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 Drosophila melanogaster	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, Zellinien	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 (Übernachtkulturen)	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.	Plasmidisolation aus Escherichia coli	42
5.2.3.	Automatische DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377 Inte- grated Thermal Cycler	42
5.2.4.	Einbringen von Punkt-oder Deletionsmutationen mit Hilfe des Quick- Change Site-Direkted 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-Ex- pressionsbibliothek	55
6.3.	Identifikation der Exon-Intron-Struktur des spir-Gens	56
6.4.	Domänenstruktur von p150-Spir	59
6.5.	Expression der spir-mRNA in Drosophila	61
6.6.	Klonierung der <i>spir</i> -cDNA und Laufverhalten in der Proteingel- elektrophorese	62
6.7.	spir ist evolutionär hoch konserviert	63
6.8.	p150-Spir JBD wird von JNK in vitro phosphoryliert	67
6.9.	p150-Spir wird von JNK in vivo 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 Aktin- clusterbildung	72

6.13.	 Die modifizierte FYVE-Domäne und die Spir-Box beeinflussen die zelluläre Lokalisation von p150-Spir 		
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 Aktinorganisator	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	
Anhai	ng	100	
	Abkürzungen Sequenzen von p150-Spir und hu-Spir-1 Danksagung Curriculum vitae Publikationen aus dieser Arbeit Erklärung	101 104 109 110 111 112	

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 denkbares Modell wäre, daß p150-Spir unter der Kontrolle von JNK-Signalen zelluläre Aktinstrukturen reguliert, die für Transportprozessse 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 co-localizes 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. Ionenkanal-gekoppelte 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 extraund 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 Ca²⁺ weiterleitet. Aktivierte G-Proteine können in einigen Fällen auch zur Konformationsänderung von lonenkanälen 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 Tyrosinkinasen bezeichnet. Bei den meisten Wachstumsfaktorrezeptoren, wie dem Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor), dem Plättchenwachstumsfaktor PDGF (platelet derived growth factor), dem neuronalem Wachstumsfaktor NGF (neuronal growth factor) oder auch dem Insulinrezeptor handelt es sich um Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität in ihrer zytoplasmatischen Domäne: Rezeptortyrosinkinasen (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.

8

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

Proteinkinasen 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 Proteinkinasen kodieren. Eine einzige Säugetierzelle kann mehr als 100 verschiedene Proteinkinasen besitzen. [Alberts et al.1994] Die Zelle verfügt damit über ein breites Repertoire von Proteinkinasen, die Signale auf ihre jeweiligen spezifischen Substrate übertragen können. Bei den Zielproteinen handelt es sich dabei oft ebenfalls um Proteinkinasen, 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-Kinasen (*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 specifity 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.(\rightarrow Abb.2)

Bisher wurden mindestens drei Gruppen von MAP-Kinasen gefunden: ERK (<u>extracellular signal regulated kinase</u>), JNK/SAPK (<u>Jun-N-terminal kinase</u>/stress <u>activated</u> <u>protein kinase</u>), wobei JNK das humane und SAPK das murine Homolog bezeichnet und CSBP/p38 (<u>CSAID</u>TM/ cytokine suppressive anti-inflammatory drug <u>binding protein</u> / <u>Protein von 38</u> 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-Kinasekaskade. 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 Autophoshorylierung 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; Erk 2/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, osmotischenoder Hitzeschock oder zytotoxische Substanzen, wie Anisomycin oder Arsenit akti-

12

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] Aktiviertes p38 aktiviert im Zellkern unter anderen die Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF2, SRF und CREB, hat aber auch zahlreiche zytoplasmatische Zielproteine (\rightarrow 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 (\rightarrow 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, (\rightarrow 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. [Garrington und Johnson 1999; Widmann et al. 1999; Jp 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 linage 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, das 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

13

der Kaskaden und damit Weiterleitung der Signale zu den Effektoren möglich, die Signale werden sozusagen gebahnt. (\rightarrow 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.Einleitung

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-iun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) Signalweg ist ebenfalls hierarchisch aufgebaut. Zur Aktivierung der Kaskade führen zelluläre Stressinduktoren (proinflammatorische Cytokine, Interleukine, TNF α , 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 (p21activated 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, lp und Davis 1998] Aktiviertes Rac/Cdc42 ist in der Lage, die MEKK-Isoformen MEKK1 und MEKK4 direkt zu aktivieren [lp 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. (\rightarrow 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 α oder Interleukin-1. [Davis 2000] MKK4 und MKK7 phosphorylieren JNK im TPY-Motiv an Threonin- und Tyrosinresten, die benachbart zu Prolinen liegen. (\rightarrow 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. [lp 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 α , β) 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; Jp 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 (<u>activator protein-1</u>) 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 (<u>nuclear factor for activated <u>T</u>-cells) in T-Zellen gezeigt werden, was allerdings nur für diese Isoform von NFAT zutraf. Da die Expression der Isoformen gewebsspezifisch erfolgt, wäre eine zellspezifische Regulation der JNK-Funktion auf transkriptioneller Ebene zu postulieren. [Ip und Davis 1998].</u>

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 Tumorzellinien 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 verhindert 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. [lp 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 Pankreaskarzinomzellinien könnten Hinweise auf eine mögliche Funktion von Mitgliedern der JNK-Kaskade als Tumorsuppressorgene darstel-Ien zumal der Genlokus von MKK4 auf Chromosom 17 nahe dem Lokus 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 α 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 α 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

19

NF_KB, 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 Kostimmulation 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 Leukozytenädhäsion 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 adhärenten 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, [Garington 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

20

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.(\rightarrow 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; Jp 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. Mutantenanalysen, 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. [lp 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 Emryonen zeigen dorsal ein Loch. Die Expression von dominant inhibitatorischen Mutanten von DRac und DCdc42 führt ebenfalls zu diesem als "dorsal open" bezeichneten Phenotyp. 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 TGFß (transforming growth factor ß) 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

22

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 TGFß-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 TGFß-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 TGFß 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 Epithelzellmigration 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 Membranstrukurproteinen und Zytoskelett assoziierten Proteinen wie z.B. 1 (1) myospheroid (ß-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; Jp 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; Jp 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.Einleitung

3.3. Gegenstand der Arbeit

Wie in den vorhergegangenen Kapiteln dargestellt, beeinflußt die JNK-Kaskade eine Vielzahl von zellulären Funktionen, wie Stressreaktion, Proliferation, Differenzierung, Apotose, 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 Zytoskeletts 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. Strukur 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	Hoefer	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	Hoefer
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. Ethidiumbromid	Aplichem Gibco-BRL
Adenin	Sigma	Fettfreie Trockenmilch	Nestlé
Agar select	Sigma	Fötales Kälberserum	PAN Systems
Agarose, ultra pure	Gibco-BRL	Formaldehyd	Sigma
3AT:3Amino1,2,4-triazol	Sigma	GSH-Sepharose	Böhringer
Ammoniumacetat	Merck	D (+)-Glucose-Monohydrat	Merck
Ammoniumpersulfat	Fluka	Glycin	Sigma
Ampicillin	Sigma	Glycerol	Sigma
Anisomycin	Sigma	Hefe-Stickstoff (Basis)	GibcoBRL
Antipain	Boehringer	ohne Aminosauren	
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		Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma	Lipotectamine *** Reagent	GIDCO-BRL
DTT (Dithiothreitol)	Sigma	Lithiumacetat	Sigma
DMF (Dimethylformamid)	Sigma	L-Lysin	Sigma
Dulbecco´s Modified Eagle Medium DMEM	Gibco-BRL	Magnesiumacetat Magnesiumchlorid	Sigma Merck
EDTA	Sigma	Magnesiumsulfat	Sigma
EGTA	Sigma	β -Mercaptoethanol	Sigma
Eisessig	Sigma	Methanol	Rühl AG

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

4.2.2 Enzyme

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

Sonstige Enzyme :

Enzym

Calf Intestinal Phosphatase (CIP) Klenow Fragment RNAse A Pwo-DNA-Polymerase Pfu-DNA-Polymerase T4-DNA-Ligase T4-DNA-Polymerase

Firma

NEB, MBI NEB Sigma Peqlab Stratagene NEB, MBI-Fermentas NEB, MBI-Fermentas

4.2.3 Molekulargewichtsmarker

Molekulargewichtsmarker für Proteine:

Prestained Molecular Weight Standart 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 Plasmid Maxi Kit Plasmid Mini Kit QIAquick Gel Extraction Kit QIAquick PCR Purification Kit Quick Change[™] Site Directed Mutagenesis Kit dNTP(ATP, CTP,GTP,TTP) Random-DNA-labeling-Kit Amersham QIAGEN QIAGEN QIAGEN QIAGEN Stratagene Peqlab Boehringer

4.3. Bakterienstämme, Hefestämme, Zellinien

Escherichia coli; DH5 α

Subcloning Efficiency DH5a[™] 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 4Δ , gal 80Δ , cyh^r2, LYS2::GAL1_{UAS}-HIS-_{TATA}-HIS3, URA3::GAL1_{1UA}-GAL1-_{TATA}-LacZ, Benerter HIS3, JacZ, Transformations, Marker, trp1, Jou2, cyh^r2

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∆C	(D. Matenia, MSZ)
pCMV5 Myc-Erk2-MEK-1-LA	(M.H. Cobb, Southestern 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 Restriktionsenzymschnittstellen Ncol 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 Restriktionssschnittstellen für BamHI und AccI 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 Clal 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 Xhol ausgeschnitten und in pGEX4T3 subkloniert.

pcDNA3-MT Spir ∆C-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* (\rightarrow 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 \underline{C} CT TCC TGT \underline{C} CC TGC GCA CTC 3` reverse Primer : 5`GAG TGC GCA GG \underline{G} ACA GGA AG \underline{G} AGA CGC GAC 3`

pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 3,4 S

oberer Primer : 5`CAT TCA GT<u>C</u> CAA GTT GT<u>C</u> CCA GCG CAC GGT C 3` reverse Primer : 5'GAC CGT GCG CTG <u>G</u>GA CAA CTT G<u>G</u>A CTG AAT G 3`

pcDNA3 MT p150-Spir ∆ C 5,6 S

forward Primer: 5`CGC ACG GTC T<u>C</u>C GCC AAG T<u>C</u>C TAT ACC AAG 3` reverse Primer : 5`CTT GGT ATA G<u>G</u>A CTT GGC G<u>G</u>A GAC CGT GCG 3`

pcDNA3 MT p150-Spir Δ C 7,8 S

oberer Primer: 5`GTG ACC GTG T<u>C</u>C AAC GAC T<u>C</u>C CAG GGA CTG 3` reverse Primer: 5`CAG TCC CTG G<u>G</u>A GTC GTT G<u>G</u>A 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 & 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 Δ F,F/A,A

forward Primer: 5`CTC GGT TCT CG<u>G CCG C</u>CG GTC CCT GGG 3` reverse Primer : 5`CCC AGG GAC CG<u>G C</u>G<u>G C</u>CG AGA ACC GAG 3`

pcDNA3-p150-Spir-MT ∆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.

2× 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 Blottingpapier, 3 MM, 190 g/m ² Bottle Top Filter 0,22 µm ECL-Hyperfilm Eppendorf Combitips Eppendorf-Gefäße 1,5 ml Frischhaltefolie Gewebekulturflaschen Gewebekultur-Roller-Bottles Gewebekulturschalen Glasperlen 0,45-0,5 mm Greiner-Röhrchen 15 ml, 50 ml Hybond [™] -C extra 82 mm Hyperfilm [™] -MP Kulturschalen 9 cm Kulturschalen 15 cm Mullbinden Parafilm Poly Screen PVDF Transfer Membran Polystyrenröhrchen 5 ml Protran Nitrozellulose Transfer-Membran Sterilfilter Millex [®] -GS 0,22 µm Whatman-Rundfilter 8,5 cm Zahnstocher	Firma Schleicher & Schuell Nalge Nunc International Amersham Eppendorf Hartenstein alio Sarstedt Sarstedt Sarstedt Sarstedt Sarstedt Sigma Greiner Amersham Amersham Sarstedt Greiner Apotheke Hartenstein NEN [™] Life Science Products Sarstedt Schleicher & Schuell Millipore Whatman 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 Färbe 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 Entfärbelössung wurde die selbe Zusammensetzung ohne Coomassie BrillantBlue 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 μ l 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 μ m 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, $2\mu g/ml$ Leupeptin, $2\mu g/\mu l$ Aprotinin, 1mM PMSF, 10 mM NaF, 0,2mM Na₃ VO₄ und 100 μ M 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.

1× 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-HCI-Puffer pH 6.8, 1ml Glycerin, 0.5 ml β -Mercaptoethanol, 1.5 ml 20% (w/v) SDS-Lösung und 50 μ l 1% (w/v) Bromphenolblau wurden in 10 ml Aqua bidest. gelöst und als 1ml Aliquots bei –20°C eingefroren.

5× 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-HCI-Puffer pH 6.8, 5 ml Glycerin, 2.5.ml β -Mercaptoethanol, 7,5 ml 20% (w/v) SDS-Lösung und 250 μ l 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 H_2 O) zugegeben (5,4 g), auf ein Endvolumen von 500 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt und steril filtriert (0,22 μ m).

10×TBE-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-HCI-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 HCI 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 μ l β -Mercaptoethanol und 500 μ l 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 (\rightarrow 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	pACT-2 AD	
5`(1) CAA CTG CAG CAG CAG CAG ATC 3′(1) CAA GAT CAT GGC GTG GGC ATC	TAA TAC CAC TAC AAT GGA TGA TG	
LD 37577	pACT-2 rueck	
5'(1) GAT CAA GGC GTC GGA ATC ATC 3'(1) CTG CAT ACA ACC GCC CAC	GTG CAC GAT GCA CAG TTG AAG TG	
Τ7	тз	
AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AC	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 Schrimpf 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 (\rightarrow 5.1.3.) wurden auf LB+Amp.-Platten über Nacht bei 37°C selektioniert. Für Übernachtkulturen 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 (\rightarrow 5.1.4.) anzulegen oder Plasmid-DNA im kleinen oder großen Maßstab zu präparieren (\rightarrow 5.2.2). Zum Animpfen der Übernachtkultur 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-I-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 (μ g) angegeben und lag durchschnittlich bei 10⁸ Klonen pro 1 μ g 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 μ l einer frischen Bakterienübernachtkultur und 200 μ l 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 (Ta), 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× 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 Agua 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 Ta des Primers begonnen. In einem zweiten PCR-Schritt mit der höheren, nun für das Annealing der Primer an die Fragmente passenden Ta 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 μl): 3-5 μl Plasmid-DNA (0,1-1 μgDNA), 2 μl Reaktionspuffer, 1 μl Restriktionsenzym, mit Aqua bidest. auf 20 μl Gesamtvolumen auffüllen

• präparativer Verdau (20 μl): 5-10 μl Plasmid-DNA (1-5 μg DNA), 2 μl Reaktionspuffer, 1 μl Restriktionsenzym, mit Aqua bidest. auf 20 μl Gesamtvolumen auffüllen

Der Ansatz wurde für 1 bis 3 Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die Vollständigkeit des Verdaues 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× TAE in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung pro 100 ml hinzugefügt.Die Agaroselösung wurde in abgedichtete Gelschlitten gegossen und ein Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisierung bei Raumtemperatur konnte der Gelschlitten dann in eine Elektrophoresekammer eingelegt und mit 0,5×TAE überschichtet werden.Die Taschen wurden mit den DNA-Proben (1-20 µl DNA + 1-5 µl DNA-Probenpuffer) beladen. In eine Tasche wurden 0.5 µg 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 µl einer 10 mM dNTP-Lösung und 2 µl 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 µl einer 10 mM dNTP-Lösung und 2 µl 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× 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 µl Elutionspuffer (10 mM Tris pH 8,5) aus der Säulenmatrix eluiert.

5.2.2. Plasmidisolation aus Escherichia coli

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

1,5 ml einer 2ml Übernachtkultur 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 I (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 1xTris-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 = $OD_{260} \times 50 \text{ x Verdünnungsfaktor}$

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 PCRbasierender 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 TRIzolTM Reagent (Life Technologies) oder peqGOLD TriFastTM (PeqIab) 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. (\rightarrow 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 μ g Gesamt-RNA wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Endvolumen von 15 μ l ergänzt und 5 μ l RNA-Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden 15 min bei 65°C inkubiert, für 3 min auf Eis gestellt, 3 μ l 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 Na-OH-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 Filmexpositionskassettte 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 dieTranskription 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 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 220 UpM wachsen gelassen. Diese Übernachtkultur 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 Iac-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 Proteinseinhibitoren (\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 aufzuschliesen 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 (\rightarrow 5.3.3.) mit anschliessender Coomassie-Blaufärbung (\rightarrow 5.3.2.) im Vergleich zu BSA-Standards und mittels Immunodetektion im Westernblot (\rightarrow 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 Zellextrakten (\rightarrow 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 Trenngele 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 Sammelgele wurden aus einer 33,9% bzw. 21% Acrylamid/ Bisacrylamid Stammlösung durch Zugabe entsprechender Mengen an Tris-CI, Wasser, SDS, TEMED und APS gemischt:

	Trenngel				Sammelgel
	6 %	10 %	12 %		
Acrylamid-	5,85ml	9,3ml	11,16 ml	Acrylamid-	2,25 ml
Bisacrylamid (37.5:1)				Bisacrylamid	
				(19:1)	
3 M Tris-CI 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 $1 \times$ SDS-Page-Laufpuffer befüllt.

Die Proteinproben wurden in 1xLämmlipuffer gelöst und für 5 Minuten bei 100°C gekocht. Jede Kammtasche wurde mit 10-20 μ l Probe bzw. mit 10 μ l 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 Elektroblotkammer 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/cm²) 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 immunologischem Nachweis der Proteine wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Hierzu wurden zunächst unspezifische Bindungstellen 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 Chemoluminiscence) 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 Lysispuffer (wie z.B. IKCA-Lysispuffer) aufgebrochen und größere unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert. Die Zell-Lysate konnten dann verwendet werden, um Proteinexpression nachzuweisen (\rightarrow 5.3.2), in Koimmunpräzipitationsexperimenten Komplexbildung zweier oder mehrerer Proteine zu zeigen (\rightarrow 5.3.6.) oder in Kinase-Assays funktionelle Beziehungen zwischen interagierenden Faktoren zu untersuchen (\rightarrow 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 Lämmlipuffer versetzt (100 µl Lämmlipuffer 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-Übernachtkultur wurden 1:50 verdünnt in 10 ml frischem YPD-Medium angesetzt und bis zu einer OD ₆₀₀ 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 Stickstoff schockgefroren 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 (\rightarrow 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 (\rightarrow 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 (\rightarrow 4.7.) und Immunpräzipitation der Kinase (\rightarrow 5.3.6.) wurden radioaktiv markiertes ATP und für die in *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 (\rightarrow 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 (\rightarrow 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 [γ^{32} P]-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 pelletiert 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 adhärend 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 ddas 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 μ l Trypsin/EDTA trypsinisiert.(\rightarrow 5.4.1) 200 μ l 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 μ l Zellsuspension wurden nach Zugabe von 2 ml frischem DMEM-Vollmedium pro Loch ebenfalls ffür 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 μ l 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 Dunklen.

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.(\rightarrow 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 (ß-Galaktosidase) und HIS3 unter der Kontrolle eines Gal4responsiven 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 ß-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. Prev-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 Hefeklone mit Protein-Protein-Interaktionen detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Bait-Plasmid (pAS2-1 DJNK) und die Prev-Plasmide einer cDNA-Bibliothek (Clontech *Matchmaker* embyonale *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 Transformanden auf Selektionsmedien ohne Histidin wachsen, bei Expression des E.coli-Gens LacZ (ß-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 Reportergenaktivierung 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 einen *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 Übernachtinkubaton 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 < 10⁸ 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 Transformanden 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 I, 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 μ l abgenommen. Im verbliebenen Medium wurde das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden 2 μ l Carrier-DNA und ca. 1 μ g Plasmid-DNA (~1-3 μ l) 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 20 μ l DTT (1M), zwischendurch wurdeder 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 μ l 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.(\rightarrow 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-Konzentartion 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 Konzentartion 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*-Pasmids und der Bibliotheksplasmide erfolgte sequenziell, d.h. der Hefestamm Y 190 wurde zuerst mit dem pAS21DJNK transformiert (*small scale*, \rightarrow 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 BibliothekscDNA 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 cyh² 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 Leucinmagelplatten wachsen können und im lac-Z-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-Übernachtkultur 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 DH5 α gegeben und mit den Hefeplasmiden 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 (\rightarrow 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. (\rightarrow 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 x 10⁶ 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 Proteinstrukur und Funktion des als p150-Spir (\rightarrow 6.3.) bezeichneten identifizierten neuen Interaktionspartners von DJNK.

55

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.(\rightarrow 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. (\rightarrow Abb. 8)



Abb.8 : <u>LacZ-Assay</u>: 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 Start-codon 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 interagierte, 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. (\rightarrow Abb.9) Die komplette DNA und Proteinsequenz befindet sich im Anhang.

