

**Funktionelle Untersuchungen zur Regulation der Protein
Kinase CK2 durch Polyamine in *Drosophila melanogaster* und
deren physiologische Bedeutung**

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

vorgelegt von

Felix Stark
aus München

Würzburg 2011

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Raabe

Zweitgutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die hier vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Felix Stark

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Die Proteinkinase CK2	1
1.2 Regulation der Proteinkinase CK2	2
1.3 Synthese und Funktion von Polyaminen	4
1.4 Mitogen aktivierte Protein Kinasen Signalwege	7
1.5 Regulation des MAPK-Signalwegs durch Gerüstproteine	10
1.6 Ziele dieser Arbeit	12

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Inhibitoren	14
2.1.3 Puffer und Medien	14
2.1.3.1 Puffer für GST-Proteinaufreinigungen	16
2.1.3.2 Puffer für Antikörperkopplung	16
2.1.3.3 Lysepuffer	17
2.1.4 Enzyme	17
2.1.5 Kits	18
2.1.6 Primer	18
2.1.7 Plasmide	19
2.1.8 Fliegenstämme	20
2.1.9 Bakterienstämme	20
2.1.10 Antikörper	20

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1 Restriktionsverdau von DNS	21
2.2.1.2 Ligation von DNS	21
2.2.1.3 Transformation von DNS	21
2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion	22

2.2.1.5 Überprüfung der Genexpression in Schneider S2 Zellen	23
2.2.1.6 DNS-Sequenzierung	23
2.2.2 Zellkultur	23
2.2.2.1 Kultivierung von Schneider S2 Zellen	23
2.2.2.2 Herstellung stabiler Zelllinien	24
2.2.2.3 Behandlung von Zellen	24
2.2.2.4 Serum-Stimulation von Zellen	24
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	25
2.2.3.1 Herstellung von Zellysaten	25
2.2.3.2 Proteinaufreinigung	25
2.2.3.3 Antikörperherstellung	26
2.2.3.4 Antikörperkopplung	26
2.2.3.5 Co-Immunpräzipitation	27
2.2.3.6 Überprüfung der Kinaseaktivität <i>in vitro</i>	27
2.2.3.7 Immunoblot	28
2.2.3.8 Massenspektrometrische Untersuchungen	28
2.2.4 Fliegenhaltung	29
2.2.4.1 Fütterungsexperimente	29
3. Ergebnisse	
3.1 DCK2 ist Teil des DKSR Komplexes und phosphoryliert DRaf	31
3.1.1 DCK2 interagiert mit DKSR und vermittelt die Phosphorylierung von GST-DRaf	31
3.1.2 DCK2 phosphoryliert DRaf, aber nicht DERk	37
3.2 Polyaminabhängige Phosphorylierung von DRaf durch DCK2	39
3.2.1 Spermin inhibiert die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2	39
3.2.2 Putrescin und Spermidin wirken nicht inhibitorisch auf die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2	41
3.2.3 Der Einfluss von Polyaminen auf die DRaf-Phosphorylierung ist unabhängig vom Phosphatgruppennonor	43

3.3 Wirkungen von Polyaminen in Zellen	44
3.3.1 Spermin wirkt inhibitorisch auf den MAPK-Signalweg	44
3.3.2 Die Relation der Polyamine zueinander ist ausschlaggebend für die Signalstärke des MAPK-Signalwegs	45
3.4 Identifizierung der DCK2-Phosphorylierungsstelle in DRaf	47
3.4.1 Massenspektrometrische Untersuchung möglicher Phosphorylierungsstellen in DRaf	48
3.4.2 Serin 11 von DRaf wird durch DCK2 phosphoryliert	50
3.4.3 Bedeutung von Serin 11 in DRaf für den MAPK-Signalweg	52
3.5 Wirkungen von Polyaminen in <i>Drosophila</i>	53
3.5.1 Polyamine sind spezifische Regulatoren des MAPK-Signalwegs <i>in vivo</i>	53
3.5.2 Die Überexpression eines DCK2β-Proteins mit mutierter saurer Schleife interferiert mit der polyaminabhängigen Regulation des MAPK-Signalwegs	55
3.5.3 Die polyaminabhängige Steuerung des MAPK-Signalwegs ist abhängig von der DCK2 Kinaseaktivität	57
4. Diskussion	
4.1 DCK2 ist Teil des DKSR-Komplexes und phosphoryliert DRaf an Serin 11	60
4.2 Polyaminabhängige Steuerung von DCK2 und deren physiologische Bedeutung	67
5. Zusammenfassung	75
6. Summary	77
7. Literaturverzeichnis	78

8. Danksagung	85
9. Lebenslauf	86
10. Publikationen	87
11. Abkürzungsverzeichnis	88

1. Einleitung

1.1 Die Proteinkinase CK2

Die Charakterisierung der Proteinkinase CK2 begann bereits im Jahre 1954, als die sogenannten Protein(phospho)kinase-Aktivitäten von CK1 und CK2 erstmals beschrieben wurden. Zu dieser Zeit konnte die Phosphorylierung des artifiziellen Substrates Casein durch Leberextrakte beobachtet werden (Burnett und Kennedy, 1954). Die Entdeckung physiologischer Substrate verlief zunächst schleppend, doch im Jahre 2003 waren bereits mehr als 300 identifiziert (Meggio und Pinna, 2003). CK2 phosphoryliert überwiegend Serin- und Threoninreste innerhalb saurer Aminosäuresequenzen, wobei eine negative Ladung an der Position +3 in nahezu 90 % und an Position +1 in 75 % der Fälle vorhanden ist (Pinna, 2002). Die Phosphorylierung kann aber, beispielsweise durch das Vorhandensein positiver Ladungen in unmittelbarer Nähe, unterdrückt werden. Besonders kritisch sind dabei die Positionen -1 bis +4 bezüglich der potentiellen Phosphorylierungsstelle.

Bei einer kürzlich durchgeführten Weblogo Phosphoproteomanalyse wurden 433 überprüfte CK2 Phosphorylierungsstellen benutzt, um eine genauere Beschreibung der Konsensussequenz vorzunehmen (Programm zugänglich unter <http://weblogo.berkeley.edu/>). Von 10899 bekannten Phosphorylierungsstellen im menschlichen Phosphoproteom wurden 2275, mit wenigen möglichen Ausnahmen, als wahrscheinliche CK2 Substrate bestätigt. Die anschließende Überprüfung von acht zufällig ausgewählten Phosphorylierungsstellen führte ausschließlich zu positiven Ergebnissen (Salvi et al., 2009). Damit liegt der vorhergesagte Anteil von durch CK2 vermittelten Phosphorylierungen des menschlichen Proteoms bei 20,9 %. Eine Besonderheit von CK2 bei der Phosphorylierung von Substraten ist ihre Fähigkeit neben ATP auch GTP als Phosphatgruppdonor benutzen zu können (Pinna, 1990).

Die Proteinkinase CK2 liegt in der Zelle überwiegend als heterotetrameres Holoenzym vor, das aus zwei katalytischen α - und zwei regulatorischen β -Untereinheiten besteht (Abbildung 1). Die Bildung des Holoenzym erfolgt durch Dimerisierung der β -Untereinheiten nach Bindung von jeweils einem Zn^{2+} -Ion durch vier Cystein-Reste, die einen Zink-Finger ausbilden. Anschließend können die katalytischen Untereinheiten an das CK2 \square -Dimer binden (Chantalat et al., 1999). CK2 ist nachweislich an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Proliferation, Überleben der Zelle und Differenzierung beteiligt. In Krebszellen wurden einige Auswirkungen von CK2 beobachtet. So ist in allen überprüften Tumoren die Expression von CK2 erhöht (Trembley et al., 2009). Zudem wirkt CK2 einerseits positiv auf das Voranschreiten der einzelnen Zellzyklusphasen und

andererseits antiapoptotisch (St-Denis & Litchfield, 2009). Am Beispiel der Inhibition der Apoptose sollen hier einige Mechanismen von CK2 beschrieben werden. Die Konsensussequenz zur Phosphorylierung durch CK2 ähnelt der Konsensussequenz zur Spaltung durch Caspasen, welche Apoptose durch Degradation von Proteinen einleiten. Die Phosphorylierung verschiedener Proteine führt zu einer veränderten Ladung, wodurch die Spaltung verhindert wird (Litchfield, 2003). Zusätzlich verhindert die Phosphorylierung der Caspase 9 durch CK2 deren Aktivierung durch Caspase 8 (McDonnell et al., 2008). CK2 phosphoryliert außerdem Caspase 2 und verhindert dadurch deren Dimerisierung und Aktivierung (Shin et al., 2005).

In der Zelle kann CK2 sowohl an der Plasmamembran als auch im Cytoplasma, im Zellkern, an Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Reticulum oder mit dem Cytoskelett assoziiert vorliegen (Faust und Montenarh, 2000). Aufgrund ihrer Lokalisation und der großen Diversität ihrer Substrate wird vermutet, dass die grosse Mehrzahl physiologischer Prozesse durch CK2 mitbestimmt wird. Dafür spricht auch, dass die CK2 Untereinheiten β und α ubiquitär in eukaryontischen Zellen vorkommen, hoch konserviert und essentiell in beispielsweise *Drosophila melanogaster* (CK2 β) und *Mus musculus* (CK2 β /CK2 α) sind (Jauch et al., 2002; Buchou et al., 2003; Lin et al., 2002).

Bezüglich ihrer Wirkung innerhalb von Signalwegen nimmt CK2 eine Sonderstellung ein. Die meisten Proteinkinasen erfüllen ihre Funktion als Teile einer hierarchisch organisierten Signalübertragungskaskade. Im Vergleich dazu scheint CK2 eher modulierende Aufgaben zu übernehmen (Meggio et al., 2003) und verschiedene Signalwege miteinander zu vernetzen (Pinna und Allende, 2009).

1.2 Regulation der Proteinkinase CK2

Die funktionelle Vielfalt von CK2 bezüglich zellulärer Funktionen führt zu der Frage wie diese Kinase reguliert wird, um in Zellen unterschiedlicher Gewebe und Entwicklungsstadien spezifische Reaktionen einzuleiten. Sowohl CK2 α als auch das CK2 Holoenzym besitzen eine konstitutive Kinaseaktivität (Pinna et al., 2003), die im Gegensatz zu vielen anderen Kinasen unabhängig von regulatorischen Botenstoffen („second messengers“) wie Nucleosidmonophosphaten oder Ca²⁺/Calmodulin ist. Das Holoenzym wird dennoch durch eine Vielzahl von Mechanismen in seiner Kinaseaktivität reguliert (Litchfield, 2003). Dazu gehören Lokalisation, Expressionsstärke, Bildung des Holoenzym, kovalente Modifikationen der Kinase sowie deren Interaktion mit Proteinen und anderen Molekülen. Auch eine indirekte Stimulation von CK2 durch verschiedene Wachstumsfaktoren konnte gezeigt werden (z.B. Sommercorn et

Einleitung

al., 1987; Ackerman und Osheroff, 1989). Für das Holoenzym wurde außerdem die reversible Bildung von Aggregaten *in vitro* beschrieben, deren Stabilität hauptsächlich durch ionische Interaktionen zwischen benachbarten Holoenzymen zustande kommt und Einfluss auf die Kinaseaktivität von CK2 hat (zusammengefasst in Niefind und Issinger, 2005).

Eine bedeutende Rolle bei der Regulation von CK2 spielen deren β -Untereinheiten, welche abhängig vom Substrat sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Kinaseaktivität wirken können (Pinna und Allende, 2009). Eine Möglichkeit zur kontrollierten Substratphosphorylierung liegt in der Lokalisation der Kinase bzw. deren Assoziation mit Substraten. Im Fall der Assoziation mit den Substratproteinen Topoisomerase II und p53 konnte gezeigt werden, dass CK2 β für die Bildung stabiler Komplexe mit CK2 α notwendig ist (Bojanowski et al., 1993; Filhol et al., 1992). Daneben kann CK2 β die Stabilität von CK2 α gegenüber Hitze und Proteolyse erhöhen (Rodriguez et al., 2008). Eine wichtige Rolle bei der Regulation von CK2 durch CK2 β spielt eine saure Schleifen-Region der β -Untereinheit (Abbildungen 1 und 2).

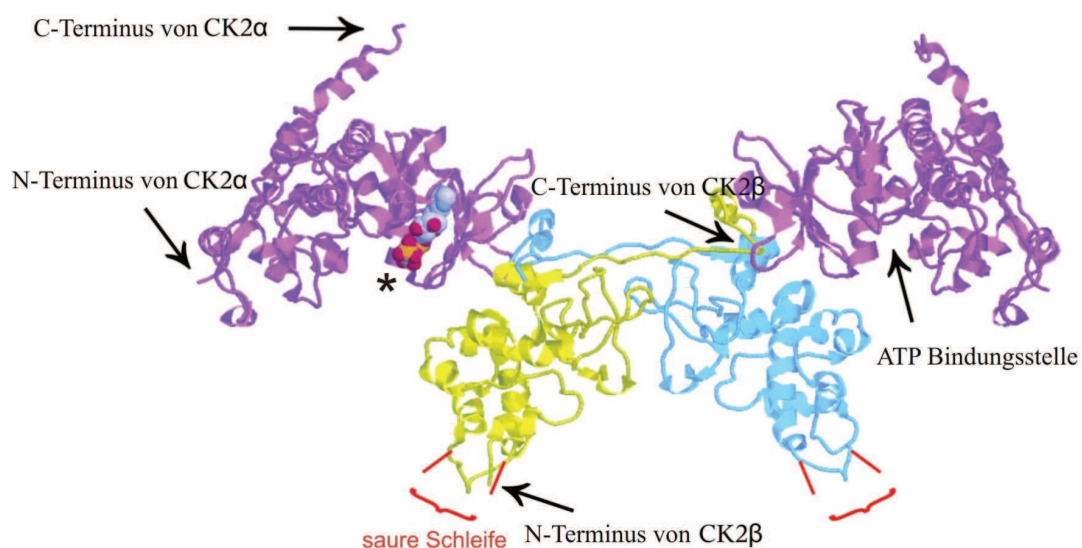


Abbildung 1) Schleifendiagramm des heterotetrameren CK2 Holoenzym. CK2 α -Untereinheiten (lila); CK2 β -Untereinheiten (gelb/ blau); Position der sauren Schleife (rot); „*“: Lage des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogs AMPPNP (Adenosin 5'-[β , γ -imido]triphosphat; (verändert nach Litchfield et al., 2003).

Strukturell zeichnet sich dieser Bereich durch seine für CK2 einzigartig hohe Flexibilität aus (Niefind et al., 2009) und ist wie das ganze CK2 β Protein hoch konserviert (Abbildung 2). Die saure Schleife besteht überwiegend aus sauren Aminosäuren, an die positiv geladene

Polyamine binden können. Diese Bindung ist abhängig von pH-Wert und Ionenkonzentration, wie es für eine ionische Bindung zu erwarten ist, und konnte auf die Aminosäuren 51-80 von CK2 β eingegrenzt werden (Leroy et al., 1997a/b). Die Bindung des längsten Polyamins Spermin verändert die Konformation des CK2 Holoenzym und erhöht dessen Kinaseaktivität bezüglich des Substrates Casein *in vitro* um das siebenfache.

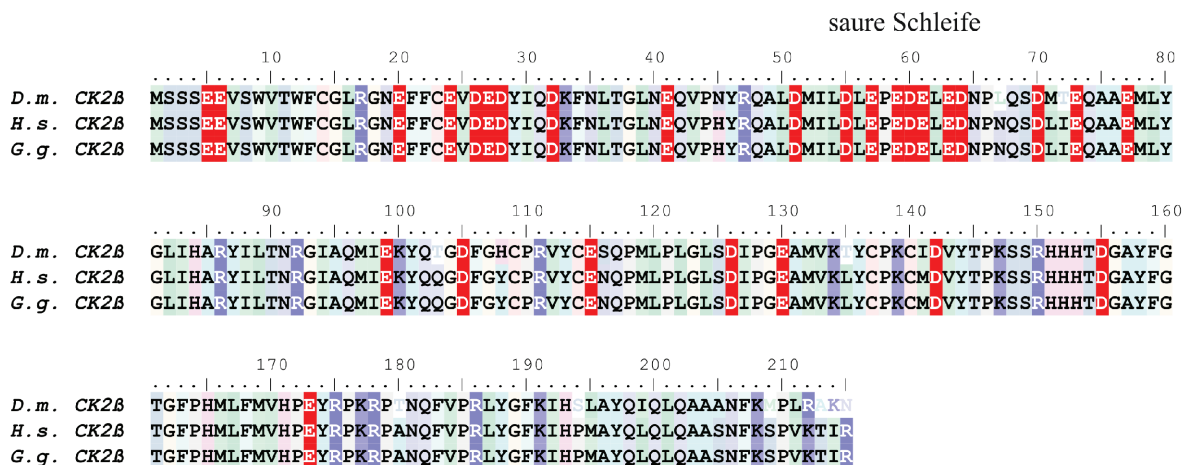


Abbildung 2) CK2 β Aminosäuresequenzen im Vergleich. *Drosophila melanogaster* (*D.m.*), *Homo sapiens* (*H.s.*) und *Gallus gallus* (*G.g.*); die saure Schleife erstreckt sich über die Aminosäuren 51– 80 und enthält mehrere saure (in rot) Aspartat- (D) und Glutamatreste (E).

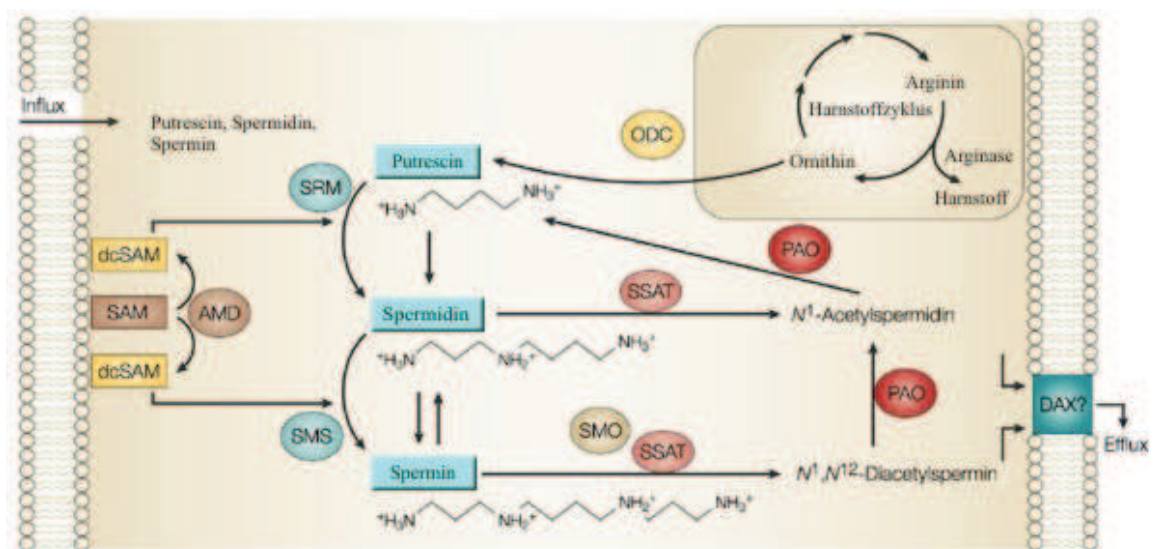
1.3 Synthese und Funktion von Polyaminen

Polyamine sind aliphatische Polykationen, die ubiquitär in Prokaryoten und Eukaryoten vorkommen (zusammengefasst in Gerner und Meyskens, 2004). Ihre Entdeckung geht auf van Leeuwenhoek zurück, der 1678 Spermin-Kristalle in Samenflüssigkeit entdeckte. Polyamine können von Organismen über die Nahrung aufgenommen werden und vom extrazellulären Medium in die Zelle transportiert werden. Man geht aber davon aus, dass der überwiegende Teil der Polyamine in der Zelle synthetisiert wird.

