., Kuchinke,U., Knust,E.:** Bazooka provides an apical cue for Inscutable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*,402,544-547, 1999
- Xu,S., Cobb,M.H.:** MEKK1 binds directly to the c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases. *J Biol.Chem.*,272, 32056-32060, 1997
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., Matsumoto, K.:** Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*, 270, 2008-2011, 1995.
- Yang,D., Tournier,C., Wysk,M., Lu,H-T., Xu,J., Davis,R.J., Flavell,R.A., :** Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation and defects in AP-1 transcriptional activity.*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 94, 3004-3009, 1997

- Yang,D., Kuan,C-Y., Whitmarsh,A.J., Rincon,M., Zheng,T.S., Davis,R.J., Rakic,P., Flavell,R.A.:** Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the JNK3 gene. *Nature*, 389, 865-870, 1997
- Yasuda, J., Whitmarsh, A.L., Cavanagh, J., Sharma, M., Davis, R.J.:** The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol.Cell.Biol.*, 19, 10, 7245-7254, 1999.
- Yujiri,T., Fanger,G.R., Garrington,T.P., Schlesinger,T.K., Gibson,S., Johnson,G.L.:** MEK kinase 1 (MEKK1) transduces c-Jun NH2-terminal Kinase activation in response to changes in the microtubule cytoskeleton. *J.Biol.Chem.* 274,18,12605-12610, 1999
- Zheng, C.-F., Guan, K.-L.:** Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *The EMBO Journal* 13, 1123-1131, 1994
- Zhang,P., Talluri, S., Deng, H., Branton, D., Wagner, G.:** Solution structure of the pleckstrin homology domain of *Drosophila* beta-spectrin. *Structure*, 3, 11, 1185-1195, 1995

Anhang

Abkürzungen

aa	Aminosäuren
A. bidest	Aqua bidestillata
AD	acidic domain
AP-1	activator-protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	Actin-related-protein
ATP	Adenosintriphosphat
3-AT	3-Amino1,2,4-triazol
ATCC	American Type Culture Collection
baz	bazooka
β-Gal	β-Galactosidase
bsk	basket
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDS	coding sequence
cfu	colony forming unit
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
Cot	cancer osaka tyroid
CREB	cAMP-response element-binding protein
CRIB	Cdc/rac interacting and binding region
CSBP	CSAID™ [cytokine suppressive anti-inflammatory drug] binding protein
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerin
DB	DNA-Bindedomäne
DEJL	docking site for Erk and JNK
DJNK	<i>Drosophila</i> - c-Jun N-terminale Kinase
(d)dNTP	(Di)Desoxynukleotidtriphosphat
DM	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DC	dorsal closure (dorsale Schließung)
DTT	Dithiothreitol
Dpp	Decapentaplegic
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolbistetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal regulated kinase
EST	expressed sequence tags
FCS	fetal calf serum
FGRB	Formamid Gel Running Buffer

F-Aktin	filamentäres Aktin
G-Aktin	globuläres Aktin
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Gluthathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
Hep	hemipterous
His	Histidin
HPK	hematopoietic progenitor kinase 1
ICKA	Immuno-Komplex-Kinase Assay
IL	Interleukin
Insc	Inscutable
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalactosid
JBD	JNK-Binde-Domäne
JIP	JNK interagierendes Protein
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
JSAP	JNK/SAPK-associated protein
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
KD	Kinase dead
kDa	Kilo-Dalton
kompl.	komplett
lacZ	β -Galactosidase-Gen
LE	leading edge
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKAP-K	MAPK aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase
MBP	myelobasic protein
MEK	MAPK/ERK aktivierende Kinase
MEKK	MAPK/ERK aktivierende Kinase Kinase
MKK	MAP Kinase Kinase
MLK	mixed-lineage-kinase
MP1	MEK-Partner 1
mFYVE	modifizierte FYVE-Domäne
mRNA	messenger RNA
MSZ	Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
NGF	neural growth factor
NEB	New England Biolabs
NFAT	nuclear factor for activated T-cells
NP40	Nonidet 40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	plateled derived growth factor
PEG	Polyethylenglykol