57



58

6.Ergebnisse

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. (\rightarrow 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 <u>Fab1</u>, <u>Y</u>GLO23, <u>V</u>sp27und <u>E</u>EA1 ab) binden das Membranlipid Phosphatydilinositol-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 (\rightarrow 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. (\rightarrow 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. (\rightarrow 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 <u>Erk</u> and <u>Jnk</u>, <u>LxL</u>) DEJL-Motive bestehen aus einer aminoterminal gelegenen Folge basischer Aminosäuren, der sich eine L/I-X-L/I-Sequenz anschließt. (\rightarrow Abb.11) Sie wurden als Bindungsdomänen für MAPkinasen, wie JNK und Erk beschrieben, die die Interaktion der Kinasen mit Regulatorproteinen oder ihren Substraten vermitteln (\rightarrow 7.1.) [Jacobs et al.1999] In p150-Spir bilden die carboxyterminalen Aminosäuren 997-1014 mit der Sequenz KQKRSSARNRTIQNLTLD das DEJL-Motiv.*

p150-Sp	r 990 NEITSSVKQRSSA <u>R</u> N <u>R</u> TIQN - <u>L</u> TLDLTPVWK 102	20
d-MEK	MS <u>K</u> N <u>K</u> LN <u>L</u> V <u>L</u> PP	
h-JNK1	QG <u>KRK</u> A <u>L</u> K <u>L</u> NF	
sp-BYR1	MF <u>KRR</u> RNPKG <u>L</u> VLNP	
sc-Ste7	LQ <u>RR</u> NLKG L N <u>L</u> NL	
DI	EJL-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 anderern dieses Motiv enthaltenden Proteinen

6.5. Expression der s*pir* 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 (\rightarrow 5.2.5.), auf einem 1%igen denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. (\rightarrow 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.Ergebnisse

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, \rightarrow 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 Clal 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 B14-myc-p150-Spir-Plasmid transient transfiziert ($\sqrt{5.4.2.10}$ die

(NIH3T3) mit dem BJ4-myc-p150-Spir–Plasmid transient transfiziert (\rightarrow 5.4.2.), die Zellen zur Gewinnung der enthaltenen Proteine mit Proteinprobenpuffer lysiert (\rightarrow 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. (\rightarrow 5.3.3.). Das Spir-Protein läuft bei etwa 150 kDa und wurde deshalb als p150-Spir bezeichnet. (\rightarrow Abb.13).



Abb.13: Western Blot

NIH3T3-Zellen wurden transient p150-Spir (BJ4-myc-Spir) mit transfiziert, die Proteinlysate auf einem 10%SDS-Gel aufgetrennt und p150-Spir mit einem anticMyc-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 verschiedenenen Spezies. So zeigt die p150-Spir-Proteinsequenz Ähnlichkeit zu Pem-5 (<u>posterior endmark gene</u>), 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.(\rightarrow 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 Zellinien konnte für humanes *spir-1* eine Expression eines ca 4.5 kb großen Transkripts in HeLa-Zellen (humanes Cervix-carcinom), GM251 (humane Fibroblastenzellinie), HUVEC-Zellen (humanes Nabel-schnurepithel), 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. (\rightarrow 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). (\rightarrow Abb.14b und 14c)

63

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



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.

p150-Spir	EDEECOVSOELENL FNFMT ADETDDDC IDEG IDEGDKRUDDESEE-ERNDTKELEN I IET
DFM-5	ANOPOFISISI DEVISIONT AND OT - CARFFUNDE CVD - CRUDSTOT CVOSCTIDELLTE
hu-Spir-1	
Ru-Spir-2	- Andre CFL
p150-Spir	CRNHIKTT-LPENHYRAUCRALUTET IELRUPLQQULNNEAGAEKLIKASESSATT
PEM-5	CESRLSQRWEADVHYTAVCSAMLREAQELKIFLSKVESANQSLRKLTQVTSSSRDPHCES
hu-Spir-1	CAAHLPTESDAPNHYQAVCRALFAETMELHTFLTKIKSAKENLKKIQEMEKS DES
hu-Spir-2	EQREGLWPQEAPHGYGPCEGASFSPTKPVCVSVLESTFAEEHRGLEPAASLPVL
p150-Spir	QQELAKLGFNDWARFWVQVIDELRRG-VRLKKSNHERTPIEYELTPYEILMGDIRAK
PEM-5	PDE IPNL GFADWARLUMOVLDOLRKGVTRLKKVE0OTRNSVEVELTPVE ILMED IROK
hu-Spir-1	STDLEELKNADWAR FW/01MEDLENG-VKLKK/0ER0YNPLP IEVOLTPYEMLMDD IRCK
hu-Spir-2	PLDLGWLGLLSGODSLAEVFRG-TM.PSTTSLKCIKMBWKGGWETOGNTWROW
n150-Snir	WY AT DUS M AN CHIED DE AVAILABLE AND IF PID SODDE WY SCHOOL CODDMOPD SODDEAL MPS
DEN-F	
FLM=5	
hu-spir-1	R TILLREN HUNGD IFFRLERSARE I ILDI IKORPELIP OSARALAP IFFRPROLIEK ILLE
Ru-Spir-2	KKTWKDIFFKOKKIARELIEDTIKSKFFEKQUSEKEKFEFFKQKS <u>EREKIEEE</u>
150 5	
p130-3p11	TRRGAL -LKUTTPPLAPTLRLROLPSANSTLSRSRURLIKODTSRTUDDDLTY
PEM-5	THE QAUPLES IDELS INPOSET FOUGERPOTES INGHT SSESCER ILELENLSDENDSFT
hu-Spir-1	IKAERK-LRPU3PEEIRR3RLDUTT
hu-Spir-2	IKQERR-LRPURGEGWAARGFGSLPCILNACSGDAKSTSCINLSUTDAGG
0 - 1 - 12 -	Demoin
	Dornain 🔤 WH2-Domain 🛄 TP-Motif

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-Phosphorylisierungsstelle (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 Expressionsverktor 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 -³²P)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 aktvierte JNK1 phosphoryliert. $(\rightarrow Abb.17)$.



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.Ergebnisse

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. (\rightarrow 5.4.2.) Die Zellysate (\rightarrow 5.3.4) wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen geblottet und p150-Spir mittels Antikörperreaktion mit dem anti-Myc-9E10 monoklonalem Mausantikörper nachgewiesen. (\rightarrow 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. (\rightarrow Abb.18, rechtes Bild)

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

68



Abb.18: p150-Spir wird in vivo von aktivierter JNK phosphoryliert

Immunoblot mit Proteinlysaten von mit p150-Spir zusammen mit JNK2 und Mlk3, konstitutiv aktiver JNK-MKK7, kinase-inaktiver JNk-MKK7-KD oder konstitutiv aktiver Erk2-Mek-LA kotransfizierten 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 konstitutivaktiver 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 (\rightarrow 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. (\rightarrow 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 (\rightarrow 5.4.2.) und nach 36 Stunden Koimmunopräzipitationen durchgeführt. (\rightarrow 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, HAmarkierter JNK2 (SAPK) und mit beiden Konstrukten zusammen kotransfiziert. p150-Spir wurde mit anti-Myc (9E10) Antikörpern immunopräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im anschließenden Immunoblot auf die Anwesenheit von interagierender JNK (SAPK) untersucht, die über die Fusion der Kinase mit dem Hämmaglutinin-Epitop mit einen anti-HA-Antikörper (12CA5) nachgewiesen wurde. (TL=Totallysat; 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 Kolokalisation 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 einen gegen den Myc-Epitop gerichteten TRITC markierten Antikörper angefärbt (rot, mittleres Bild). Die F-Aktin-Färbung zeigt perinukleäre Aktincluster, die mit den Spir-Akkumulationen kolokalisieren, wie die Überlagerung beider Färbungen zeiat (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 Nterminal 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. (\rightarrow Abb.23) Um die Funktion der mFYVE Domäne für die zelluläre Lokalisation von p150-Spir zu untersuchen, wurden verschiedene Punkt- und Deletionsmutanten innerhalb der

untersuchen, wurden verschiedene Punkt- und Deletionsmutanten innerhalb der mFYVE-Domäne hergestellt (\rightarrow 4.4.), in denen die Integrität der Domäne zerstört wurde. Für die Punktmutanten wurden alle 8 Cysteine einzeln mittels in vitro – Mutagenese (\rightarrow 5.2.4.) durch Serine ersetzt (pcDNA3-MTp150-Spir $\Delta C^{X,Y}$ 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 △FA/FA). Für die Deletionsmutante wurden die Aminosäuren 2-777 von p150-Spir mit einem Myc-Epitop fusioniert (pcDNA3 Δ C-term). (\rightarrow Abb.23 unten) Die Plasmide wurden in NIH3T3-Zellen transfiziert (\rightarrow 5.4.2.) und die Lokalisation von p150-Spir in den Zellen mit dem anti-Myc-Antikörper mittels Immunfluoreszenz analysiert (\rightarrow 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. (\rightarrow 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. (\rightarrow 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. (\rightarrow 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 JNKinteragierenden 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.(\rightarrow 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. (\rightarrow 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. $(\rightarrow 6.10., Abb.20)$

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. (\rightarrow 6.12., Abb.22) Ein ähnlicher Phänotyp wurde bei Expression der WH2-Domänen Proteine WASP und WAVE in adhärenten 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 Wiskot-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 adhärenten 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 monomerem 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 momomere 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] (\rightarrow 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. (\rightarrow 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).

Unveröffentliche Ergebnisse von *in vitro* Aktin-Polymerisationsassays, die von unseren Kooperationspartnern im Labor von Dyche 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 verstärkt. 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 Kolokalisation 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∆WH2 und pcDNA3-MTp150-Spir∆WH2∆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 staufen 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 denkbares 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 asymmetrischen 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 adhärenten 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

81

Mikrotubulizytoskelett denkbar. Einen weiteren Hinweis geben vorläufige Immunfluoreszenzdaten bei Überexpression von p150-Spir in NIH3T3-Zellen, die eine Kolokalisation 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. (\rightarrow 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 komlexen Zusammenspiel verschiedener Signaltransduktionsenzyme reguliert. p150-Spir stellt ein Substrat der JNK-Kinase dar. Bei Überexpression in adhärenten 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.

83

[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 weitern 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; lp und Davis 1998; Stronach 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.

84

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. (\rightarrow 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 Aktinassoziierten 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-Threonin-Kinase (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 Transport-mechanismen beteiligt. In FYVE-Zinkfingermotiven werden zwei Zinkionen durch jeweils 4 Cysteine und/oder Histidine komplexiert (Cx₂Cx ₉₋₃₉ Cx ₁₋₃ (C/H)x ₂₋₃ Cx ₂Cx ₄₋₄₈ Cx₂ 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. (\rightarrow 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. (\rightarrow 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] (\rightarrow 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 mFY-VE-Domäne eine gleichmäßige Verteilung des Proteins im Zytoplasma. (\rightarrow 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. (\rightarrow 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, ß-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- Domäne von p150-Spir zeigte das Protein ebenfalls ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster, was auf eine Funktion dieser hydrophoben Aminosäuren in der Lokalisation von p150-Spir hindeutet. In weiteren Experimenten bleibt festzustellen an welche zytoplasmatischen Strukturen p150-Spir mit Hilfe seiner mFYVE-Domäne gebunden wird. Zu klären ist auch die Frage, welche Bedeutung die Aktinmonomere bindenden WH2-Domänen für die Lokalisation des Proteins haben. Die Aminosäuresequenz von p150-Spir enthält eine weitere Region unmittelbar vor der modifizierten FYVE-Domäne, die einen hohem Konservierungsgrad zwischen den Spir-Homologen in Drosophila, Mensch und *Ciona* zeigt. Diese als Spir-Box bezeichnete Domäne zeigt in Datenbank-Sequenzvergleichen Homologie zu Rabphilin-3A, einem die GTPase Rab3A bindenden Protein, das ebenfalls eine FYVE-Domäne besitzt, die der von p150-Spir ähnelt. [Ostermeier und Bruneger 1999; Hurley und Misra 2000] (\rightarrow Abb.28)

	α helical
Rabphilin-3A	RKQEELTDEEKEIINRVIARAEKMETMEQERIGRLVDRLETMRKNVAGDGVNRCILC
	LT EE I V RAE C C
150-Spir	DDR <mark>LSVTLAEIVHIRSVMTKAELE</mark> GLPMDVRVKEDVEKRRVCFLC
PEM-5	VAS <mark>LSLTVEEVMHIRQVLTRAELE</mark> KFQSDKELYRALKNEKVCFTC
hu-Spir-1	VEC <mark>LALTVEEVMHIRQVLVKAELE</mark> KYQQYKDIYTALKKGKLCFCC
	L LT EE HIR V RAELE CF C
	V A K 1 2
	Spir-box

Abb.28: Sequenzvergleich der Spir-Box zwischen Rabphilin-3A und einigen Spir-Proteinen mit darunter angegebener Konsensussequenz. Das vor der FYVE-Domäne lokalisierte 20 Aminosäuren umfassende Motiv zeigt in der Kristallstrukturvorhersage eine α -helikale Struktur.

Rab-GTPasen sind an der Regulation von zellulären Vesikeltransportvorgängen beteiligt. Mehr als 40 Proteine dieser Familie wurden bisher in Säugern entdeckt, wobei jedes Protein mit spezifischen subzellulären Membrankompartimenten und Transportsystemen assoziiert ist. So spielt beispielsweise Rab3A eine wichtige Rolle in der 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 Koimmunopräzipationsexperimenten deuten auf eine Interaktion zwischen der bis jetzt vom humanen Spir-1 bekannten Cterminalen Teilseguenz 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] Unveröffentliche 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 Aktinreoganisator wirken und unter der Kontrolle von kleinen GTPasen und JNK die Aktinpolymerisation initiieren, gleichzeitig über seine modifizierte FYVE-Domäne JNK und andere interagierende Proteine

89

an Zellmembanstrukturen 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. (\rightarrow 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 Säugergeweben 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.($\rightarrow 6.7$.)

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 Mamma-Karzinom-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 dentritic 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 GTPbinding 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-ativated 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 protooncoprotein, 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 mitogenactivated 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 Dijike, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsummoto, 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., Gallaghe, 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., Youg, 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 though 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 Rhoinduced cytoskeletal reorganization. J.Cell Biol.183, 913-926, 1997

Manseau, L., Schüpbach, T.: Cappuccino and spire: two uniquematernal-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 actindepolymerizing 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 FYVEdomain 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.: TNFα induced E-selectin expression is activated by the NF-κB 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 Habour 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 depolymerizating 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 proetein 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 throught 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 proteinprotein 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., Settasatian,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., Settasatian,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-actvated 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 exocitotoxicity-induced apoptosisin 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, 1185-1195,1195

Anhang

Abkürzungen

aa	Aminosäuren
A. bidest	Aqua bidestillata
AD	acidic domain
AP-1	activator-protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
Arn	Actin-related-protein
ΔΤΡ	Adenosintrinhosphat
3_ΔΤ	
0711	3-Amino1,2,4-triazol
ATCC	American Type Culture Collection
baz	bazooka
β-Gal	β-Galactosidase
bsk	basket
bp	Basennaare
bzw	baschpadre
DZW.	Venzentration
	circa
CAMP	zyklisches Adenosinmonophosphät
CDS	coding sequence
CTU	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	Drosophila- c-Jun N-terminale Kinase
(d)dNTP	(Di)Desoxynukleotidtriphosphat
DM	Drosophila melanogaster
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DC	dorsal closure (dorsale Schließung)
DTT	Dithiothreitol
Dnn	
E coli	Escherichia coli
ECI	Enhanced Chemoluminiscence
	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolbistetraacetat
EGE	childermal growth factor
	epidermai growin racion
	extracential Signal regulated Kinase
	total aalf aarum
	Tetal Call Serum
FGKB	Formamid Gel Running Butter

F-Aktin	filamentäres Aktin
G-Aktin	globuläres Aktin
GDP	Guanosindinhosphat
GST	Gluthathion-S-Transferase
GTP	Guanosintrinhosphat
НΔ	Hämagolutinin
Han	beminterous
Lie	Histidia
	homatanajatia progonitar kinasa 1
	Interleukin
IL Inco	
JBD	JNK-Binde-Domane
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
МКК	MAP Kinase Kinase
MLK	mixed-linage-kinase
MP1	MEK-Partner 1
mFYVE	modifizierte FYVE-Domäne
mRNA	messenger RNA
MSZ	Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
NGE	neural groth factor
NER	New England Biolabs
NEAT	nuclear factor for activated T-cells
	Nonidet 40
	ontische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PRS	Phosnhate huffered saline
	nolymerase chain reaction
	porymerase enalmicaellon platalad darivad arowth factor
	Pateieu uenveu yrowin lation Polyothylonglykol
FEG	гојуецијенијукој

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
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
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
TNFα	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-33-indolyl-β-D-galactopyranosid
YTH	yeast-two-hybrid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Sequenzen

p150-Spir

```
4525 bp
                                   mRNA
LOCUS
            DME238876
                                                    INV
                                                              19 - NOV - 2000
DEFINITION Drosophila melanogaster mRNA for p150-Spir protein (p150-Spir
           gene).
ACCESSION
           AJ238876
          AJ238876.1 GI:6572124
VERSION
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.
            The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal
TITLE
            kinase function and actin reorganization
            Curr. Biol. 10 (6), 345-348 (2000)
JOURNAL
            20211961
MEDLINE
REFERENCE 2 (bases 1 to 4525)
AUTHORS
          Kerkhoff,E.
TITLE
           Direct Submission
           Submitted (20-MAY-1999) Kerkhoff E., Institut fuer Medizinische
JOURNAL
           Strahlenkunde und Zellforschung, University of Wuerzburg,
            Versbacher Str. 5, D-97078 Wuerzburg, GERMANY
           Revised by [3]
REMARK
            3 (bases 1 to 4525)
REFERENCE
AUTHORS
           Kerkhoff,E.
            Direct Submission
TTTTT
            Submitted (08-DEC-1999) Kerkhoff E., Institut fuer Medizinische
JOURNAL
            Strahlenkunde und Zellforschung, University of Wuerzburg,
            Versbacher Str. 5, D-97078 Wuerzburg, GERMANY
           Location/Qualifiers
FEATURES
            1..4525
source
                     /organism="Drosophila melanogaster"
                     /db xref="taxon:7227"
                     /chromosome="2"
                     /map="38C"
                     /dev stage="embryonic"
     gene
                     249..3311
                     /gene="p150-Spir"
                     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="MTEHQAEEQADTPPTKVKATPTPTPSGKFKDAKEDAFLSTSPDS
ANGDAQHKLPADQLAMSSSAHPQQAGQARPLILQAFHRCSSPEQCVTLHDILDSFKAP
LSEDQAWALIHQFAGLYHQVAVQAHTCAADYEAALPTGFELHFHRDGSVHFSGPDQLT
PKEOLOOEOIPLPPOHDVIVDOPDHSASSSGDSSVINRAFDNSNHHHHHOHHHPPLVV
SHRKIISELAEIVYTALDYNLPEDEECQVSQELENLFNFMTADETDDDCIDEGIDEGD
KRWDDESEEERNDTKELEHIIETCRNHIKTTLPENHYRAVCRALVTETIELRVFLQQV
LNNEAGAEKLIKASESSATTQQELAKLGFNDWARFWVQVIDELRRGVRLKKSNHERTP
IEYELTPYEILMGDIRAKKYQLRKVMVNGDIPPRVKKDAHAMILEFIRSRPPLKKASD
RQLGPPRMCEPSPREQLMESIRKGKELKQITPPEAPTLRERVLPSANSTLSRSRQRLI
```

KVDFSKFQDDDLFYDENSISSSHSTAATHQHHPHFAEMHRCSQPKMPPYPFGGYMVPS QARQDCRETASLMRPRRTMEPAKQVPPPEEPSFTKDEYHKFYDTALESYDLATQCESR RASLRHTIVGCQSNLDETHSMPPTRPESRQSDDVSKETPKRSPAEQTHPSDEGSSTS SLGPWNKSFMDKQTWMERGDDRLSVTLAEIVHIRSVMTKAELEGLPMDVRVKEDVEKR RVCFLCLRTRFSFFGPWGIQCKLCQRTVCAKCYTKMRIPSEHFRNVPLVLISPSLLSS PASSSTPSPSHHAQQAHSSSTGNIMDDQFPKSLIERLLRSESDRKTRSTVGSAPSSPK HQRSNMSTPGISVGPGASSSSAAATGQAVEALHDQATMSSSYSAAMRPSGVHQQQKQH YNNAMSRSMEGPRSLPVHSPAYRPLSNNSTLERKSRFSRGFNLFSSGSHLAQTQEQKE NLRGEQVTVCNDCQGLVNEITSSVKQKRSSARNRTIQNLTLDLTPVWK"