Die Polyaminsynthese ist an den Aminosäurekatabolismus gekoppelt und wird durch eine große Anzahl beteiligter Enzyme genau reguliert. Die im Harnstoffzyklus entstehende Aminosäure Ornithin wird in einem ersten Schritt durch das Enzym Ornithin Decarboxylase (ODC) zu dem Diamin Putrescin umgewandelt (Polyaminstoffwechsel siehe Abbildung 3). Spermidin und Spermin werden anschließend schrittweise durch das Anfügen je einer Aminopropylgruppe durch Spermidin- bzw. Sperminsynthese (SRM bzw. SMS) synthetisiert. Die dabei verwendete

Einleitung

Aminopropylgruppe wird von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin übertragen (dcSAM), welches aus S-Adenosylmethionin (SAM) durch S-Adenosylmethionin Decarboxylase (AMD) entsteht. Die Acetylierung von Spermidin und Spermin durch Spermidin/Spermin N¹-Acetyltransferase (SSAT) ermöglicht deren Export aus der Zelle durch den Diamin Exporter (DAX). N¹,N¹²-Diacetylspermin kann aber auch durch eine Polyamin Oxidase (PAO) schrittweise in Putrescin umgewandelt werden. Nichtacetyliertes Spermin kann durch das Enzym Spermin Oxidase (SMO) oxidiert werden. Die physiologische Bedeutung davon ist allerdings unklar.



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 3) Polyaminmetabolismus in der Zelle. Ornithin Decarboxylase (ODC), Spermidin- bzw. Sperminsynthase (SRM bzw. SMS), S-Adenosylmethionin Decarboxylase (AMD), decarboxyliertes S-Adenosylmethionin (dcSAM), S-Adenosylmethionin (SAM), Spermidin/Spermin N¹-Acetyltransferase (SSAT), Diamin Exporter (DAX), Polyamin Oxidase (PAO), Spermin Oxidase (SMO), Beschreibung siehe Text, (verändert nach: Gerner und Meyskens, 2004).

Das Schlüsselenzym der Polyaminsynthese ODC ist essentiell und ihr Verlust führt zu früher Letalität bei Mausembryonen (Pendeville et al., 2001). Für eine strikte aber adaptive Regulation des Polyaminstoffwechsels bietet sich die Modulation dieses Enzyms, das die Zufuhr des ersten Polyamins Putrescin regelt, besonders an. Es konnte gezeigt werden, dass die ODC Menge in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Oncogenen und Polyaminmengen verändert werden kann. Die Menge zellulären ODC-Proteins wird durch Regulation von Transkription und Translation sowie durch Degradation des Enzyms reguliert (zusammengefasst in Pegg, 2006).

Einleitung

Die Degradation von ODC wird wesentlich durch Antizym beeinflusst, welches damit indirekt zur Abnahme zellulärer Polyaminmengen führt. Für die Translation funktionellen Antizyms ist eine Leserasterverschiebung notwendig, die durch hohe Polyamintiter stimuliert wird. Antizym (AZ) verstärkt die Bindung von ODC-Monomeren an das 26 S Proteasom, wodurch die Bildung des enzymatisch aktiven Dimers verhindert und ODC abgebaut wird (Abbildung 4). Die durch ODC eingeleitete Polyaminsynthese führt also bei hohen Titern zu deren eigener Inhibition. Alternativ kann Antizym-Inhibitor (AZIN) an Antizym binden, wodurch der Abbau von ODC verhindert wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Antizym die zelluläre Polyaminaufnahme durch ein noch nicht vollständig charakterisiertes Transportsystem (Polyamin transporter) inhibiert.

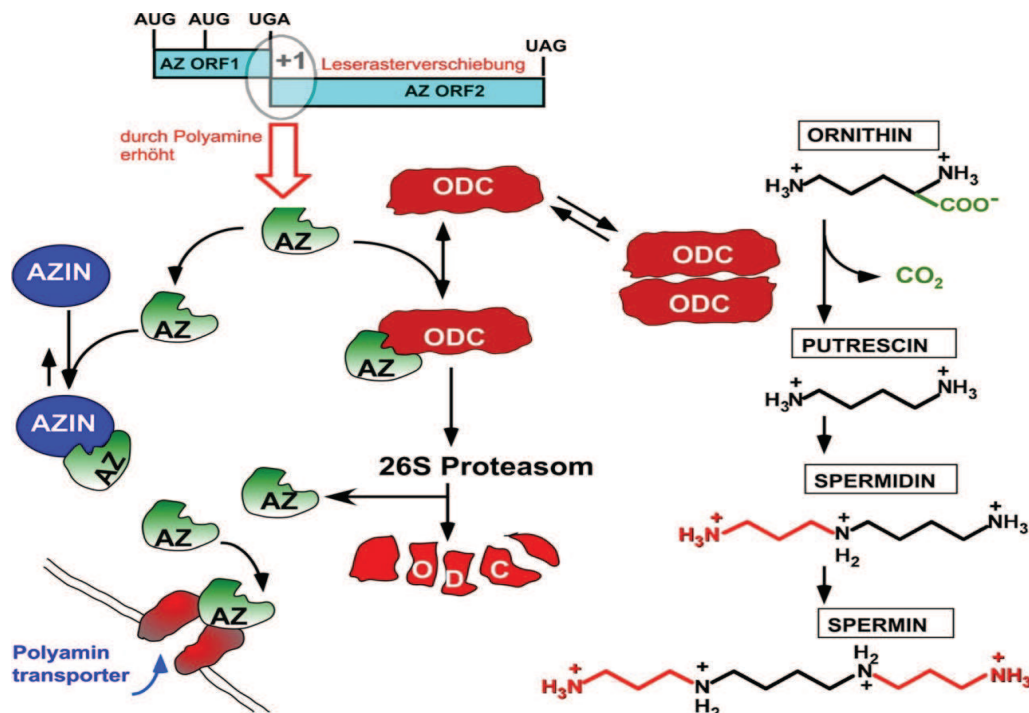


Abbildung 4) Wirkungsweise von Antizym. Hohe Polyamintiter führen zur Expression von Antizym (AZ) durch Ermöglichen der für die Translation nötigen Leserasterverschiebung; Antizym bindet an ODC Monomere und leitet deren Degradation durch das 26 S Proteasom ein; Antizym blockiert auch die Polyaminaufnahme der Zelle durch einen Polyamin Transporter und kann durch einen Antizym Inhibitor (AZIN) blockiert werden. (verändert nach Pegg, 2006).

Polyamine gelten als wichtige Regulatoren der Embryonalentwicklung, Zellproliferation, Apoptose und anderer zellulärer Funktionen (zusammengefasst in Thomas und Thomas, 2001). Polyamintiter werden während der Embryonalentwicklung und dem Zellzyklus moduliert und sind in mehreren Krebsarten erhöht (zusammengefasst in Gerner und Meyskens, 2004), wohingegen ihre Synthese in seneszenten Zellen herunterreguliert wird (Chang und Chen, 1989). Aufgrund Ihrer positiven Ladungen bilden Polyamine ionische Wechselwirkungen zu negativ geladenen Molekülen aus, und haben eine Vielzahl von Interaktionspartnern. Polyamine liegen in der Zelle überwiegend an RNA assoziiert vor, binden aber auch an DNA, Phospholipide und Nucleosid-Triphosphate, sowie an Proteine mit sauren Ladungen (Igarashi und Kashiwagi, 2000). Durch ihre Bindung an DNA und RNA nehmen sie Einfluss auf Transkription und Translation.

Für das Bakterium *Escherichia coli* wurde zur Überprüfung der Auswirkungen von Polyaminen auf die Genexpression ein Hybridisierungsversuch von zellulärer RNA mit immobilisierter DNA durchgeführt (Yoshida et al., 2004). Dazu wurde ein Bakterienstamm verwendet, der nicht in der Lage ist Putrescin zu synthetisieren und dessen Wachstum eingeschränkt ist. Bei einer Gesamtmenge von 2742 detektierten Genen war die Transkription von 309 Genen nach Zugabe von Putrescin verstärkt und bei 319 Genen verringert. Die Einteilung der Gene erfolgte in 15 funktionelle Kategorien, die unter anderem eine Beeinflussung einiger Gene für Aminosäuremetabolismus, Nucleotidmetabolismus, Energiemetabolismus, Replikation, Transkription und Translation aufdeckte.

Für Spermin konnte gezeigt werden, dass es einen ternären Komplex mit ATP und Mg^{2+} bilden kann, der die Phosphorylierung durch Proteinkinasen moduliert (Meksuriyen et al., 1998). Dadurch kann beispielsweise die Aktivität von Protein Kinase A erhöht werden.

Ein Signalweg, der wechselseitig mit Polyaminen verknüpft ist, ist der Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPK) Signalweg. Er moduliert einerseits die Expression von ODC (Flamigni et al., 1999), während andererseits Zellen mit erhöhter ODC Menge eine erhöhte Aktivität dieses Signalweges aufweisen.

1.4 Mitogen aktivierte Protein Kinasen Signalwege

Zellen müssen in der Lage sein eine grosse Anzahl extrazellulärer Signale zu erkennen und diese, in Abhängigkeit von Zelltyp und Entwicklungszustand, in spezifische intrazelluläre Reaktionen umzuwandeln. An der Transduktion dieser Signale sind MAPK-Signalwege wesentlich beteiligt. In Säugetieren sind 5 unterschiedliche, hoch konservierte MAPK-Signalwege bekannt (Roux &

Blenis, 2004). Sie sind als hierarchische Signaltransduktionswege beschrieben, die extrazelluläre Signale von der Zelloberfläche über die Plasmamembran ins Zellinnere transferieren. Im Zentrum steht dabei ein Modul von drei Kinasen, die als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli schrittweise phosphoryliert und dadurch aktiviert werden: eine MAPK Kinase Kinase (MAPKKK), eine MAPK Kinase (MAPKK) und an letzter Stelle eine MAPK. Der wohl bekannteste dieser Signalwege umfasst die Kinasen Raf (MAPKKK), Mek (MAPKK) und Erk (extrazelluläre Signal regulierte Kinase; MAPK). Er reguliert Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung, Zellmotilität und nimmt Einfluss auf den zellulären Metabolismus (zusammengefasst in Mc Kay & Morrison, 2007). In vielen Fällen steht am Anfang des Signalwegs die Aktivierung membranständiger Rezeptortyrosinkinasen durch Wachstumsfaktoren nach deren Bindung durch den entsprechenden Tyrosinkinase-Rezeptor auf der extrazellulären Seite.

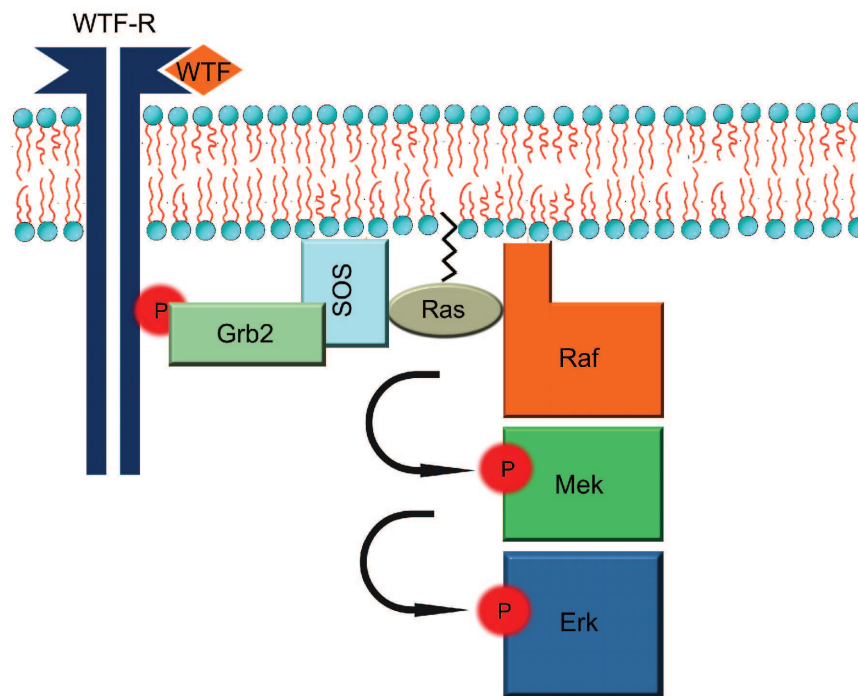


Abbildung 5) Vereinfachtes Schema des MAPK-Signalwegs. Nach Bindung von Wachstumsfaktoren (WTF) dimerisiert der WTF-Rezeptor (WTF-R) und wird auf der cytoplasmatischen Seite autophosphoryliert. Das Adapterprotein Grb2 bindet an phosphorylierte Tyrosinreste des Rezeptors und kolokalisiert den Guaninnucleotid-austauschfaktor SOS mit der GTPase Ras. SOS vermittelt den Austausch von GDP zu GTP an Ras, wodurch dieses aktiviert wird. Daraufhin wird Raf aktiviert und leitet die schrittweise Aktivierung durch Phosphorylierung von Mek und Erk ein. (nach McKay und Morrison 2007).

Zu den extrazellulären Signalen, die diesen Signalweg stimulieren zählen verschiedene Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), IGF-1 (Insulin-artiger Wachstumsfaktor 1), PDGF (Blutplättchen-abhängiger Wachstumsfaktor) und NGF (Nerven Wachstumsfaktor) (Lemmon & Schlessinger, 2010).

Die meisten Rezeptortyrosinkinasen liegen im inaktiven Zustand als Monomere vor und dimerisieren als Folge der Bindung ihrer Liganden auf der extrazellulären Seite, was zu ihrer Aktivierung führt. Tyrosinreste auf der intrazellulären Seite der Rezeptoren werden im Zuge der Aktivierung an mehreren Stellen autophosphoryliert und dienen als Andockstellen für Adaptorproteine mit SH2 (Src Homologie 2) Domänen wie Grb2, das konstitutiv mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS assoziiert ist (Überblick siehe Abbildung 5). SOS bindet an die GTPase Ras an der Zellmembran, was bei dieser zu einer Konformationsänderung und dem Austausch von GDP zu GTP führt (Omerovic et al., 2007). Die anschließende Aktivierung von Raf ist ein komplexer Prozess, der eine Reihe von Proteininteraktionen, sowie Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse umfasst (Ramos, 2008; Udell et al., 2010). In Vertebraten gibt es drei verschiedene Raf-Proteine, C-Raf, A-Raf und B-Raf (Bonner et al., 1985; Huebner et al., 1986; Ikawa et al., 1988). Im inaktiven Zustand liegen C-Raf und B-Raf im Cytoplasma in einer geschlossenen Konformation vor, die durch intramolekulare Interaktion des regulatorischen N-terminalen Bereichs mit der Kinasedomäne im C-terminalen Bereich zustande kommt, wodurch die Rekrutierung der Raf-Proteine zur Plasmamembran und ihre Aktivierung inhibiert wird (Cutler et al., 1998; Terai et al., 2005; Tran et al., 2005). Die geschlossene Konformation wird durch Bindung von dimeren 14-3-3-Proteinen an ein phosphoryliertes Serin in einer Serin/Threonin-reichen Region im N-terminalen Bereich und an ein phosphoryliertes Serin am C-Terminus stabilisiert, wobei die Phosphorylierung des C-terminalen Serinrestes zusätzlich für den Aktivierungsprozess von Raf nötig ist, da C-Raf-Proteine mit Alaninsubstitutionen an dieser Stelle inaktiv sind (Terai et al., 2005; Tzivion et al., 1998; Mischak et al., 1996). Weiterhin wird durch Phosphorylierung dieses Serinrestes die Stabilität von C-Raf gegenüber proteosomaler Degradation erhöht (Noble et al., 2008). Als Folge der Stimulation durch Wachstumsfaktoren bindet Raf an aktiviertes GTP-gebundenes Ras an der Plasmamembran. Diese Interaktion wird durch Dephosphorylierung der N-terminalen 14-3-3-Bindestelle durch die Phosphatasen PP1 und PP2A und der damit verbundenen Dissoziation von Raf-Proteinen von 14-3-3-Proteinen positiv reguliert (Abraham et al., 2000; Jaumot and Hancock, 2001; Ory et al., 2003; Rodriguez-Vicinia et al., 2006). Als Folge davon nimmt Raf eine offene Konformation ein und erfährt eine zusätzliche Aktivierung durch eine Reihe von

Phosphorylierungen durch unterschiedliche Kinasen (zusammengefasst in Ramos et al., 2008). Auch die Dimerisierung von Raf-Proteinen führt zu deren Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Heterodimerisierung von B-Raf und C-Raf zu einer Aktivitätssteigerung der Raf-Proteine in trans im Vergleich zu den Monomeren und Homodimeren führt, selbst wenn eine der Kinasen keine Kinaseaktivität besitzt (Weber et al., 2001, Wan et al., 2004; Rushworth et al., 2006). Aktives Raf aktiviert die Kinase Mek durch Phosphorylierung mehrerer Serinreste, welche ihrerseits Erk durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten aktiviert.

Erk moduliert zahlreiche Substrate in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten. Im Zellkern werden unter anderem die Transkriptionsfaktoren ELK-1, c-Fos und c-Myc phosphoryliert, an der Plasmamembran Syk und Calnexin und im Cytoplasma eine Reihe verschiedener Vertreter von Proteinkinasen der RSK-Familie (ribosomale S6 Kinase; zusammengefasst in Ramos, 2008).

1.5 Regulation des MAPK-Signalwegs durch Gerüstproteine

Neben der grossen Anzahl extrazellulärer Stimuli zur Aktivierung des Signalwegs sind für Erk-Proteine bisher über 150 Substrate mit unterschiedlichen Funktionen bekannt (Yoon und Seger, 2006). Es müssen also eine Vielzahl von Stimuli durch den MAPK-Signalweg wie durch einen Flaschenhals in zelltypspezifische Reaktionen münden, während andere Reaktionen nicht auftreten sollen. Wie das möglich ist, ist bisher nur ansatzweise verstanden.

Generell sind mehrere Regulationsmöglichkeiten des MAPK-Signalwegs denkbar. Modulation der Dauer und Intensität des Signals können zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen führen. Die Regulation des Signalwegs hängt auch von verschiedenen MAPK-spezifischen Kinasen und Phosphatasen ab (zusammengefasst in Ramos, 2008). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verfügbarkeit der Substrate, das kann sowohl deren Vorhandensein als auch die Blockierung von Interaktionsdomänen und Phosphorylierungsstellen betreffen. Die subzelluläre Lokalisation von Effektor kinase und Substrat ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung.

Eine wichtige Rolle bei der Lokalisation spielen Gerüstproteine. Sie können einerseits Dauer, Intensität und Spezifität von Signalen beeinflussen, indem sie eine Plattform für die Assoziation von signalrelevanten Molekülen bilden, und andererseits Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der Signale nehmen. KSR ("Kinase Suppressor of Ras") ist das wohl am besten untersuchte Gerüstprotein, es ist im aktiven Zustand an der Zellmembran lokalisiert und bindet Raf, Mek und Erk (Roy et al., 2002; Denouel-Galy et al., 1998; Yu et al., 1998). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass KSR durch Heterodimerisierung mit BRaf dieses unabhängig von Ras aktiviert (Rajakulendran et al., 2009). Bedingung für eine maximale Signalverstärkung des

MAPK-Signalwegs sind ausreichende Mengen an KSR. Allerdings wird das Signal bei zu hohen Proteinmengen abgeschwächt, da dann die Bindung der verschiedenen MAPK-Proteine an unterschiedliche Gerüstproteine erfolgt, wodurch die Bildung vollständiger MAPK-Module verhindert wird (Sacks, 2006; Ritt, Daar und Morrison, 2006). KSR liegt in der Zelle als Multiproteinkomplex mit Molekulargewichten zwischen 250 und 1000 kDa vor, dessen Komponenten die Aktivierung und Stabilität von KSR beeinflussen (Pérez-Rivas et al., 2010). Beispiele dafür sind die Serin/Threonin-Kinasen C-TAK1 und CK2, sowie die Phosphatase PP2A und 14-3-3-Proteine, deren Zusammenwirken die Membranlokalisierung und Aktivierung von KSR regulieren, wohingegen diverse Hitzeschockproteine die Stabilität des Komplexes erhöhen.