PEM-5	posterior endmark gene 5
PH	Pleckstrin-Homology
PtdIns-3-P	Phosphatidylinsoitol-3-phosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
puc	puckered
Rb	Retinoblastoma-Protein
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAPK	Streß-aktivierte Proteinkinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH	Src Homologie
Sos	son of sevenless
SPRK	SH3-domain containing proline-rich-kinase
TA	transaktivierende Domäne
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGF β	transforming growth factor β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tpl	tumor progression lokus 2
TPY-Motiv	Threonin-Prolin-Tyrosin-Motiv
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	unit
u. U.	unter Umständen
u.a.	unter anderem
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/Vol	Volumen
w	weight, Gewicht
WASP	Wiskott-Aldich-Syndrom-Protein
WH2-Domain	Wiskott-Aldich-Syndrom Homology domain 2
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YTH	yeast-two-hybrid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Sequenzen

p150-Spir

LOCUS DME238876 4525 bp mRNA INV 19-NOV-2000
DEFINITION Drosophila melanogaster mRNA for p150-Spir protein (p150-Spir gene) .
ACCESSION AJ238876
VERSION AJ238876.1 GI:6572124
KEYWORDS p150-Spir.
SOURCE fruit fly.
ORGANISM [Drosophila melanogaster](#)
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Tracheata; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Brachycera; Muscomorpha; Ephydroidea; Drosophilidae; Drosophila.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4525)
AUTHORS Otto, I.M., Raabe, T., Rennefahrt, U.E., Bork, P., Rapp, U.R. and Kerkhoff, E.
TITLE The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization
JOURNAL Curr. Biol. 10 (6), 345-348 (2000)
MEDLINE [20211961](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 4525)
AUTHORS Kerkhoff, E.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-MAY-1999) Kerkhoff E., Institut fuer Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, University of Wuerzburg, Versbacher Str. 5, D-97078 Wuerzburg, GERMANY

REMARK Revised by [3]
REFERENCE 3 (bases 1 to 4525)
AUTHORS Kerkhoff, E.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-DEC-1999) Kerkhoff E., Institut fuer Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, University of Wuerzburg, Versbacher Str. 5, D-97078 Wuerzburg, GERMANY

FEATURES
source 1..4525
/organism="Drosophila melanogaster"
/db_xref="taxon:7227"
/chromosome="2"
/map="38C"
/dev_stage="embryonic"
[gene](#) 249..3311
/gene="p150-Spir"
[CDS](#) 249..3311
/gene="p150-Spir"
/codon_start=1
/product="p150-Spir protein"
/protein_id="[CAB62901.1](#)"
/db_xref="GI:6572125"
/db_xref="SPTREMBL:Q9U1K1"
/translation="MTEHQAEQADTPPTKVKATPTPTPSGKFKDAKEDAFLLSTSPDS
ANGDAQHKLPADQLAMSSSAHPQQAGQARPLILQAFHRCSSPEQCVTLHDILDSFKAP
LSEDDQAWALIHQFAGLYHQVAVVQAHTCAADYEALPTGFELHFHRDGSVHFSGPDQLT
PKEQLQEQEIQPLPPQHDVVDQPDHSASSSGDSSVINRAFDNSNHHHHHHQHHPPLVV
SHRKIISELAEIVYALDYNLPEDEECQVVSQELLENLNFMTADETDDDCIDEGIDEGD
KRWDDESEEERNDTKELEHIIETCRNHIKTTLPENHYRAVCRALVTETIELRVFLQQV
LNNEAGAELIKASESSATTQQELAKLGFNDWARFWVQVIDELRRGVRLKKS NHERTP
IEYELTPYEILMGDIRAKKYQLRKVMVNGDIPPRVKKDAHAMILEFIRSRPPLKKASD
RQLGPPRMCEPSPREQLMESIRKGGKELKQITPPEAPTLRERVLP SANSTLSRSRQRLI

KVDFSKFQDDDLFYDENSISSSHSTAATHQHHPHFAEMHRCSQPKMPPYPFGGYMVPS
 QARQDCRETASLMRPRRTMEPAKQVPPPEEPSFTKDEYHKFYDTALESYDLATQCESR
 RASLRRTIVGCQSNLDETHSMPPTRPESRQSDVSKETPKRSPAEOQTHPSDEGSSTS
 SLGPWNKSFMDKQTMWERMGGDRSLVTLAEIVHIRSVMTKAELEGLPMDVVRKEDVEKR
 RVCFLCLRTRFSFFGFWGIQCKLCQRTVCAKCYTKMRIPSEHFRNVPLVLISPSLLSS
 PASSSTPSPSHHAQAHSSSTGNIMDDQFPKSLIERLLRSESDRKRSTVGSAPSSPK
 HQRSNMSTPGISVGPASSSSAAATGQAVEALHDQATMSSSYSAAMRPSGVHQQQKQH
 YNNAMSRSMEGPRSLPVHSPAYRPLSNNSTLERKSRFSRGNLFSGSHLAQTQEQKE
 NLRGEQVTVNCDCQGLVNEITSSVKQKRSSARNRTIQNLTLDLTPVWK"