BASE COUNT 1204 a 1298 c 1105 g 918 t

<pre>1 ggaatcogaa ttocatcoc tcytytyty ttattatty attaaqtt ctttgcaat 61 ttaccacaca (aacacacaa) aacacaaca (aacaaaca) aacaaaca (acacaaaca) 121 caaacagga atttyggg ttagcacac cagagggg acaagggc cacacagcca 241 cacacatat gacggacac caggccagg accacgaga cacacgcca 361 tytccacat gecggacac (ccacggag accacgcaca) accaagtca 361 tytccacat gecggacac (ccacggag accacgcac) accaagtca 421 tagccatt egceggaca (ccacggag accacgcac) atcatcgg 421 tagccatt egceggaca (ctaggagcac) gaccacga (ccaccggat 421 tagccatt) eggegtet (ctaggagcac) gaccacga (ccacggat 421 tagtcatgg) eggette (gagaccag ctyggcc) gattagag (ccaccggat 541 ctttaage gccgttc) togcacgaca (ctyggcc) gattagag (ccaccggat 721 actgaggc) tagaggaca (ccacaccac accatcaca) totaccag 841 gacgtteg (cacacgaat) (cacacgcac) gacacacg) gacacaga 841 gacgtteg (cacacgaat) (cacaccgac) (cacaccgat) ttoaatata 961 atctgccgg ggacagga (gccatgg) gagaatt) ttoaattta 1021 tyacggaa ggacagg gaggatga (ccaggac) (cacacgac) ttggataa 961 atctgccgg ggacagga (gagaatgc) (cacacgac) (ccacacgat) 124 gacggacg (gaacacg gacgatgc) (cacacgac) (ccacacatat 125 agcaggag (gaacagg) gacaggg) (ccaggaat) (ccacacgat) (ccacacatat) 126 agcagtg) gagaatat (gacggaca (ggacatac) (gccacaca) (ccacaatag 126 agcagtg) gagaatag (gaggacac) (ccacacgat) (ccacacagat) 126 agcaggg (gagaac) (ccaggaca (gacacac) (ccacacaa) 126 agcaggg) ggacacag (gacaggac) (ccacacgat) (ccacacaa) 127 tggcagac) gagataca (gacggacac) (ccacataga) (ccacacgat) 128 tggcagac) (gagaacc) (ccaggaca (gacacac) (ccacataga) (ccacacgac) 129 tggcagg) gagataca (gacggacac) (ccacataga) (ccacacgac) 120 tggcagga (gggctcaa (gacggacac) (ccacataga) (ccacacgac) 120 tggcagga (gggctcaa (gacggacac) (ccacataga) (ccacacgac) 120 tggcaggac) (ccacaggac) (ccacacggac) (ccacataga) (ccacacaca) 120 tggcaggac) (ccacaggac) (ccacacgac) (ccacataga) (ccacacaca) 120 tggcaggac) (ccacaggac) (ccacacacac) (ccacacada) (ccacacaaca) 120 tggcaggac) (ccacaggac) (ccacacacac) (cca</pre>	ORIGIN						
61 ttaccacac cacacaga aacaacac acacaacta aacaaacta aacaaatc qaccaaata 121 caacacaata gacgaqaa tuggaquaca cagacaga attatagt 181 ggccagtgc gggttigcag tiggaatcgg tigaagca tagatagca cacacagcca 241 cacacataa gacgaqaca cacaggcaga agtcagaga agtcagag agacgadga gacgacgaga 241 cacacataat gacgagaca cacaggcaga agtcagag agtcagag agacgadga gacgacgaga 241 tagccagtc cacaccaca cagggcaga agtcagag agtcagag agacgatta 241 tagccagta cacacaca cagggcaga agtcagag agtcagag agtcagag agacgatta 241 tagccagta cacacag cacacgag cacacagg agacgat cacacaga caggag agacgad agtcaga agtcagag gacgacgag 241 tagccagta cacacgacg cacacgaca caggag agacgad gacgacag cacacgaca atcagaga gacgacaga 241 cacacaga taggatga cacacaga agtggcaca cacacaga gacgagag 241 cacacag gggtgca cacacgag aggacag gacgacg gacaaga 241 actacacag gggtgca cacacgaga aggacag gacgacg gacaaga 241 actacacg gggtgca cacacgag acggacag gacgacag cacacgacg gacagag 241 tagtagag taggagga cacacagaca catgacag gacgacac cacacaa tatcacacg cacacgacg 781 tgattgag tagacgag gacgacgag tagcagag aggacag cacataga gacgatag 1021 tagacgaag tagacaga gacgatg cacagag gacgacag gacgacag 1021 tagacgaag tagacaga gacgatga tagacaga gacgatag tacacaga gagacagg gagacag gacaacg 1021 gacgacag tagacaga gacgacga cacacaga agaacaga gagacag tagacaga gagacag tagacaga gagacag tagacaga gagacag gacaacag 1221 tagacgag taggagac atagagca gatataca gacaatag gacacaag 1221 tagagagt gagataga gaagacac agagacaa cacaagaga tagacagg gagataca gacaatag gacacaca cacaagata agacatag gagatata gacgatag cacacaga gacacaga cacaagag 1221 tagagagt gagatag cacagaga gaagacac agagaga gacacaag dagagagt gagagata atagag gacaca cagagag agagagag cacaagaga gagagaca gagagaga	1	ggaatccgaa	ttccatcccc	tcgtgttgtg	ttattattgt	attaaagttt	cctttgccat
121 caacegega attitgegg tgaategg tgaagegg aaaaaata attatatgt 141 ggecagtge gggtggg tgagggga agggggg acacgege acceqce accaggta 241 caccataat gaeggagea caggeggg agggggg caggeggea agcegece accaaggtea 301 aggecaege caacecaec cegagtgga agtecaaga eggeaggga gagetgte 421 tgeceatgte ecceatgeg ecceacae aggegggea agcegaega agcegeceg etatectga 421 agcettee cegeggaegae agcegecae agceggee agcegaegae agcegee eteggee 601 tetaceacea ggtggeegt cadgecaga eteggeeg gaetaegag gegeedge 601 tetaceaca ggtggeegt cadgecaega ectggeeg gaetaegag gegeedge 601 tetaceaca ggtggeegt eacecteg aggaegaeg ecadetee ggeeeg etateacae 121 agetgaegae tagagaea tgeageega agcagatee ecatetee ggeeegge 601 tetaceacaa ggtggeega eacecaege accateaea ecateaeae ecateaeae tetaceege eggeeegg agagaega tgaagae tagagaega gagateg tetacaeege eggeeegge gaesgagg gaegaggg ggeegaegg agaatge tacaacae tetaceege eggetgtae agetgteg aaaetata aaeecaee tgeetgaeg gggaateg tetaaeatg 121 agetggaege eggaeteg gaggatee aggeetee ggeeeaea tgaegaegg gggaadg eggeegg eggeee eggatetee ggeeaeae tgeetgaeg gggaatge eagateg ggaaaeatg etaaeaege easaeaaea 1221 tggegaege eggaeteg gagaetee ggeeeaeaa aceataea geeggee eggateea eggatee eggeeee tgaeaaeat geeggeee eggateee eggeee eggeeee eggeeeee eggeeeee eggeeeee eggeeeeee	61	ttaccacaca	caacacagaa	aaacaacaac	aacaaaacta	aaccaaaatc	gaaccaaaaa
181 ggcagtge: gggttfgeg tggattegg ttgaategg ttgaatege tegatagee acaegeea 241 cacacata gaeggagea caggeegga aggeegga aggeegee acaegeea 361 tgtecaete geeggateg eccaegge atgeecae caggeeg aggeette 361 tgtecaete cecagtge cateceae aggeeggee ageeegge cageegge acceese 481 ageettee eccagtege cateceae aggeeggee ageeegge eccaetette 541 ectttaage geegettee tegeeaga ectgtgeee gatecaees tegeegge 661 tetaeeae aggtgeegt ecaetege aggeeaget ecaetette ggeegget 661 ecaeeggat eggetgeae tteeatege aggeeaget ecaetette ggeegget 781 tgattgtgg teagetgeae teeatege aggeeaget ecaetette ggeegget 901 tetegeag aggeegae ecgeagg ggeatege ggeatege ggeateae 901 tetegeag aggeegae ecaegege ggeatege ggeateae 901 tetegeag aggeegae ecaegege ggeatege ggeateae 901 tetegeag aggeegae aggeageg ggaatege teaeteee ggeegge 901 tetegeag aggeegae aggeageg ggaatege teaeteee ggeegge 901 tetegeag aggeegae aggeageg aggaateg teaeaege ggeateae 901 tetegeag agaeagag aggegede atgaegeg ggaatege ttgaeag 901 tetegeag agaeagag aggeaged aggaege acaetaag ectgtege 901 tetegeag agaeagat aggeaged atgaeage ggaatet teaeaege etgaeag 902 gegeetga gaateag aggagee atgaegee gagaatet geagaateg 903 getgeag agaeaga aggeage aggaeae agaeaea agaeatag ectataag 904 gedgeed aataead aaaecee gegtatee ggeaatet ggeeacaag ecaeaag 904 gegeetg aggaacet atgagee ggaatete ggeeacaag ecaeaag 905 gegeegee etgaeaetg ggeacate gaegeecae teeatega attegge 906 teaeagg agattee gedgeaet ggagaeae teaeggee etceaeaa agaeage 907 gegeegee teteegg ggaeaeta tgageece teaeggaag geegeege 908 teaeagg ggeegee eaggeece teaggeaag geegeege 909 teaeagg gaattee gegeegee teaggaag geegee 900 teaeagg geegeeta tegageece teaeggaag geegeege 900 teaeagg geegeeta tegageece teaeggaag geegeege 900 teategge etgaegae aggeegee teaggaag geegee 900 teategge ecgeaeaa atgageee teaggaag geegee 900 teategge gaageee taaggaee teaggeeg geegeege 900 teategge gagaeee taaggaeee geegeege eaggeege aggeegee 900 teategge gagaeee aggaeeee eaggeegee eaggeegee 900 teategge gageaeee aggaeeee eaggeege gaeegeee teaggeege 900 teategge gaeeeee aggaeeeee ecaeeeee ecae	121	caaaccgcga	attttgcagg	ttagcccacc	cgaaagaggc	aaaaaatca	attatatgtt
241 cacactaat gacggagcac caggccgagg agcaggcgga cacgcgcaga gacactacc 301 aggccacgcc cacacccacc ccggatgga agtccaaga caggcgacga gacgcctacc 361 tgtcccatc gccggacag gccacacgcg atgcccaca caagctgca gcgcacaga 421 tggccatgtc ctccatgcg catcccaga agtcgctac gctcacaga ctcggacg 421 tgccatgtc ctccatgcg catcccaga agtcgctac gctcacaga ttcgccgg 601 tctaccaca ggtggcgta cacgccaga catggcgcg gactacagg gccgcctgc 611 catccgat cgacgtcac ttcatcgg aggcagagt ccctgcccg ggactacgg gcccctga 721 agtggacgc taaggacaa tgcagcaga catgacagg gcacagge gccacagacg 901 tctocacag gaggatac agcgacad cacatcaca tcatcaccg ccgctgtag 901 tctogcatag aaggtata cacacacca cacatcaca tcatcaccg ccgctgga 121 gacggagga tgacagga gacgatca ttcacagg ggaaatcg ttcacacgg ggacaagg 121 gacggagga gagatgag tgccaagtg cgaaatcg tcacacagg ggacaagg 911 tctogcatag aagatata agcgactg ggatacca gacataga gcgtacag 911 tatgcgga gaaggag tgccaagtg cgatacca gacatagg gcgacaag 121 gagcgcga cgatccag gaggacg agcatacca gacacagg ggacaagg 1241 agactgcg gaatcacta aaaaccacc tgcctggaa cacatatg 921 gtcggaagg ggaggaga agcgataca ggagatact gccacaaga gcgacagg 1261 agcaggga ggaggaga agatgaca agagtatc ggccacag caaggacg 1261 agcaggga ggaggaga agagaga gccacaga gaggatact ggccacag caaggacg 1261 agcaggag ggaggaga agagaga gccacaga gacgatag cgagaagg 1261 agcaggag ggaggaga agagaac agagatac gacgacag gagaatg 1261 tggcgaact ggcgtcaa gacgaca gacgacag cacacgaa tatggctga 1361 tggcgaagc tggcggagaa agagaca cggacaag gccacaga gacggacg	181	ggccagtgcc	gggtttgcag	tggaatcggg	ttgaaagcca	tcgatagcca	cacacgccca
301 agoccaçoc caaccace cogatgaga agtteaaga cogaagaga gacgettee 361 tgtecaate geogacage gecaacgge atgecaaca caactace agocgace detetage 481 aageettea cogetgete tegecagaa agtgegtea getgeacga ateetagga 601 tetacacea ggtggeegta caagegeaa eetggeeeg gaetacaag geogeeeg 601 tetacacea ggtggeegta caagegeaa eetggeeeg gaetacgag geogeetge 601 tetacacea ggtggeegta caagegeaa eetggeeeg gaetacgag geogeetge 601 tetacacea ggtggeegta caagegeag ageagatee eetecoe gaecagaeg 781 tgattgtgga teageegga ecaagegea geogacageg gaetacgag geotacaca 841 gaegettea caagegaa ecaagegea geogacageg caacageeg geotacaca 901 tetogeatg aaagattate agegaatgg egaateeg gaetacgag geotacata 901 tetogeatg agaagatg geogaategg ecacatacaa tactacee tggattaca 901 tetogeatg agaagag ggagageg acaatacea agaactaga cataate 901 tetogeatg agaacaga gaggatgea tgaagagg ggagaateg tetacaceg 1081 getggaega egaategg gagagegea acgatacea agaactaga ceataata 902 tgaegeag tgagaagac atagagete gagattee tgaegagg caacaaga caataate 1092 gaeceteg gagatega gagageea acgateea agaactag ceataaca 1201 gaegeeag agagatae gaeggee gatatee geeacae caacagaac 1201 gaegeeag agagtegea gatgaeea acgaegeae tecaacag caacaagaac 1321 tggegaagt geggetgaa gaageacae agaegeae tecaateg geeacae 1321 tggegaagt geggetgaa agageacae geetgeeaa ateeagtg eecegee 1361 ageaggee tetecegg gagaageeae agaageae acgaegeeg ecaategg eecegee 1361 ageagatee ceegeaaga geeegaee tegggaag ggteeecaa 1621 tggegage tetecegeg gaeageee teggagag ggteeecaa 1621 tggegage tetecegeg gaeageee teggagag geegeeg 1631 ageatee ceegeeaga acaectag eacgaeee eccaagag geeegeet 1641 ageateee caectereg aagaeecaa geageegae eccaacag teceaagag geegeege 1641 ageateee ceegeeagaa geaegaee teggagag geegeege 1651 teateaggte acatggte ceageaga cacaecag eecaagag geegeege 1651 teateaggte caatagge geaegeet teggagag geegeege 1651 teateagge ecgeeeaa agageeegee teggagaa gegeegee 1651 ageateag gagageee taggaegee teggagaa geegeegee eccaacage eccaagage geegeege 1651 ageateag gagageee agaagaee ecaageege eccaacae eecaageee 1651 ageateag gagaeeee agagaeeegee eccaageee eccaageee ecca	241	cacacataat	gacggagcac	caggccgagg	agcaggcgga	cacgccgccc	accaaggtca
 361 tojecacate georgacage georaacge gingecaaca chaqetegea georgaceg etelestering 421 tojgecatgte etecatigeg cateceaga agtoggedea georgaceg etelestering 421 tojgecatgte etecatige georgate agtogedea georgaceg etering 421 tojgecatgte etecatigeg georgate agtogedea georgaceag georgaceag georgaceag georgateete gatecacag tetegeorga 421 tojatetigeg etecatigegea etecatigeg georgateete etegeorga georgaceage georgaceage georgateete etegeorga gatecaceag tetegeorga 421 tojatetigega teageorgae etecaceae accateaca teateaceet georgacego 421 tojatetigega teageorgae etecaceae accateaca teateacege egorgacego 421 tojatetigega teageorgae etecaceae accateaca teateacege egorgag 421 tojatetigega gaeorgaga gaegatega etecaceae accateaca teateacego egotetige 421 tojatetigega gaeorgaga gaegatega etecacagage 422 tojatetigega gaeorgaga gaegatega etecacaga agaatega georgacage 423 tojatetigega gaatedea gaegategea equateea agaatega georgacage 424 tojatetiga gaacaga gaegatega egotetiggi georgada egotetiga 425 tojatetiga gaacaga gaegategea egotetiggi georgaga georgacage 426 tojacaegg gageorga egotetig georgada egotetiggi georgada egotetiga 427 tojatetiga gaacaga gaegategea georgade etecatega georgade egotesiag georgade egotesiag georgade egotesiag georgade egotesiag georgade etecatega 421 tojacogaga tojaceaga gaegacace agageorga eccaceaga egotesiag georgade egotesiag georgade egotesiag georgade eccacega egotesiag georgade egotesiag georgade egotesiag georgade eccacega egotesiag georgade eccaceaga egotesiag georgade eccacega egotesiag georgade egotesiag egotesiag georgade eccacega egotesiag georgade eccacega egotesiag egotesiag egotesiag egotesiag georgade eccaceaga egotesiag eccacega egotesiag egote	301	aggccacgcc	cacacccacc	ccgagtggaa	agttcaagga	cgcgaaggaa	gacgccttcc
 421 tgccatgte etteragtgeg eateceage aggegese agetgeorg etteretie 421 tgccatgte etteragtgeg egettere gagaceag ettgggeet gatecaecag ttegeorgge 601 tetaceaca gytggeette gagaceag eetggeget gatecaecag teegeorg 601 tetaceaca gytggeette caagegea ettgggeet gatecaecag georgggge 601 tetaceaca gytggeette caagegea ettgggeet gatecaecag georgggge 721 agetgaege taagegga eetgeage georgg egacagaeg georaceaea 841 gaogtteg cacacgaa ecaceace ecaceaeaa tetatecege ggeacageg georgaeage 901 tetogeatag aaagattate agegaatgt ecaaggage georaceaea 901 tetogeaga tgagacage georgatge excagaget ettgataea 901 tetogeaga tgagacage gagatgee acgateea agaateag ecaceaege ettgataea 901 getgggaeg gagacagag ggeorgae acgateea agaateag ecaceaege ettgataea 901 georggaeg gagacaga gagaggee acgateea agaateag ecaceaeg ecacagae 1021 gageeetgt gaeggagae atagagete gagattet georgaeage ettgataea 1031 gageetegt gaeggagae atagagee eagageeae ecaceaeaa agaataeg 1261 ageogaggt georgaaatea aaaceaee tgcetsgaa ecacea agaateag 1381 gaeggagat georgatgaa agageaeae agageeaa teceategaa tatggetga 1381 gaeggagat geogetgaa agageaeae agageeae teceategaa tatggetga 1381 gaeggagat eagegee ttagggeeae tecaggaag gergeeaaa 1381 gaeggaeae ecaceae agaegeae tecaagge ecacagaeg 1381 gaeggaeae ecaceae ecaceae gagedeea tecaagag georgeeaaa 1381 gaegatee ecceeag gaateeg egaceaae gageeeae tecaagag gagagega 1381 gaegatee ecceeaga gaegeeae egageeae tecaagag georgeeaaa 1381 gaegatee ecceeaga gaegeeeae egageeae tecaagag gagagega 1381 gaegatee ecceeaga gaegeeae egageeae decaaag georgeeaaaa 1381 gaegateae ecceeaga gaegeeae egageeae decaaag georgeeaaaa 1381 gaegateae ecceeaga gaegeeae egageeae decaaage ggaacaeae 1381 gaegateae ecceeaga gaegeeae egageeaeaga georgeeaeaaaa gaactagaaeaeaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	361	tgtccacatc	gccggacagc	gccaacggcg	atgcccaaca	caagctgcca	qcqqaccaqc
 481 aagoetteea egetgete tegeegaal agtgegtea getgegeet getegegeet 601 tetaceaca getgeeget caagegeae eteggeet gateacaga tegeegge 602 tetaceaca getgeeget caagegeae eteggeeget caateeq gedegaget 721 agetgeete taaggagea etgeageag geageaget ceattee gedegage 721 agetgeete taaggagea etgeageag geageaget ceattee gedegage 721 agetgeete taaggagea etgeageag geageaget ceattee gedegage 721 agetgeete taaggagea etgeageag geageaget teaceace 721 agetgeete tagatate agegadeete gegaateet teaceace 721 tgattgega gaegagag tgeeagetg egaategt teaceage 721 tgatgegee gaateget gegaategt teaceage 721 tgatgegee gaateget gegaategt teaceage 721 tgatgege egaateget gegaategt teaceage 721 tgatgege egaategat gaegagege agegeete gegaateget ecaetaae 721 tgaeggeag tgaegagag tgeeagtgee agetteega agaetagegege ecaetaae 721 tgaeggege egaategat aageeteg gegaatege tecaetage getgetge 721 agegaget gegetaaa aageeteg gagtattee gegaateet tecaetage 721 tgaeggaget gegetaaa gaegagee atgageete gedaateet gedeaceag agetgege 721 agegeaget gegetgaaa aageetee gateetagge ceagaatege agetgegee tecaetage 721 tggegaget gegetgaaa gageaca agegegee tecaetage atatgegetge 731 tggegaget teteegg gageagete tegeetaa agaategege gedagegeg agegeeta 731 tggteaaeg aattee gegegeeta agaaagage ceaetageg 732 tggegaget teteegg gageagete tggageeta aggaaggeg agggegeaae 733 tggteaaeg agattee eegeegee ecaegeate gedeetaa aggagggg agggeeta 734 teaettee agggeegee ecaegee eceee tegegaaggegee ecaetage gedeetee aggaatee 733 tggteaeg agattee ecgeegee ecaegeeta aggaaggegee ecaetage ecceeeageeta 734 teaettee ecgeegeee ecaegeeta aggaegee ecceeeageeta aggaggegee 735 teaetagee ecceeage aggeegee ecceeeageeta aggaegeee ecceeagegeeta aggaegeee 734 tegeggeee teeegee gaegeeee gegeetee ecceeageeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee	421	tggccatgtc	ctccagtgcg	catccccage	aqqcqqqcca	agcccgcccg	ctcatcctgc