Neben KSR gibt es noch eine Reihe anderer Gerüstproteine: MP1 (Mek Partner 1) verstärkt die Erk-Aktivierung an späten Endosomen im Komplex mit dem Adaptorprotein p14 (Schaeffer et al., 1998; Wunderlich et al., 2001; Teis et al., 2005). Das Transmembranprotein Sef ist am Golgi-Apparat lokalisiert, wo es aktiviertes Mek bindet und die Aktivierung von Erk vermittelt (Torii et al., 2004). Aktiviertes Erk bleibt am Komplex und ist dadurch nur noch in der Lage cytosolische Proteine zu phosphorylieren. Neben der Beeinflussung cytosolischer Signale nimmt so gleichzeitig die Menge an Erk ab, die im Zellkern Einfluss auf Transkriptionsfaktoren nehmen kann. Das Gerüstprotein Paxillin ist ein Bestandteil von Focalkontakten. Seine Assoziation mit aktiven MAPKinasen ist wichtig für die Dynamik der Komplexbildung von Focalkontakten und damit für morphogenetische Veränderungen (Ishibe et al., 2004).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Die in der Einleitung genannten Ergebnisse stammen aus Untersuchungen in unterschiedlichen Tiersystemen, hauptsächlich dem Maussystem. Die Proteinkinase CK2, die Komponenten des MAPK-Signalwegs KSR, Ras, Raf, Mek, Erk sowie die Enzyme des Polyaminstoffwechsels sind auch in *Drosophila* hoch konserviert. Zudem hatte der Modellorganismus *Drosophila* speziell an der Aufklärung des MAPK-Signalwegs wesentlichen Anteil. Durch die Konservierung der Proteine eignet sich *Drosophila* als Tiersystem für Untersuchungen von CK2, der MAPK-Kaskade und der Wirkungen von Polyaminen.

Der Modellorganismus *Drosophila* bietet speziell auf genetischer Ebene einige Vorteile gegenüber anderen Organismen. So stehen eine Reihe von Techniken für zell- und entwicklungs-spezifische Expression von Transgenen, sowie für die Generierung homozygot mutanter Zellen in ansonsten heterozygoten Tieren zur Verfügung. Die MARCM-Technik (Lee und Luo, 2001) ist ein solches System zur Generierung und Visualisierung homozygot mutanter Zellen in einem bezüglich der Mutation heterozygoten Tier, deren Bildung durch gezielte mitotische Rekombination eingeleitet wird. Diese Methode hat den Vorteil, dass auch Zellen mit zwei Kopien eines rezessiv letalen Allels untersucht werden können.

Wie bereits erwähnt, können Polyamine an das regulatorische CK2 β -Protein binden, wodurch sich die Konformation des CK2 Holoenzym ändert und seine Kinaseaktivität moduliert wird (Leroy et al., 1997b/a). Die MARCM-Technik wurde benutzt um auf der Ebene von Geweben eine funktionelle Untersuchung zum Funktionsverlust von CK2 β durchzuführen (Thomas Raabe, nicht veröffentlicht). Dazu wurde das CK2 $\beta^{\Delta A26-2L}$ -Nullallel verwendet, bei dem der überwiegende Anteil der kodierenden Sequenz fehlt. Die Induktion von homozygoten CK2 $\beta^{\Delta A26-2L}$ -Nullklonen in neuronalen Vorläuferzellen (Neuroblasten) der sich entwickelnden Pilzkörper von *Drosophila melanogaster* führt zu einer Verkleinerung der Pilzkörper (Thomas Raabe). Desweiteren zeigte diese klonale Analyse, dass in CK2 $\beta^{\Delta A26-2L}$ -Nullklonen Entwicklung und Überleben der Neurone (Kenyonzellen) der Pilzkörper vom ersten Larvenstadium bis zur adulten Fliege möglich ist, so dass der Grund für verkleinerte Pilzkörper wohl in Proliferationsdefekten zu suchen ist. Die Modulation von Polyamintitern durch Überexpression von SamDC, eines wichtigen Enzyms der Polyaminsynthese, führt zu einer Abnahme der Spermidinmenge und zu verkleinerten Pilzkörpern (Eike Jauch, nicht veröffentlicht). Ausreichende Mengen an CK2 β und regulierte Polyamintiter sind also für die Entwicklung wildtypischer Pilzkörper erforderlich.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, wie die Kinaseaktivität von CK2 in Abhängigkeit von Polyaminen reguliert wird und wie diese Regulation Einfluss auf das

Einleitung

Verhalten von Zellen und Geweben nehmen kann. Dazu war an erster Stelle die Aufdeckung eines physiologischen Substrates von CK2, sowie die Entwicklung einer Messmethode zur Überprüfung polyaminabhängiger Effekte auf dessen Phosphorylierung nötig. Überdies sollten die molekularen Mechanismen aufgeklärt werden, die zur Weiterleitung der Signale führen und daraus resultierende physiologische Effekte beschrieben werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von Roth, Applichem, Invitrogen, Roche und Sigma-Aldrich bezogen. Radiochemikalien ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Adenosintriphosphat und -Guanosintriphosphat) wurden von Amersham (GE Healthcare) geliefert.

2.1.2 Inhibitoren

Protease-, Phosphatase- und Kinaseinhibitoren

Inhibitor	Bezugsquelle	Inhibition von	Arbeitskonzentration
Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Proteasen	1x
β -Glycerophosphat	Applichem	Serin-/ Threonin-Phosphatasen	50 mM
Natrium-ortho-vanadat	Applichem	Protein-Tyrosin-Phosphatasen, Alkalische Phosphatasen	100 μM
Natriumfluorid	SIGMA	Saure Phosphatasen, PP-2A,-2B,-2C	1 mM
TBB (4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol)	SIGMA	CK2	10-100 μM
Heparin	SIGMA	CK2	0,01 % (w/v)

2.1.3 Puffer und Medien

Zellkulturmedium:

<i>Drosophila</i> Schneider Medium (Biowest), +	
FCS	10 %
Glutamin	2 mM
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 $\mu\text{g/ml}$

Material und Methoden

PBS (pH 7,4) (10x)

NaCl	1,39 M
Na ₂ HPO ₄	55 mM
NaH ₂ PO ₄	11,4 mM

Tris-SDS-Sammelgelpuffer (4x)

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 6,8)	500 mM
Natriumdodecylsulfat	0,4 %

Tris-SDS-Trenngelpuffer (4x)

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 8,8)	500 mM
Natriumdodecylsulfat	0,4 %

Proteinladepuffer (Laemmli) (5x)

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 6,8)	70 mM
β-Mercaptoethanol	5 %
Glycerin	40 %
Natriumdodecylsulfat	3 %
Bromphenolblau	0,05 %

Gellaufpuffer (1x)

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 8,3)	25 mM
Glycin	200 mM
Natriumdodecylsulfat	0,1 %

Western Transfer Puffer (1x)

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 8,3)	25 mM
Glycin	150 mM
Methanol	10 %

TBST (10x)

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 8,0)	100 mM
NaCl	1,5 M
Tween20	0,5 %

Stripping Puffer für Western Blot (1x)

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 6,8)	60 mM
Natriumdodecylsulfat	2 %
β-Mercaptoethanol	0,1 %

CK2 Kinasepuffer (4x)

Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)	344,8 mM
MgCl ₂	656 mM

Coomassie Färbelösung (Standard)

Brilliant Blue 250	0,2 %
Methanol	45 %
Essigsäure	10 %

Material und Methoden

Coomassie Entfärbelösung (Standard)

Methanol	35 %
Essigsäure	7 %

Kolloidale Coomassie Färbelösung für die Massenspektrometrie

Phosphorsäure	10 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 %
Brilliant Blue 250	0,12 %
Methanol	16 %

Coomassie Entfärbelösung für die Massenspektrometrie

dH₂O

2.1.3.1 Puffer für GST-Proteinaufreinigungen

GST-Lysispuffer (1xTPE)

Triton X100	1 %
Ethylendiamintetraacetat	100 mM
Protease Inhibitor Cocktail in 1x PBS (s.o.)	1x

GST-Waschpuffer

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 7,5)	50 mM
Ethylendiamintetraacetat (pH 7,5)	100 mM
Tween 20	0,1 %

GST-Elutionspuffer

Glutathion (pH 7)	100 mM
-------------------	--------

2.1.3.2 Puffer für Antikörperkopplung

Waschpuffer (pH 5)

Zitronensäure	2,4 mM
Na ₂ HPO ₄	5,2 mM

Elutionspuffer

Zitronensäure (pH 2-3)	100 mM
------------------------	--------

Puffer für Quervernetzung

Triethanolamin (pH 8,2)	200 mM
Dimethylpimelimidat	20 mM

Puffer zum Abstoppen der Reaktion

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 7,5)	50 mM
---	-------

Waschpuffer nach erfolgter Kopplung

NaCl	139 mM
Na ₂ HPO ₄	5,5 mM
NaH ₂ PO ₄	1,14 mM
Tween 20	0,1 %

2.1.3.3 Lysepuffer

Lysepuffer (Standard)

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 7,5)	25 mM
NaCl	150 mM
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	2 mM
EGTA (Ethylen Glycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure)	2 mM
Glycerin	10 %
Nonidet-P40	0,1 %

Lysepuffer für Immunpräzipitationen/Kinaseassays

Lysepuffer	+	1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
------------	---	--

Lysepuffer zur Detektion von MAPK Signalen in Zellen

Lysepuffer	+	1x Protease Inhibitor Cocktail	
	+	β-Glycerophosphat	50 mM
	+	Natrium-ortho-vanadat	100 μM
	+	Natriumfluorid	1 mM

Lysepuffer für die Herstellung von Fliegenlysaten (Homogenisierungspuffer)

Tris(hydroxymethylaminomethan) (pH 7,5)	10 mM	
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	2 mM	
EGTA (Ethylen Glycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure)	5 mM	
+	1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche)	
+	β-Glycerophosphat	50 mM
+	Natrium-ortho-vanadat	100 μM
+	Natriumfluorid	1 mM

2.1.4 Enzyme

Taq-DNA-Polymerase	NEB
Vent-DNA-Polymerase	NEB
Phusion-DNA-Polymerase	Finnzymes
reverse Transkriptase	Eppendorf
Restriktionsenzyme	NEB, Roche
antarctic Phosphatase	NEB
T4-DNA-Ligase	NEB

Material und Methoden

2.1.5 Kits

Plasmid Minikit	Quiagen
Plasmid Midikit	Quiagen
NucleoSpin Extract II	Macherey Nagel
Quiashredder	Quiagen
RNeasy Mini Kit	Quiagen
cMaster RT _{plus} PCR System	Eppendorf
jetPEI™ Transfektionsreagenz	Polyplus/biomol
ECLPLUS Western Blotting Detection System	Amersham™ (GE Healthcare)

2.1.6 Primer

Name	Sequenz	Zweck
KSR-5A-SmaI-pGEX6P1	TCCCCCGGGTATGAGCAGCAA CAACAACGCAC	KSR-5'-linker-primer für Klonierung aus AT08303 in pGEX6P1
KSR-3A-502aa-XhoI-pGEX6P1	GGCGCTCGAGCGGTTAGGCGC TAGAGCTGCTGCCCCG	KSR-3'-linker-primer für Klonierung der ersten 502 Aminosäuren aus AT08303 in pGEX6P1
5A-BamHI-DerK	CGGGATCCATGGAGGAATTTAA TTCG	DerK, Umklonierung von pTW196 in pGEX6P1
3A-EcoR1-DerK	GGAATTCGCTTACAGCCCATTC TTAAGGC	DerK, Umklonierung von pTW196 in pGEX6P1
pGEXNT900	CCACGTTTGGTGGTGGCGACC	5'-Sequenzierprimer für pGEX-Vektor
DRaf469ntsFS	CAACAGCGCACTTCAGTGGAG G	Sequenzierprimer für DRaf
DRaf1295ntsFS	TGGCGGAGGAGATTTTAATTG GG	Sequenzierprimer für DRaf
DRaf2108ntsFS	TTCATCGCAGTGCCAGTGAAC C	Sequenzierprimer für DRaf
DRafS417DFS	TTAAGAGACGCCAAAGATTCC GAGGAAAACCTGG	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, S417 -> D, sense-Strang
DRafS417DSS	CCAGTTTTCCTCGGAATCTTTG GCGTCTCTTAA	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, S417 -> D, antisense-Strang
DRafS5DFS	CCATGTCCAGCGAGGACTCCA CCGAAGGCGAC	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, S5 -> D, sense-Strang
DRafS5DSS	GTCGCCTTCGGTGGAGTCCTC GCTGGACATGG	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, S5 -> D, antisense-Strang
DRafT7DFS	GTCCAGCGAGTCCTCCGACGA AGGCGACAGCGATC	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, T7 -> D, sense-Strang

Material und Methoden

Name	Sequenz	Zweck
DRafT7DSS	GATCGCTGTCGCCTTCGTCGG AGGACTCGCTGGAC	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, T7 -> D, antisense-Strang
DRafS11DFS	CCACCGAAGGCGACGACGATC TATACGATCC	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, S11 -> D, sense-Strang
DRafS11DSS	GGATCGTATAGATCGTCGTCGC CTTCGGTGG	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, S11 -> D, antisense-Strang
DRafS11AFS	CCACCGAAGGCGACGCCGATC TATACGATCC	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, S11 -> A, sense-Strang
DRafS11ASS	GGATCGTATAGATCGGCGTCGC CTTCGGTGG	DRaf-> <i>in vitro</i> -Mutagenese, S11 -> A, antisense-Strang
RCKII α , M. Jauch	CCGCTCGAGCTTCTTATTGCTG ATTATTGG	reverse Transkription/PCR von CK2 α aus Schneider S2 Zellen
FCKII α , M. Jauch	CGGAATTCATGACACTTCTTA GTGCG	reverse Transkription/PCR aus von CK2 α Schneider S2 Zellen
FWAC5	ACACAAAGCCGCTCCATCAG	Sequenzierprimer für pAC-Vektoren
BGH-RW	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sequenzierprimer für pAC-Vektoren

2.1.7 Plasmide

Plasmidname	Vektor	Insertion	Verwendungszweck	Referenz
pFLPS 6	pGEX-6P1	DERk	GST-Proteinaufreinigung	diese Arbeit
pFLPS 19	pGEX-6P1	KSR Nucleotide 1-1506	GST-Proteinaufreinigung	diese Arbeit
pFLPS 26	pAc5.1-myc	DRaf	Überexpression Zellkultur	diese Arbeit
pFLPS 28	pAc5.1-myc	CK2 α	Überexpression Zellkultur	H. Wecklein
pFLPS 31	pGEX-4T3	DRaf	GST-Proteinaufreinigung	diese Arbeit
pFLPS 33	pGEX-4T3	DRaf S417D	GST-Proteinaufreinigung	diese Arbeit
pFLPS 35	pGEX-4T3	DRaf S5D	GST-Proteinaufreinigung	diese Arbeit
pFLPS 36	pGEX-4T3	DRaf	GST-Proteinaufreinigung	diese Arbeit
pFLPS 37	pGEX-4T3	DRaf S11D	GST-Proteinaufreinigung	diese Arbeit
pFLPS 38	pCOHygro	Hygromycinresistenzgen	Generierung stabiler Zellen	diese Arbeit
pFLPS 39	pAc5.1-myc	DRaf S11A	Überexpression Zellkultur	diese Arbeit
pFLPS 40	pAc5.1-myc	DRaf S11D	Überexpression Zellkultur	diese Arbeit
DP 22	PGEX-5X-1	CK2 α	GST-Proteinaufreinigung	D. Pühringer

Material und Methoden

2.1.8 Fliegenstämme

Wildtyp Berlin (WTB)

Transgene Fliegenstämme:

$y^1 w^*$; P {tub-Gal4}LL7/Tm3, Sb¹

w; P {UAS: CK2 β -VIIa}^V/Sm6a, CyO

w; P {UAS:CK2 β ^{D55A,E57A}}²/Sm6a, CyO

(Bloomington, Linie 5138)

(Jauch et al., 2002)

(E. Jauch, nicht veröffentlicht)

2.1.9 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α

Escherichia coli BL21(DE3)

Klonierungen

Proteinexpression

2.1.10 Antikörper

primäre Antikörper

Spezifität, Klon	Isotyp, Spezies	Verwendungszweck	Anwendung	Herkunft
pErk, MAPK-YT	IgG1, monoklonal, Maus	Western Blot	1:2000, TBST + 5 % MP	Sigma
Erk, C-14	polyklonal, Kaninchen	Western Blot	1:1000, TBST + 5 % MP	Santa Cruz
CK2 β	polyklonal, Kaninchen	Western Blot	1:500 - 1:1000, TBST	(Jauch et al., 2002)
c-Myc, 9E10	IgG1, monoklonal, Maus	Western Blot	1:1000, TBST + 5 % MP	Santa Cruz
KSR (Aminosäuren 1-502)	polyklonal (SYC113), Meerschweinchen	Immunpräzipitation, Western Blot	IP: 20-25 μ l/mg Proteinlysat WB: 1:50, TBST	Eurogentec, in dieser Arbeit hergestellt
PCNA, PC10	IgG2 α , κ , monoklonal, Maus	Western Blot	1:5000, TBST + 5 % MP	BD Biosciences
Aktin, I-19	polyklonal, Kaninchen	Western Blot	1:1000, PBST + 5 % MP	Santa Cruz

sekundäre Antikörper

Spezifität, Klon	Isotyp, Spezies	Verwendungszweck	Anwendung	Herkunft
Maus	IgG, Schaf	Western Blot	1:2500, TBST	GE Healthcare
Kaninchen	F(ab') ₂ -Fragment, Esel	Western Blot	1:5000, TBST	GE Healthcare
Meerschweinchen	IgG, Schaf	Western Blot	1:500, TBST	Dianova

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben durchgeführt.

2.2.1.1 Restriktionsverdau von DNS

Standardmäßig wurden 1-2 µg Plasmid-DNS mit Restriktionsenzymen von NEB und Roche nach den Angaben der Hersteller in einem Volumen von 50 µl verdaut. Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte durch Gelelektrophorese in 0,8-1 % Agarosegelen. Das im Gel vorhandene Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) interkaliert während der Elektrophorese in die DNS-Fragmente, und kann durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dadurch konnten DNS-Banden lokalisiert und ausgeschnitten werden. Die Reinigung der DNS erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II-Kit (Macherey Nagel).

2.2.1.2 Ligation von DNS

Zur Ligation von DNS wurden standardmäßig 50 ng Plasmid-DNS, 250 ng der zu inserierenden DNS, 0,5 µl T4-DNA-Ligase (NEB) und 1 µl 10x Ligasepuffer in einem Volumen von 10 µl bei 16°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.3 Transformation von DNS

Von Ligationen wurden 2-8 µl, und von Plasmid-DNS wurden 1-5 ng durch Hitzeschocktransformation in *Escherichia coli* DH5α eingebracht. Dabei wurden 100µl Bakterien, die mit CaCl₂ vorbehandelt sind, eine halbe Stunde auf Eis mit der zu inserierenden DNS vorinkubiert. Nach einminütiger Inkubation bei 42 °C wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt, eine Stunde lang bei 37 °C in 500µl LB-Medium inkubiert und auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Durch das in der inserierten DNS enthaltene Antibiotikaresistenzgen wachsen Bakterien nur zu sichtbaren Kolonien heran, wenn die Plasmid-DNS transformiert wurde. Vorbereitend für Proteinaufreinigungen wurden Vektoren zur Proteinexpression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformiert.