BASE COUNT 1204 a 1298 c 1105 g 918 t

ORIGIN

```

1 ggaatccgaa ttccatcccc tcgtgttgtg ttattattgt attaaagttt cctttgccat
61 ttaccacaca caacacagaa aaacaacaac aacaaaacta aaccaaatac gaaccaaata
121 caaacccgca attttgcagg ttagccacc cgaaagaggc aaaaaaatca attatatgtt
181 ggccagtgcc gggtttgcag tggaaatcggg ttgaaagcca tcgatagcca cacacgcca
241 cacacataat gacggagcac caggccgagg agcaggcggg cacgcccgcc accaaggtca
301 aggccacgcc cacaccacc ccgagtggaa agttcaagga cgcgaaggaa gacgccttcc
361 tgtccacatc gccggacagc gccaacggcg atgccaaca caagctgcca gcggaccagc
421 tggccatgtc ctccagtgcg catccccagc aggcgggcca agcccggccg ctcatcctgc
481 aagccttcca ccgctgctcc tcgccagaac agtgcgtcac gctgcacgac atcctggact
541 cctttaaggc gccgctctcc gaggaccagg cctgggccct gatccaccag ttcgccgggc
601 tctaccacca ggtggccgta caagcgcaca cctgtgccgc ggactacgag gccgcctgc
661 ccaccggatt cgagctgcac ttccatcggc acggcagcgt cacttctcc ggcccggatc
721 agctagcgcc taaggagcaa ctgacgagc agcagatccc cctccccccg cagcagcagc
781 tgattgtgga tcagccggac cacagcga gcagcagcgg cgacgagcgg gtcataca
841 gagcgttcga caacagcaat caccaccacc accatcaaca tcatcaccgc ccgctcgtcg
901 tctcgcatag aaagattatc agcgaactgg cggaaatcgt ctacaccgcc ttggattaca
961 atctgccgga ggacgaggag tgccaagtgt cacaggagct ggagaatctg ttcaacttta
1021 tgacggcaga tgagacagac gacgattgca ttgacgagg catcgacgag ggcgacaagc
1081 gctgggacga cgaatccgag gaggagcgc acgatacaca agaactagag cacataatcg
1141 agacctgcag aaatcacata aaaaccacc tcctgagaa ccactataga gctgtctgca
1201 gagccctcgt gacggagacc atagagctcc gagtatttct gcagcaggtc ctgaacaatg
1261 aagcaggtgc cgagaaactg atcaaggcgt cggaaatcac gccaccacc caacaagaac
1321 tggcgaagct gggcttcaac gactgggcac gcttctgggt gcaggtgatc gacgaaactgc
1381 gacggggagt gcggtgaag aagagcaacc acgagcgcac tccatcgaa tatgagctga
1441 caccctacga aatactcatg ggcgacatcc gagcaaaaa gtatcagttg cgcaaggtga
1501 tggccaacgg agatattccg ccgcgcgtca agaaagatgc ccacgccatg atcttggagt
1561 tcatcaggtc acggccgccc ctgaagaagg ccagcgcagc ccaattgggc ccgccgcga
1621 tgtgcgagcc ttctccgccc gagcagctca tggagtccat acggaagggg aaggagctca
1681 agcagatcac cccgccagaa gcaccgacc tcagggaaag ggtgcttcca agtgcaaaact
1741 ccacgctgtc acgatccaga cagcggctca tcaaagtga cttctcaaag tttcaggagc
1801 acgatctctt ctacgatgag aacagcatca gcagctccc cccacagcgg gccaccacc
1861 agcatcatcc acatttcgcc gagatgcacc gctgctcga gcccaagatg ccgcgctatc
1921 cattcggtg ctacatggtg ccagtcagg cacgacaaga ttgccgggag acggcgtcgc
1981 tgatgcggcc ccgacgcaca atggagccag caaagcaggt gccgcctcca gaagagccat
2041 ccttcacgaa ggaacgagta cacaaagttc acgacacggc cctggaatcc tacgacctgg
2101 cactcagtg cgagtcgagg agggcttctc tgcgccgcca caccatcgtt ggatgccaga
2161 gcaacctgga cgagacgcac tcaatgccgc ccacgcggcc cgagtcgct caatcggagc
2221 acgtcagcaa ggagacgcct aagagaagtc ctgcggagca gacctatcc tcagacgag
2281 gcagttcaac atcctcgtt gggccatgga acaagtcct catggacaaa cagacgtgga
2341 tggaacgggg tgacgatcgg ctgtccgtaa cgctggcggg gatcgttcac atccgttccg
2401 tcatgaccaa ggcggagctg gaggccctgc cgatggacgt gcgcgtcaag gaggatgttg
2461 aaaagcgtcg cgtctgctt ctgtgcctgc gactcgggt ctcgttctt gggtccctggg
2521 gcattcagtg caagttgtgc cagcgcacgg tctgcgcca gtgctatacc aagatgcgaa
2581 ttccctcgga gcacttccga aacgtgccc tcgtgctgat ctgcctatcg ctgctgtcca
2641 gtcgggccag ctcgagcacc ccataccct cccatcatgc ccagcagcgg cactcatcct
2701 cgacggggaa catcatggac gaccagttcc ccaagtcgt gatagagcgt cttttgcgt
2761 ccgagtcaga tcgaaagact cgcagcatta tgggcagtc cccatcctcc ccaagcacc
2821 aaagatcaaaa catgacagc cccggcatta gcgtgggacc cggatcctc tctcctcag
2881 cggccggccac tggacagcc gtggagggc tgcacgacca ggcgaccatg tcgtcctcgt
2941 attccgccc catgcgacc tctggcgtcc accagcagca gaagcagcag tacaacaacg
3001 ccatgtcgag gagcatggag ggacccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcataatcagc
3061 cgctctccaa taacagcacc ttggagagga aatcccgtt ttcgagggga ttcaacctgt