 541 cettaagge geögetete gağgacagg eetgigeet gatacacag tegeogge 601 tetacaca gitgigeet caaggacag eetgigeet gatacacag geogeetgi 721 agetgacge taaggacaa etgeageag ageagatee exactede ageagag 781 tgattgitgi teageegga exacageaa eacateaaa teateacee tegeoggi 781 tgattgitgi caaceagaat eacacacea eacateaaa teateacee tegeoggi 901 tetegetag aagattate agegaatgi egaategi etgacaggi gigegeetgi 901 tetegetag agaegggi gigeaatgi etgacaggi gigegeetgi etgacaggi gigegeaaggi gigegeetgi etgacaggi gigegeaggi gigegeaaggi egaategi etgacaggi gigegeaga egagatgi etgacaggi gigegeagagi etgacagagi etgacagagi etgacagagi etgacaggi etgacagagi etgacaggi gigegeaage 1021 tgacggaag egatecgi gaggagee atgageeg accatatag ecatateg agaategi etgacagi etgacaggi eggeacaagi eggatatea agaactagi eacaaatgi eggateat gigegetgi eggateat gigedeaag ecatategi gagategi eggateae eacataga eacaacagi eggaategi eggatagi eggeatagi eggateae egaceaca egageee tegaaaggi eggatgi gigegetgi gigegetgi agagageee etcestiggi gaggatgi eggaggi gegetgi eggeetgi eggateae eggaetee etcestaga atatgagetgi eggaggi ecacagai ecacaga gitetgi egaggite eacgaategi ecacgaagi ecacaati aaacacee tegeagaagi ecacaati eacacaeaga eacgaetei ecacagaa tategagetgi eacgaategi ecaceaga atategi ecgeegea agaaagig ecacacaga etcestiggi ecacagaa etcestiggi ecaceaga eggeetei eggaaategi ecacagaa etcestiggi ecaceaga agagaetea ecagaeaeti ecacagaa atategi ecaceaga agagaetea eacgaeaeti ecacagaa diateagi egeeteea agagaatee ecceegga agaagaete ecageacaa tecateaga eggeetee ecageaeaa teacaeage ecceedaa ecceeggi eggeeteag ecacaagi ecceagae geedeaaeti eacgaeagi ecceagaeaeti etgacaaeti eacaaetee ecceeggi eggeetea agagaetee ecageaeaa teaceage ecceagae ecceedaa ecceedaa ateegaeagi ecceagee ecceagee ecceaga eaca ecgeedaaeti ecacagaeaeti etgacaeaeti ecaaetee ecceaga eggeetee ecceagaeaea teacaeae ecceedaa ecceedaa ecceedaa ecceedaa eggeetee ecceagaeaea teacaeaee ecceagaeaea teacaeaee ecceagaeaea teacaeaee teagaeee ecceage ecaeedaa ecceedaaee ecceage ecacaeeae ecaeeaea	481	aagcetteea	ccgctgctcc	tcgccagaac	agtgcgtcac	gctgcacgac	atcctggact
 601 tetaccacca ggtggeegta caagegeada eetgeegeg ggaetaegag geegeegtge 601 tetaccaccagatt egagetaga tetaceega aeggeagete eeteteege 721 agetgaegee taagggeaa etgeageag geegaetee eeteteege 721 agetgaege eaacageaat eaceaceace accateaca tetaceege egageageg 901 tetegeatag aaagattate agegaaetgg egagaateg etacaceege etggattaea 901 tetegeatag aaagattate agegaaetgg egagaateg etacaceege etggattaea 901 tetegeatag aaagattate agegaaetgg egagaateg etacaceege etggattaea 901 getgggaega egaategga gaegageeg acgatecea agaaeteaga ecaetaaag ecaetataag 901 getgggaega egaategag gaegageegea aegatecea agaaeteag ecaetatega 901 getgggaega egaatega gaegageegea aegatecea agaaeteag ecaetateg 901 gaecetegt gaeggaaeatg ateaageete ggattetee ggeegaete 902 ageetegg gggetteaa gaegaee etggeegee etceetaggt egagaaetg 903 gaeggegga egagaaetg eegagaaete egageaetee egageaeteg egageaeteg egageaeteg egageaeteg egageaagg eggeegee etceetaggg ecaeaggeg acaeaggege 903 gaeggegge egagaaetg eegegeete agageaete egageegeete teteegg ageegeete ecaetagag ecceetagg 904 tetaceega agatateeg egegeetea agagaegee ecaeaggege ecceetagg 905 tetaceega agatateeg egegeetea agagaagtee ecaetagge agegeetee 906 tetaceega agatateege egegeetea agagaagtee ecaetagge agegeetee 901 tetaceagte aeggeegee ecaeagaee ecaeagaee ecaeagaee 903 tetaceaga agatateeg egegeetea ecaeagaeege ecaeagaeege ecaeagaeege 904 tetaceaga acaeceegeeg ageagaeee ecaeagaeege ecaeagaeege ecaeagaeege ecaeagaeege 905 tetacaeag agaeageee ecaeagaeege ecaeagaeege ecaeagaeegeege 904 tetaceada agaegeaee ecaeagaeegee ecaeagaeegee ecaeagaeegee ecaeagaeegeegeegeegeegeegeegeegeegeegeegee	541	cctttaaggc	gccgctctcc	gaggaccagg	cctgggccct	gatccaccag	ttcgccgggc
 661 ccaccggatt cgagctgac ttcatcgg acggarget cacttere ggeorggat 721 agetgacgee taaggagea etgeageagg ageagatee 721 tgattgtga teageegga eacggarge geagaegge gegaateet teagaegga gaegaggag tgeagaegg gaggaegge accatgaca agaatett teagaegg gaggaegga gaggaegge acgateegg gagaategt teaataga getgetega 1021 tgacggaga tgagaega gaggaegga gegatega acgataega agaataega gaetaateg 1021 tgacggaga tgagaega gaggaegga acgataeca agaaceag ggegaeage 1021 tgacggaga tgagaega gagaegga gegatega acgataeca agaaceag gegaeagg 1021 tgacggaga gggatega gagaggeg acgateegg gggaateg eggaaateg 1201 gacgeteg ggagaateg ataagget eggateae ggeaeagge etagaagg 1201 gacggaggt geggtaae gatgggee gettetggt geaggagt gacgaateg 1201 gacggaggt geggtaae gatggge gettetggt geagagte gacgaagg 1201 gacgegga gagategg gagaaceg atagagee gettetggt geaggagt gacgaagg 1201 gacgeggg gagateg ggegetaa gaggaece atggagee teggaaateg geegeaaateg 1201 tagteaagg agattee ggegaaace gaggaace acgagegea tegaaggg gaggagga geegeaaag gacgaea agaagagge ccaecacag acaagage 1201 tagteaagg agattee ggegeaae gggeacaa ggacgaag ccaecaea gagaegga 1201 tagteaaeg acateteg ggagaace tggagaeae ccaecaga aggegaea 1201 tagteaaeg acgeegee tteagagag ccaecaea ccaecaga aggeetaa aggaaggee caecaeag gaggaeea 121 tagteggaee tteeeggg gacgaeea cgagaegge ccaecaeag ateggagge 121 tagteggaee ccaecaga acgaegeea teaaggege ceacaeag gaegeege 121 tagteggaee ceacagga acgaegeea ccaecagga aggeegee 121 tagteggaeea ceacaggaa caecgaee ceacaggaag gegeedea 1221 tagteggeeea acgeegeea teaaggeea aggeegeea teaggaeggeeee ceacaegeegee 1221 tagteggaeea ceacaggae aggeegeea aggaeeea aggaeeea aggaeeeea acgaeeeeaeaeaeaeaeaeaeaeaeaeaeaeaeaeaeae	601	tctaccacca	ggtggccgta	caaqcqcaca	cctgtgccgc	ggactacgag	gccgccctgc
721 agetgåegee taaggagea etgeageag ageagatee etteecee etgeageage etteeleenee 1841 tgategttega etaecageat etaecaecae ecaetaeaa teateaece etgeageag 901 tetegeatag aagattate agegaateg egaaategt etaeaege etgeate 901 tetegeatag agagatgag tgeeaagtg egaaategt etaeaege ttgattaea 901 atetgeegg tgagaagag tgeeaagtg egaaategt etaeaege ttgattaea 901 atetgeegg tgagaagag tgeeaagtg egaaategt etaeaege ttgattaea 901 atetgeegg tgagaagag gaegagtee etgagage ggagatete ttgattaea 901 atetgeegg gagaagag gaegagtee etgagagg etgeeaagtg etgegag gegaaateg 1021 tgaegeage egaaaeag aaaeaeee ttgaegagg eateatea gegeatete 1021 ageeeteg gaegagaee ataageete gaetattet geeaeaeg eetgaaeteg 1201 ageegeteg ggegeagaae gaetaegag etteegg geagete etgaeaetg 1201 ageegage egagaaetg ateaageete ggatattet geeaeaeg eetgaeaetg 1201 ageegage egagaaetg ateaageete egaeaea agaagate eccaeegaa tateagetg 1301 gaegaggag eggeteaa aagageaee agaagage eccaeegeae teeeaaagae 1321 tggegaage tgegeegaa aagageaee agaagage eccaeegeae teeeaaagae 1501 tgeteaeg gaattee egeegeaa agaagate eccaeegaa gaegage 1501 tgeteaeg agateeg etgagagag eccaeegage eccaeegag agagetea 1621 tgtegagee tteteegg gaeaegeet teagagag gtgetee agageg 1621 tgtegagee tteteegag aaeagateg eccaeegag geegeeta 1621 tgtegagee teeteegg gaeaegeae teagagag ettee agageg 1601 agatetet etaegatga acaeegaee etteegag aggegetee 1621 tgtegagee eccaega ageegeeta teagageg ecceeagag geegeeta 1621 tgtegagee eccaega ageegeeta teagageg ecceeagag geegeeta 1621 tgtegagee eccaega ageegeeta teagaagg geeteeta 1621 tgtegagee eccaega agaegage ecceeaga geegeetee 1621 agetegte eegaeegag aggegeeta teagaeegg ecceeageg geegeeta 1621 tgtegagege ecgaeagag eccee ecaegeg geeteegg 1621 agetegte eagategag egaegeeta teagaeegg ecceeageg ecceeageg 1621 agetegeg egaeegate eccaegee geeteege eccaegeg ecceeageg 2621 agetegg egaeegate egageege eccaegege ectgaeae ecaegeg 2621 agetegeag egaeegee taggeeege eccaegeg eccaeageg 2721 aegeggaa deegeet gaegaeege tegegeeag eccaegeg gaeegeteg 2721 aegeggaa eccaegee gaegeeege eccaegee geeteege 2721 aegeggaa ecceageeg eccae	661	ccaccggatt	cgagctgcac	ttccatcgcg	acggcagcgt	ccacttctcc	ggcccggatc
781 tgatgtgga tcagcoggac cacagogca goagagcg cgacagcag gtatcaaca 841 gacgttega cacagogat caccacca acataaca tatcacceg ccgtedteg 901 tctcgcaga ggacgaggag tgccaagtg cgacagtg tatcaaca 961 atctgcega ggacgagga tgccaagtg cgacagtg cgacagte ttacacceg 1081 gctggacga cgatcega ggaggagca acgataccaa agactagag cactaateg 1141 agacetgea gaataccata aaaccace tgcctgaga cactatag getgtetgea 1201 gacgetegt ggaggagac atagagete ggatattet ggacgagge cgacagag 1201 gacgetgg ggagaactg atcaagget cgacatate ggccaccaa agactagag cactaateg 1201 gacgetgg ggggaga ggacgag ggacgac acgatatec ggccaccag cacaagaac 1201 gacgetgg gggetcaa gacgataca dagagete ggacgate ggcgacage 1381 gacggggag gggetgag aggacgac acgatagea cacacagaa gtataggtg 1301 tggcaagg gggetgag aggacgac aggacgac cacagcag atatgggg 1301 tggtcaacg agatatecg ccgcgegta agaagaga cacacgagag gacgagtg 1501 tggtcaacg agatatecg ccgcgegta agaagag ccacgcatg atettgggt 1501 tggtcaacg agatatecg ccgcgegta tgagaggag cagagggag aggaggta 1621 tgtgcgage ttccggg ggcacace tcagggaag ggggaggag agggggag acggeggaca 1681 ageagatee ccegecaga gacageace tcagggaag ggtgettee agtgaaat 1681 ageagatee ccegecaga gacageace tcagggaag ggggagag agggegta 1681 ageagatee ccegecaga gacageace tcagggaag ggcggaga cgcggedace 1681 ageateate acattege gagagcac getgetega geccacag geccacae 1861 ageateate acattege gagageca cacagagag geccacae teagagagg ccaggeggg 2011 ccatcagtg cgacgaca cacagggt cacagcaga tgccgegga acggegtege 2021 catteggag ggagggag agggettee tggecgea gaccacae tggacgag 2021 ccatcagtg cgagageg ggggetg cacaggag acgagedeg 2021 tcatgacaa ggagagge gaggeteg caaggagge gaccatee taggacgg 2021 tcatgacaa ggagagee aaggagge cacagteg ggacgate aggaggeg 2021 tcatgacaa ggeggage ggaggete caaggegg gacgate tggacgaa 2031 tcatgacaa ggeggage cacagee cocacege ggaggeg gagggetg 2031 tcatgacaa ggaggegeg ggaggeteg caaggage gacgatee aggaggeg 2031 tcatgacaa ggaggegg ggaggeeg cacagee tcaggagg gagggegg gaggetgg gaggegg gaggegg gaggegg gaggetge caaggaggg gagggegg gaggegg gagggegg gaggegg gagggegg gagggegg gaggggg gaggegg gagggegg gagggegg gagggegg gagggegg gacg	721	agctgacgcc	taaqqaqcaa	ctgcagcagg	agcagatccc	cctcccccq	cagcacgacg
 841 gagcgttega caacageaat caccacecac accateaaa teateaceg cegetegteg 901 tetegeatag aaagattat agegaateg eggaaategt etaacacege tiggattaa 901 tetegeatag agaggagag tgecaatgg eagaategt etaacacege tiggataateg 1021 tgaeggeaga tgagaeaga gaegatega tigaeagaeg gaegatega acgataceaa agaaetagg cacatateg 1141 agacetgega gaaggagaga taeagaece acgatacea agaaetaga ceataateg 1201 gageeteg gaegaagag taeagaeega atagagete gagattet geegeaga ceataateg 1201 gageeteg gaegagaega taeagagete gagattet geegeaga ceataateg 1201 gageeteg gagetega ataeageega eggattee gaegattee gaegattee gaegattee gaegattee gaegattee gaegattee gaegateg 1201 gageeteg ggeetegaa ataeageege eggatatee geegeaga eteetegag agegateg 1301 tggteaaegg aggattee eggeegea acgaegaee acgaegeag teecagaga gaegaege 1301 tggteaaegg agaattee eeggeegea agaecageae agaegagge ecageegag 1501 tggteaaegg agaattee eeggeegea etaaggaege ecageegga gaegaee teecaegga gaegaege ecageaga gaegagee ecageaga gaegaege ecageaga gaegaegee teeggaga agagaege ecageaga gaegaegee teaggaaggg ecaecageg ecceedaa 1621 gaecaete ecaettege gagaegee etaaggaagg geeceedaaeat 1631 ageagateae ecegeega acaecgee taeaaggaegg aeggaegee gegeetea atgagegg geeceedaaeat 1641 agactete etaegatega aaegeaee geeceeda etaegaegg aeggeegeg 1801 acgatetet etaegatga aaegaeca geeceeda etaegeegg aeggeegg 1801 acgateate ecegeegaa atgageee gegeecea acaecageg eceedaaeat 1921 catteegtg etaadgega gageetee tegeegea acaecagee ecageaga 1921 ceateagt gagaagee atagageee ecageege ecageegg aeggeegg 2031 ceateagt gagaagee taagageege ecaecgee ecaecaga gaegaegg 2031 ceateagt gagaagee gagaegee ecaecgee ecaecage gaegaegg 2231 acgteacae geegaaeg geegeegga gaeggeeee ecaecage gaegaegg gaegaeggeeggeeggeeggeeggeeg	781	tgattgtgga	tcagccggac	cacagegeea	qcaqcaqcqq	cqacaqcaqc	gtcatcaaca
 901 tötögöttäg aaagattate agogaactgg oggaaatogt ottacacoge ttägattaei 961 atotgoogga tagacagag gaogattgo ttacaaoggot gagaatotg ttacaottta 1021 tgaoggoag oggacagag tgeottaga ttacagggg ottogag googacaage 1081 getggacga oggatcoga gaggaged tgeottagag ottogagg googacaage 1201 gaocotogt gaogagaca tagagette dagattet googacagte otgacaatag 1201 gaocotogt gaogagaca tagagette dgattatet googacagte otgacaatag 1201 gaocotogt gaogagaca tagagetee gattggga osactatagg getgtetga 1201 aagoaggtg oggetgaag aagagaaca ooggaca toocataga googacatge 1321 tggogaaget gggettcaac gaotggaca dogagogac toocataga googacatge 1321 tggogaaget goggotgaa gaagagaaca ooggacga toocagetag tatgagetga 1321 tggogaaget goggetgaag aagagoaaca ooggoogac toocatoga tatgagetga 1321 tggtoaagg agatatteeg cogoogata dagagogaac ooggooga toocagetga tattggagt 1501 tggtoaagg agatatteeg cogoogata dagaagatge coacgecatg atottggag 1501 tggtoaagg agatatteeg cogoogaca tagagage coagogatg googaagggg gaggagetea 1621 tgtgogace ttotcoogg gagaageta tggagtoca aggagaggg aggagetea 1631 agoagatea cocgocaga gacogace toagagag ottocaagtg googacaca 1631 agoatcate acattege gagagage coagged googacage googooga ttocaggg googacaca 1631 agoatcate acattege gagageaca dagagagag toocaaggg googacaca 1631 agoatcate acattege gagageaca dagagagetea cocaagag teocagg googoog 1801 acgateet ctacagatgg cocageaga cacagaag ttgcocgg gaagageet 1921 catteggag gagagaga cacagaca caagagag toocaagag googoog 2001 coaccagtg ggacagaga cacaagce cacageaga ttgcogga aggaged 2011 coaccagtg gagageget taatagegee cacagegge cacacage gagageag 2021 geatcaa atectget gggecaga acagee cacaegge gaagageag 2021 geatcaa atectget gggecaga aggeegete cacaeggeg gategttea acaeggagg 2021 geatcaag gagageget cacaagee cacaeggee dagaegage teggeege 2221 acgtagae godetege cacaegee taggeege cacaecae tagaeggg 2231 geatcaag gagageget cacaece cacaecae taggeegg 2331 tggaacgeg godegeeg cacaece cacaecae tagaeggg 2331 tgaacgeg godegeege cacaece cacaecae tagaeggg 2331 tgaacgeg godegeege cacaecee teggeegae dagaegeege cacaecae 2331 tgaacgeeg ceteggee caca	841	qaqcqttcqa	caacaqcaat	caccaccacc	accatcaaca	tcatcacccq	ccqctcqtcq
961 atctgccgga ggacgaggag tgccaagtgt cacaggagt ggagatttg ttaacttta 1021 tgacgccaga tgagacagac gacgattga ttgacgagg catcgacgag ggcgacaagc 1081 gotggacga cgaatccgag gaggaggca acgatacca agaactagg cactatatg 1141 agacctgcag aataccata aaaaccacc tgcctgaga cactataga gctgttcga 1201 gagcctcgt gacggagac atagagctc ggatatttc gcagcaggt ctgaacaatg 1201 gagcctgg gacgaactg atcaaggcgt cggatactc ggccaccag cacaagaac 1321 tgccgaagt gggctcaac gactggcac ggtatttgg gcagtgatc gacgaatgc 1381 gacggggat gcggctgaag aagaccacc agagcgac tcccatcga tatgagctga 1441 cacctacga aatactcatg ggcgacacc gagcaatag ccacgccat attggagt 1501 tggtcaacgg agatattcg gcgcgcac tggagaagtg ccacgcgga 1621 tggtcgacc ccgccgcg ctgaagaagg ccaggatg ccacaggg aggaggag 1621 tggtcgacc ccgccgag gacagctac tggagaaggg aggaggtca 1621 tggtcgacc ccgccgag gacagctac tggagaag ggtgatcag aggaggg 1801 acgatcatc cacgtcaga caggggcta tcaaagtgg ccaccaca 1621 agcatcatc acgatccaga caggggcta tcaaagtgg ccaccaca 1621 tgtcgagcc ttctccggg gacagctac ggagaag gttccaa gtgagaag 1801 acgatcatc cacgatcga caggggcac tcaaagtgg cccaccaca 1801 acgatcatc cacgatggag cacgaccg ctgaagaag ttccaaggt ccccacac 1801 acgatcatc cacgatgg cacgacgac gcagcacag ttccaaggt ccccatcg 1801 acgatcatc cacattegc gagagacc gcagcacag ttccaaggt ccgccgtac 1921 cattcggtg ctacatgg cccagtcag cacgacaga ttgccggag acggctcg 1981 tgatgcgcc cgacgagaa tcaaggagt ctgcgcaca aggagcat 2041 cctaccaga ggagagcc taaggagat ctgcgcga accacatcg tggagcag 2161 gcaacctgg ggagagcg tgagaggc ctgcggag gacgtccc tcaggacgg 2221 acgtcagaa ggagagcg tgagaggc cgaggagag ccaccacag gggggggg gaggagcg gaggagcg gaggaggg gacgtgg gaggaggg gaggagcg gaggagcg cagggaga caggacgc ctgggaca acgacggg gaggaggag 2581 ttcctcgga ggcggagcg cggcaccag gccggcaca acgacggg gaggaggg 2521 gcattcagg gcagttgg caggagg ccaccacg ccatcggg gaggaggg ccaccacag caggggg ccaccacag ccaggggg ccaccacag ccaggggg ccaccacag ccaggggg ccaccacag ccaggggg ccaccacag ccaggggg ccaccacag ccaggggg ccaccacag ccaggagg ccaccacag ccaggagg ccaccacag ccaggagg ccaccacag ccaggaggg ccaccacag ggaggaggg ccaccacag ggaggagggg ccaccacag ggaggagggg	901	tctcqcataq	aaaqattatc	agcgaactgg	cqqaaatcqt	ctacaccqcc	ttqqattaca