2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde für folgende Anwendungen benutzt:

- 1.: Herstellung von kodierenden Sequenzen mit den gewünschten Restriktionsschnittstellen (Linker-PCR)
- 2.: Gezieltes Einfügen von Mutationen in DNA (*in vitro*-Mutagenese)
- 3.: für den Nachweis erfolgreicher Klonierungen in Bakterien. (Kolonie-PCR)

Die Reaktionen wurden, mit leichten Abweichungen in speziellen Fällen, nach folgendem Schema angesetzt:

Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge
DNA	50 ng
dNTPs	20-30 nMol
Primer 1	10-20 pMol
Primer 2	10-20 pMol
Polymerase	0,5-1 µl
Puffer	1x
H ₂ O	auf 50 µl Endvolumen

PCR-Programm für Linker-PCR und Kolonie-PCR

Schritt/Zyklen	Temperatur	Dauer
1./1	96 °C	120 sec.
2./30	96 °C	30 sec.
	45-60 °C, je nach T _m der Primer	30-45 sec.
	72°C	60 sec./kb
3./1	72°C	90 sec./kb

PCR-Programm für *in vitro*-Mutagenesen

Schritt/Zyklen	Temperatur	Dauer
1./1	96 °C	45 sec.
2./16-20	96 °C	30 sec.
	55-60 °C	30-45 sec.
	72 °C	60 sec./kb

Schritt/Zyklen	Temperatur	Dauer
3./1	72 °C	60 sec./kb

2.2.1.5 Überprüfung der Genexpression in Schneider S2 Zellen

Die Expression von CK2 α in Schneider S2 Zellen wurde durch reverse Transkription der RNS mit anschließender PCR überprüft. Dazu wurde RNS aus 5×10^6 Zellen mit dem RNeasy Kit (Quiagen) unter Verwendung einer QIAshredder Säule aufgereinigt, in 35 μ l H₂O aufgenommen und mit 0,8 μ l eines RNase-Inhibitor (Invitrogen) versetzt. Als notwendiger zusätzlicher Reinigungsschritt erfolgte die Präzipitation der RNS durch LiCl. Dazu wurden 30 μ l 8 M LiCl zu 90 μ l RNS-Lösung gegeben und nach Mischen 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 12.000 U/min und 4 °C wurde das entstandene RNS-Pellet mit 100 μ l 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 30 μ l H₂O aufgenommen.

Anschließend wurde cDNS, durch reverse Transkription der RNS mit dem cMaster RT_{plus}PCR System-Kit (Eppendorf), wie vom Hersteller angegeben, hergestellt. 4 μ l der cDNS Lösung wurden in einer PCR als Ausgangs-DNS, wie unter 2.2.1.4 angegeben, eingesetzt. Die entstandene doppelsträngige DNS wurde durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert und sequenziert.

2.2.1.6 DNS-Sequenzierung

DNS-Sequenzen wurden nach den Vorgaben von SeqLab mit Primer und Puffer versetzt und anschließend von SeqLab analysiert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung von Schneider S2 Zellen

Für Experimente zur Wirkung von Polyaminen auf den MAPK Signalweg sowie für Immunpräzipitationen wurden *Drosophila* Schneider S2 Zellen (Schneider, 1972) verwendet (erhältlich unter: <https://dgrc.cgb.indiana.edu/cells>). Diese wurden bei 25 °C ohne CO₂-Begasung in *Drosophila* Schneider Medium von Biowest kultiviert, und zweimal pro Woche in einem Verhältnis von etwa 1:5 in frischem Medium verdünnt. Dem Medium waren, falls nicht anders angegeben, 10 % FCS, sowie 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin und 2 mM

Glutamin zugesetzt.

2.2.2.2 Herstellung stabiler Zelllinien

Die Herstellung stabiler Zellen erfolgte durch Cotransfektion des Plasmids, das für das Transgen kodiert (Expressionsplasmid), und dem Selektionsplasmid pCoHygro, das ein Hygromycin-resistenzgen beinhaltet. Die Cotransfektion von Expressions – und Selektionsplasmid erfolgte im Fall der DRaf-Transgene in einem Mengenverhältnis von circa 7:1, im Fall von CK2 α lag das Mengenverhältnis bei circa 14:1. Die Transfektion erfolgte mit dem jetPEITM Transfektionsreagenz nach den Angaben des Herstellers. Die transfizierten Transgene exprimieren Fusionsproteine mit sechsfach aufeinander folgendem Myc-Epitop am N-Terminus. Die Selektion von Zellen mit Selektionsplasmid erfolgte durch Zugabe von 300 μ g Hygromycin B pro ml Medium und wurde mindestens fünf Wochen angewandt, bevor die Zellen für Experimente benutzt wurden. Von allen stabilen Zelllinien wurden Aliquots in Medium aufgenommen, das 10 % DMSO enthält. Dabei betrug die Dichte 1×10^7 Zellen/ml. Nach dreitägiger Inkubation bei -80°C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.3 Behandlung von Zellen

Schneider S2 Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Medium mit 1 % FCS ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Polyamine wurden dem Medium 6 Stunden vor der Zellernte, 10 μ M TBB (4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol) wurde 3 Stunden vorher zugegeben.

2.2.2.4 Serum-Stimulation von Zellen

Um Zellen zu aktivieren wurde die Konzentration des Serums und der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren kurzfristig erhöht. Dadurch erfolgt die Aktivierung membranständiger Rezeptoren und nachgeschalteter Signalwege. Dazu wurden Schneider S2 Zellen für 24 Stunden in Medium mit 1 % FCS kultiviert und anschließend mit Medium, das 10 % FCS enthält, inkubiert. Nach 5 Minuten wurden die Zellen für 4 Minuten bei 1200 U/min und 4°C sedimentiert und in Lysepuffer mit Protease -und Phosphataseinhibitoren aufgenommen (siehe Punkt 2.2.3.1).

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Für Immunoblot-Analysen und Immunpräzipitationen wurden *Drosophila* Schneider S2 lysiert. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1200 U/min für 4 Minuten sedimentiert, in Lysepuffer (25 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 10 % Glycerol; 0,1 % Nonidet-P40; 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) aufgenommen und bei 4 °C auf einem Nutator 1 Stunde lysiert. Da bei Immunoblot-Analysen phosphoryliertes Erk nachgewiesen werden sollte, wurden hier Phosphataseinhibitoren (50 mM β -Glycerophosphat, 100 μ M Natrium-ortho-vanadat, 1 mM Natriumfluorid) zugegeben, um eine nachträgliche Dephosphorylierung von Erk zu verhindern.

Anschließend wurde 30 Minuten bei 12000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Schließlich erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung des Überstandes nach Bradford und die Weiterverwendung der Lysate für Immunoblot und Immunpräzipitation.

2.2.3.2 Proteinaufreinigung

Für verschiedene Anwendungen wurden rekombinante Proteine aufgereinigt, die N-terminal mit dem Protein Glutathion S-Transferase verknüpft waren. Dazu wurden 0,5–2 Liter antibiotikahaltiges LB-Medium mit 25-100 ml Übernackkultur des Stammes *E. coli* BL21 (DE3), die das erwünschte Expressionsplasmid tragen, angeimpft und bei 37 °C in einem Bakterieninkubator bis zu einer optischen Dichte (OD 600) von etwa 1,0 wachsen gelassen. Daraufhin erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, in 1x TPE mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und durch Ultraschall (Bandelin Sonopuls HD70) aufgebrochen. Dies erfolgte durch Einbringen einer Ultraschallsonde in die Bakterienlösung und Verabreichen von Ultraschall unter Kühlung für dreimal je eine Minute bei maximaler Leistung und einer Impulsdauer von 70 %. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand durch einen Filter mit der Porengröße 0,25 μ m gedrückt. Das Filtrat wurde je nach Expressionsmenge des GST-Proteins mit etwa 100 – 250 μ l Glutathion-Sepharose pro Liter Bakterienlösung (GE Healthcare) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Auftragen der Sepharose-Kügelchen auf eine Säule wurde einmal mit 1x TPE und drei- bis viermal mit je 10 ml GST-Waschpuffer gewaschen. Die Elution von der Säule geschah durch Verdrängung der Glutathion-Sepharose von den Proteinen nach Inkubation der Sepharose-Kügelchen für zwei bis vier Stunden mit 100 mM Glutathion (pH 7). Die eluierten GST-Proteine

Material und Methoden

wurden dialysiert und anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Nach Aliquotieren der Proteine wurden diese in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Um Degradation der Proteine zu minimieren wurden alle Reinigungsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die verschiedenen Bedingungen für Proteinexpression und Aufreinigung sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst:

Protein	Induktionstemperatur	Induktionsmittel und- dauer	Dialysepuffer (je 48h Dialyse)
GST-CK2 α	17 °C	1 mM IPTG, 4h	30 mM TrisCl (pH 8), 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT
GST-DErk	25 °C	1 mM IPTG, 3h	20 mM Tris (pH 7,5)
GST-DRaf (und Varianten)	25 °C	1 mM IPTG, 3h	20 mM Tris (pH 7,5)
GST-KSR (mit den Aminosäuren 1-502 von KSR)	25 °C	1 mM IPTG, 3h	5 mM Tris (pH 7,5)

2.2.3.3 Antikörperherstellung

Ein Fusionsprotein aus N-terminaler Glutathion S-Transferase und den ersten 502 Aminosäuren des *Drosophila* KSR Proteins wurde benutzt, um ein polyklonales Serum aus Meerschweinchen herzustellen. Dazu wurde das „28-day Speedy“-Protokoll von Eurogentec angewandt.

2.2.3.4 Antikörperkopplung

Die kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein-G-Agarose verhindert, dass die Antikörperketten beim Aufkochen in Laemmli-Puffer in diesem gelöst werden und bei SDS-Gelelektrophorese auf das Gel aufgetragen werden. Das ist nötig, falls die Antikörperketten auf Immunoblot-Ebene von sekundären Antikörpern gebunden werden und durch das entstehende Signal andere Signale überdeckt werden.

Nach Zentrifugation von 40 μ l der Protein-G-Agarose Lösung bei 3500 U/min wurde der Aufbewahrungspuffer abgenommen und die Agarose-kügelchen 3x mit je 1 ml Waschpuffer (Zitratpuffer, pH 5,0) gewaschen. Danach wurden 40 μ l des KSR-Antikörpers zur Protein-G-Agarose gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Nutator inkubiert. Die Protein-G-Agarose wurde dann nach Zugabe von 40 μ l Waschpuffer 40 Minuten auf einem Nutator inkubiert, und danach dreimal mit 1 ml Waschpuffer und zweimal mit 1 ml 0,2 M Triethanolamin

(pH 8,2) gewaschen. Die eigentliche Kopplungsreaktion erfolgte anschließend durch Inkubation der Protein-G-Agarose mit 0,5 ml des Kopplungsreagenzes Dimethylpimelimidat (20 mM) in 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2) für 40 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Nutator. Nach Entfernen des Überstandes wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 50 mM Tris (pH 7,5) und Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur abgestoppt.

Die Protein-G-Agarose wurde anschließend dreimal mit 0,5 ml PBS + 0,05 % Tween (pH 7,4) gewaschen, dann dreimal mit 100 µl Elutionspuffer (0,1 M Zitratpuffer, pH 3,0) unter Schütteln jeweils 2 Minuten inkubiert, um nicht kovalent gekoppelte Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde je einmal mit 0,5 ml PBS + 0,05 % Tween (pH 7,4) und dem Puffer für die folgende Immunpräzipitation gewaschen.

2.2.3.5 Co-Immunpräzipitation

Spezifische Antikörper für *Drosophila* sind für viele Antigene nicht verfügbar. Zum Nachweis von CK2 α an immunpräzipitiertem KSR wurden deshalb *Drosophila* Schneider S2 Zellen verwendet, die stabil Myc-Epitop gekoppeltes CK2 α exprimieren. Der Nachweis von CK2 α erfolgte indirekt über den Nachweis des Myc-Epitops des Fusionsproteins auf Immunoblot-Ebene. Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.7 beschrieben in Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren lysiert. Das Lysat wurde dann mit circa 25 µl Protein-G-Agarose pro mg Proteinlysate für eine Stunde bei 4 °C vorinkubiert, um eine unspezifische Bindung von Lysatkomponenten an Protein-G-Agarose in der Immunpräzipitation zu verhindern. Nach Sedimentation der Protein-G-Agarose bei 3500 U/min für 5 Minuten erfolgte die Immunpräzipitation von Proteinen des Überstandes bei 4 °C über Nacht. Dabei wurden 25 µl Protein G Agarose mit kovalent gekoppeltem KSR-Antikörper pro mg Gesamtprotein des Lysats verwendet. Anschließend wurden die Agarosekügelchen dreimal in Lysepuffer gewaschen.

Für *in vitro* Untersuchungen zur Wirkung von Polyaminen wurden Polyamine während der Inkubation von Antikörper und Antigen sowie bei den nachfolgenden Waschschrritten zugegeben.

2.2.3.6 Überprüfung der Kinaseaktivität *in vitro*

Zur Überprüfung der Kinaseaktivität von an KSR assoziierten Proteinen wurde endogenes KSR unter Verwendung des neu hergestellten anti-KSR Immuserums, nach Kopplung der Antikörper an Protein-G-Agarose, aus Schneider S2 Zellen immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in Anwesenheit von Polyaminen dreimal in Lysispuffer und zweimal in 1x CK2

Kinasepuffer (86,2 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 164 mM MgCl₂) gewaschen. Für eine einzelne Kinasereaktion wurde das Immunpräzipitat aus 300 µg zellulären Gesamtproteins verwendet. Alternativ wurde 6 µg bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes GST-CK2α als Kinase eingesetzt. Als Substrate wurden 30 µg GST-DRaf, 3 µg GST-DErk und 15 µg GST als Kontrolle eingesetzt. Zur Inhibition der CK2 Kinaseaktivität erfolgte die Reaktion nach Zugabe von 100 µM TBB. Jeder Ansatz erfolgte in Anwesenheit der jeweils angegebenen Menge Polyamine in 1x CK2 Kinasepuffer nach Zugabe von 1 µl [γ -³²P]-ATP oder -GTP (0,37x 10⁶ Becquerel) in einem Endvolumen von 50 µl. Bei Versuchen zur Überprüfung der Effekte von Polyaminen auf die Kinaseaktivität erfolgte die Inkubation bei 30 °C für 7 Minuten, bei anderen Versuchen wurde die Reaktion 30-40 Minuten inkubiert. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von Proteinladepuffer und Erhitzen der Proben auf 96 °C für 5 Minuten gestoppt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 9 %-igen Polyacrylamidgel. Durch Inkubation des Gels mit Coomassie wurden die Proteine gefärbt. Die Signaldetektion erfolgte durch Autoradiographie.

2.2.3.7 Immunoblot

Um Proteine immunologisch nachzuweisen, wurden diese nach Auftrennung durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Western Transfer Puffer nach dem Semi-Dry Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Membran wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver in TBST und anschließend mit dem primären Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 15 Minuten erfolgten eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur und 3 weitere Waschschrte für je 15 Minuten mit TBST. Anschließend wurde die Membran mit dem Western Blotting Detektionsreagenz ECLPLUS nach Angaben der Hersteller inkubiert, ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt. Für den Nachweis von Erk wurde die Membran nach Detektion des pErk-Signals 30 Minuten bei 60 °C mit Stripping Puffer inkubiert, um den pErk-Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgten die gleichen Schritte wie nach Transfer der Proteine auf die Membran.

2.2.3.8 Massenspektrometrische Untersuchungen

Zur Identifizierung der CK2-spezifischen Phosphoakzeptorstelle in DRaf wurden Kinasereaktionen mit GST-CK2α, GST-DRaf und 40 nMol ATP, wie unter 2.2.3.6 für Kinasereaktionen unter Verwendung von rekombinantem GST-CK2α beschrieben, angesetzt.

Nach 20 Minuten Inkubation bei 30 °C wurden den Reaktionen je 1 µl 5 mM β-Glycerophosphat, 5 mM Natrium-ortho-vanadat und 5 mM Natriumfluorid zugegeben, 20 Minuten später wurden die Reaktionen abgestoppt. Nach Auftrennung der Proteine in einem Polyacrylamidgel wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, die Proteinbanden ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die Analyse der entstandenen Peptide erfolgte durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) nach Auftrennung durch Chromatographie (Jens Pfannstiel, Iris Klaiber; Universität Hohenheim). Der Nachweis der Phosphorylierung des Peptids erfolgte durch Messung der Massen des phosphorylierten Peptids, sowie des Peptids nach Neutralverlust (Massenverlust), der in einem Fall einem Phosphatrest und in einem anderen Fall einem Verlust eines Phosphatrestes sowie eines Wassermoleküls entsprach. Zur Identifizierung der Phosphorylierungsstelle wurde das phosphorylierte Peptid fragmentiert. Dabei entstehen Fragmentionen, bei denen am C- oder N-Terminus Aminosäuren fehlen (Ionen des y- oder b-Typs). Durch Überprüfung der Aminosäuresequenzen von Fragmenten mit Phosphatmodifikation war der Nachweis möglich, dass CK2α DRaf *in vitro* an Serin 11 phosphoryliert.

2.2.4 Fliegenhaltung

Fliegen wurden bei 25 °C auf Standardmedium und in einem 12 Stunden Tag/ Nacht Rhythmus gehalten.

2.2.4.1 Fütterungsexperimente

Für Experimente zur Auswirkung von Polyaminen auf den MAPK Signalweg und auf Proliferation wurden 3-4 Tage alte jungfräuliche Fliegen 5-6 Stunden gehungert und anschließend mit einer Lösung von 10-100 µM Polyaminen in Wasser, oder in PBS mit 15 % Saccharose gefüttert. Beide Lösungen enthielten geringe Mengen Lebensmittelfarbe um sicherstellen zu können, dass die Fliegen Nahrung aufgenommen haben. Da der spezifische CK2 Inhibitor TBB (4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol), der in einer Konzentration von 20 µM in einzelnen Ansätzen eines Versuchs verabreicht wurde, in Ethanol gelöst vorlag, wurde die Konzentration von Ethanol in der Nährlösung auf 4 ‰ in jedem Ansatz dieses Versuchs gebracht. Um Austrocknen des Hungermediums zu verhindern erfolgte die Fütterung in einer Feuchtekammer. Je 10-11 Fliegen pro Ansatz wurden nach 13 oder 23 Stunden aufgrund gefärbter Abdomen selektiert und in Homogenisierungspuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (10 mM Tris, pH 7,5; 2 mM EDTA; 5 mM EGTA; 1x Protease Inhibitor

Material und Methoden

Cocktail (Roche); 50 mM β -Glycerophosphat, 100 μ M Natrium-ortho-vanadat, 1 mM Natriumfluorid) homogenisiert. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte bei 10.000 U/min für 3 und 15 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Überstands nach der Bradford-Methode bestimmt, und die Lysate für Immunoblot-Analysen weiterverwendet.

3. Ergebnisse

3.1 DCK2 ist Teil des DKSR Komplexes und phosphoryliert DRaf

CK2 wird durch Bindung von Polyaminen an CK2 β in seiner Konformation und seiner Kinaseaktivität bezüglich des unphysiologischen Substrats Casein beeinflusst (Leroy et al., 1997a/b). Um mögliche Effekte, die von CK2 durch Bindung von Polyaminen und anschließender Substratphosphorylierung vermittelt werden messbar zu machen, war zuerst die Aufdeckung eines CK2-Substrates, sowie die Etablierung einer Messmethode nötig. Vor diesem Hintergrund wurden die unter 3.1 dargestellten Versuche durchgeführt.