```

```

3121 tctcctcggg cagccatctt gccagacgc aggagcaaaa ggagaacctg cgcggcgagc
3181 aggtgaccgt gtgcaacgac tgccagggac tgggtcaacga gatcacgagc tccgtgaagc
3241 agaagcgcag ctccgcacgg aaccgcacca ttcagaatct caccctggat ctgacgcccg
3301 tctggaagta ggcgggaatc agatcagaga taggataact ccgcagtgcg tttgaagacc
3361 gtaggatggt tgcaatggag ttctaacgac tgacttggct ctacatcgct atacatacta
3421 ccattgacta catgacactg atgatgactc attgacagac aacagacgct atttgattac
3481 tgaccacatt ccttacctgt gagaattttc agtttcagcg cggctgtttt agggccttca
3541 gaacgcactt gcacatttag ctattacata catgcataga tatggattag atcgactgtt
3601 gtacacttaa aaggatagag cctcgaggag cctcgtttgt aaatcgtggt agtctagtga
3661 ataagcagag gagaataaccg agaattcctg gctgaagctt tgtacatttt ctgccggcta
3721 cagagagatc cgcttgagcg caccacacca ctttctattt ataaaggagc taacttacac
3781 gtcgctacac attatattat cgcagatcgc aacgcgatgc cgttgtttat aactgttcaa
3841 agtatgcgta aaagttgatt aagtacatgt aatcataact cttgtatccg catatatcaa
3901 atgcacatat attcgacctt acttgtacct tgctcctgca ttcgtttcag cacgagcgac
3961 gtattgatca tacagaatac atcgatattc gcaatacgat tcccagttca gaaaaaaaaa
4021 atttcgattg ttgaaatagt tatccgaaaa tgttgtgaaa cttttgtgct tgcgcagatc
4081 tttgttttacg ttgtgaagtt ttcgttttgt tcccctatta actacaatgt caatgtataa
4141 cgcaagaact acttgatagc ctaatttaat tttagtcggc gttgctatgc agcccaaact
4201 atttagttaa ttcgcttagt ttttaattctc cctaagtgcg tctaagttgt aagcgacgtc
4261 tatataattg tacaagctga tgatgcaaag caaaccccta acgaacatta tattacctaa
4321 ttgtagctgc tattatagtt tttctaaccg tttttgaaca attttgtttg atttatctgt
4381 aattgtaaat gcatttaagt acttgaataa ttaaatttta tgcttttaag ttaaattcat
4441 ttacaataat ttaatacaca cacgaacaca caaagagatc gaaaatacac aaaacagcaa
4501 taataaatga aaatacaaac taaag