1021 tgacgccaga tgagacagac gacgattga ttgacgagg categacagc ggcgacaagc 1081 gctggacga cgaatccgag gaggagcga acgatacca agaactaga cacatatcg 1141 agacctgcag aaatcacata aaaaccacc tgcctgagaa cacataga gctgctgca 1201 gagcctcgt gacgagacc atagagctc gagatattc ggcacacac cacacagaac 1321 tggcgagct cgagaactg ataaggctc ggatatac ggcacgtgat gacgaactg 1381 gacggggat gcggctgaa gaagcgacac acgacgcac tcccatcgaa tatgagctga 1381 gacgggagt gcggctgaa gaagcgacac acgacgcac tcccatcgaa tatgagctga 1391 tggcaacg agatatccg cggcgcta agaaagatg ccacgccat attgaggt 141 caccctacga aatactcat gggcgacacc gagccaaaa gtatcagttg cgcaaggtga 141 caccctacga agatatccg cggcgcta agaagatg ccacgccat attgaggt 1501 tggtcaacg agatattcg ccgcgcgta agaagatg ccacgcgat attgaggt 1511 tggcgagc ttctccgcgg gagcagcta tgaggtcat acggagggg aggggctca 1621 tgtcgagc ttctccgcgg gagcagtca tgagtgaag gtgcttca agtgcaact 1611 agcagtaca cccgccaga gacaggtca tcaaagtgg cttccaag gtgcaacat 1621 agcatcatc acatttcgc gagatgcac gctgctga gccaagag gtgcttca agtgcaac 1621 agcatcatc acatttcgc gagatgcac gctgctcga gccaagag gccgctac 1801 acgatcatc acatttcgc gagatgcac gctgctcga gccaagatg ccgccgtat 1921 cattcggtg ctcaatggt cccaagtag cacgacgg cccaaggg gcgctcca gaaggact 2041 ccttcacaa ggacgata ccaaagttc tgcgcgca cacacagtt ggatgccag 2101 ccatcagtg cgagtcgg agggcttct tgcgcggc cacacatggt ggatgcag 2221 acgtcaa ggaaggcc taatgcg ccagggacg gaccatcc tcagacgag 2221 gcagttcaa atcctgct gggccatga acaggtcg ccatcggg gacggtca 2221 gcagtcaa atcctggt ggggctg caggagg gacgtcaa acaggtgg 2231 tggaaggg tgcgatcg ccatcgg ccatcgg gacggt catcggacg 2231 gcagttcaa atcctggt gagggctg caggagg gacgtcaa acagaggg gaggtgt 2341 tggaacggg cagttgga caggagg ccatcgg ccatcggac acacatcgt 2351 ttccctgga gcattggc caggacgg ccatcggc ctggacgg gaggtgt 2351 tccctgga gcattgga caggagcg ccatcacct ccatcagc gagggg gaggtgt 2351 tccctgga gcattgga caggagcg ccatcact ccatcagc gagggg gaggtgt 2551 gaatagg gagcagcg ccatcacct ccatcacc ccatcagc gagggg gaggtgt 2561 tccctgga gcattgga gacgcc tccgcacg gagcagg ccatcatct 2761 cgagtgga catcagga gacgccc tcggcacg gacggg gagggc ccat	961	atctgccgga	qqacqaqqaq	tgccaagtgt	cacaqqaqct	qqaqaatctq	ttcaacttta
<pre>1081 getgggacga cgaatecgag gaggagegea acgatacaa agaatagag cacataateg 1141 agactgeag aatcacata aaaaccacc tgectgaga cacataga getgtetgea 1201 gagecetgg gaggagec atagagete gggatattet gedgaagte cgacaatag 1201 agecgggggt geggetgaag ateatagegt eggaatate ggecacaeg cacaaagae 1321 tggegaaget gggettaae gaetgggea acgagegea teetategat tatgagetga 1441 cacectacga aatatecatg geggeatace ggecaaaaa gtateagttg cgeagtggt 1501 tggteaaeg agatateeg eegegget agaaagage ccaegegea teetategge eegeegge 1611 tateaggte acggeegee etgaagaagg ecagegee teaaggggg agggettea agtgeaaeg 1621 tgtgegaee tetteeggg gaeactee ggageaegee teaagggg geceedaa agtgeaege 1621 tgtgeggee teateggag aacgatee ggagetea aggaagge ccaegeggg agggettea 1621 ageatete teteeggg gaeactee ggageee teaagggg geceedaag ecagegeee teaaggg geceedaag ecagegeee ecageggaa atggeeee ecageggaa aggagetee tgagateee ecasage geceedaag ecaeageg ecaeagg geceetee gaagaegee 1981 tgateggee eegaegaag atggeeeg eaageagee ecaeaegge ecaeaegg gaggeetee 1981 tgateggeg eggetgag aggegete taatgeeg eaageagge eggeteee aggagegee 2021 aceteagtg eggetegg aggegete taatgeeg eaageagge eggeteee ateegaeeg 2021 aceteaga ggageget aaggagage etgeggag acaedeee eaageegg gaeeeeee eaageegg gaeeeeeeee</pre>	1021	tgacggcaga	tgagacagac	gacgattgca	ttgacgaggg	catcgacgag	qqcqacaaqc
<pre>1141 agacctgcag aaatcacata aaaaccacc tgcctgagaa ccactataga gctgtctgca 1201 gagcctcgt gacggagacc atagagctc gggtatttct gcagcaggt ctgaacaatg 1261 aagcaggtg cgggtaaca gactgggca cggaatcat gcagcaggt gacgacaga 1321 tggcgaggt gggttcaac gactgggca cggaatcat ggcacacac gacaagaac 1321 tggcaagt gggttcaac gactggcac cggagcaac tcccatcgaa tatgagctga 1441 cacctacga aatactcatg ggcgacatc ggcgcaaa gtatcagttg cccaaggtg 1501 tggtcaacgg agatattcc ccgccggt agaagatg ccaaggatg ccacccac attggge 1621 tgtgcgace tctccogcg ggacagtca tggagtcaa acggaggg aaggagcta 1621 tgtgcgacc tcctcogg ggcacacc tcagggaag ggtgttca agtgcaact 1741 ccacggtg acgatcag acagggcac tccaaggagg ccagcaggg ggcaccacc 1621 tgtgcgacc tctccogcg ggacagtca tggagtcca acggaggg aaggagcta 1621 agcatcat ccacgcaga gaccgacca tcaagtgg cttccaagtgg 1801 acgatctt ctacgatgg acacgacca gcagcacag gcccaagg gccaccacc 1861 agcatatca acatttcgc gagtgcac gcagagag gccacagg gccaccacc 1861 agcatcatc caatttcgc gagtgcac cacaggg gcccctac gaagagg 2101 ccatcagg ggagggag aggggttct tgcgcgca cacacagg gccgcgtac 221 acgtcagaa ggagagac caaaggcc ctgggaga acggcgtgg 221 ccttcacgaa ggagagcac tcaatggcc ccagcgga acgacctgg 2221 acgtcagca ggagacgca tcaatggc ccagcggaa acgacgtg 2221 acgtcagaa ggagacgct aggagagac ctatcggaag gaccatc ctaggacag 2231 tggaacggg ggagagg ctgctgtcg gcactagg gaccatcc tcagacggg 2241 ccttcacgaa ggagacgct aagagagt ctgggaga gaccatc ctagacgag 2251 gcattcaca atcctcgtt ggagccag cacaggag gacgttca accgtcgg 2251 gcattcaca ggcgagatg gaggcctc ctgtggaag ggcgtcag gacggtgg 2521 gcattcacag gcagatgg ctgtcgtc ccatcatgg ccactacg cagacggg 2521 gcattcag caagtgg cactaccc ccataccc ccatagg gcgcctaa 2651 ttcctcgg gcattcga cacaggac ccatcacc ccatagg ccatcatcct 2701 cgacgggaa ctcatggac gccgccat ccataggc gccctaca agagtgga 2551 gcattcag cagagacg ccataggac ccataggc ccatcatcct ccatagg ccatcacc 2621 aaagacaa ctcatggac gcccata gcggcacag gcgcctaa ccatagc 2651 tccctgg gcattcga ccataggac gcccata ccatagg ccatcacct 2701 cgacgggaa cacatggac gcccata ccataggc cgggacac ccataggac ccatcacc 2651 aaagataa cataggacg ccataggac ccataggac gccatac</pre>	1081	gctgggacga	cqaatccqaq	qaqqaqcqca	acgataccaa	agaactagag	cacataatcq
1201 gagecetegi gaeggagaee atagagetee gagtattitet geageaggie etgaacaatg 1261 aageaggtge egagaactg ateaaggegi eggaateate ggeeaeeeg 1321 tggegaaget ggeetteaae gaetggeae gettetgggi geaggtaee gaegaaege 1321 tggegaaget gegetgaag aagaeaeee aegaegeaee teeeategaa 1441 caecetaega aataeteatg ggegaeaee ggeeaaaa gtateagtig egeaggtg 1501 tggteaaegg agatatteeg eegeegeeta agaaagatge eeaegeateg eeaegaggg aaggaegte 1621 totaeaggte aeggeegeeg etgagaagg eeagegateg eeageaggg aaggagetea 1621 tggtegagee teteeegag gaeegeeee teeaggaagg ggegetteea agtgeaaee 1621 totaeaggte aegaeeeag eagegegee teagggaagg gegeteea agtgeaaee 1621 totaeaggte aegateeaga eagegeeee teagggaagg gegeteea agtgeaaee 1621 ageagateae eegeeegag ageaegeee teagggaag gegeegag geeeeegag 1801 aegateete eegaegaag eaeegaeee geegeegag geeeeeag eegeetae 1861 aegateatee aeatteege gagatgeee geegeeag eecaaggt geeeeeeag geeeeee 1861 aegateatee aeatteege gagatgeee eaageagge eegeetaee taegaeegg 2010 eeateagg egageagae eecaaggee eaeageaggt geeegeetea gaaggeeg 2021 eeteaggg egageaegee teaatgeege eecaageag eecaageag eegeetae 2021 eeteaggg egagegee teaatgeege eecaageag gaeeedee taegaeegg 2021 aegteagea ggagegee teaatgeege eecaagga gaeeetee taegaeegg 2021 aegteagea ggagaegee taeatgeege eecagegaa acageegg 2021 aegteagea ggegaegee taatgeege eecaageag gaeeetee taegaeegg 2021 aegteagea gegageege eggeetege egatgeege eaageggg 2021 aegteagea geegtegeg eggeetege egatgeege eagaeggg 2021 geagteaee ateeteget ggeegeeg egategeg gaeggeag gaeggegg 2021 geagteaee ateeteget ggeegeege egatgeegt eadeggag 2021 teatgaeeg egdegaeeg eageeege egatgeegt eeggeeag gaggatgtg 2021 geatteagg egaetteet etggeedea gedegeeg gaeggeege 2021 teatgaeeg egaetteega aaeggeeee egatgeegt eeggeeag gaggatgtg 2021 geatteagg eagttee edgeeeee egaegeaeg geegeteag gaggatgtg 2021 geatteagg eagtteee eegeegeegee egaegeag geegeteag gaggatgtg 2021 geateagge eegeegee egaegeaee teegeegee eegeege eegeegeegeegeegeegeegee	1141	agacctgcag	aaatcacata	aaaaccaccc	tgcctgagaa	ccactataga	gctgtctgca
1261 aagcaggtge egagaaetg ateaaggegt eggaateate ggeeaecaeg caacaagaae 1321 tgeegaaget ggegtteae gaetgggeae gettetgggt geaggtgate gaegaetge 1381 gaeggggagt geggetgaag aagaecaec aegageegae teceategaa tatgagetga 1441 caecetaega ataeteatg ggegaetae aggaecaaaa gtateagttg egaaggtga 1501 tggteaaegg agatatteeg eegegegtea agaaagatge ecaegeateg ecaegeateg 1621 tggtegaeet aeggeegeeg etgaagaagg eeaeggateg ecaegegateg atettggge 1621 tggtegaeet teteegeg ggeggetea tgaagaegg ecaegegateg ecaegegaeg 1621 tggtegaeet teteegegg ggeggeetea tegaggaagg etteeta aggeegae 1621 tggtegaeet ecaegeaga geaecgaeet tegaggaag gtgetteea agtgeaaett 1741 ecaegetgte aegateeag eaegegetea teaagggag etteetaaggeeg 1801 aegatetett etaeggtag aacageatea geageteeea etceeagg ecceeaga egegetee 1861 ageateatee aeatteege ggagtgeee getgetegea geeeagag eegeetee 1861 ageatetee aeattegee gagatgeee getgetegea geeeaceae teagaegg 2101 eeatteggtg etaeatggtg eceagteege eaegeegee ecaeggege eaegeege 2101 eeatteegg egageegee teatggeege eaegegee eaegeegee eaegegeg 2221 aegteagea ggaegeet eaaggaegee eaegegege eaegegege 2221 aegteagea ggeggeteg eagagegee eaegegege gaeegetee 2401 teatgaeea ggeggaeget eagggeege gaeegeege gaeegeege 2401 teatgaeea geeggaegee teagtgeege gaeegeege gaeegeege gaeegege 2401 teatgaeea geeggaegee eaegegeege eagegeege gaeegeege gaeegeege 2401 teatgaeea geeggaegee eagegeee gaeteege geegeaag gaeggeteg 2401 teatgaeea geeggaegee eagegeege geeteege geegeaag gaeggeteg 2521 geatteage eeteege eagegeege teggegeaa gteegteea geegeaeg eageteeg 2521 geateage eeteege eaceege teggeegea eteegeege ecaegeege ecaegeege eaceege 2631 geegeegea etegaeee eeteege ecaegeegee ecaegeege ecaeceege ecaegeege ecaeceege 2641 gteeggeag etegaegaee geaecaete eeteege ecaegeege ecaeceege ecaegeege ecaeceege ecaecee	1201	gagecetegt	gacggagacc	atagagetee	gagtatttct	gcagcaggtc	ctgaacaatg
1321 tgqcgaagt gggttcaac gactgggcac gettctgggt gcaggtgatc gacgaactgc 1381 gacggggat gcggctgaag aagagcaacc acgagcgaa tcccatcgaa tatgagctga 1441 caccctacga aatactatg ggcgacatcc gagccaaaa gtatcagttg cgcaaggtga 1501 tggtcaacgg agatattcg ccgcgcgta agaagatg ccacgcatg atcttggagt 1561 tcatcaggtc acggcccg ctgaagaagg ccacggatg ccaattggg ccgccggaa 1621 tgtgcgagcc ttctccgcgg gagcagcta tggagtcat acggaagggg aaggagcta 1681 agcagatcac cccgccagaa gcaccgaccc tcaggaaag ggtgcttca agtgcagac 1681 agcagtcat ctacggtg agacggtca tggagtcat acggaaggg aaggagcta 1681 agcagtcat ctacgatgg aacagcacc tcaggaaag ggtgcttca agtgcagac 1691 acgatctt ctacgatgg acacgacc gctgctcga gcccaagat gccgccgtatc 1992 cattcggtg ctacatggtg cccatcagg ccagcaaga ttgccgggag acggcgtcg 1981 tgatgcggcc ccgacgcaa atggagccag caagacaga ttgccgggag acggcgtcg 2011 ccactcagtg cgagtcgag agggcttct tgcgcgcca caccatcgt ggatgccag 2101 ccactcagtg cgagtcgag agggcttct tgcgcgcaa caccatcgt ggatgccag 2221 acgtcagca ggagagcgc taaggagagt ccgcgggag acaggtggg 2221 acgtcagca ggagacgca tcaatgcgg ccaagggg gaccatce tcagacggg 2231 tggaacggg tgacgatcg ctgtccgaa cacggtgg accatce tcagacggg 2341 tggaacggg tgacgatcg ctgtccgta cgatggag gaggtgttg 2461 aaaagetg gctgttc ctgtgcctg gaatggcat cacaggt cgcgctaca atcgttcg 2401 tcatgacaa ggcggacg cacacce tcatggccag gaccatce tacgtcgg 2521 gcattcaga ctgaggacg ctgtccgta cacaggt ctgcgtcag gaggtgg 2521 gcattcaga gcagactg caggccag cacacgt ccatcgt cgg 2521 gcattcaga ccgagcacc cacaccet ccatcagc gg 2521 gcattcaga ccgagcacc ccatcacct cccatcag gaggagg 2631 ttcctcgg gcacttcga aacgtgccc tgtgccga gtcgct ctactctgg 2641 gtccggcag ctcgacgac ccatcacct cccatcatg ccagcagg ccacacg ccatcatcet 2701 cgacgggaa acacatgg gaccgacac tcatcacct cccatcag cggg ccacacce 281 aaagatcaa catgagcacg ccgacacat ggcggacg cggacgcac ccatcacct 281 aaagatcaa catgagcacg ccggcacta tggcggcac ggagcaca 281 tgccggcac tggacgg cggacggc gacagac tgcagaca 281 cgccccac tggacagc tcggaccac tcaccaca ggagacg ccaacacc 2821 aaagatcaa catgagcacg ccggacaca gacagaca gacagaca tcacacaca 281 cgccgcac tggacgc ttggaggca tgcacgaca g	1261	aaqcaqqtqc	cqaqaaactq	atcaaqqcqt	cqqaatcatc	qqccaccacq	caacaaqaac
1381 gacgggggt gcggctgaag aagagcaacc acgagcgcac teceategaa tatgagctga 1441 caeeetacga aatactatg ggcgacatec gagcaaaaa gtateagttg cgeaagtga 1501 tggteaaegg agatatteeg eegeegtea agaaagatge eeaeetagagtg 1501 tggteaaegg agatatteeg eegeegtea agaaagatge eeaeetagaggg aaggagtea 1621 tgtgegagee tteteegegg gagcagetea tggagteeat aeggaaggg aaggaggetea 1681 ageagateae eegeegaa geaeegaee teaaggaaag gtgetteea agtgeaaeet 1741 eeaegetgte aegateega eageggetea teaagggaag gteetteea agtgeaaeet 1741 eeaegetgte acgateega gagatgeaee getgetegea geeeaagatg eegeegtate 1921 eatteggtgg etaeatggtg eeeagteag eaegaeaga tgeegggag aeggegtege 1981 tgatgeggee eegaeggae eacaagtee aggaeeaeg eegaetee taegaeegg 2010 eeaeteagtg gagaggaga eeaeggetee teagaeagg eegeeteea gaagageeat 2041 eetteagag ggaeggae eeaagtee tgeegeee eagaeggeg eagaeed 2161 geaaeetgg egagtegag agggeteet tgegeegee eagaeggeg eagaeegg 2221 aegteagag egagaegee teaatgeeg eacagegg gaeceatee taegaeegg 2221 aegteaga ggagaegee teaatgeeg eagaeett eategaeegg 2221 aegteaga ggagaegee teaatgeeg eagaeget eateggaeg 2231 geagtteae ateeteget gggeeatgg acgeteet eategaeegg 2341 tggaaeggg tgeegateg gagggeetge egatgegg gaeettee ateegteeg 2401 teatgaeea ggegaeet gggeeaegg gaeettee ateegteeg 2401 teatgaeea ggeggaetg gagggeetge egatgegt etegteea aagatgega 2521 geatteag egaetteega aaegteee tegteegta etegteetg 2521 geatteag egaetteega aaegteee tegteegat etegteete ggteetgea 2641 gteeggeeag etegetee easteee tegteetgat etegeeag eacteete 2641 gteeggeag tegaagae gaeeagtee ceaagtegt gaeggaege eacteete 2641 gteeggeeag tegaagae gaeeagtee eeaagtee eeaeedge eacteegg 2821 aaagaeag etegaagae egeaetee eeageae gaeggeee eeaeeggee 2821 aaagateaa eatgageeg egeaetge gaeggeee eeaeeggee eeaeedge eacteege 2821 aaagateaa eatgageeg egeaetge gaeggeee eeaeedgee eeaeeeggeeeeaeeeggeeeeeaeeggeeeeeeggeeeeee	1321	tqqcqaaqct	qqqcttcaac	qactqqqcac	qcttctqqqt	gcaggtgatc	qacqaactqc
1441 caccetacga aatacteatg ggegacatee gageeaaaaa gtateagttg egeaagtga 1501 tggteaaegg agatatteeg eegeegetea agaaagatge eeaegateg eegeegea 1621 teateaggte aeggeegeeg etgaagaagg eeagegateg eeaetteggag aeggagetea 1621 tgtgegagee tteteegegg gageagetea tggagteeat aeggaagggg aaggagetea 1621 tgtgegagee teeteegag eageggetea teaagggaag ggtgetteea agtgeaaet 1741 eeaegetgte aegateeaga eageggetea teaagatgg etteteeaag tteeaggeeg 1801 aegatetet etaegatgag aaeageatea geageteea eteeaaegg geeeeeee 1861 ageateatee aeattegee gagtgeaee geegeeagag geeegeetea 1921 eatteggtgg etaeatggtg eeagteag eaegegee eeagaag tgeeggegg aeggegtege 1981 tgategegee eegaegeaea atggageeag eaageagge eegaegaag eegeegte 2041 eetteaega ggaeggate eaeaggegee eaageagge eegaegee eagaegeeg 2041 eetteaega ggagegeae teaatgeeg eeageegee eagaegeege eagaeggeg 2051 geaeetgg eggaegee teaatgeeg eegaegea aeageegg aegeegtee 2021 aegteagea ggagaegeet eaaggaagte etgeeggag aggeegtee 2021 aegteagea ggagaegeet eaagaeagte etgeeggag ageegetee 2021 aegteagea ggagaegee teatgeege egaeggeag gaeeetee eagaeggg 2021 aegteagea ggegagetg eggeeegg geegeeag gaeegtegg 2021 aegteagea ggeggaetg gggeeteg egatggaegt eegtegga 2021 teatgaeea ggeggaetg gaggeetge egatggeag geegeteag gaggatgt 2021 teatgaeea ggeggaetg edgeedeg egateggeg geegeteag gaggatgt 2021 teatgaeea ggeggaetg eegteegte egatggeag geegeteag gaggatgt 2021 teatgaeea ggeggaetg eegeeeag tetgeeeaa ggegedeag gaggatgt 2021 geatteagt eaattege eageeaegt etgeegeaa gteettee ggteeetgg 2021 geatteag eestteega aaegtgeee teggeeaea gtgetaee aaagaegga 2031 teatgaeea geegeaee eeateeee eeaeageeggee eetaeaeae 2031 teatgaeeag etegaeee eeateeee eeaeageeggeeeaeageeeaeagee 2031 eegageaga tegaagaee eeaeaeae eeaeaeaee eeaeaeaeae 2031 geeggaeaa tegaagaee eeaeaeaee eeaeaeaea geegeaeae teeaeaeae 2031 aaagateaa eatgageeg eeegeaeat geeggaeea geegeaeae teeaeaeae 2031 aaagateaa eatgageeg eeegeaeat geeggaeea gaegaeae teeaeaeae 2031 aaagateaa eatgageeg eeegaeae teeaeaeaea geegeaeae teeaeaeae 20301 eeagteegee tggaeggee gaegeee gaegaeae teeaeaeae 20301 eesteteea	1381	qacqqqqaqt	gcggctgaag	aagagcaacc	acgagegeac	tcccatcgaa	tatgagetga