3.1.1 DCK2 interagiert mit DKSR und vermittelt die Phosphorylierung von GST-DRaf

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass Modulation von Polyamintitern in *Drosophila* Einfluss auf CK2-abhängige Phosphorylierungen *in vitro* hat. Dabei wurde weiblichen Fliegen durch Fütterung der ODC-Inhibitor α -DFMO verabreicht und die Kinaseaktivität der Lysate nach Zugabe von [γ - 32 P]-ATP und dem CK2-Inhibitor Heparin als Kontrolle in 1x CK2 Kinasepuffer durch Autoradiografie überprüft. In diesem Versuch konnte eine Vielzahl von Phosphorylierungssignalen beobachtet werden, von denen einige durch Heparin unterdrückt wurden, und damit durch *Drosophila*-CK2 (DCK2) verursacht werden. Ein Phosphorylierungssignal, dessen Position im Polyacryl-amidgel auf ein Protein mit etwa 46 kDa schließen lässt, war bei DFMO-behandelten Fliegen abgeschwächt, während die Zugabe von Heparin zum Ersetzen des Signals durch ein weiteres Signal auf der Höhe von etwa 50 kDa führte. Polyamine sind an Zellproliferation und Apoptose beteiligt (Thomas und Thomas, 2001), Prozesse an denen auch CK2 und der MAPK-Signalweg beteiligt sind (St-Denis & Litchfield, 2009; Mc Kay & Morrison, 2007). Ein Zusammenhang zwischen Polyaminen und dem MAPK-Signalweg konnte durch verschiedene Zellkulturversuche gezeigt werden. Die Behandlung von embryonalen Mausfibroblasten und lymphozytischen Leukämiezellen aus Maus mit DFMO führte zu einer Reduktion der Phosphorylierung und der dadurch vermittelten Aktivierung der MAP-Effektorkinase Erk (Stefanelli et al., 2002; Flamigni et al., 1999). In einem weiteren Vorversuch konnte eine Reduktion der Menge von aktiviertem *Drosophila*-Erk (pDERk) nach Verfütterung von α -DFMO an Fliegen gezeigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse schien der MAPK-Signalweg ein vielversprechender Kandidat für die Weiterleitung von polyaminabhängigen Signalen über DCK2 zu sein.

In einer vorhergehenden Studie konnte zudem gezeigt werden, dass CK2 an das Gerüstprotein

KSR in Maus bindet (Ritt et al., 2007) und KSR sowie humanes B- und C-Raf phosphoryliert. In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob CK2 in *Drosophila* an KSR bindet.

Nachdem ein spezifischer Antikörper gegen *Drosophila*-KSR (DKSR) nicht zur Verfügung stand, musste dieser erst hergestellt werden. Dazu wurde ein DNS-Konstrukt, das für ein Fusionsprotein aus N-terminaler Glutathion S-Transferase und den ersten 502 Aminosäuren von DKSR kodiert, durch Polymerasekettenreaktion und anschließende Klonierung in ein bakterielles Expressionsplasmid hergestellt.

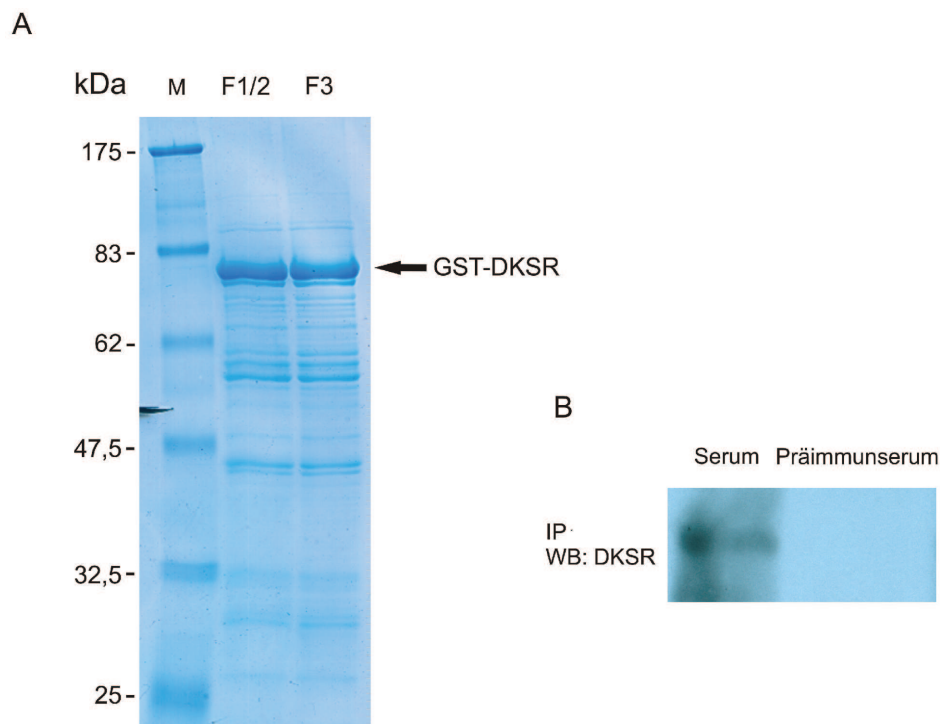


Abbildung 6) Aufreinigung des GST-DKSR Proteins und Überprüfung der Spezifität des generierten Immunsersums. Für die Herstellung eines Antiserums gegen *Drosophila*-KSR (DKSR) wurde ein GST-DKSR Fusionsprotein, das die ersten 502 Aminosäuren von DKSR beinhaltet, in *E.coli* überexprimiert und aufgereinigt. Dargestellt ist ein mit Coomassie gefärbtes Acrylamidgel, über das Proteinproben der gesammelten Fraktionen 1 und 2 (F1/2), sowie von Fraktion 3 (F3) aufgetrennt wurden. Dabei entsprechen die Fraktionen den jeweiligen Elutionsschritten von der GSH-Sepharose (A). Zur Überprüfung der Spezifität des generierten anti-DKSR Serums wurden Immunpräzipitationen von endogenem DKSR aus Schneider S2 Zellen mit dem Serum, sowie mit Serum vor Immunsierung durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine über ein Polyacrylamidgel und anschließendem Immunoblot, wurde der Immunoblot mit dem Serum inkubiert. Bei Verwendung des Serums in der Immunpräzipitation wird auf Immunoblotebene ein Signal erkannt, dessen Molekulargewicht DKSR entspricht (B).

Nach Expression des Proteins wurde dieses an GSH-Sepharose gebunden und nach vier Waschschritten in 3 Fraktionen von der Sepharose eluiert. Zur Überprüfung der Qualität des aufgereinigten Proteins wurden ein Aliquot der vereinigten Fraktionen 1 und 2 sowie ein Aliquot von Fraktion 3 nach Dialyse in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie angefärbt (Abbildung 6A). Die Position der Hauptbande im Gel entspricht etwa der Erwartungshaltung für das Protein, das ein Molekulargewicht von etwa 82 kDa hat.

Nach je dreimaliger Injektion von Proteinen der vereinigten Fraktionen 1 und 2 in zwei Meerschweinchen wurden Immunsereen gewonnen (SYC112, SYC113; Eurogentec). Um die Spezifität des Immunsereens zu überprüfen wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Nur die Immunsereen, die nach erfolgter Injektion des GST-Fusionsproteins hergestellt wurden, nicht aber die Präimmunsereen, detektieren auf Immunoblotebene das GST-DKSR Fusionsprotein, sowie ein Protein aus Schneider S2 Zellen, dessen Molekulargewicht dem von DKSR entspricht (nicht gezeigt). Um die Eignung des Immunsereens SYC 113 für Immunpräzipitationen zu überprüfen, wurde versucht endogenes DKSR aus Lysaten von Schneider S2 Zellen mit dem Immunsereum und dem Präimmunsereum zu präzipitieren. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde auf Immunoblot-Ebene das Vorhandensein von Proteinen, die mit dem Immunsereum interagieren, überprüft (Abbildung 6B). Dabei konnte ein Signal, das der Position im Gel nach DKSR entspricht, nur im Fall der Verwendung des Serums, nicht aber im Fall der Verwendung des Präimmunsereens während der Immunpräzipitation, detektiert werden.

Nachdem auch kein spezifischer Antikörper für die Detektion von *Drosophila*-CK2 α (DCK2 α) vorlag, wurden polyklonale Seren durch Injektion von GST-DCK2 α und durch Injektion von synthetisch generierten DCK2 α Peptiden in Meerschweinchen hergestellt. In beiden Fällen wurden, nach Auftrennung von Lysaten aus Schneider S2 Zellen durch SDS-PAGE, auf Immunoblot-Ebene eine Vielzahl von Signalen mit unterschiedlichem Molekulargewicht detektiert, die eine sichere Identifizierung von DCK2 α nicht zuließen. Auch Überexpression von DCK2 α in Zellen führte zu keiner deutlichen Änderung von Signalen der Lysate auf Immunoblot-Ebene. Eine eindeutige Identifizierung von DCK2 α durch die generierten Seren war damit unmöglich. Um DCK2 α detektieren zu können, sollte deshalb ein DCK2 α -Fusionsprotein in Zellen überexprimiert werden, das ein Epitop besitzt, gegen das spezifische Antikörper verfügbar sind. Zu diesem Zweck wurde das offene Leseraster von DCK2 α in das Plasmid pAc5.1myc kloniert (H. Wecklein), so dass ein Fusionsprotein aus sechsfach aufeinander folgendem N-terminalem Myc-Epitop und DCK2 α in Zellen exprimiert werden konnte. Durch Transfektion dieses Plasmids in Kombination mit einem Selektionsplasmid, das ein

Hygromycinresistenzgen besitzt, in Schneider S2 Zellen wurden Zellen hergestellt, die das Fusionsprotein (Myc-DCK2 α) stabil exprimieren. Nach 5 Wochen Selektion von Zellen in Hygromycinhaltigem Medium, wurde die Expression von Myc-DCK2 α von diesen Zellen, von transient mit Myc-DCK2 α transfizierten Zellen, und nicht transfizierten Zellen als Negativkontrolle auf Immunoblot-Ebene miteinander verglichen (Abbildung 7). Die Signalstärken zeigen, dass bei gleichen aufgetragenen Gesamtproteinmengen die Myc-DCK2 α Proteinmenge in stabilen Zellen deutlich höher als bei transienter Transfektion ist. Das lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass der größte Teil der Zellen, die ein Selektionsplasmid tragen auch Myc-DCK2 α exprimieren.

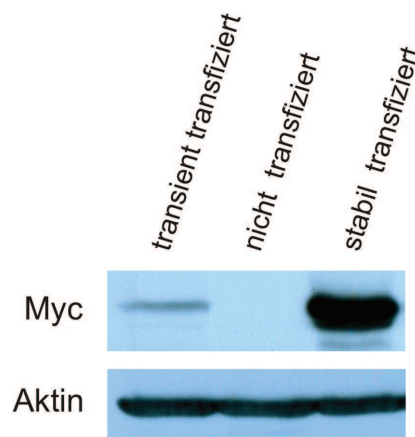


Abbildung 7) Überprüfung der Expression von Myc-DCK2 α in Schneider S2 Zellen. Die Myc-DCK2 α Proteinmenge von transient und stabil transfizierten Schneider S2 Zellen wurde auf Immunoblot-Ebene miteinander und mit nicht transfizierten Zellen verglichen. Die Myc-DCK2 α Proteinmenge in stabil transfizierten Zellen ist deutlich höher als in transient transfizierten Zellen, was auf die negative Selektion der Mehrzahl von nicht transfizierten Zellen hinweist.

Nach diesen Vorarbeiten sollte überprüft werden, ob CK2 mit KSR in *Drosophila* interagiert. Dazu wurde der polyklonale anti-DKSR Antikörper nach kovalenter Kopplung an Protein-G-Agarose für Immunpräzipitationen benutzt. Endogenes DKSR wurde dabei aus Schneider S2 Zellen, die stabil Myc-DCK2 α exprimieren, immunpräzipitiert. Nach Auftrennung der Proben durch SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot wurde die Blotmembran mit Antikörpern gegen DKSR, das Myc-Epitop und DCK2 β (Jauch et al., 2002) inkubiert. Signale sind für DKSR, Myc und DCK2 β sichtbar (Abbildung 9, unten), was darauf hindeutet, dass das *Drosophila* CK2 Holoenzym an DKSR assoziiert vorliegt. Um überprüfen zu können, ob

Drosophila Raf (DRaf) durch an DKSR gebundenes DCK2 phosphoryliert wird, sollte DRaf in Bakterien überexprimiert und aufgereinigt werden. Dazu wurde das offene Leseraster, das für DRaf kodiert, durch Polymerasekettenreaktion mit Restriktionsschnittstellen versehen und in ein bakterielles Expressionsplasmid kloniert. Nach Expression des GST-DRaf Fusionsproteins wurde dieses aufgereinigt und dialysiert. Proteinproben der Elutionsfraktionen 1-3 (F1-3) wurden über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abbildung 8). Die Bande mit dem größten Molekulargewicht entspricht GST-DRaf, wie durch Massenspektrometrische Analyse bestätigt werden konnte (Abschnitt 3.4.1). Neben dieser Bande ist aber eine grosse Anzahl an Proteinen mit unterschiedlichen Molekulargewichten aufgereinigt worden, bei denen es sich vermutlich um Abbauprodukte von GST-DRaf oder um bakterielle Proteine handelt.

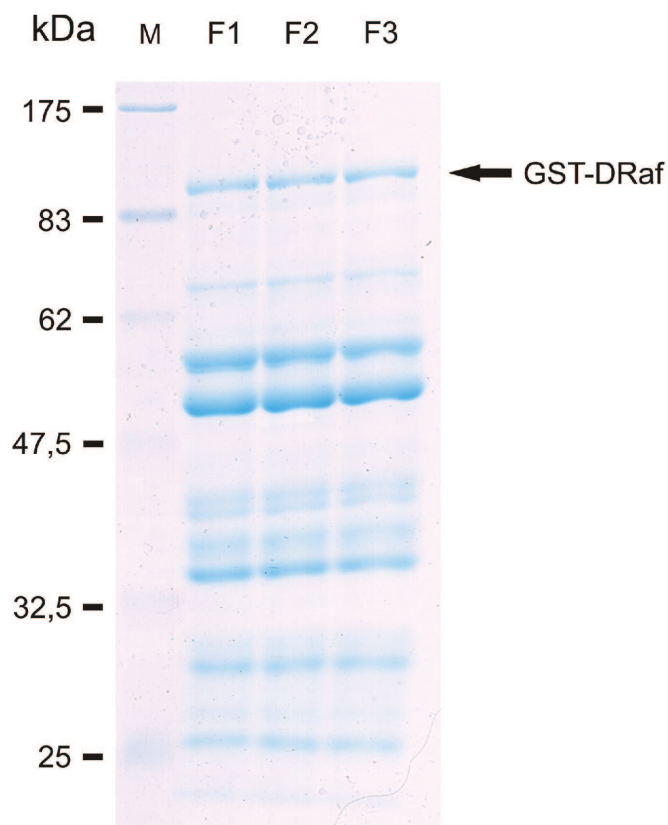


Abbildung 8) Aufreinigung des GST-DRaf Proteins. Ein rekombinantes Fusionsprotein, das aus N-terminaler Glutathion-S-Transferase und *Drosophila*-Raf (DRaf) besteht, wurde durch Expression in *E. coli* hergestellt. Nach Aufreinigung und Dialyse des Proteins wurden Proteinproben der Elutionsfraktionen 1-3 (F1-3) über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Beschreibung siehe Text).

Durch die Aufreinigung des GST-DRaf Proteins stand ein Protein zur Verfügung, dessen Vertebraten-Homolog durch CK2 α phosphoryliert wird (Ritt et al., 2007). Parallel zur beschriebenen Immunpräzipitation von endogenem DKSR aus Schneider S2 Zellen wurden Teile des Immunpräzipitats entnommen und wie angegeben mit rekombinantem GST-DRaf und dem CK2-Inhibitor TBB zur Überprüfung der Kinaseaktivität mit [γ - 32 P]-ATP in 1x CK2 Kinasepuffer inkubiert. TBB ist mit einem IC $_{50}$ -Wert (halbmaximale Hemmung des Enzyms) von 0.9 μ M in Rattenleber und 1.6 μ M bei Verwendung von humanem rekombinantem CK2 ein effektiver, und mit einem Ki-Wert (Dissoziationskonstante des Enzym/Inhibitor-Komplexes) von 0,4 μ M bezüglich CK2 im Vergleich zu 47 μ M bezüglich CK1 spezifischer Inhibitor (Sarno et al., 2001). Die Zugabe von GST-DRaf resultiert in dem Auftauchen eines Phosphorylierungssignals auf Höhe des GST-DRaf-Proteins (Abbildung 9, oben links, Spur 2), das durch Zugabe von TBB (Spur 3) unterdrückt werden kann. Dadurch konnte gezeigt werden, dass GST-DRaf in Abhängigkeit von DCK2, das an DKSR assoziiert vorliegt, *in vitro* phosphoryliert wird.

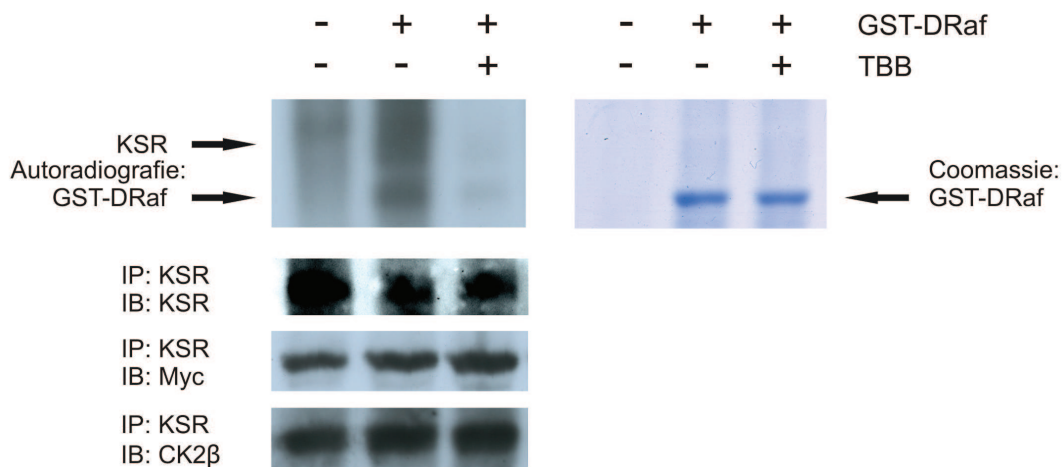


Abbildung 9) DCK2 interagiert mit DKSR und vermittelt die Phosphorylierung von DRaf. Durch Immunpräzipitationen (IP) von DKSR aus stabil mit Myc-DCK2 α transfizierten Schneider S2 Zellen wurde die Interaktion mit Myc-DCK2 α und DCK2 β auf Ebene eines Immunoblot (IB) bestätigt (unten). Parallel dazu wurden Immunpräzipitate in *in vitro*-Reaktionen zur Bestimmung der Kinaseaktivität wie angegeben mit GST-DRaf und dem CK2-Inhibitor TBB inkubiert und das Signal durch Autoradiografie nachgewiesen (links oben). Dabei wird GST-DRaf in Abhängigkeit von DCK2 phosphoryliert (Spur 2), wie durch Abnahme der Phosphorylierung durch Inhibition von DCK2 mit dem spezifischen Inhibitor TBB zu sehen ist (Spur 3). Zum Vergleich eingesetzter GST-DRaf Mengen wurde das Polyacrylamidgel nachträglich mit Coomassie gefärbt (rechts).

Ein zusätzliches Phosphorylierungssignal, das dem Molekulargewicht im Gel nach zu urteilen DKSR entspricht, wurde in allen Kinasereaktionen, bei denen DKSR-Immunkomplexe verwendet wurden, detektiert und wird ebenfalls durch TBB unterdrückt. Ob KSR tatsächlich in *Drosophila* durch CK2 phosphoryliert wird, oder ob es sich um ein anderes mit DKSR assoziiertes Protein handelt, kann durch diesen Versuch aber nicht beantwortet werden.