```

human-Spir 1 (unvollständige Sequenz)

```

LOCUS      HSA277587      4989 bp      mRNA          PRI          03-JUL-2000
DEFINITION Homo sapiens partial mRNA for Spir-1 protein (Spir-1 gene).
ACCESSION  AJ277587
VERSION    AJ277587.1      GI:8920229
KEYWORDS   Spir-1 gene.
SOURCE     human.
ORGANISM   Homo sapiens
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
           Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE  1 (bases 1 to 4989)
AUTHORS    Otto,I.M., Raabe,T., Bork,P., Doerks,T., Rapp,U.R., Kerkhoff,E.
TITLE      The Drosophila p150-Spir is highly conserved between Drosophila
           and human
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 4989)
AUTHORS    Kerkhoff,E.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (20-APR-2000) Kerkhoff E., Institut fuer Medizinische
           Strahlenkunde, Universitaet Wuerzburg, Versbacher Str.5, 97078,
           GERMANY

FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..4989
                       /organism="Homo sapiens"
                       /db_xref="taxon:9606"
                       /chromosome="18p11.2"
                       /sex="male"
                       /tissue_type="brain,testis"
                       /dev_stage="adult"
           gene                1..1863
                       /gene="Spir-1"
           CDS                <1..1863
                       /gene="Spir-1"
                       /function="actin reorganisation"

```

```

/codon_start=1
/product="Spir-1 protein"
/protein_id="CAB96370.1"
/db_xref="GI:8920230"

```

```

/translation="TEVIXSLXIIIIYKALDYGLKENEERELESPPLEQLIXHMANTVEA
DGSNDEGYXAAEEGLGDEDEKRKISAIRSYRDVMKLCAAHLPTESDAPNHYQAVCRAL
FAETMELHTFLTKIKSAKENLKKIQEMEKSDSSTDLEELKNADWARFWVQVMRDLRN
GVKLLKVQERQYNPLPIEYQLTPYEMLMDDIRCKRYTLRKVMVNGDIPRLKKSAAHEI
ILDFIRSRPPLNPVSARKLKPPTPRPSLHERILEEIKAEKLRPVSPEEIRRSRLDV
TTPESTKNLVESSMVNGGLTSQTKENGLSTSQQVPAQRKLLRAPTLAELDSSESEEEE
TLHKSTSSSSVSPSPFPEEPVLEAVSTRKKPKFLPISSTPQERRQPPQRRHSIEKET
PTNVRQFLPPSRQSSRSLEEFYVVECLALTVEEVMHIRQVLVKAELEKYQQYKDIYT
ALKKGKLCFCCTRTRRFSSFTWSYTCQFCKRPVCSQCCKKMRLPSKPYSTLPIFSLGPS
ALQRGESSMRSEKPPSTAHHRPLRSIARFSSKSKSMDKSDDEELQFPKELMEDWSTMEVC
VDCKKFISEIISSRRSLVLANKRARLKRKTQSFYMSSPGPSEYCPSERTISEI"
BASE COUNT      1474 a      1028 c      1077 g      1405 t          5 others
ORIGIN