1501 tggtcaacgg agatatteeg eegegetea agaaagatge eeaecatg atettggagt 1561 teateaggte aeggeegeeg etgaagaagg eeageteg eeaetgggg aaggagetea 1621 tgtgegagee tteteegeg gageagetea tggagteeat aeggaagggg aaggagetea 1681 ageagateae eeegeag eageeggeee teaaagtgga etteeaagtggaagtg 1801 aegatetet etaegatgag aaeageeae teaaagtgga etteeaagtgga 1801 aegateete etaeggtag aaeageeae geageteeea etteeaageg geeaeeaee 1861 ageateatee aeatteegee gagatgeee geegeagag geegeetee geegeaeeaee 1861 ageateatee aeatteegee gagatgeeae geegeeteea geegeetee 1921 eatteggtgg etaeatggtg eeeagteag eaegaegge geegeetee gagagegt 2041 eetteeagaa ggaeggete eaeaggeee eagageee eagageege 2051 eeaaetggg egagegee eaaeggeeee eagageege eagagegg 2051 eeaaetggg egagegee teaatgeege eeagageegee eagageeg 2051 eeaaetggg egagegee eaaeggeeeee eagageegee eagageegg 2051 eeaaetggg egagegee teaatgeege eeageee eagageegge eaaeeggg 2051 eeaaetggg egagegee teaatgeege eaaeggee eagagegge 2052 aegteagea ggagegeet aagagaagte etgeeggee eagategg eaaeeggg 2051 geatteaae ateeteet gggeeatgg aaeagteet eateggeeg 2051 teatgeegg egeteget eatggeege egagegge gaeegteeg 2051 teatgeegg egetegete etgegeege gadeegt eateeggeg 2052 geatteagt gegetegg eggeeee egagegg egeetee ateeggeeg 2052 geatteagt eagategg eaggeeeg egatggeeg eeseteegg egeetee 2051 teatgaeea geeggeee egageege egatgeeg eeseteegg egeetee 2051 teatgeegg egeetegete etgtgeetge geaeteggt etegeetee aeaggegg 2052 geatteegg egeetegete etgtgeetge eeseteeg etgetteea 2051 teatgeegg egeeteega eaegtgeee teggeege eceaeggeg eaeteege 2052 geatteegg eeseteega eeseteegg eeseteegg eeseteeg 2052 geateegg eeseteega eesetee eeseteege etgetgee 2053 deagagege eeseteegg eeseteegg eeseteeggeee etgeeggee 2054 geeggeegg eteggeee eeseteeggeegeee eeseggegeee etgeeggee 2054 geeggeeggeee eesegeee eesegeeggeee eesegegeee etgeeggeee eeseggeegeeeeseggeegeeeeseggeegeeeeseggeegee	1441	caccctacqa	aatactcatq	qqcqacatcc	qaqccaaaaa	gtatcagttg	cqcaaqqtqa
1561 tcatcaggtc acggccgccg ctgaagaagg ccagcgatcg ccaattgggc ccgccgcga 1621 tgtgcgagcc ttctccgcgg gagcagcta tggagtcat acggaagggg aaggagcta 1681 agcagatcac cccgccagaa gcaccgacc tcagggaaag ggtgcttca agtgcaga 1741 ccacgctgtc acgatccaga cagcggcta tcaaagtgga cttctccaag tttcaggacg 1801 acgatcatt ctacgatgag aacagcatca gcagctcca ctccacagcg gccaccacc 1861 agcatcatc acatttcgc gagatgcace gctgctcga gcccaagatg ccgccgtatc 1921 cattcggtgg ctacatggtg cccagtcagg cacgacaga ttgccgggag acggcgtcg 1981 tgatgcggcc cgacgcaca atggagccag caagcaggt gccgcctca gaagagccat 2041 ccttcacgaa ggacggtac cccagtcgg cacgacaga ttgccggag 2101 ccactcagtg cgagtcgagg agggttcct tgcgcgccc cgagtcggt gatgccaga 2221 acgtcagca ggagagca tcaatgcgc ccagcggac gaccatcc tcagacggg 2231 gcattcaac atcctcgctt gggccatgga acagtcgt gccgctcaa gaagtgg 2341 tggacgggg tgacgatcg ctgtgccgc ggatgtcca atccgtcgg 2401 tcatgacaa ggcggagtg cgtgccgta cgatggacg gacgttcca 2401 tcatgacaa ggcgagtg cgtgccgta cgatggagg gacgttca 241 tggaccggg tgacgatcg ctgtcgta cgtggggg gatgttca 2421 acgtcagca ggcggacg cgtgccgta cgatggacg gacgatca 2431 tggacgggg tgacgatcg cgtggccg caatgga caagtgtg 2441 agaacgggg tgacgatcg aacggccc ccaggacg ggggtgct 2441 tatgaccag ggcgacg cactccga aacgtgcc ccatcagt ctcgttcgg 2521 gcattcagt caagtgtgc cactgcgc ccatcagt ctcgtctac agagtgga 2531 ttccctcgga gcacttcga aacgtgccc tcgtgcga gtgttaac aagatgcaa 2641 gtccggcag ctgagcacc ccatcacct cccatcatgc ccgcaggg cactcatcct 2701 cgacgggaa catcatgga gaccattc ccatagtcg tgatgagg ctttgcgca 2641 gtccggcag tcgaagact cgcagcact tcgagcatg ccatcatc tcctctcag 2641 gtccggcag tcgaagact gaccagtcc ccatcactc ccatacatcg tcgctgca 2641 gtccggcag ctgagacg cccggcata ggcggtgc ccatcatc tcctcctag 2641 gtccggcag tcgaagact ggacggtc ccatcact tcctcctag 2641 gtccggcag tcgaagact cgcagcatg tggacgatg ccatcatct 2701 cgacggggaa catcatgga gaccagtc tccaagtcg gaagagcg ctacatcct 2701 cgacggggaa catcatgga gaccagac tccaagacg ggacgac ccaagacg 281 aagatcaaa catggacag cccggcata gcggggac ggacgaca gagacgaca tccaacaag 281 aagatcaaa catggacg cccggaca tc	1501	tqqtcaacqq	agatattccg	ccqcqcqtca	aqaaaqatqc	ccacqccatq	atcttqqaqt
1621 tgtgcgagcc ttctccgcgg gagcagctca tggagtccat acggaaggg aaggagtca 1681 agcagatcac cccgccagaa gcaccgaccc tcagggaaag ggtgcttca agtgcaact 1741 ccacgctgtc acgatccag cagcggctca tcaaagtgga cttctccaag tttcaggacg 1801 acgatcttt ctacgatga aacagcatca gcagctcca ctccacagcg gccaccacc 1861 agcatcatc acattcgcc gagatgcac gctgctcga gcccaagatg ccgcgtatc 1921 cattcggtgg ctacatggtg cccagtcagg cacagacaga ttgccggga acggcgtcg 1981 tgatgcggcc ccgacgaca atggagccag caagacagt gccgcgtatc 1921 cattcagtg ggagggagtac cacaagttt acgacaggc cctggaatcc tacgacctgg 2011 ccactcagtg cgagtcgagg agggcttcct tgcgccgca caccatcgtt ggatgccaga 2161 gcaacctgga cgagacgcac tcaatgccg ccacggcgc cgagtcgcgt caatcggacg 2211 acgtcagca ggagagcgca tcaatgcgg acaagtcct tacgacagg 2221 acgtcagca ggagggtg gggcttge cgatggagg accatccc tcaggagg 2231 tggaacggg tgacgatcg ctgtcgcga acaagtctt catggacaa cagacgtgg 2341 tggaacggg tgacgatcg ctgtcgtg gcactcgg gaccatca atccgtcg 2401 tcatgacca ggcggagctg gagggctgc cgatggacg gacggtcag 2521 gcattcagtg cagttggc cagcgacag ttgcgcga gatcgttca atccgtcgg 2521 gcattcagtg cagttggc cacgcacgg ttggcgta aggaggg ctgtcctg 2641 gtccggcag ctcggcac caccact cccatagcg gacgtggg cactatct 2701 cgacgggag acatctcga agctggcc tcagtggag cccatcg ttgcgtgca 2641 gtccggcag tcgaagacg ccatcacct ccatagcg cacagagg cactatct 2701 cgaggggaa catcatgga gaccattc ccaatgcgt gaggagt ttgcgcatg cacagagg ccatactct 2761 ccgagtcag tcgaagacg ccggcattg tggggagt ccaatcgac ggaggacgt tcctctag 2881 cgccgccac tggacaga cgggaggac tcggggaca ggaggacg tcctctca 2881 cgccgccac tggacaga ctcatggac gtggagca tgacagaca ggagacat tccaacagg 2881 cgccgccac tggacaga ctcatgga cgaggacgac tccatcta cccaagacg 2881 cgccgccac tggacaga ctcatggac cgagacgac tccacgacag ggagcacat tcctcctag 2881 cgccgccac tggacagc ttggaggac tcgaggaca tacaagacg 2881 cgccgccac tggacagac ttcggaggac tcacgacag gagacgaca tacaacagg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggacccgaa gtcgcccga gagacgaca tacaacacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggacccgaa gtcgcccga gagacgac tacaacacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag gagacccgaa gtcgccgaa gacac	1561	tcatcaggtc	acqqccqccq	ctgaagaagg	ccaqcqatcq	ccaattqqqc	ccqccqcqca
1681 agcagatcac cccgccagaa gcaccgaccc tcagggaaag gdtgcttca agtgcaaact 1741 ccacgctgtc acgatcaga cagcggcta tcaaagtgga cttctccaag tttcaggacg 1801 acgatctct ctacgatgag aacagcatca gcagctcca ctccacagcg gccaccacc 1861 agcatcatc acattcgcc gagatgcacc gctgctcga gcccaagatg ccgccgtatc 1921 cattcggtgg ctacatggtg cccagtcagg cacgacaaga ttgccgggag acggcgtcgc 1981 tgatgcggcc ccgacgcaca atggagccag cacagacaga ttgccgggag acggcgtcgc 2041 ccttcacgaa ggacgagtac cacaagttc tgcgccgca caccatcgt ggatgccagg 2161 gcaacctgga cgagacgac tcaatgcgc ccagcggca gacccatcc tcagacggg 2221 acgtcagca ggagagcac tcaatgcg cacagtcat catggacag 2341 tggaacggg tgacgatcg ctgtccgta gccggtcac atcggtcgg 2401 tcatgacca ggcggagcg ctgtccgta cgtggaga cggcgttgg 241 tcatgacaa ggcggagcg ctgtccgta cgctgggag gacggtgg 2221 acgtcagca ggcgagcg ctgtccgta cgctgggag gacggtgg 2221 acgtcagca ggggagcg ctgtccgta cgctgggga gacggtcac atccgtcgg 2221 acgtcagca ggcgagcg ctgtccgta cgctgggag gacggtcac atccgtccg 2401 tcatgaccag ggcggagcg gaggcctg cgatggacg gaggatgtt 2461 aaaagcgtg cgctgcttc ctgtgctg gcactcggt ctgtcctgg gagatgtg 2521 gcattcagtg cagttggc caccgcagg tctgcggaa gtcgttacc agagtggaa 2581 ttcctcgga gcattcga accggcacgg tctgcggaa gtcgttacc agatgcgaa 2641 gtccggcag ctcgagcac ccatcacct cccatcatgc ccgagagcg ctgttgcct 2761 cgagtggaa tcgaagacg cccgacatg tggggagc ccgagcagg cactactct 2701 cgacggggaa catcatggac gccggata ggcggacat gcgggacac gcggacac 2821 aaagatcaa catgagcag cccgacatg tggggaca ggcggacat cccaagcacg 2881 cggccgcac tggacacg cccgacatg tggaggac cgagacatg tcgtcctag 2881 cggccgcca tggacacg ctcgggcac tcggagcaa ggcggacat tcctctcag 2881 cggccgcac tggacacg ctcgggaca tcggagcaa gacgagaca tacaacacg 3001 ccatgtcgg gagcatggag ggacccga gtcgccga gacagcac tacaacacg 3001 ccatgtcgg gagcatggag ggacccga gtcgcccta cccagcagca gaagagca tacaacacg 3001 ccatgtcga tacacacac ttggaaga atccgccg gcacatcct ttcgacgac 3001 ccatgtcga dagcacac ttggacaca ttggagag aaccgtca ttcgacctg 3001 ccatgtcga tacacagaca ttggagag aaccgtag aatccgct ttcgacgaca gaagagca 3001 ccatgtcga tacacacac ttggaagag aaccgta atcccgt tttggagag	1621	tgtgcgagcc	ttctccgcgg	gagcagctca	tggagtccat	acqqaaqqqq	aaggagctca
1741 ccacgetgte acgatecaga cageggetea teaaagtgga ettetecaag ttteaggaeg 1801 acgatetett etaegatgag aacageatea geageteea eteecaageg geeaceeae 1861 ageateatee acattegee gagatgeaee getgetegea geeeaagatg eegeegtee 1921 catteggtgg etaeatggtg eceagteagg eaeageagag ttgeeggag aeggegtege 1981 tgatgeggee eegaeggaea atggageeag eaaageaggt geegeeteea gaagageeat 2041 eetteaegaa ggaegagtae caeagtete tegeegeee eegageetege eaateggaeg 2101 eeateagtg egagtegagg aggetteet tgegeegee eageeggee eagegaegg 2221 aegteagea ggagaegeet aagagaagte etgeeggaea gaeceateee teagaeggg 2281 geagtteae ateeteget gggeeatgg aceagtegg gaeceateee teagaeggg 2341 tggaaegggg tgaegategg etgteegg egatggaeg gaeceateee teagaeggg 2401 teatgaeea ggeggagetg gagggeetge egatggaegt eteggeeta aceagtegg 2521 geatteagtg eagttgge eagtggee geaeteggt eteggeeag gaegeteae agaeggeg 2521 geatteagtg eagttgge eagtgeee tegggeeag ggeegteaag gagatgttg 2461 aaaaggetg egtetgete etgtgeee egatggaegt etegeeaeg ggeeteagg 2521 geatteagg eagttega aacgtegee tegegeaeg teggeetaeg ggeetegg 2521 geatteagg eagttgge eagtgeee tegtgeeaa gtgetatee aagatgega 2581 tteeetegga geaetteega aacgtgeee tegtgetgat etegeeateg etgetgteea 2641 gteeggeeag etegaaege gaecagtte eeaatege eeaageeg eacteateet 2701 egaeggggaa cateatggae gaecagtee eeaategte gagagaegt ettttgeget 2761 eegagteaga tegaaagaet egeageaet gegegaege eggageaet eteeteeae 2821 aaagateaa eatgageee gtegageee tggeegeae ggaegaee teeteeae 2821 aaagateaa eatgageeg etggaegee tgeeeaeae ggageaee teeteetee 2941 atteegege categgaeee teggeega gageaee tgeeeaeae ggaegaeee taeaaeaeg 3001 ecatgtegg gageatggag ggaeceega gaeceegt teegeete 3061 egeeteeaa taeageaee ttggaagga aateegt teegeeteg geatategae	1681	agcagatcac	cccqccaqaa	qcaccqaccc	tcaqqqaaaq	qqtqcttcca	aqtqcaaact
1801 acgatetett etacgatgag accageatea geageteea eteeaagatg geeaeceace 1861 ageateatee acattegee gagatgeaee getgetegea geeeaagatg eegeegate 1921 catteggtgg etacatggtg eccagteagg cacgacaaga ttgeeggag acggegtege 1981 tgatgeggee eegagegatae eacaagtet acgacaegg geeeeteea gaagageeat 2041 eetteaegaa ggaegagtae eacaagteet tgegeegee eetggaatee taegaeetgg 2101 eeaeetgg egageegag aggeeteet tgegeegee eeaeggege eeaeggege eagegegg 2221 acgteagea ggagaegee teaatgeege eeaeggege egagteegt eaateggaeg 2221 acgteagea ggagaegeet aagagaagte etgeggaga gaeceatee teagaeeggg 2221 acgteagea ggagaegeet aggagaagte eeaeggege gaeceatee teagaeeggg 2221 acgteagea ggagaegeet gggeeetgg accatee teagaeeggg 2221 acgteagea ggagaegeet gggeeetgg accatee teagaeeggg 2231 geagteae ateeteget gggeeatgg accatee teagaeggg 2341 tggaaegggg tgaegateg gaggeetge egatggeg gaeettee ateegteegg 2401 teatgaeea ggeeggaeet etggeeegg gaeetegte etegteegg 2521 geatteagt eagettgte eagegeaegg tetgeeeaa gtgeetaee aagatgegaa 2581 tteeetegga geaetteega aaegtgeee teategee eeagegge eaeteateet 2701 egaeggggaa eateatggae gaeeagtee eeaagtegt gatagaegt ettttgeget 2761 eegagteag tegaaagaet egeageaeg tegageae eeagaegge eeeateeet 2761 eegagteag tegaaagaet egeageaeg tegaegaee eggageee teeteeg 2881 eggeeegee tggaeage egggagee gtggaggee tgeeggaee ggageae teeteeteg 2881 eggeegee etggaegge egggagee gtggaggee tgeegaee ggageae teeteeteg 2881 eggeegee etggaegee gtggaggee tegaegae ggaegaee teeteeteg 2941 atteegege eatgegaee tetggegae ggaegee ggaegaee taeaaeaeg 3001 eeatgtegg eatgegaee tetggagagg aateeteeg geaeeteg geaegee gaaegeee taeaaeaeg 3001 eeatgtegg gaeedgag ggaeeeega aateegae aateegee gaaegee taeaaeege	1741	ccacqctqtc	acgatccaga	cageggetca	tcaaaqtqqa	cttctccaaq	tttcaqqacq
1861 agcatcatce acatttegee gagatgeace getgetegea geceaagatg eegeetate 1921 catteggtgg etacatggtg eccagteagg eacgaeaga ttgeeggagg aeggegtege 1981 tgatgeggee eegaeggaea atggageeag eaageaggt geegeeteea gaagageeat 2041 eetteaegaa ggaeggatae eacaagttet aegaeaegge eetggaatee taegaeetgg 2101 eeaeteagtg egagtegagg aggetteet tgegeegeea eaceategtt ggatgeeaga 2161 geaacetgga egagaegeae teaatgeege eeaeggee egagtegegt eaateggaeg 2221 aegteageag ggagegeet aagagaagte etgeggagea gaeceateee teagaeggg 2281 geagteeae ateeteget gggeeatgga acaagteett eatggaeag acaagtegte 2401 teatgaeeaa ggeggaegg etgteegta egetggegg gaeegteeae ateegteegg 2401 teatgaeeaa ggeggagetg gaggeetge egatggeeg gaeegteeag gaeggtegg 2401 teatgaeeaa ggeggagetg gaggeetge egatggeegt eegetgegg gaeegteea 2401 teatgaeeaa geeggagetg gaggeetge egatggeegt eegetgegg gaeegteeag gaeggtegg 2401 teatgaeeaa geeggagetg gaggeetge egatggeegt etgegeeaa gaeggtegga 2521 geatteagtg eaagttgtge eagegeaegg tetgegeeaa gtgetataee aagatgegaa 2581 tteeetegga geeetteeaa aaegtgeeee tegtgeegae geeetegge eccateete 2701 egaegggaa eateatggee gaeeagtee eeaagtegt gatgagegt ettttgeget 2761 eegagteaga tegaaagaet eeeaagtee tegaeggee eeeaageegg eeeteete 2761 eegagteaga tegaaagaet eeeageaegg tgegggaee eeeaageee eeeaageee 2881 eggeegeea tegaaagee geeggeee tgeaegeea ggeggeeee teeteetee 2881 eggeegeea tggaeagge gtggageee tegaegeea ggeggeee egageeag eaceagee 2941 atteeggge eatgegaee tetggegee aeeageag agegaeee teeteeteg 3001 eeatgtegag gageatggag ggaeeegae gteggagea aeeageega gaageagee taeeaeag 3001 eeatgtegag gageatggag ggaeeegaa aateeega gaeeagee geaageega taeeaaeag 3001 eeetgeega gageatggag ggaeeegaa aateeegaga aateeegaega aateecgeeffeegaegae ateeageage	1801	acgatctctt	ctacgatgag	aacagcatca	gcagetecca	ctccacagcg	gccacccacc
1921 catteggtgg ctacatggtg cccagtcagg cacgacaaga ttgccgggag acggctcgc 1981 tgatgcggcc ccgacgaca atggagccag caaagcaggt gccgcctca gaagagcat 2041 ccttcacgaa ggacgagtac cacaagttct acgacacgge cctggaatec tacgacctgg 2101 ccactcagtg cgagtcgagg agggetteet tgcgccgcca caccategtt ggatgccaga 2161 gcaacetgga cgagacgac tcaatgcege ccaegeggee cgagtegegt caateggaeg 2221 acgtcagcaa ggagacgeet aagagaagte etgeggagea gacecateee tcagacgagg 2281 gcagtteaae ateetegett gggccatgga acaagteett catggacaa cagaegtgga 2341 tggaacgggg tgaegategg etgteegtaa egetggegga gategtteae ateegteeg 2401 teatgaceaa ggeggagetg gagggeetge egatggaegt etegegteag gaggatgttg 2461 aaaagegteg egtetgette etgtgeetge geaeteggt etegetaea gagagegaa 2581 tteeetegga gcaetteega aacgtgeee tegtgetgat etegetaee aagatgegaa 2581 tteeetegga geaetteega aacgtgeee tegtgetgat etegeetae aagatgegaa 2641 gteeggeeag etegaagee gacagttee ccaagtegt gatagagegt etttgeete 2701 cgaeggggaa cateatggae gaceagttee ccaagtegt gatagagegt etttgeete 2761 cegagteaga tegaaagaet egeageaet ggegggaee ccaageee caageage 2881 eggeegeea tggaeage gteggagee ggeggeate ggeggaee teeteeteg 2881 eggeegeea tggaeagee gteggagee tggaggeee tgeeteteg 2881 eggeegeea tggaeagee gteggagee tgeaggeea ggegaeeat teeteeteg 2941 atteeggge catgegaee tegggaeea ggegaeeat teeteeteg 3001 ccatgtegg gageatgga ggaecegaa gtetgeeeg geaagee tacaacaacg 3001 ccatgtegg gageatgga ggaecegaa ateecget ttgggagae tteeaeea 3061 egeteteea taacageee ttggagaga aateeegtt ttegaggga tteaaeetg	1861	agcatcatcc	acatttcgcc	gagatgcacc	gctgctcgca	gcccaagatg	ccgccgtatc