3.1.2 DCK2 phosphoryliert DRaf, aber nicht DErk

Die im Abschnitt 3.1.1 beschriebene Phosphorylierung von GST-DRaf durch immunpräzipitierte DKSR-Komplexe ist abhängig von DCK2, wie durch deren Inhibition nach Zugabe von TBB gezeigt werden konnte. KSR liegt in der Zelle aber als Multiproteinkomplex mit Molekulargewichten bis zu 1000 kD vor (Pérez-Rivas et al., 2010), in dem neben CK2 die Kinasen Raf, Mek und Erk sowie C-TAK1 nachweisbar sind. Nachdem der vorhergesagte Anteil von durch CK2 vermittelten Phosphorylierungen des menschlichen Proteoms bei 20,9 % liegt (Salvi et al., 2009), und CK2 zwischen Mensch und *Drosophila* hoch konserviert ist, besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass die CK2-abhängige Phosphorylierung von DRaf indirekt durch Aktivierung einer weiteren Kinase stattfindet. Um dies zu überprüfen sollte GST-DRaf parallel zu der Inkubation mit immunpräzipitiertem DKSR (unter 3.1.1 beschrieben), in einem zweiten Ansatz mit aufgereinigtem bakteriellem *Drosophila* CK2 α (DCK2 α) inkubiert werden. Zusätzlich sollte in der gleichen Weise untersucht werden, ob rekombinantes *Drosophila* Erk (DErk) durch DCK2 phosphoryliert wird. Im Säugersystem konnte nämlich gezeigt werden, dass Erk C-Raf phosphorylieren kann (Anderson et al., 1991; Ueki et al., 1994), wodurch DErk nach einer möglichen Aktivierung durch DCK2 in dem hier verwendeten *Drosophila*-System seinerseits DRaf phosphorylieren könnte.

Um diese Versuche durchführen zu können sollten DCK2 α und DErk als GST-Fusionsproteine in Bakterien überexprimiert und aufgereinigt werden. Für DCK2 α konnte gezeigt werden, dass sie im Gegensatz zu den meisten anderen Kinasen als rekombinantes Protein aktiv ist (D. Pühringer, Diplomarbeit). DErk wurde in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert und wie auch ein Expressionsvektor zur Herstellung von rekombinantem DCK2 α (D. Pühringer) in Bakterien transformiert. Nach Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden diese dialysiert. Aliquots der Proteine der gesammelten Elutionsfraktionen 1 und 2 von GST-DCK2 α (Abbildung 10 A) und GST-DErk (Abbildung 10 B), die für weitere Versuche verwendet wurden, wurden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

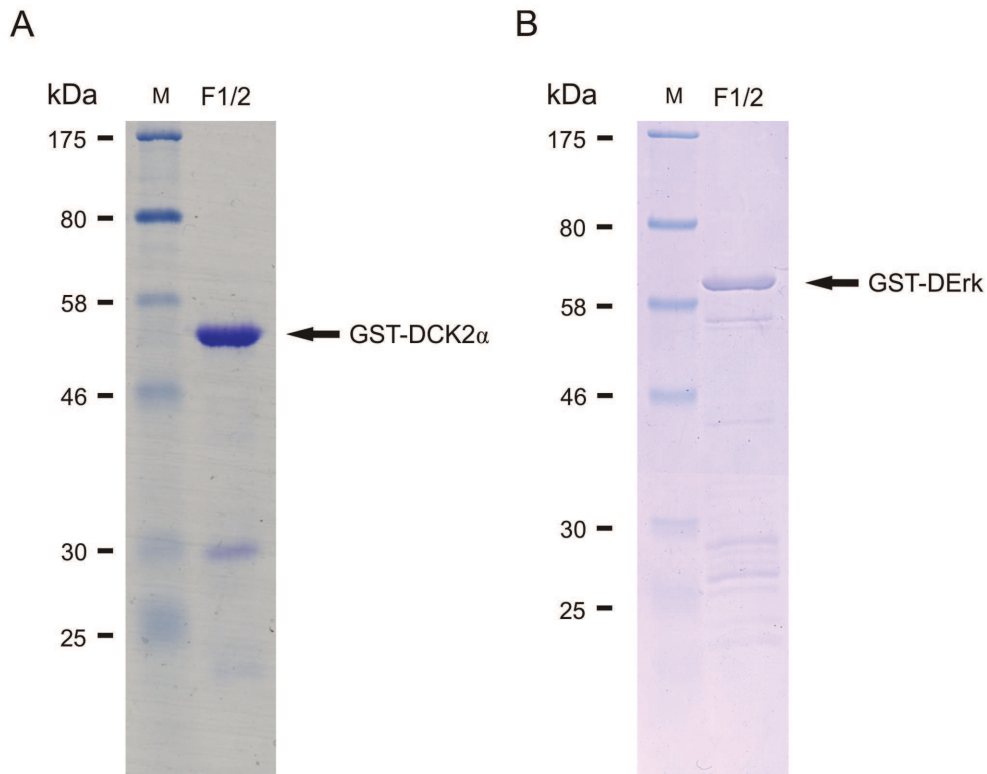


Abbildung 10) Aufreinigung der GST-DCK2 α und GST-DErk Proteine. Um die Phosphorylierung von DErk und DRaf durch DCK2 α überprüfen zu können wurden Fusionsproteine, die aus N-terminaler Glutathion-S-Transferase und *Drosophila*-Erk (DErk), beziehungsweise *Drosophila*-CK2 α (DCK2 α) bestehen, durch Expression in *E. coli* hergestellt. Nach Aufreinigung und Dialyse der Proteine wurden Proteinproben der kombinierten Elutionsfraktionen 1 und 2 (F1/2) von GST-DCK2 α (A) und GST-DErk (B) über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

Nach Aufreinigung von GST-DCK2 α und GST-DErk konnte überprüft werden, ob rekombinantes DCK2 α DRaf und DErk phosphoryliert. Die Kinasereaktion von GST-DRaf mit GST-DCK2 α führt zur Phosphorylierung von GST-DRaf (Abbildung 11, Spur 2), aber nicht des GST-Proteins. Dadurch konnte gezeigt werden, dass DCK2 α GST-DRaf *in vitro* direkt phosphoryliert, wobei die Phosphorylierungsstelle nicht innerhalb der GST-Sequenz, sondern innerhalb der DRaf-Sequenz liegt. Dagegen ist GST-DErk kein *in vitro*-Substrat von DCK2 α , da es nicht durch rekombinantes DCK2 α phosphoryliert wird (Spur 6). Bei Inkubation von GST-DErk mit immunpräzipitiertem DKSR ist ein Signal zu beobachten, dass möglicherweise durch an DKSR gebundenes DMek zustande kommt.

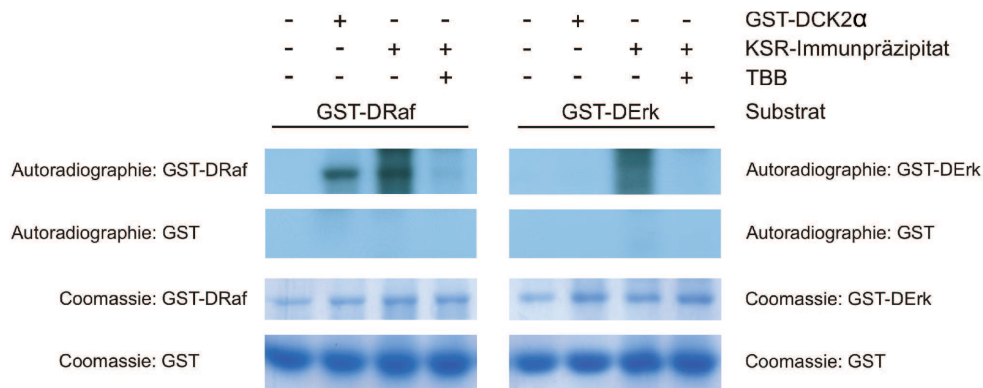


Abbildung 11) DCK2 phosphoryliert DRaf direkt, aber nicht DERk. GST-DRaf und GST-DERk wurden in *in vitro*-Kinasereaktionen mit immunpräzipitiertem DKSR, TBB und rekombinantem GST-DCK2 α inkubiert (oben). GST-DRaf wird direkt durch GST-DCK2 α (Spur 2), sowie durch Proteine des DKSR-Immunpräzipitats (Spur 3) phosphoryliert. TBB inhibiert die DRaf-Phosphorylierung durch Inhibition von DCK2 (Spur 4). Dagegen wird GST-DERk nicht direkt durch DCK2 α phosphoryliert (Spur 6), während ein Signal bei Inkubation von DKSR-Immunpräzipitat mit GST-DERk möglicherweise durch an DKSR gebundenes DMek verursacht wird. Zum Vergleich der eingesetzten Proteinmengen wurde eine Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels durchgeführt (unten).

3.2 Polyaminabhängige Phosphorylierung von DRaf durch DCK2

KSR ist ein Gerüstprotein, das an der Plasmamembran als Plattform für die Interaktion der Kinasen Raf, Mek und Erk dient und aktivierend auf den MAPK-Signalweg wirkt (Roy et al., 2002). Die Interaktion von CK2 und KSR in Säugetieren ist als ubiquitär beschrieben und wirkt nach Raf-Phosphorylierung aktivierend auf den MAPK-Signalweg (Ritt et al., 2007). Im Abschnitt 3.1 konnte gezeigt werden, dass CK2 in *Drosophila* an DKSR assoziiert vorliegt und dabei DRaf phosphoryliert. Nachdem CK2 als Modulator von Signalwegen betrachtet wird (Meggio et al., 2003), stellt sich die Frage nach Regulationsmöglichkeiten der Phosphorylierung von DRaf durch DCK2. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, ob sich die Phosphorylierungsaktivität von an DKSR assoziiertem DCK2 bezüglich DRaf in Anwesenheit von Polyaminen ändert.

3.2.1 Spermin inhibiert die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2

Bei der Durchführung von Kinasereaktionen ist davon auszugehen, dass die Reaktion sich nach einiger Zeit einer Plateauphase annähert und sich das Signal somit einem Endpunkt annähert, sofern keine Dephosphorylierung stattfindet. Um Unterschiede in der Phosphorylierungsstärke zu

detektieren, muss die Reaktion deshalb vor Erreichen der Plateauphase beendet werden.

Bei den eingesetzten Mengen von DKSR-Immunpräzipitat und GST-DRaf-Protein (beschrieben unter 2.2.3.6) konnte in einem Vorversuch gezeigt werden, dass bis zu einer Inkubationszeit der Kinasereaktion von 16 Minuten der Endpunkt der Phosphorylierung nicht erreicht wird. Die folgenden Kinasereaktionen wurden 7 Minuten inkubiert.

In diesem Versuch sollte herausgefunden werden, ob Spermin einen Einfluss auf die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2 hat, und welche minimale Polyaminkonzentration eingesetzt werden muss, um mögliche Effekte detektieren zu können. Dazu wurden DKSR-Immunpräzipitate wie bereits im Abschnitt 3.1.1 beschrieben mit GST-DRaf und wo angegeben mit TBB und Spermin in einer Kinasereaktion inkubiert. Die Immunpräzipitation von endogenem DKSR-Protein aus Schneider S2 Zellen, die stabil mit Myc-DCK2 α transfiziert waren, sowie die anschließenden Waschschrte und die Kinasereaktionen wurden in Anwesenheit der angegebenen Spermin-Konzentrationen durchgeführt, um die Bindung der Polyamine an DCK2 zu ermöglichen. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte der Phosphorylierungsnachweis durch Autoradiografie (Abbildung 12). Das verwendete Acrylamidgel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt um die Mengen eingesetzter GST und GST-DRaf Proteine miteinander vergleichen zu können.

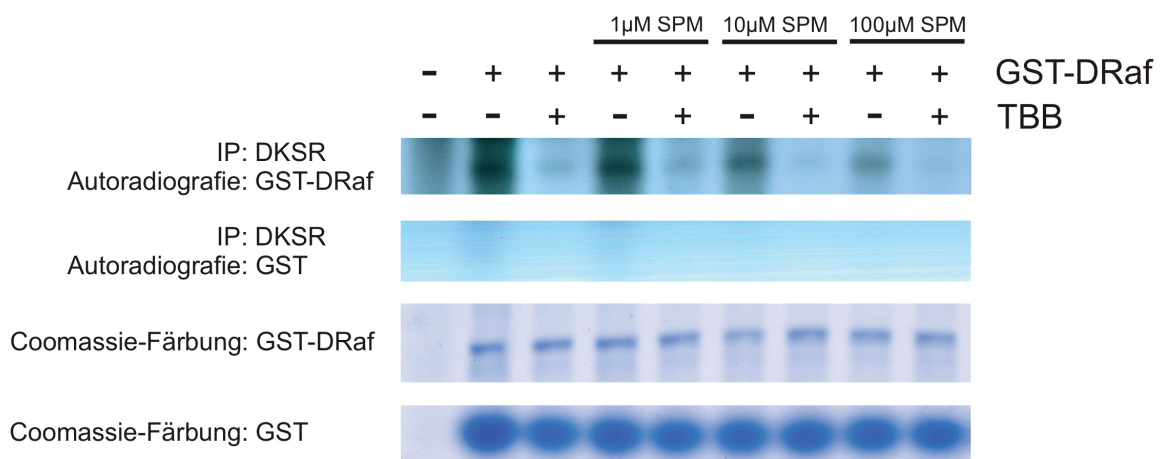


Abbildung 12) Spermin inhibiert die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2. Immunpräzipitiertes DKSR aus Schneider S2 Zellen wurde mit unterschiedlichen Spermin-Konzentrationen, GST-DRaf und dem CK2-Inhibitor TBB in einer Kinasereaktion inkubiert (oben). Je höher die Konzentration an Spermin, desto geringer die DRaf-Phosphorylierung (vergleiche Spuren 2, 4, 6 und 8). Die Reduktion der Signale nach TBB-Zugabe bestätigt die Abhängigkeit der Phosphorylierung von DCK2 (Spuren 3, 5, 7 und 9). Die Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels zeigt, dass die eingesetzten Proteinmengen vergleichbar sind (unten).

Mit steigender Sperminkonzentration wird die Phosphorylierung von GST-DRaf zunehmend unterdrückt (vergleiche Spuren 2, 4, 6 und 8). Es konnte also gezeigt werden, dass Spermin konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von GST-DRaf durch DCK2 inhibiert, wobei der Effekt bereits bei Inkubation mit einer relativ geringen Menge von 10 μ M Spermin deutlich ist. Die Reduktion der Phosphorylierung nach TBB-Zugabe bestätigt die CK2-Abhängigkeit der Reaktionen (Spuren 3, 5, 7 und 9), während die Coomassie-Färbung des Gels die Aussage zulässt, dass die eingesetzten GST-Proteinmengen vergleichbar sind.

3.2.2 Putrescin und Spermidin wirken nicht inhibitorisch auf die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2

In *in vitro*-Kinasereaktionen wurde gezeigt, dass sowohl Putrescin, als auch Spermidin und Spermin konzentrationsabhängig die Kinaseaktivität von CK2 gegenüber Casein erhöhen (Leroy et al., 1997a). Dabei ist die Aktivierung von CK2 stärker, je höher die Affinität des Polyamins zu CK2 ist, welche von der Menge der positiven Ladungen abhängt. Spermin mit 4 positiven Ladungen erhöht die Kinaseaktivität von CK2 bezüglich Casein bei einer Konzentration von 1 mM um das siebenfache, wohingegen die Kinaseaktivität durch 1mM Putrescin mit 2 positiven Ladungen um weniger als das dreifache gesteigert wird.

Nachdem im Abschnitt 3.2.1 die Inhibition der Phosphorylierung von DRaf durch DCK2 in Anwesenheit von Spermin gezeigt werden konnte, sollte im nächsten Versuch überprüft werden, ob Putrescin und Spermidin ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die DRaf-Phosphorylierung haben. Dabei erfolgten die KSR-Immunpräzipitationen (wie bereits im Abschnitt 3.2.1 beschrieben), die anschließenden Waschschrte, sowie die folgenden Kinasereaktionen in Anwesenheit von 100 μ M Putrescin, Spermidin oder Spermin. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte der Phosphorylierungsnachweis durch Autoradiografie. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie angefärbt, um die eingesetzten GST-Proteinmengen miteinander vergleichen zu können. Jeweils der gleiche Anteil aus den einzelnen Immunpräzipitaten wurde in einem zweiten Ansatz auf Immunoblot-Ebene hinsichtlich der Mengen von DKSR, Myc-DCK2 α und DCK2 β überprüft.

Wie schon in Versuch 3.2.1 gezeigt, wird die Phosphorylierung von GST-DRaf bei Zugabe von Spermin (Abbildung 13, Spur 8), im Vergleich zur Kontrolle ohne Zugabe von Polyaminen, inhibiert, wohingegen das Vorhandensein von Putrescin und Spermidin die Phosphorylierung (Spuren 4 und 6) nicht signifikant inhibiert. Die Analyse der Immunpräzipitationen zeigt, dass die in die Kinasereaktionen eingesetzten Mengen an DKSR, Myc-DCK2 α und DCK2 β

Ergebnisse

vergleichbar sind, und die eingesetzten Polyamine die Bindung von DCK2 an DKSR nicht wesentlich beeinflussen. Unterschiede in der Menge phosphorylierten DRaf-Proteins sind also nicht auf unterschiedliche DCK2-Proteinmengen, sondern auf Unterschiede in der Phosphorylierungsaktivität von DCK2 zurückzuführen. Auch Unterschiede in der Menge eingesetzter GST-Proteinmengen sind nicht festzustellen und kommen als Erklärung der unterschiedlichen Signalstärken nicht in Frage.

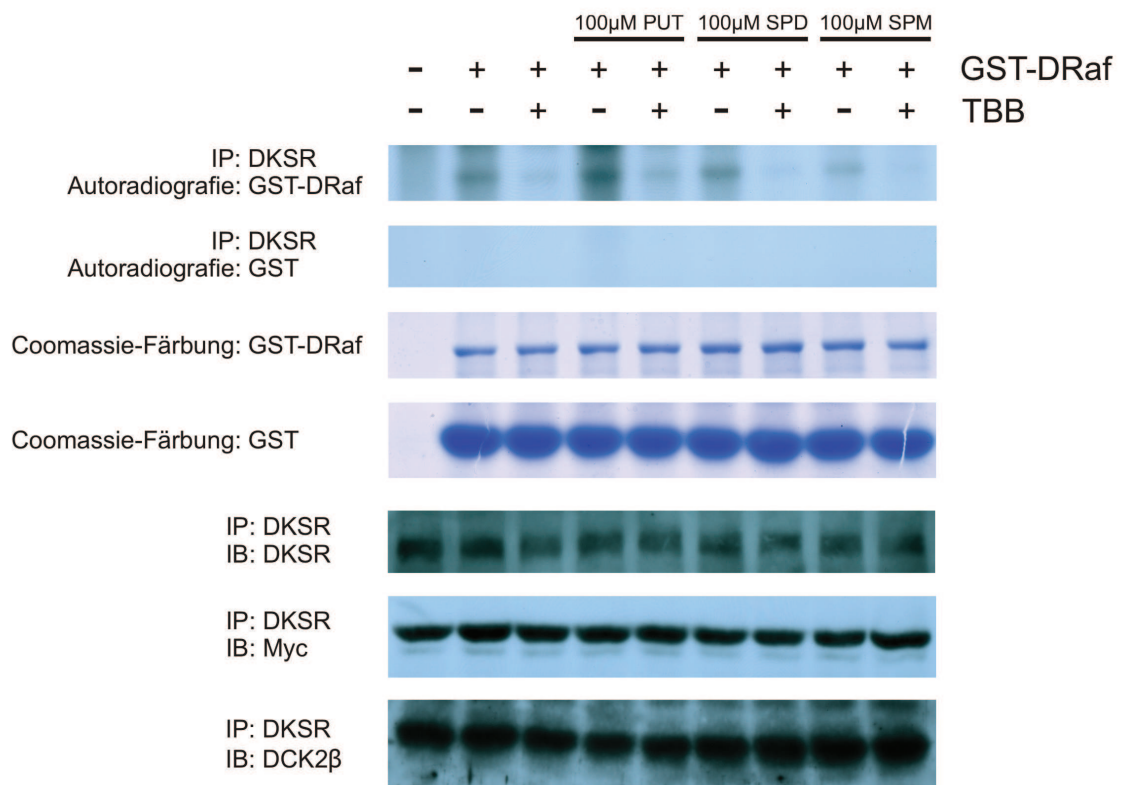


Abbildung 13) Putrescin und Spermidin wirken nicht inhibitorisch auf die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2. Die Phosphorylierung von GST-DRaf wird durch Spermin (Spur 8, oben) unterdrückt, wohingegen Putrescin und Spermidin nicht zu einer deutlichen Abnahme des Signals führen (Spuren 4 und 6, oben). Zum Vergleich der eingesetzten GST-Proteinmengen wurde eine Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels durchgeführt. Die Analyse von Aliquots der für den Kinaseassay eingesetzten Immunpräzipitate auf Immunoblot-Ebene bestätigt, dass die eingesetzten Mengen von DKSR, DCK2 α und DCK2 β vergleichbar sind (unten).