```

```

1 acagagggtca ttnantcttt ggnaattatt atttataaag cactggacta tggtttgaag
61 gagaatgaag aaaggggaatt aagccctccc ctagagcagc ttatcgntca catggccaac
121 acggtggaag ctgacggtag caatgatgag ggctatnagg ctgcagaaga aggcctggga
181 gatgaagatg aaaagagaaa aatctcagct attcggatcat atagagatgt catgaagttg
241 tgtgctgctc atctccctac tgaatcagat gcaccaaatac attatcaggc agtatgtcgt
301 gcaactgtttg cagaaacaat ggagctccat acatttctga ccaaaattaa gagtgcgaaa
361 gagaatctta agaagattca agaaatggaa aagagcgatg aatctagcac agacttggaa
421 gagctgaaaa acgctgactg ggcacgattc tgggtacagg tgatgagggg tttgaggaat
481 ggggtaaaaac ttaagaaggt ccaagagcgg cagtacaacc ctttgcccat tgaatatcag
541 ctcacccttt atgagatggt aatggatgac attcgctgca aaagatacac cttgcgaaaa
601 gtgatggtga atggtgatat tccccctcgg ttaaaaaaga gtgctcatga aatcatcctc
661 gacttcatca gatccagacc tcctttaaat ccagtctcag ccagaaaact gaaaccaact
721 ccaccacggc cacggagcct ccatgaaaga atattagaag aaattaaagc agaaagaaag
781 ctgcggcctg tatcaccaga ggagattaga cgtagcagat tagatgtgac taccctgaa
841 tctacaaaga atcttgtgga gtcattctatg gtgaatggag gtttgacatc acaaacaaaa
901 gaaaacgggt taagtacctc acagcagggtg cctgcacagc ggaagaagct cctcagagcc
961 ccaactctgg ccgaactgga cagctctgag tctgaggaag aaacgctgca caagtcgacc
1021 agcagcagca gcgtgtctcc ctctttccct gaagagccag tcctggaggc cgtgtccaca
1081 aggaagaagc ctccaaaatt cctgccata tcatcaacac ccagccaga gagacggcag
1141 ccaccacaga gacgacattc cattgaaaag gaaacgccta ctaacgtgag gcagttcctg
1201 ccgccttcca ggcagagttc ccgctctctt gaggaattct gctaccagat ggaatgcctc
1261 gctcttactg tggagaagaat gatgcatatt cgccagggtcc tgggtgaaggc agagctggaa
1321 aaataccaac agtataaaga catctacacc gccttgaaaa aaggaaagct ctgcttttgt
1381 tgccgaacca ggaggttttc ctcttccact tggctctata cctgtcagtt ctgaagagg
1441 ccggtgtgct cacagtgttg caaaaagatg cggctgccct ccaaaccata ctccactctt
1501 cctatctttt cattgggacc ttctgctctg caaagagggg aaagtagtat gaggtcagaa
1561 aaaccctcca ctgcccatac tgggccactt cggagcattg ccaggttctc ctcaaaatct
1621 aagtctatgg acaaatcaga tgaagaactc cagtttccca aagagttgat ggaggactgg
1681 agcaccatgg aggtgtgtgt ggactgcaag aagttcattt cggaaatcat cagttcaagc
1741 cggcgcagtc tgggtgttggc caacaaaagg gcccgattga aaaggaaaac gcagctcttc
1801 tacatgtcct cgccaggccc ctcgagtagc tgcccttcag agaggacgat cagtgagatc
1861 tgagcctcgt gcctttcagc tgcttttctg ctacgagtca gcgtccgtgc gcgaggacac
1921 tgagccgggc tggctctcct ttctgtggtt ttatttaatg ggcttgaatt tgcattagat
1981 cagatttttg ccgcatcaca ttgttccaca gactgaatgc tgtgttcgta tcgattgatg
2041 aaacgtgaca ggtccgcca a ttgctcgttt gcaactgagag aggacaacag tttgaaactt
2101 acttttgtgt gtgtgtgggt ttggaagcca gtagctactt ccttagttca gttctttact
2161 gttcctcgaa taatctcctg actaaggcaa aaaaaaaaaa gcttctcctac gagaatcagt
2221 ctaacagaga tgccgatgtc agcacagccc taagcagtaa gtcataattg catttccacg
2281 tgactgtggt tctatcccgt gtacagagag atccagagcc ctacactcca cgacctgggg
2341 gctcacagca cagaacctag aagcacctgc tgacactctt caactgattt ttaaatggtg
2401 ttgcttggag ataaaaatta cataagggac tttttgctg cactctagtg caaaacatct
2461 gaagagctgt acaccacaaa gggtagctat ttcccctgag tggccgtggt gtcaccatgc
2521 cctggttcag tgtctcctga gtggatgaca ggtcttcatt ctctatcttg aatgtattat
2581 ggttactaat agttttataa tggagggtcta agaattaaag ttgtgtggga gtttcaggac
2641 aaaggaaggc taaaagtttg tcaagacggt gagcgtattt tggttaccta tgagaagggg