1981 tgatgcggcc ccgacgcaca atggagccag caaagcaggt gccgcctca gaagagccat 2041 ccttcacgaa ggacgagtac cacaagtct acgacaggc cctggaatcc tacgacctgg 2101 ccactcagtg cgagtcgagg agggctteet tgegeegeea caceategtt ggatgecaga 2161 geaacetgga cgagaegee teaatgeege ceaegeggee cgagtegegt caateggaeg 2221 acgteageaa ggagaegeet aagagaagte etgeggagea gaeceateee teagaegagg 2281 geagtteaae ateetegett gggeeatgga acaagteett catggaeaa cagaegtgga 2341 tggaaegggg tgaegaegg etgteegtaa egetggeegg gategtteae ateegteeg 2401 teatgaeeaa ggeggagetg gagggeetge egateget etegtgeeg gaegeteegg 2521 geatteagtg egetgete etgtgeetge geaeteggt etegteete ggteegga 2521 geatteagtg caagttgte eagegeaegg tetgeegaa gtgetataee aagatgegaa 2581 tteeetegga geaetteega aaegtgeee tegtgetgat etegteete gtgeeggee cateateet 2701 egaeggggaa cateatggae gaecagttee ceaategte gaeaggeg cacteete 2701 egaegggeaa cateatggae gaecagttee ceaategte gaeaggeg cacteete 2761 cegagteaga tegaagaet egeageaet ggeggagte tggeggeatee ceaateete 2761 egeagteaga tegaagaet egeageaet tggegeate eggageae ceaateete 2821 aaagateaa catgageeg eteggeet teggegeae eggageae tegaegaet 2821 aaagateaa catgageeg geeggeate ggeggaete tgeaggeae teeteeggage 2821 aaagateaa catgageeg gaegaete gaegaete tgeaggae eggaetee teeteega 2821 aaagateaa catgageeg gaegaete gaegaete ggaegaete teeteetea 2761 cegagtegg tegaegaete ggaegaete ggaegaete tgeagaete teeteetea 2821 aaagateaa catgageeg gtggageae tgeacgaea gaegaetee teeteetea 2821 aaagateaa catgageaeg deegaeata gegtggaete eggaetee teeteetea 2841 eggeegeeae tggaeaggee gtggageae tgeacgaea gaageaeete teeteeteag 2841 atteegegge catgegaee tetggegea gaegaeae gaagaeae taeaaeaaeg 3001 ceatgtegag gaeetggag ggaecegaa gtetgeeeg gaeagaeae taeaaeaaeg 3001 ceatgtegag gaeatggag ggaecegaa gtetgeeeg gaeagtee teeteeteg	1921	cattcqqtqq	ctacatqqtq	cccaqtcaqq	cacqacaaqa	ttqccqqqaq	acqqcqtcqc
2041 ccttcacgaa ggacgagtac cacaagttct acgacacgge cctggaatee tacgacctgg 2101 ccactcagtg cgagtegagg agggetteet tgegeegea caceategt ggatgecaga 2161 geaacetgga cgagaegea teaatgeege ceaegeggee cgagtegegt caateggaeg 2221 acgteageaa ggagaegeet aagagaagte etgeggagea gaeceateee teagaegagg 2281 geagtteae ateetegett gggeeatgga acaagteett catggaeaa cagaegtgga 2341 tggaaegggg tgaegategg etgteegtaa egetggegg gategtteae ateegteeg 2401 teatgaeeaa ggeggagetg gagggeetge egatggaet etegteete ggteedta 2461 aaaagegteg egtetgette etgtgeetge geaeteggt etegteeta ggteetae 2521 geatteagtg caagttgtge eagegeaeg tetgeegeaa gtgetataee aagaagtega 2521 geatteagtg eagetteega acagtgeee tegtegeta etegteete ggteetae 2641 gteeggeeag etegageae ecateaceet ecateatge eagegegge eacteateet 2701 egaeggggaa cateatggae gaecagttee eeageegge eacteateet 2701 egaegggaa eateatggae gaecagtee ecaagtegt gggeggeae eceateete 2701 egaegggaa eateatggae geeeggeatta geegggaee eceateete eceaageae 2821 aaagateaa eatgageaeg eeeggeatta geegggaee eceateete eceaageae 2821 aaagateaa eatgageaeg eeeggeatta geetgegeae ggegaeee teeteegg 2831 eggeegeeae tggaeagee gtggaggee degegeae ggageaee teeteegg 2831 eggeegeeae tggaeagge gtggaggee aceageaeg ggegaeeat teeteetegg 2831 eggeegeeae tggaeagge gtggaggee ggeageae gaageageae tacaacaaeg 3001 eeatgtegg gageatggag ggaeeegaa gteegeegt geaeagtee geatategae 3001 ceatgtegag gageatggag ggaeeegaa ateeeget ttegaggga teeaactege	1981	tgatgcggcc	ccgacgcaca	atggagccag	caaaqcaqqt	gccgcctcca	qaaqaqccat
2101 ccactcagtg cgagtcgagg agggetteet tgegeegeea caccategtt ggatgeeaga 2161 geaacetgga cgagaegee teaatgeege ceaegeggee cgagtegegt caateggaeg 2221 acgteageaa ggagaegeet aagagaagte etgeggagea gaeceateee teagaegagg 2281 geagtteaae ateetegett gggeeatgga acaagteett catggaeaa cagaegtgga 2341 tggaaegggg tgaegategg etgteegtaa egetggegg gategtteae ateegtteeg 2401 teatgaeeaa ggeggagetg gagggeetge egatggaegt etegteete ggaegeggag 2521 geatteagte cagetgeete egatggaegt etegteete ggeetegg 2521 geatteagt caagttgte cagegeeaeg tetgegeaa gtgetataee aagatgegaa 2581 tteeetegga geaetteega aaegtgeee tegtgetgat etegteete agatggeg 2641 gteeggeeag etegageae ceateaceet eceateatge ceageagge eaeteateet 2701 egaeggggaa cateatggae gaecagttee ceaagtegtt gatagaeget ettttegget 2761 eegagteaga tegaaagaet egeageaetg tgggeagtge ceeateete 2761 eegagteaga tegaaagaet egeageaetg tggeeagtee ggageaete teeteeteag 2881 eggeegeeae tggaeagee gtggaggee tgeeageae ggegeaeet teeteeteag 2881 eggeegeeae tggaeagee gtggaggee tgeeageae ggegeaeetg tegteetegg 2941 atteegegge gageatggag ggaeeeggaa gaecagtee aceageage 3001 eeatgtegag gageatggag ggaeceega ateegegea geeageet teegeagea 3061 egeteteeaa taacageae ttggagagga aateegett ttegaggga tteaaeetgt	2041	ccttcacqaa	qqacqaqtac	cacaaqttct	acqacacqqc	cctqqaatcc	tacgacctgg
2161 gcaacctgga cgagacgcac tcaatgccgc ccacgcggcc cgagtcgcgt caatcggacg 2221 acgtcagcaa ggagacgcac tcaatgccgc ccacgcggcc cgagtcgcgt caatcggagg 2281 gcagttcaac atcctcgctt gggccatgga acaagtcctt catggacaaa cagacgtgga 2341 tggaacgggg tgacgatcgg ctgtccgtaa cgctggcgga gatcgttcac atccgttccg 2401 tcatgaccaa ggcggagctg gagggcctgc cgatggacgt gcgcgtcaag gaggatgttg 2461 aaaagcgtcg cgtctgcttc ctgtgcctgc gcactcggtt ctcgttcttc ggtccctggg 2521 gcattcagtg caagttgtgc cagcgcacgg tctgcgccaa gtgctatacc aagatgcgaa 2581 ttccctcgga gcacttccga aacgtgcccc tcgtgctgat ctcgccatcg ctgctgtcca 2641 gtccggccag ctcgagcacc ccatcacct cccatcatgc ccagcaggcg cactcatcct 2701 cgacggggaa catcatggac gaccagttcc ccaagtcgtt gatagagcgt cttttgcgct 2761 ccgagtcaga tcgaaagact cgcagcactg tgggcagtgc cgagcatcc tcctccag 2821 aaagatcaaa catgagcacg cccggcatta gcgtgggacc ggagcatcc tcctccag 2821 aaagatcaaa catgagcac gtggaggcac tgcacgacca ggagcatcc tcctcctcag 2821 aaagatcaaa catgagcac gtggaggcac tgcacgacca ggagcacatg tcgtcctcg 2821 aaagatcaaa catgagcacg gtggaggcac tgcacgacca gagcgaccat tcctcctcag 2831 cggccgccac tggacagc gtggaggca tgcacgacca gagcgaccatg tcgtcctcgt 2941 attccgcggc catgcgacc tctggcgtca accagcaga gaagcagcac tacaacaacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggacccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggagagga aatccgtt ttcgggt ttcaactgt	2101	ccactcagtg	cgaqtcgaqq	agggcttcct	tgcgccgcca	caccatcqtt	qqatqccaqa
2221 acgtcagcaa ggagacgeet aagagaagte etgeggagea gaeceateee teagacgagg 2281 geagtteaae ateetegett gggeeatgga acaagteett eatggaeaaa cagaegtgga 2341 tggaacgggg tgaeggaegg etgeegtea egetggegg gategtteae ateegtteeg 2401 teatgaeeaa ggeggagetg gagggeetge egatggaegt gegegteaag gaggatgttg 2461 aaaagegteg egtetgette etgtgeetge geaeteggt etegeteaa gtgeeataee aagatgegaa 2581 tteeetegga geaetteega aaeegtgeeee tegtgeetga etegeegaa gtgetataee aagatgegaa 2641 gteeggeeag etegageaee eeeateeee eeeateee eeeatee 2701 egaeggggaa eateatggae gaeeagtee eeaateet gatagagegt etttegeget 2761 eegagteaga tegaaagaet egeageaetg tggegggeee eeeateeee eeeateee 2821 aaagateaaa eatgageee gtggaggeee tgeeggaeee eegageaeeeeeeeeee	2161	qcaacctqqa	cqaqacqcac	tcaatgccgc	ccacqcqqcc	cgagtcgcgt	caatcqqacq
2281 gcagttcaac atcctcgctt gggccatgga acagtcctt catggacaaa cagacgtgga 2341 tggaacgggg tgacgatcgg ctgtccgtaa cgctggcgga gatcgttcac atccgttccg 2401 tcatgaccaa ggcggagctg gagggcctge cgatggacgt gcgcgtcaag gaggatgttg 2461 aaaagegtcg cgtctgette ctgtgectge gcacteggtt etcgttette ggtceetggg 2521 gcattcagtg caagttgtge cageggacgg tetgegecaa gtgetataec aagatgegaa 2581 tteeetegga gcaetteega aacgtgeeee tegtgetgat etcgecateg etgetgteea 2641 gteeggeeag etegagaeee ceateaeee tegtgetgt gatagageg eacteateet 2701 cgaeggggaa cateatggae gaecagttee ceaagtegtt gatagagegt etttgeget 2761 cegagteaga tegaaagaet egeageaee tggegggeee eegageaee eegageae 2821 aaagateaaa catgageee gteggeatea gegtgggaee eggageaee teeteete 2821 aaagateaaa catgageee gteggageae tgeaegaea ggegaeeae teeteete 2831 eggeegeeae tggaeagee gteggageae tgeaegaea gageaeeae teeteete 2941 atteegegge catgegaeee tetggegtee aceageae gaageageae taeaaeaae 3001 ceatgtegag gageatggag ggaeeeegaa gtetgeeegt geaeagteea geatategae 3061 egeteteeaa taacageaee ttggagagga aatecegett ttegaggga tteaaeetgt	2221	acgtcagcaa	qqaqacqcct	aagagaagtc	ctgcggagca	gacccatccc	tcagacgagg
2341 tggaacgggg tgacgatcgg ctgtccgtaa cgctggcgga gatcgttcac atccgttccg 2401 tcatgaccaa ggcggagctg gagggcctgc cgatggacgt gcgcgtcaag gaggatgttg 2461 aaaagcgtcg cgtctgcttc ctgtgcctgc gcactcggtt ctcgttcttc ggtccctggg 2521 gcattcagtg caagttgtgc cagcggacgg tctgcgccaa gtgctatacc aagatgcgaa 2581 ttccctcgga gcacttccga aacgtgcccc tcgtgctgat ctcgccatcg ctgctgtcca 2641 gtccggccag ctcgagcacc ccatcaccct cccatcatgc ccagcaggcg cactcatcct 2701 cgacggggaa catcatggac gaccagttcc ccaagtcgtt gatagagcgt cttttgcgct 2761 ccgagtcaga tcgaaagact cgcagcatta gcgtgggacc cggagcatc tcctcag 2821 aaagatcaaa catgagcacg cccggcatta gcgtgggacc cggagcatc tcctccag 2821 aattccgggc catgcgaccc tctggcgtca ggcgaccatg tcgtcctca 2641 gtccgcgccac tggacagcc gtggaggcac tgcacgaca ggcgaccatg tcgtcctca 2701 cgacggggaa catcatggac gccggcatta gcgtgggacc cggagcatc tcctccag 2821 aaagatcaaa catgagcacg cccggcatta gcgtgggacc ggagcatc tcctcctcag 2831 cggccgccac tggacagcc tctggcgtc accagcag gaagcagca tacaacaacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggacccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggagagga aatccgtt ttcgaggga ttcaacctgt	2281	gcagttcaac	atcctcgctt	qqqccatqqa	acaaqtcctt	catggacaaa	cagacgtgga
2401 tcatgaccaa ggcggagctg gagggcctgc cgatggacgt gcgcgtcaag gaggatgttg 2461 aaaagcgtcg cgtctgcttc ctgtgcctgc gcactcggtt ctcgttcttc ggtccctggg 2521 gcattcagtg caagttgtgc cagcgcacgg tctgcgccaa gtgctatacc aagatgcgaa 2581 ttccctcgga gcacttccga aacgtgcccc tcgtgctgat ctcgccatcg ctgctgtcca 2641 gtccggccag ctcgagcacc ccatcaccct cccatcatgc ccagcaggcg cactcatcct 2701 cgacggggaa catcatggac gaccagttcc ccaagtcgtt gatagagcgt cttttgcgct 2761 ccgagtcaga tcgaaagact cgcagcactg tgggcagtgc cccatccta cccaagcacc 2821 aaagatcaaa catgagcacg cccggcatta gcgtgggacc cggagcatc tcctcag 2881 cggccgccac tggacagcc tctggcgtc accagcag ggcgaccatg tcgtcctcg 2941 attccgcggc catgcgacc tctggcgtc accagcag gagcagcac tacaacacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggacccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggagagga aatcccgct ttcgagggga ttcaacctgt	2341	tqqaacqqqq	tgacgatcgg	ctgtccgtaa	cqctqqcqqa	gatcgttcac	atccqttccq
2461 aaaagegteg egtetgette etgtgeetge geaeteggt etegtette ggteeetgg 2521 geatteagtg eaagttgte eagegeaeg tetgegeeaa gtgetataee aagatgegaa 2581 tteeetegga geaetteega aaegtgeeee tegtgetgat etegeeateg etgetgteea 2641 gteeggeeag etegageaee ecateaeeet eceateatge eeageaggeg eaeteateet 2701 egaeggggaa eateatggae gaeeagtee ecaagtegt gatagagegt ettttgeget 2761 eegagteaga tegaaagaet egeageaetg tgggeagtge eceateete eceaageaee 2821 aaagateaaa eatgageaeg eeeggeatta gegtgggaee eggageatee teeteeteg 2881 eggeegeeae tggaeaggee gtggaggeae tgeaegaeea ggegaeeatg tegteetegt 2941 atteegegge eatgegaee tetggegtee aceageagea gaageageae taeaaeaaeg 3001 eeatgtegag gageatggag ggaeeeegaa gtetgeeegt geaeagteea geatategae 3061 egeteteeaa taaeageaee ttggagggaa aateeegett ttegagggaa teaaeetgae	2401	tcatgaccaa	qqcqqaqctq	qaqqqcctqc	cqatqqacqt	gcgcgtcaag	gaggatgttg
2521 gcattcagtg caagttgtgc cagcgcacgg tctgcgcaa gtgctatacc aagatgcgaa 2581 ttccctcgga gcacttccga aacgtgccc tcgtgctgat ctcgccatcg ctgctgtcca 2641 gtccggccag ctcgagcacc ccatcacct cccatcatgc ccagcaggcg cactcatcct 2701 cgacggggaa catcatggac gaccagttcc ccaagtcgtt gatagagcgt cttttgcgct 2761 ccgagtcaga tcgaaagact cgcagcactg tgggcagtgc cccatcctca cccaagcacc 2821 aaagatcaaa catgagcacg cccggcatta gcgtgggacc cggagcatcc tcctcctcag 2881 cggccgccac tggacaggcc gtggaggcac tgcacgacca ggcgaccatg tcgtcctcgt 2941 attccgcggc catgcgacc tctggcgtc accagcagca gaagcagcac tacaacaacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggaccccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggaggga aatcccgct ttcgagggga ttcaacctgt	2461	aaaaqcqtcq	cqtctqcttc	ctqtqcctqc	qcactcqqtt	ctcqttcttc	qqtccctqqq
2581 ttccctcgga gcacttccga aacgtgcccc tcgtgctgat ctcgccatcg ctgctgtcca 2641 gtccggccag ctcgagcacc ccatcacct cccatcatgc ccagcaggcg cactcatcct 2701 cgacggggaa catcatggac gaccagttcc ccaagtcgtt gatagagcgt cttttgcgct 2761 ccgagtcaga tcgaaagact cgcagcactg tgggcagtgc cccatcctca cccaagcacc 2821 aaagatcaaa catgagcacg cccggcatta gcgtgggacc cggagcatcc tcctcctcag 2881 cggccgccac tggacaggcc gtggaggcac tgcacgacca ggcgaccatg tcgtcctcgt 2941 attccgcggc catgcgacc tctggcgtc accagcagca gaagcagcac tacaacaacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggaccccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggaggga aatcccgct ttcgagggga ttcaacctgt	2521	gcattcagtg	caaqttqtqc	caqcqcacqq	tctqcqccaa	gtgctatacc	aagatgcgaa
2641 gtccggccag ctcgagcacc ccatcacct cccatcatge ccagcaggeg cactcatect 2701 cgacggggaa catcatggac gaccagtte ccaagtegt gatagagegt ettttgeget 2761 cegagteaga tegaaagaet egeageaetg tgggeagtge eccateetea eccaageaee 2821 aaagateaaa catgageaeg eeeggeatta gegtgggaee eggageatee teeteeteag 2881 eggeegeeae tggacaggee gtggaggeae tgeaegaeea ggegaeeatg tegteetegt 2941 atteegegge eatgegaeee tetggegtee accageagea gaageageae taeaaeaaeg 3001 ceatgtegag gageatggag ggaeeeegaa gtetgeeegt geaeagteea geatategae 3061 egeteteeaa taacageaee ttggagagga aateeeget ttegagggga tteaaeetgt	2581	ttccctcqqa	gcacttccga	aacqtqcccc	tcqtqctqat	ctcqccatcq	ctgctgtcca
2701 cgacggggaa catcatggac gaccagttcc ccaagtcgtt gatagagcgt cttttgcgct 2761 ccgagtcaga tcgaaagact cgcagcactg tgggcagtgc cccatcetea eccaageace 2821 aaagatcaaa catgageacg eccggeatta gegtgggaee eggageatee teeteete 2881 eggeegeeae tggacaggee gtggaggeae tgeaegaeea ggegaeeatg tegteetegt 2941 atteegegge eatgegaeee tetggegtee aceageagea gaageageae taeaaeaeg 3001 ceatgtegag gageatggag ggaeeegaa gtetgeeegt geaeagteea geatategae 3061 egeteteeaa taaeageaee ttggaggga aateeegett ttegagggga tteaaeetgt	2641	gtccggccag	ctcgagcacc	ccatcaccct	cccatcatqc	ccaqcaqqcq	cactcatcct
2761 ccgagtcaga tcgaaagact cgcagcactg tgggcagtgc cccatcctca cccaagcacc 2821 aaagatcaaa catgagcacg cccggcatta gcgtgggacc cggagcatcc tcctcctcag 2881 cggccgccac tggacaggcc gtggaggcac tgcacgacca ggcgaccatg tcgtcctcgt 2941 attccgcggc catgcgaccc tctggcgtcc accagcagca gaagcagcac tacaacaacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggaccccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggaggga aatcccgctt ttcgagggga ttcaacctgt	2701	cgacqqqqaa	catcatqqac	gaccagttcc	ccaaqtcqtt	gatagagcqt	cttttgcqct
2821 aaagatcaaa catgagcacg cccggcatta gcgtgggacc cggagcatcc tcctcctcag 2881 cggccgccac tggacaggcc gtggaggcac tgcacgacca ggcgaccatg tcgtcctcgt 2941 attccgcggc catgcgaccc tctggcgtcc accagcagca gaagcagcac tacaacaacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggaccccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggagagga aatcccgctt ttcgagggga ttcaacctgt	2761	ccgagtcaga	tcgaaagact	cqcaqcactq	tadacadtac	cccatcctca	cccaaqcacc
2881 cggccgccac tggacaggcc gtggaggcac tgcacgacca ggcgaccatg tcgtcctcgt 2941 attccgcggc catgcgaccc tctggcgtcc accagcagca gaagcagcac tacaacaacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggaccccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggagagga aatcccgctt ttcgagggga ttcaacctgt	2821	aaagatcaaa	catgagcacg	cccggcatta	qcqtqqqacc	cggagcatcc	tcctcctcaq
2941 attccgcggc catgcgaccc tctggcgtcc accagcagca gaagcagcac tacaacaacg 3001 ccatgtcgag gagcatggag ggaccccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggagagga aatcccgctt ttcgagggga ttcaacctgt	2881	cqqccqccac	tggacaggcc	gtggaggcac	tgcacgacca	ggcgaccatg	tcqtcctcat
3001 ccatgtcgag gagcatggag ggaccccgaa gtctgcccgt gcacagtcca gcatatcgac 3061 cgctctccaa taacagcacc ttggagagga aatcccgctt ttcgaggggga ttcaacctgt	2941	attccgcggc	catgcgaccc	tctggcgtcc	accagcagca	gaagcaqcac	tacaacaacq
3061 cgctctccaa taacagcacc ttggagagga aatcccgctt ttcgagggga ttcaacctgt	3001	ccatgtcgag	qaqcatqqaq	qqaccccqaa	gtctgcccat	gcacaqtcca	gcatatcqac
	3061	cgctctccaa	taacagcacc	ttggagagga	aatcccgctt	ttcgagggga	ttcaacctgt