3.2.3 Der Einfluss von Polyaminen auf die DRaf-Phosphorylierung ist unabhängig vom Phosphatgruppennonor.

CK2 kann sowohl ATP als auch GTP mit hoher Effizienz als Phosphatgruppennonor benutzen (Gatica et al., 1993), wobei die Kinaseaktivität durch mehrere weitere Faktoren beeinflusst wird. So ist die Verwendung von GTP in Anwesenheit des Cofaktors Mn^{2+} effizienter, während in Anwesenheit von Mg^{2+} , das in diesem Versuch verwendet wurde, die Verwendung von ATP effizienter ist. Hier sollte überprüft werden, ob der Phosphatgruppennonor eine Auswirkung auf die unterschiedliche Phosphorylierungsaktivität von DCK2 in Abhängigkeit von Polyaminen bezüglich DRaf hat. Dazu wurden die gleichen Kinasereaktionen wie in Abschnitt 3.2.2 unter Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ durchgeführt und die Phosphorylierung von GST-DRaf nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE über Autoradiografie nachgewiesen (Abbildung 14). Auch bei Verwendung von GTP als Phosphatgruppennonor führt Spermin (Spur 8) zu einer Inhibition der GST-DRaf Phosphorylierung durch DCK2, während keine deutliche Inhibition in Anwesenheit von Putrescin oder Spermidin (Spuren 4 und 6) festzustellen ist.

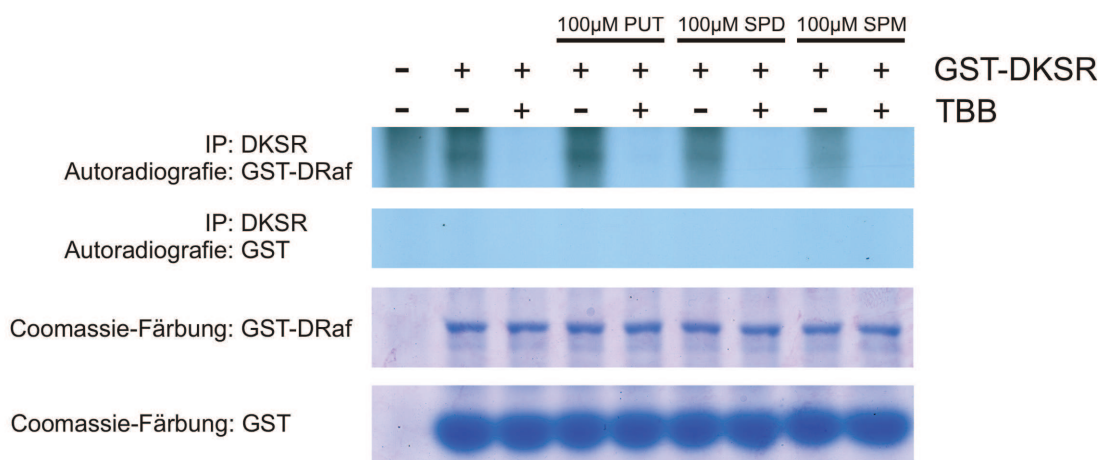


Abbildung 14) Der Einfluss von Polyaminen auf die DRaf Phosphorylierung ist unabhängig vom Phosphatgruppennonor. Die Phosphorylierung von GST-DRaf wird wie im Falle der Verwendung von ATP (vgl. Abbildung 13) auch bei der Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ durch Spermin (Spur 8, oben) unterdrückt, wohingegen Putrescin und Spermidin (Spuren 4 und 6, oben) nicht zu einer deutlichen Inhibition des Signals führen. Wie aus der Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels hervorgeht (unten), sind die eingesetzten Proteinmengen vergleichbar.

3.3 Wirkungen von Polyaminen in Zellen

Das Kernmodul des MAPK-Signalwegs besteht aus den Kinasen Raf, Mek und Erk, die schrittweise durch Phosphorylierung aktiviert werden und dadurch verschiedene physiologische Vorgänge in Zellen einleiten (Mc Kay & Morrison, 2007).

In den vorangegangenen Versuchen wurde die Beeinflussung der Kinaseaktivität von CK2 durch Polyamine bezüglich der Phosphorylierung von DRaf *in vitro* gezeigt. Wenn die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2 einen aktivierenden Effekt auf den MAPK-Signalweg hat, sollte die Menge von aktiviertem pDERk in Zellen abhängig von dieser Phosphorylierung sein. In diesem Fall ist zu erwarten, dass eine Inhibition der DRaf-Phosphorylierung durch Spermin zu einer Reduktion der DERk-Aktivierung führt.

3.3.1 Spermin wirkt inhibitorisch auf den MAPK-Signalweg

Die in den Abschnitten 3.1 und 3.2 dargestellten Experimente zur Überprüfung der Auswirkung von Polyaminen wurden *in vitro* auf der Ebene von DRaf durchgeführt. In dem hier dargestellten Versuch sollte überprüft werden, ob Polyamine in Abhängigkeit von DCK2 einen spezifischen Einfluss auf die Aktivierung der Effektor kinase DERk haben. Um möglichst nahe an der *in vivo*-Situation zu bleiben, wurden für die folgenden Versuche Schneider S2 Zellen verwendet. Um sicherzustellen, dass diese Zellen DCK2 α exprimieren wurde ein Vorversuch durchgeführt, in dem die Expression von DCK2 α in Schneider S2 Zellen durch reverse Transkription, Polymerasekettenreaktion und anschließende Sequenzierung des DNS-Fragments nachgewiesen werden konnte. Schneider S2 Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Medium mit 1 % FCS ausgesät. Wo angegeben wurden dem Medium 6 Stunden vor der Ernte der Zellen je 100 μ M der angegebenen Polyamine (siehe Abbildung 15) sowie 3 Stunden vor der Ernte 10 μ M des CK2-Inhibitors TBB zugesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen 5 Minuten in Medium mit 10 % FCS stimuliert, sedimentiert und in Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren aufgenommen. Zur Analyse der DERk-Aktivierung wurde die Menge an aktivem diphosphoryliertem DERk in den Lysaten auf Immunoblot-Ebene überprüft. Der verwendete Antikörper erkennt nur Erk, das durch Phosphorylierung eines Threonin- sowie eines Tyrosinrestes innerhalb des regulatorischen Bereichs aktiviert wurde (entspricht Thr 183 und Tyr 185 in Erk-2 von Maus, bzw. Thr 197 und Tyr 199 in DERk). Als Ladekontrolle wurde die Gesamtmenge an DERk überprüft. Die Inkubation mit dem anti-Erk Antikörper erfolgte nach Entfernen des anti-pErk Antikörpers durch Inkubation der Membran mit Stripping Puffer für 30 Minuten bei 60 °C.

Spermin inhibiert die Aktivierung von DERk deutlich (Spur 7, oben), während die Auswirkungen von Putrescin und Spermidin (Spuren 3 und 5) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Spur 1) deutlich geringer ausfallen. Die Abnahme der DERk-Aktivierung bei Zugabe von TBB zu den jeweiligen Ansätzen bestätigt die Abhängigkeit der Reaktionen von DCK2.

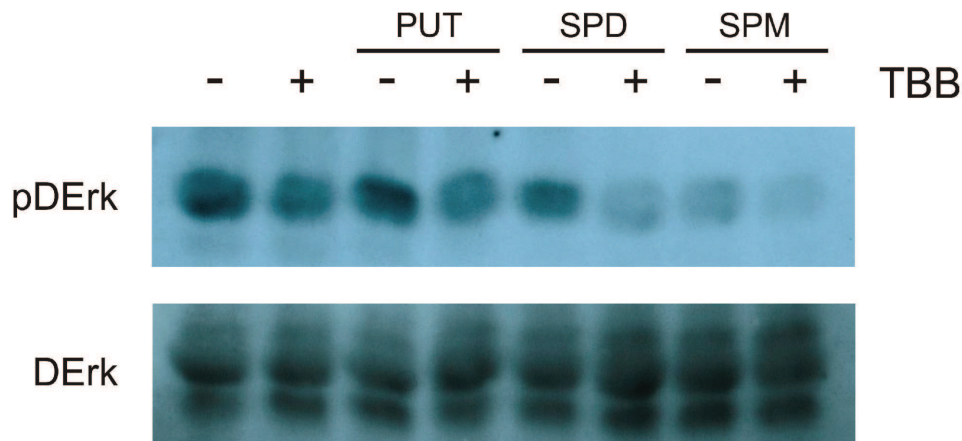


Abbildung 15) Spermin wirkt inhibitorisch auf den MAPK-Signalweg. Schneider S2 Zellen wurden 6 Stunden mit 100 μ M Polyaminen und 3 Stunden mit 10 μ M TBB behandelt. Die Immunoblot-Analyse der Lysate zeigt nur im Fall der Behandlung mit Spermin (Spur 7) eine signifikante Reduktion der Aktivierung von DERk. Die Reduktion der Signale durch TBB-Zugabe zeigt die Abhängigkeit der DERk-Aktivierung von der DCK2 Kinaseaktivität.

3.3.2 Die Relation der Polyamine zueinander ist ausschlaggebend für die Signalstärke des MAPK-Signalwegs

Das Ergebnis des in Abschnitt 3.3.1 dargestellten Versuchs zeigt eine unterschiedliche Stärke der Erk-Aktivierung bei Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Polyaminen. Polyamine unterscheiden sich aufgrund ihrer Kettenlänge und der Anzahl der Ladungen. Dementsprechend ist auch die Affinität von Polyaminen zu CK2 β unterschiedlich, wie durch Verdrängungsexperimente von an CK2 gebundenem Spermin durch verschiedene Polyamine gezeigt werden konnte (Leroy et al., 1997a). Bei diesen Versuchen war im Vergleich zur Verdrängung von Spermin durch Spermin in etwa die 5-fache Menge an Spermidin, beziehungsweise die 10-fache Menge an Putrescin für die halbmaximale Verdrängung von Spermin nötig.

Wenn die unterschiedlichen Polyamine spezifische Wirkungen auf die DERk-Aktivierung haben, sollte die Zugabe von Putrescin oder Spermidin die inhibitorische Wirkung von Spermin durch

dessen Verdrängung abschwächen. Um dies zu überprüfen wurden Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Medium mit 1 % FCS ausgesät, 6 Stunden mit $100 \mu\text{M}$ Spermin und, wo angegeben, zusätzlich mit $100 \mu\text{M}$ Putrescin oder Spermidin inkubiert (Abbildung 16). Zur Überprüfung der DCK2-Abhängigkeit der DERK-Aktivierung wurden Zellen parallel dazu zusätzlich 3 Stunden lang mit $10 \mu\text{M}$ TBB behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen 5 Minuten in Medium mit 10 % FCS stimuliert, sedimentiert und in Lysepuffer aufgenommen. Zur Analyse der Erk-Aktivierung wurde die Menge an aktivem phosphoryliertem DERK der Lysate auf Immunoblot-Ebene überprüft. Als Ladekontrolle wurde die Gesamtmenge an DERK überprüft. Die Inkubation mit dem anti-Erk Antikörper erfolgte nach Entfernen des anti-pErk Antikörpers durch Inkubation der Membran mit Stripping Puffer für 30 Minuten bei 60°C .

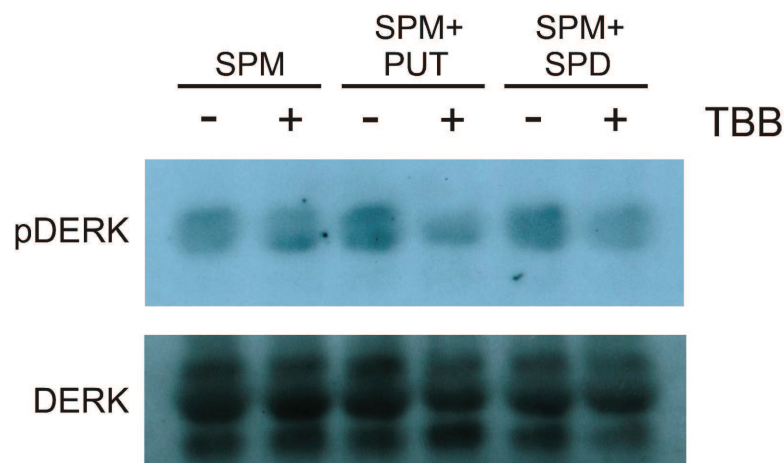


Abbildung 16) Die Relation der Polyamine zueinander ist ausschlaggebend für die Signalstärke des MAPK-Signalwegs. Schneider S2 Zellen wurden 6 Stunden mit je $100 \mu\text{M}$ der angegebenen Polyamine und 3 Stunden mit $10 \mu\text{M}$ TBB behandelt. Die Immunoblot-Analyse der Lysate zeigt ein niedriges Niveau von aktiviertem pDERK nach Behandlung der Zellen mit Spermin, sowie eine Zunahme des Signals bei gleichzeitiger Behandlung mit Putrescin oder Spermidin. Eine Reduktion der Signale durch TBB-Zugabe zeigt die Abhängigkeit der Erk-Aktivierung von der DCK2 Kinaseaktivität.

Das Niveau der DERK-Aktivierung bei Inkubation mit Spermin ist niedrig (Spur 1), während das zusätzliche Verabreichen von Putrescin oder Spermidin im Vergleich dazu zu einer Verstärkung des Signals führt (Spuren 3 und 5). Dadurch konnte gezeigt werden, dass Putrescin und Spermidin, im Vergleich zu Zellen die nur mit Spermin behandelt wurden, einen aktivierenden Effekt ausüben. Damit ist das Verhältnis der Polyamine zueinander wesentlich für die Stärke der

Aktivierung von DERK.

3.4 Identifizierung der DCK2 Phosphorylierungsstelle in DRaf

In Vertebraten existieren drei verschiedene Raf-Proteine. Die humanen B-Raf und C-Raf Proteine werden an Serin 446 bzw. Serin 338 durch CK2 phosphoryliert (Ritt et al., 2007). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen A-Raf und C-Raf wird außerdem davon ausgegangen, dass A-Raf ebenfalls von CK2 phosphoryliert wird. DRaf ist das einzige Raf-Protein in *Drosophila* und weist mit Serin 417 ein Serin mit hoher Homologie zu der CK2-Phosphorylierungsstelle in B-Raf bezüglich dessen Sequenzumgebung und der Lage innerhalb von humanen Raf Proteinen auf (zusammengefasst in Abbildung 17).

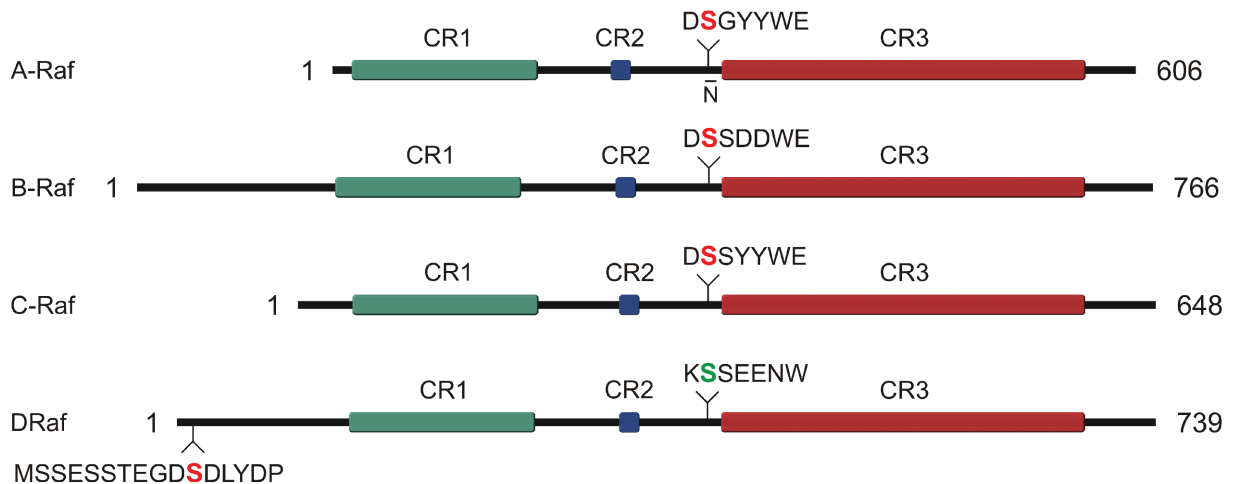


Abbildung 17) Vergleich der Lage funktioneller Bereiche von humanem A-, B- und C-Raf sowie *Drosophila* DRaf. Raf-Proteine besitzen 3 konservierte Regionen (CR1, CR2 und CR3). CR1 beinhaltet die Ras Bindungsdomäne und eine Cysteinreiche Region, CR2 ist durch eine hohe Anzahl an Serin- und Threoninresten gekennzeichnet und CR3 beinhaltet die Kinasedomäne. Durch CK2 phosphorylierte Serinreste (rot) und die potentielle CK2-Phosphorylierungsstelle in DRaf (grün) sind mit der sie umgebenden Sequenz dargestellt.

3.4.1 Massenspektrometrische Untersuchung möglicher Phosphorylierungsstellen in DRaf

Um CK2-Phosphorylierungsstellen in DRaf zu identifizieren wurden Massenspektrometrische Untersuchungen von phosphoryliertem GST-DRaf durchgeführt. Dazu wurde eine Kinasereaktion mit rekombinantem GST-DRaf und GST-DCK2 α wie bereits im Abschnitt 3.1.2 beschrieben, unter der Verwendung von 40 nMol nicht radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie gefärbt und die Bande, die der Position im Gel nach GST-DRaf entspricht, ausgeschnitten. Nach Trypsinverdau des Proteins im Gel erfolgte eine Analyse mittels nano-LC-ESI-MS/MS (Jens Pfannstiel, Iris Klaiber; Universität Hohenheim). Dabei werden die nach Trypsinverdau entstandenen Peptide chromatographisch (LC: liquid chromatography) aufgetrennt und nach der Elektrospray-Ionisationsmethode (ESI) ionisiert. Anschließend erfolgte die Identifizierung von Peptiden durch MS-Analyse (MS: Massenspektrometrie), sowie die anschließende MS/MS-Analyse der 5 abundantesten Peptide nach deren Fragmentierung.

MSPILGYWKI **KGLVQPTRLL** **LEYLEEKYEE** **HLYERDEGDK** **WRNKKFELGL**
EFPNLPYYID **GDVKLTQ SMA** **IIRYIADKHN** **MLGGCPKERA** **EISMLEGAVL**
DIRYGVSRIA **YSKDFETLKV** **DFLSKLPEML** **KMFEDRLCHK** **TYLNGDHVTH**
PDFMLYDALD **VVLYMDPMCL** **DAFPKLVCFK** **KRIEAIPOID** **KYLKSSKYIA**
WPLQGWAQATF **GGGDHPPKSD** **LVPRGSPNS** **SSESSTEGDS** **DLYDPLAEEL**
HNVQLVKHVT **RENIDALNAK** **FANLQEP PAM** **YLIEYQELTS** **KLHELEAKEQ**
ELMERLNSQD **QQEDSSLVER** **FKEQPHYQNO** **TQILQQQRQL** **ARVHHGNDLT**
DSLGSQPGSQ **CGTLTRQPKI** **LLRAHLPNQQ** **RTSVEVISGV** **RLCDALMKAL**
KLRQLTPDMC **EVSTTHSGRH** **IIPWHTDIGT** **LHVEEIFVRL** **LDKFPIRTHI**
KHQIIRKTFE **SLVFCEGCR** **LLFTGFYCSQ** **CNFRFHQRCA** **NRVPMLCQPF**
PMDSYYQLLL **AENPDNGVGF** **PGRGTAVRFN** **MSSRSRSRRC** **SSSGSSSSSK**
PPSSSSGNHR **QGRPPRISQD** **DRSNSAPNVC** **INNIRSVTSE** **VQRSLIMQAR**
PPLPHPCTDH **SNSTQASPTS** **TLKHNRPRAR** **SADESKNLL** **LRDAKSEEN**
WNILAEIILI **GPRIGSGSFG** **TVYRAHWHGP** **VAVKTLNVKT** **PSPAQLQAFK**
NEVAMLLKTR **HCNILLFMGC** **VSKPSLAIVT** **QWCEGSSLYK** **HVHVSETKFK**
LNTLIDIGRQ **VAQGM DYLHA** **KNIHRDLKS** **NNIFLHEDLS** **VKIGDFGLAT**
AKTRWSGEKQ **ANQPTGSILW** **MAPEVIRMQE** **LNPYSFQSDV** **YAFGIVMYEL**
LAECLPYGHI **SNKDQILFMV** **GRGLLRPDMS** **QVRSDAPQAL** **KRLAEDCIKY**
TPKDRPLFRP **LLNMLENMLR** **TLPKIHRSAS** **EPNLTQSQLQ** **NDEFYLYLSP**
KTPVNFNNFQ **FFGSAGNI**

Abbildung 18) Sequenzabdeckung der Massenspektrometrischen Analyse. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von GST-DRaf mit den identifizierten Peptiden (rot). Das Start-Methionin der DRaf-Sequenz (blau hinterlegt) sowie das zu B-Raf homologe Serin 417, dass in B-Raf von CK2 phosphoryliert wird (grün hinterlegt) sind angegeben. Die identifizierte Phosphorylierungsstelle Serin 11 ist rot unterstrichen.