```

2701 tgtgacagtg tacagtgcca gctggtggcc acgctgcaga aatgagctgg agctcatggg
2761 ttttcagcta catttttcat aactttgtag tacatccatc ttgagtaaat taagccacaa
2821 tttggtacct agggctotcaa actaaaattt atttttataa atgaatttta aaagaaaaaa
2881 tatctacttc ttttaaagtt agaagaaaaat taacctgctg acaggcaaca tttttggggg
2941 gctttctgca ctagttttcc ttgtaaatga tttgagtgag taggtttggt ttctgacgaa
3001 agtagactgg agggtagcat tgtatgcctc aaatgtctca gtgtgtttgg ctcatagctg
3061 ggctatactt tattattttg gtatgcttac cacatgcaca ataatttcct gaaagccata ggacatgtct
3121 gtttggaata tctgttaatg cacatgcaca ataatttcct gaaagccata ggacatgtct
3181 gtagtcagca ccacgatagc accgtttcat gaaaggcatg gcggtgcat ttcataccac
3241 atcaaaatac agtaacattt ctatactaaa ttaacagtaa tacctcaaaa ctgctccggg
3301 agtagttttt aatggattga aatttacagt ttagtaaaag gcttaaaatt acttatactt
3361 atgaaataaa ctttaccagt tgactaaaat aatgcatggt aacagttggt ctgtatttgc
3421 atgtaaaagt gggccaccag agaaccctta ttgattactt aagtgtttac attattttta
3481 agactcctgt ttaagagctt tcagaattgt actgggtgaa tctcatttat aaaacttcct
3541 aagagactat ctgaactcta tactccagac agttaggtgg gagtataaat ctaccctttt
3601 tgatgacccc aggcttgagt ttttaaaatg actaccacaga agggcacaaag ggggaaggaa
3661 atgggtatttg tatatgtata taaatatgca cctaggagaa tgtgcttttt aaaataatga
3721 ctactgtttt tattaaaaca taagaaacta ccccccaaa ataagacttt cattcacatt
3781 cacaaagcaa acatctagta catgtctttc acttcacttt atgatagtgt attggatgat
3841 ttgggcatta cgatcacctc ttaccacagc acagaacata cattcttcaa cagcattaac
3901 ggagtttgcc aagtgcatta aagaggtcac gtggagggtg cgttcatatg aaacaatctg
3961 cagaaagtgg ggtaagaaag ggcacatggc acagttaaag ttgtagaaat caaattacta
4021 tcattttttg ttgccaaaac aaagtcttac atttaacccc cttttctacc acccccctc
4081 cacacttcac gtcagctaca tagtttccac agggtaattc actaagagct tgtggagctt
4141 ggtttttaaa tccttagcct ggtctgactt taggcatagc ttccagttct tccttccttg
4201 tcctggtttc ttgttcagct ttacttcta atccaacaac aaaagaaatg tctggtggt
4261 ctcagctaga gtctgatgtg tcttagagca tgtgtgctg tctgaaccat catccctgct
4321 ctcatctcag ctccctccag gcctgagcac cggttccttt tgtcccatac gtcatgaagt
4381 cacactattg ggaaacctgt gcttccctct ccatggctta actccctgtc agtgtcggag
4441 tgtataagaa tgcttgtaaa tactgtaata tatttattaa tatttgaaag gcattcattc
4501 agtggacagt ggggaattaac tctcccaagg caagtgaaa tgaatgattg acgtacgttg
4561 atttaacaat cttactagat ttttaattctt aaggatttca aatgaaacca gaagtggtt
4621 atgtaagagg cttaaaatga tcttatgttt aaagagattc tgttattagc accatgaact
4681 cgtactatga aatttttaag ccttttattt ttctaactat attactgtag gactggatat
4741 taggtgtcat ataggaaaca caaaagttat tgctgtttgc taaagcaaaa tagcagaaaa
4801 ttttgtatat gaaaaactgt tgaaggacca tagagaaatg tgtactactg acggggcttt
4861 tactaggctt cctgcgtgtg taaaagtcga ggtattgctg gcattcaggg tgacatgatg
4921 gtactaaatg ttttccatta aagtcttcta ttttaaaatt tagagaaaaa taaaatggct
4981 ttccatcag

Danksagung

Herrn Professor Martin Heisenberg möchte ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit im Fachbereich Biologie danken. Herrn Professor Ulf R. Rapp danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas, für die Aufnahme in sein Institut, die Schaffung eines sehr kompetenten Forschungsumfeldes, für sein Interesse und seine ständige Diskussionsbereitschaft bei der Betreuung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Eugen Kerkhoff und Thomas Raabe, die beide wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und von deren Fachkompetenz ich sehr profitieren konnte. Eugen danke ich für die Aufnahme in sein Labor, seinen Ideenreichtum und Innovationsgeist und seine Begeisterung für die Forschung, die ansteckend wirkte, Thomas für seine herzliche Art, seine Hilfsbereitschaft und sein stets offenes Ohr für meine großen und kleinen Probleme. Bei Conny möchte ich mich für eine sehr angenehme Zusammenarbeit bedanken, ihre Freundlichkeit, Einsatzbereitschaft und Zuverlässigkeit machen die Arbeit im Labor sehr angenehm. Britta, Reinhold, Renate, Ludmilla, Barbara, Petra, Tina, Wolf und Ewald danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für die freundliche Aufnahme ins Team. Ihre Freundlichkeit und gute Laune trug wesentlich zur Schaffung einer gelungenen Arbeits- und natürlich auch Pausenatmosphäre bei. Heike und Lenka danke ich für interessante Diskussionen, die stets prompte und kompetente Hilfe, nicht nur wenn es um Proteine ging und zahlreiche amüsante gemeinsame Unternehmen auch außerhalb des MSZ. Carsten, Guido, Bernd, Christian, Bruce, Jannick, Dima, Nina, Ulrike, Jörg und Dorthe möchte ich für viele hilfreiche Tips, Protokolle und Plasmide danken, Yvonne und Antje für die Rettung aus manch kleiner Not, wenn z.B. mal wieder ein Puffer etc. knapp war. Jakob Troppmair, Stefan Ludwig und Stefan Feller danke ich für viele nützliche Ratschläge und kompetente Diskussionen, Silvia Pfränger für die exzellente technische Unterstützung und allen anderen Mitarbeitern und Kollegen, die nicht namentlich genannt wurden, aber an der Entstehung dieser Arbeit mitgeholfen haben, danke ich ganz herzlich. Nicht zuletzt danke ich meinen Kollegen vom MD/PhD-Programm Annette, Saskia, Hannes, Enno, Stefan E., Stefan S., Christoph und Mick für viele nette Stunden bei netten Getränken, in denen wir auch, aber zum Glück nicht nur, über Forschung diskutiert haben und die den Aufenthalt in Würzburg sehr angenehm gestalteten.