3121	tctcctcggg	cagccatctt	gcccagacgc	aggagcaaaa	ggagaacctg	cgcggcgagc
3181	aggtgaccgt	gtgcaacgac	tgccagggac	tggtcaacga	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	aaatcgtgtt	agtctagtga
3661	ataagcagag	gagaataccg	agaattcctg	gctgaagctt	tgtacatttt	ctgccggcta
3721	cagagagatc	cgcttgagcg	caccccacca	ctttctattt	ataaaggagc	taacttacac
3781	gtcgctacac	attatattat	cgcagatcgc	aacgcgatgc	cgttgtttat	aactgttcaa
3841	agtatgcgta	aaagttgatt	aagtacatgt	aatcataact	cttgtatccg	catatatcaa
3901	atgcacatat	attcgacctt	acttgtaccc	tgctcctgca	ttcgtttcag	cacgagcgac
3961	gtattgatca	tacagaatac	atcgatattc	gcaatacgat	tcccagttca	gaaaaaaaaa
4021	atttcgattg	ttgaaatagt	tatccgaaaa	tgttgtgaaa	cttttgtgct	tgcgcagatc
4081	tttgtttacg	ttgtgaagtt	ttcgttttgt	tcccctatta	actacaatgt	caatgtataa
4141	cgcaagaact	acttgatagc	ctaatttaat	tttagtcggc	gttgctatgc	agcccaaact
4201	atttagttaa	ttcgcttagt	tttaattctc	cctaagtgcg	tctaagttgt	aagcgacgtc
4261	tatataattg	tacaagctga	tgatgcaaag	caaaccccta	acgaacatta	tattacctaa
4321	ttgtagctgc	tattatagtt	tttctaaccg	tttttgaaca	attttgtttg	atttatctgt
4381	aattgtaaat	gcatttaagt	acttgtaata	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; Euteleosto-
	mi; 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	14989
	/organism="Homo sapiens"
	/db_xref="taxon:9606"
	/chromosome="18p11.2"
	/sex="male"
	/tissue_type="brain,testis"
	/dev_stage="adult"
gene	
~~~~	/gene="Spir-1"
CDS	
	/gene="Spir-1"
	/function="actin reorganisation"
/codon_start=1
/product="Spir-1 protein"
/protein_id="CAB96370.1"
/db xref="GI:8920230"

/translation="TEVIXSLXIIIYKALDYGLKENEERELSPPLEOLIXHMANTVEA

DGSNDEGYXAAEEGLGDEDEKRKISAIRSYRDVMKLCAAHLPTESDAPNHYOAVCRAL FAETMELHTFLTKIKSAKENLKKIQEMEKSDESSTDLEELKNADWARFWVQVMRDLRN GVKLKKVQERQYNPLPIEYQLTPYEMLMDDIRCKRYTLRKVMVNGDIPPRLKKSAHEI ILDFIRSRPPLNPVSARKLKPTPPRPRSLHERILEEIKAERKLRPVSPEEIRRSRLDV TTPESTKNLVESSMVNGGLTSQTKENGLSTSQQVPAQRKKLLRAPTLAELDSSESEEE TLHKSTSSSSVSPSFPEEPVLEAVSTRKKPPKFLPISSTPQPERRQPPQRRHSIEKET PTNVRQFLPPSRQSSRSLEEFCYPVECLALTVEEVMHIRQVLVKAELEKYQQYKDIYT ALKKGKLCFCCRTRRFSFFTWSYTCQFCKRPVCSQCCKKMRLPSKPYSTLPIFSLGPS ALQRGESSMRSEKPSTAHHRPLRSIARFSSKSKSMDKSDEELQFPKELMEDWSTMEVC VDCKKFISEIISSSRRSLVLANKRARLKRKTQSFYMSSPGPSEYCPSERTISEI" 1474 a 1028 c 1077 g 1405 t 5 others BASE COUNT ORIGIN 1 acagaggtca ttnantcttt ggnaattatt atttataaag cactggacta tggtttgaag 61 gagaatgaag aaagggaatt aagccctccc ctagagcagc ttatcgntca catggccaac 121 acggtggaag ctgacggtag caatgatgag ggctatnagg ctgcagaaga aggcctggga 181 gatgaagatg aaaagagaaa aatctcagct attcggtcat atagagatgt catgaagttg 241 tqtqctqctc atctccctac tqaatcaqat qcaccaaatc attatcaqqc aqtatqtcqt 301 gcactgtttg cagaaacaat ggagctccat acatttctga ccaaaattaa gagtgcgaaa 361 gagaatctta agaagattca agaaatggaa aagagcgatg aatctagcac agacttggaa 421 gagetgaaaa acgetgaetg ggeacgatte tgggtaeagg tgatgaggga tttgaggaat 481 ggggtaaaac ttaagaaggt ccaagagcgg cagtacaacc ctttgcccat tgaatatcag 541 ctcacccctt atgagatgtt aatggatgac attcgctgca aaagatacac cttgcgaaaa 601 qtqatggtga atggtgatat tccccctcgg ttaaaaaaga gtgctcatga aatcatcctc 661 gacttcatca gatccagacc tcctttaaat ccagtctcag ccagaaaact gaaaccaact 721 ccaccacqqc cacqqaqcct ccatqaaaqa atattaqaaq aaattaaaqc aqaaaqaaaq 781 ctgcggcctg tatcaccaga ggagattaga cgtagcagat tagatgtgac tacccctgaa 841 tctacaaaga atcttgtgga gtcatctatg gtgaatggag gtttgacatc acaaacaaaa 901 gaaaacgggt taagtacctc acagcaggtg cctgcacagc ggaagaagct cctcagagcc 961 ccaactctgg ccgaactgga cagctctgag tctgaggaag aaacgctgca caagtcgacc 1021 agcagcagca gcgtgtctcc ctctttccct gaagagccag tcctggaggc cgtgtccaca 1081 aggaagaagc ctccaaaatt cctgcccata tcatcaacac cccagccaga gagacggcag 1141 ccaccccaga gacgacattc cattgaaaag gaaacgccta ctaacgtgag gcagttcctg 1201 ccgccttcca ggcagagttc ccgctctctt gaggaattct gctacccagt ggaatgcctc 1261 gctcttactg tggaagaagt gatgcatatt cgccaggtcc tggtgaaggc agagctggaa 1321 aaataccaac agtataaaga catctacacc gccttgaaaa aaggaaagct ctgcttttgt 1381 tgccgaacca ggaggttttc cttcttcact tggtcttata cctgtcagtt ctgtaagagg 1441 ccggtgtgct cacagtgttg caaaaagatg cggctgccct ccaaaccata ctccactctt 1501 cctatctttt cattgggacc ttctgctctg caaagagggg aaagtagtat gaggtcagaa 1561 aaacceteca etgeceatea teggecaett eggageattg eeaggttete etcaaaatet 1621 aagtetatgg acaaateaga tgaagaacte cagttteeca aagagttgat ggaggaetgg 1681 agcaccatgg aggtgtgtgt ggactgcaag aagttcattt cggaaatcat cagttcaagc 1741 cggcgcagtc tggtgttggc caacaaaagg gcccgattga aaaggaaaac gcagtctttc 1801 tacatgteet egecaggeee eteggagtae tgeeetteag agaggaegat eagtgagate 1861 tgagcctcgt gcctttcagc tgcttttgtg ctacgagtca gcgtccgtgc gcgaggacac 1921 tgagccgggc tggctctcct ttctgtggtt ttatttaatg ggcttgaatt tgcattagat 1981 cagatttttg ccgcatcaca ttgttccaca gactgaatgc tgtgttcgta tcgattgatg 2041 aaacgtgaca ggtccgccaa ttgctcgttt gcactgagag aggacaacag tttgaaactt 2101 acttttgtgt gtgtgtggct ttggaagcca gtagctactt ccttagttca gttctttact 2161 gttcctcgaa taatctcctg actaaggcaa aaaaaaaag cttctcctac gagaatcagt 2221 ctaacagaga tgccgatgtc agcacagccc taagcagtaa gtcatattgg catttccacg 2281 tgactgtgtt tctatcccgt gtacagagag atccagagcc ctacactcca cgacctgggg 2341 gctcacagca cagaacctag aagcacctgc tgacactctt caactgattt ttaaatgttg 2401 ttgcttggag ataaaaatta cataagggac tttttgcctg cattctagtg caaaacatct 2461 gaagagetgt acaeceacaa gggtgactat tteeeetgag tggeegtgtt gteeeagtge 2521 cctggttcag tgtctcctga gtggatgaca ggtcttcatt ctctatcttg aatgtattat 2581 ggttactaat agttttataa tggaggtcta agaattaaag ttgtgtggga gtttcaggac 2641 aaaggaaggc taaaagtttg tcaagacgtt gagcgtattt tggttaccta tgagaagggt

2701	tgtgacagtg	tacagtggca	gctgttggcc	acgctgcaga	aatgagctgg	agctcatggg
2761	ttttcagcta	catttttcat	aactttgtag	tacatccatc	ttgagtaaat	taagccacaa
2821	tttggtacct	agggtctcaa	actaaaattt	attttataa	atgaatttta	aaagaaaaaa
2881	tatctacttc	ttttaaagtt	agaagaaaat	taacctgctg	acaggcaaca	tttttggggt
2941	gctttctgca	ctagttttcc	ttgtaaatga	tttgagtgag	taggtttggt	ttctgacgaa
3001	agtagactgg	agggtagcat	tgtatgcctc	aaatgtctca	gtgtgtttgg	ctcatacgtg
3061	ggctatactt	tattatttg	gtatgcttac	aaatgactaa	ccaatcaaat	tgtcattaat
3121	gtttggaaaa	tctgttaatg	cacatgcaca	ataatttcct	gaaagccata	ggacatgtct
3181	gtagtcagca	ccacgatagc	accgtttcat	gaaaggcatg	gcggctgcat	ttcataccac
3241	atcaaaatac	agtaacattt	ctatactaaa	ttaacagtaa	tacctcaaaa	ctgctccggt
3301	agtagttttt	aatggattga	aatttacagt	ttagtaaaag	gcttaaaatt	acttatactt
3361	atgaaataaa	ctttaccagt	tgactaaaat	aatgcatgtt	aacagttggt	ctgtatttgc
3421	atgtaaaagt	gggccaccag	agaaccctta	ttgattactt	aagtgtttac	attatttaa
3481	agactcctgt	ttaagagctt	tcagaattgt	actgggtgaa	tctcatttat	aaaacttcct
3541	aagagactat	ctgaactcta	tactccagac	agttaggtgg	gagtataaat	ctaccccttt
3601	tgatgacccc	aggcttgagt	ttttaaaatg	actacccaga	agggcacaag	ggggaaggaa
3661	atggtatttg	tatatgtata	taaatatgca	cctaggagaa	tgtgctttt	aaaataatga
3721	ctactgtttt	tattaaaaca	taagaaacta	cacccccaaa	ataagacttt	cattcacatt
3781	cacaaagcaa	acatctagta	catgtctttc	acttcacttt	atgatagtgt	attggatgat
3841	ttgggcatta	cgatcacctc	ttaccacagc	acagaacata	cattcttcaa	cagcattaac
3901	ggagtttgcc	aagtgcatta	aagaggtcac	gtggagggta	cgttcatatg	aaacaatctg
3961	cagaaagtgg	ggtaagaaag	ggcacatggc	acagttaaag	ttgtagaaat	caaattacta
4021	tcatttttg	ttgccaaaac	aaagtcttac	atttaacccc	cctttctacc	acccccctc
4081	cacacttcac	gtcagctaca	tagtttccac	agggtaattc	actaagagct	tgtggagctt
4141	ggttttaaaa	tccttagcct	ggtctgactt	taggcatagc	ttccagttct	tccttccttg
4201	tcctggtttc	ttgttcagct	tttacttcta	atccaacaac	aaaagaaatg	tctggctggt
4261	ctcagctaga	gtctgatgtg	tcttagagca	tgtgtgcgta	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	gggaattaac	tctcccaagg	caagtgaaaa	tgaatgattg	acgtacgttg
4561	atttaacaat	cttactagat	tttaattctt	aaggatttca	aatgaaacca	gaaggtggtt
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.

## Curiculum vitae

Name : Geboren am: Familienstand : Anschriftt:	Ines Maria Otto 29.09.1968 in Zwickau ledig Rudolf-Clausius-Strasse 55a , 97080 Würzburg Tel.: 0931/9701182 email: <u>ines.otto@mail.uni-wuerzburg.de</u>
Schulausbildung	
1975-1983 1983-1987 1987	Grundschule Ebersbrunn Gerhart-Hauptmann-Gymnasium Zwickau Abitur
Hochschulstudium	und Dissertation
1987-1988 1988-1994	Vorpraktikum am Bezirkskrankenhaus Heinrich-Braun Zwickau 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 1996	AIP, Klinik Rheinfelden, Schweiz Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg "Verlaufsbeobachtungen und dopplersonografische Kontrolle nach Carotis-Interna-Thrombarteriektomie"
Beruflicher Werde	gang
1996-1997 1997	Pathologisches Institut Kantonsspital Basel Postgraduate course in molecular biology, Department für

1997	Postgraduate course in molecular biology, Department für				
	kiinisch-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 Strahlen-				
	kunde 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				

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 organisators 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 Controll 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