Meinen Eltern und meiner Oma möchte ich herzlich für ihre Unterstützung und Anteilnahme an meiner Arbeit danken und nicht zuletzt meinem Freund Torsten für sein Verständnis und seine Geduld, wenn ich mal wieder ewig im Labor war oder am Computer saß.

Curriculum vitae

Name : Ines Maria Otto
Geboren am: 29.09.1968 in Zwickau
Familienstand : ledig
Anschrift: Rudolf-Clausius-Strasse 55a , 97080 Würzburg
Tel.: 0931/9701182
email: ines.otto@mail.uni-wuerzburg.de

Schulausbildung

1975-1983 Grundschule Ebersbrunn
1983-1987 Gerhart-Hauptmann-Gymnasium Zwickau
1987 Abitur

Hochschulstudium und Dissertation

1987-1988 Vorpraktikum am Bezirkskrankenhaus Heinrich-Braun Zwickau
1988-1994 Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1993-1994 Praktisches Jahr : Universitätsklinikum Halle-Kröllwitz, Chirurgie
Universitätsspital Zürich, Innere Medizin; Paracelsus-Klinik Zwickau, Anästhesie
1994 Ärztliche Prüfung und Teilapprobation
1995-1996 AIP, Klinik Rheinfelden, Schweiz
1996 Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
"Verlaufsbeobachtungen und dopplersonografische Kontrolle nach Carotis-Interna-Thrombarterektomie"

Beruflicher Werdegang

1996-1997 Pathologisches Institut Kantonsspital Basel
1997 Postgraduate course in molecular biology, Department für klinisch-experimentelle Forschung, Inselspital Bern
seit 01.08.1997 Promotionsstudium im MD/PhD-Programm der Julius-Maximilians-Universität Würzburg ,
seit 09 1998 Biologische Doktorarbeit am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, Universität Würzburg
Betreuer Prof. Dr. U.R. Rapp:
und am Lehrstuhl für Genetik, Biozentrum, Universität Würzburg
Betreuer Prof. Dr. M. Heisenberg;
Thema der Dissertation :
Klonierung und funktionelle Charakterisierung des Aktinreorganisators p150-Spir.

Publikationen von Daten aus dieser Arbeit:

Otto IM, Raabe T, Rennefahrt UE, Bork P, Rapp UE, Kerkhoff,E:The p150-spir protein provides a link between c-Jun-N-terminal kinase function and actin reorganization, *Current Biology*,2000 Mar 23; 10(6),345-8

Kerkhoff E, Otto IM, Doerks T, Bork P, Rapp UR, Raabe T: The Spir actin organisers are involved in vesicle transport processes, eingereicht 02/2001

Poster und Abstracts

Otto IM, Raabe T, Rennefahrt UE, Bork P, Rapp UE, Kerkhoff,E: p150-Spir : a novel player in actin reorganization
EMBL-Meeting Oncogenes and Growth Control 13.-17.05.2000, Heidelberg, Germany

Otto IM, Raabe T, Bork P, Rapp UR, Kerkhoff E: The novel p150-Spir modified FYVE Zn-finger structure determines the subcellular localisation of the actin reorganisator
ELSO-Meeting 2000,2-4.09.2000, Genf, Switzerland

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, daß die vorgelegte Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Außer den mit den Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten akademischen Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Ines Maria Otto