Bei einer Sequenzabdeckung von 61 % bezüglich der GST-DRaf Aminosäuresequenz während der MS-Analyse konnte nur ein phosphoryliertes Peptid identifiziert werden, dass die Aminosäuren 1-28 von DRaf beinhaltet. In der Negativkontrolle ohne Zugabe von GST-DCK2 α konnte dagegen nur die nicht-phosphorylierte Form des Peptids identifiziert werden. Ein weiteres Peptid, dass das zu Serin 446 in B-Raf homologe Serin 417 umfasst, lag dagegen in beiden Ansätzen in nicht-phosphorylierter Form vor und scheidet damit als *in vitro*-Phosphorylierungsstelle aus (Abbildung 18, grün hervorgehoben, vergleiche mit Abbildung 17). Der Nachweis des Phosphopeptids war durch dessen Detektion im Vergleich mit dem gleichen Peptidtyp nach Neutralverlust (Massenverlust) eines Phosphatrestes, und eines Phosphatrestes sowie eines Moleküls Wasser möglich (Abbildung 19). Das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z ; $z=3$) beträgt für das phosphorylierte Peptid 1205,86, für das Peptid nach Verlust des Phosphatrestes 1173,4, sowie 1158,1 nach Verlust des Phosphatrestes sowie eines Moleküls Wasser.

Die anschließende Fragmentierung des phosphorylierten Peptids führt zur Abspaltung von Aminosäuren am N- oder C-Terminus (Ionen des b- und y-Typs), wodurch verschiedene Fragmentationen unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung entstehen. Das Fragmentierungsspektrum des phosphorylierten Peptids (Abbildung 19) zeigt die relative Häufigkeit detektierter Peptidfragmente in Abhängigkeit von Masse pro Ladung (m/z). Durch Messung der Peptidmassen kann auf die Sequenzen der phosphorylierten Peptidfragmente geschlossen werden. Bei der Analyse der Peptidfragmente konnte herausgefunden werden, dass nur Peptidfragmente, die Serin 11 beinhalten, auch eine Phosphatmodifikation besitzen. DRaf wird also durch DCK2 α an Serin 11 *in vitro* phosphoryliert.

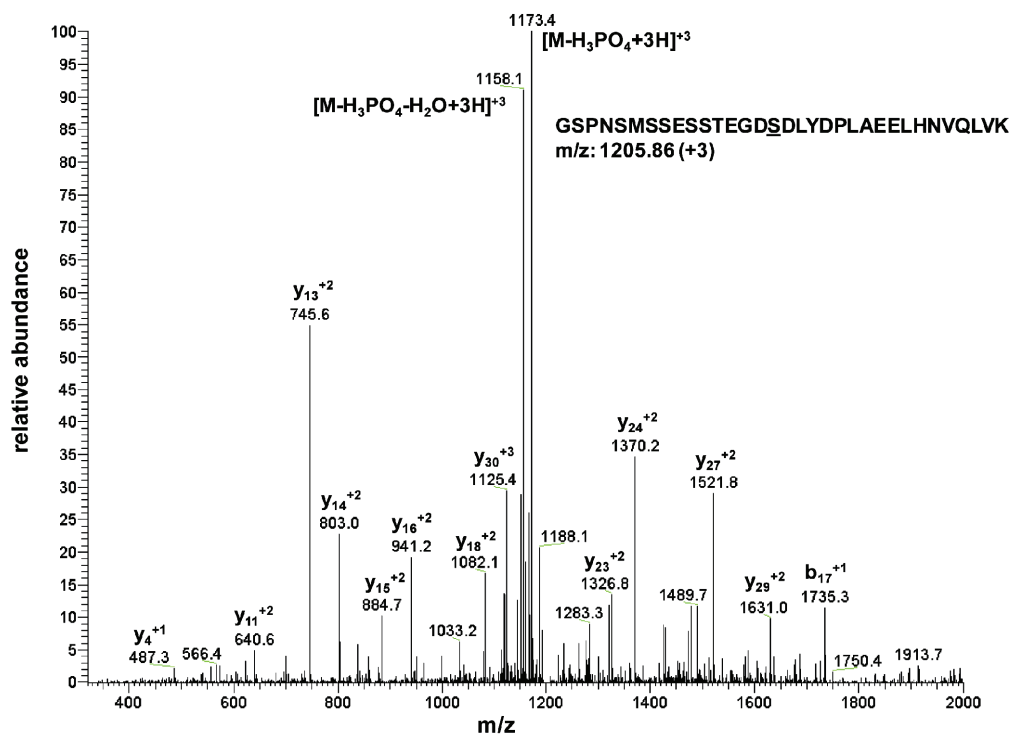


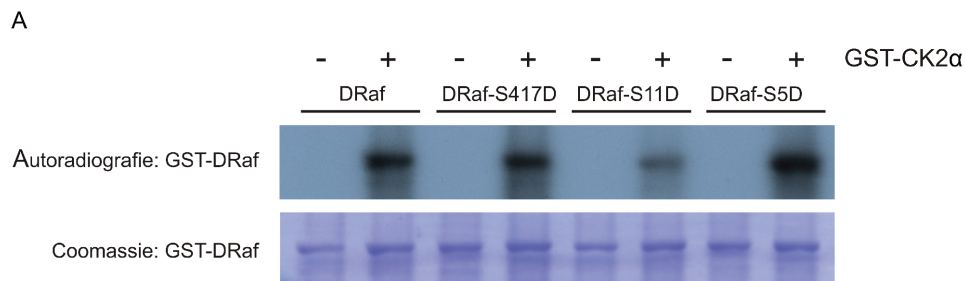
Abbildung 19) Fragmentierungsspektrum des phosphorylierten Peptids. Das Fragmentierungsspektrums des phosphorylierten Peptids ist im Diagramm als Häufigkeit (abundance) gegen Masse pro Ladung (m/z; z=3) aufgetragen. Das gesamte Phosphopeptid besitzt einen m/z-Wert von 1205,86, während der Wert für das Peptid nach Verlust (Neutralverlust) eines Phosphatrestes 1173,4, und nach Verlust eines Phosphatrestes und eines Wassermoleküls 1158,1 beträgt. Weitere Signale zeigen die relative Häufigkeit der entstandenen Peptidfragmente, wobei hauptsächlich Fragmente mit Aminosäureverlust am C-Terminus (Ionen des y-Typs) gekennzeichnet sind. Die Analyse der Fragmente zeigte, dass nur solche, die Serin 11 beinhalten in phosphorylierter Form vorliegen. (Abbildung: Jens Pfannstiel).

3.4.2 Serin 11 von DRaf wird durch DCK2 phosphoryliert

Die im Abschnitt 3.4.1 beschriebene Massenspektrometrische Analyse lässt mit grosser Wahrscheinlichkeit darauf schließen, dass DCK2 DRaf an Serin 11 phosphoryliert, wohingegen Serin 417 nicht phosphoryliert wird. Eine zusätzliche Überprüfung der Aminosäuren 1 bis 28 des in Abschnitt 3.4.1 dargestellten phosphorylierten Peptids von DRaf in Bezug auf potentielle CK2-Phosphorylierungsstellen unter Verwendung des NetPhos K1.0 Vorhersageprogramms (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) führte zu dem Ergebnis, dass Serin 5 und Serin 11 mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit von CK2 phosphoryliert werden. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit im Falle von Serin 11 geringfügig höher. In *in vitro*-Kinasereaktionen sollte

überprüft werden, welche der genannten Stellen phosphoryliert wird. Dazu wurden Aspartat-Austauschmutanten von Serin 5, 11 und 417 durch *in vitro*-Mutagenese der kodierenden Sequenz und Expression der Proteine in *E. coli* hergestellt. An den mutierten Stellen sollte eine Übertragung von Phosphatresten nicht mehr möglich sein.

GST-DRaf sowie die Aspartat-Austauschmutanten DRaf^{S417D}, DRaf^{S11D} und DRaf^{S5D} wurden mit GST-DCK2 α unter Verwendung von [γ -³²P]-ATP in 1x CK2 Kinasepuffer inkubiert. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte nach Auftrennung der Proteine in einem Acrylamidgel durch Autoradiografie (Abbildung 20). Um die eingesetzten DRaf-Proteinmengen vergleichen zu können, wurde das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt.



B

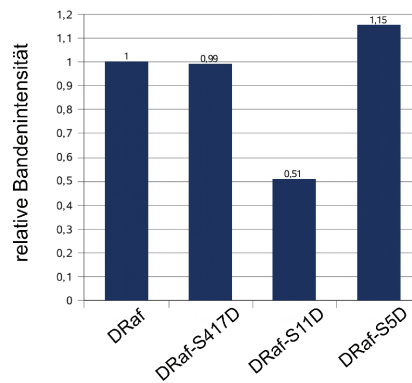


Abbildung 20) Serin 11 in DRaf wird durch DCK2 phosphoryliert. DRaf sowie die Aspartataustauschmutanten für die Serinreste 417, 11 und 5 wurden mit rekombinantem GST-DCK2 α zur Überprüfung der Phosphorylierung durch DCK2 mit [γ -³²P]-ATP in 1x CK2 Kinasepuffer inkubiert (A). Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte die Auswertung durch Autoradiografie. Nur das Ersetzen von Serin 11 durch Aspartat führt zu einem sichtbaren Verlust der Phosphorylierbarkeit von DRaf. Dadurch wurde bestätigt, dass DCK2 DRaf an Serin 11 phosphoryliert. Die Intensitäten der Phosphorylierungssignale sind im Mittel nach Abzug des Hintergrunds angegeben (B). Nachdem die Signalintensität bei Verwendung von DRaf^{S11D} etwa um die Hälfte reduziert ist, wird DRaf von DCK2 wahrscheinlich an 2 Stellen phosphoryliert.

Im Falle der S417D- und S5D-Austauschmutanten ist keine Abnahme des Phosphorylierungssignals auszumachen. Dagegen ist bei Verwendung von DRaf^{S11D} eine deutliche Abnahme des Signals zu erkennen, was für die Entfernung einer DCK2-Phosphorylierungsstelle durch Mutation von Serin 11 zu nicht phosphorylierbarem Aspartat spricht. Nachdem aber ein Restsignal vorhanden ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei Serin 11 von DRaf um eine von mehreren DCK2-Phosphorylierungsstellen handelt. Die Auswertung der Signalintensitäten der Phosphorylierungssignale im Mittel nach Abzug des Hintergrundsignals ist angegeben. Nachdem die Intensität im Falle der Verwendung von DRaf^{S11D} im Vergleich zur Kontrolle etwa um die Hälfte reduziert ist, kann davon ausgegangen werden, dass DRaf an zwei Stellen von DCK2 phosphoryliert wird.

3.4.3 Bedeutung von Serin 11 in DRaf für den MAPK-Signalweg

Nach Identifizierung von Serin 11 in DRaf als *in vitro* DCK2-Phosphorylierungsstelle stellte sich die Frage, welche Auswirkung diese Phosphorylierung in der Zelle im Hinblick auf den MAPK-Signalweg hat. Um dies zu beantworten wurden Zellkulturkonstrukte zur Überexpression von DRaf-, DRaf^{S11A}- und DRaf^{S11D}-Fusionsproteinen mit N-terminalem Myc-Epitop in Schneider S2 Zellen durch Klonierung in den pAc5.1 Vektor und *in vitro*-Mutagenese hergestellt. Durch Transfektion der Konstrukte in Kombination mit einem Selektionsplasmid mit Hygromycinresistenzgen und mindestens 5 Wochen Selektion in Hygromycin B-haltigem Medium wurden stabile Zelllinien etabliert. Die Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ /ml in Medium mit 1 % FCS ausgesät und nach 24 Stunden erfolgte die Serumstimulation der Zellen mit 10 % FCS-haltigem Medium für 5 Minuten. Anschließend wurden die Proteine des Überstands der Zelllysate durch SDS-PAGE aufgetrennt, und die Mengen an exprimiertem Transgen sowie die Mengen an pDERk und DERk auf Immunoblot-Ebene überprüft (Abbildung 21). Die Expression von DRaf und DRaf^{S11D} führt zu einer Zunahme der DERk-Aktivierung (Spuren 2 und 4, Mitte), wohingegen diese bei Expression von DRaf^{S11A} (Spur 3) im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (Spur 1) abnimmt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Vorstellung, dass die Phosphorylierung von Serin 11 in DRaf durch DCK2 zu einer Verstärkung der DRaf-Kinaseaktivität führt. Als Folge davon wird die Phosphorylierung und Aktivierung von DERk durch DMek verstärkt. Die Abnahme der DERk-Aktivierung bei Expression von DRaf^{S11A} im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen bedeutet, dass die Phosphorylierung von DRaf an Serin 11 in dem benutzten Zellsystem eine Voraussetzung für die vollständige Aktivierung des Signalwegs ist.

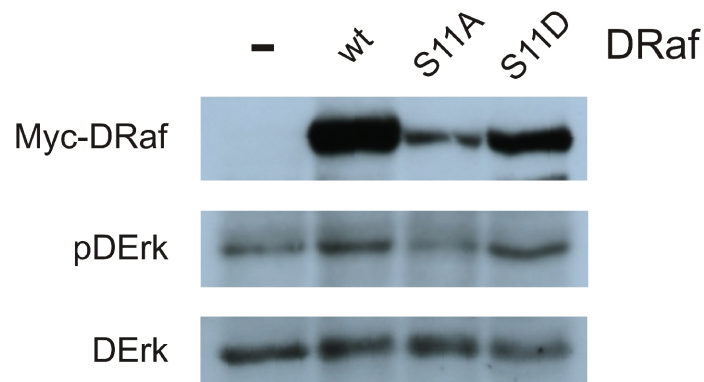


Abbildung 21) Eine positive Ladung an Position 11 in DRaf ist essentiell für maximale DERK-Aktivierung. Schneider S2 Zellen wurden stabil mit Plasmiden für die Expression von DRaf, DRaf^{S11A} und DRaf^{S11D} mit N-terminalem Myc-Epitop transfiziert. Nach 24 Stunden in Medium mit 1 % FCS wurden die Zellen für 5 Minuten mit 10 % FCS-haltigem Medium stimuliert. Die Zelllysate wurden auf Immunoblot-Ebene auf die Menge exprimierten DRaf-Proteins sowie pDERK und DERK hin untersucht. Die Expression von DRaf und DRaf^{S11D} führt zu einer erhöhten DERK-Aktivierung wohingegen die Expression von DRaf^{S11A} die DERK-Aktivierung im Vergleich zu nicht transfizierten S2 Zellen unterdrückt. Eine positive Ladung an Position 11 in DRaf ist also essentiell für die vollständige Aktivierung des Signalweg in diesem Zellsystem.

3.5 Wirkungen von Polyaminen in *Drosophila*

In den Abschnitten 3.2 und 3.3 wurden die Wirkungen von Polyaminen in *in vitro*-Kinasereaktionen und Zellen dargestellt. In dem folgenden Abschnitt sollten die Auswirkungen von Polyaminen *in vivo* in *Drosophila* untersucht werden.

3.5.1 Polyamine sind spezifische Regulatoren des MAPK-Signalwegs *in vivo*

Im ersten Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob Polyamine in *Drosophila* den MAPK-Signalweg beeinflussen. Dazu wurden weibliche Fliegen der Linie Wildtyp Berlin (WTB) nach Schlüpfen aus der Puppe 3-4 Tage auf Standardmedium gehalten. Anschließend wurde den Fliegen 6 Stunden Nahrung und Flüssigkeit entzogen. Schließlich wurde Standardmedium oder eine 15 % Saccharose-Lösung in PBS, mit je 10 μ M verschiedener Polyamine verfüttert. Um ein Austrocknen der Lösungen zu verhindern erfolgte dieser Schritt in einer Feuchtekammer. Durch Anfärben der Lösungen und Überprüfung des Abdomens nach entsprechender Färbung wurde die Aufnahme der jeweiligen Lösung sichergestellt. Pro Ansatz wurden 11 Fliegen abgesammelt und die Lysate auf Immunoblot-Ebene bezüglich pDERK und DERK überprüft (Abbildung 22).

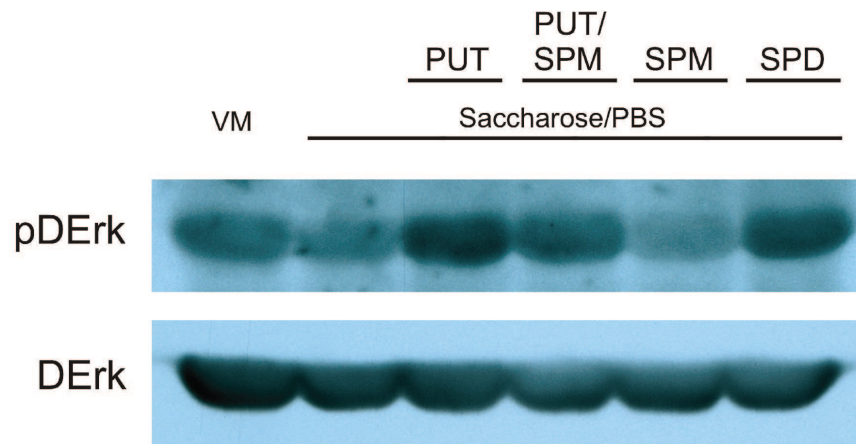


Abbildung 22) Polyamine sind *in vivo* Regulatoren des MAPK Signalwegs. 3-4 Tag alte weibliche Fliegen der Linie Wildtyp Berlin wurden nach einer 6-stündigen Hungerphase 13 Stunden mit Vollmedium (VM) oder einer 15 % Saccharose-Lösung in PBS mit je 10 μ M der angegebenen Polyamine gefüttert. Die Auswirkung der Polyamine wurde auf Immunoblot-Ebene überprüft. Das Verabreichen polyaminfreier Saccharose-Lösung reduziert die Menge aktiven pDerk-Proteins im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Spur 2 mit 1). Putrescin und Spermidin (Spuren 3 und 6) erhöhen das pDerk-Signal, Spermin reduziert das Signal (Spur 5). Bei Verfütterung von Putrescin in Kombination mit Spermin (Spur 4) wird deutlich, dass der inhibitorische Effekt von Spermin durch Putrescin abgemildert werden kann.

Bei Verfütterung von Saccharose in PBS (Spur 2) nimmt die Menge von aktiviertem pDerk im Vergleich zur Kontrolle (Spur 1) ab. Dieser Effekt wird durch das Verabreichen von Putrescin und Spermidin (Spuren 3, 6) rückgängig gemacht, was dafür spricht, dass die Abnahme im Falle des Verabreichens polyaminfreier Saccharose-Lösung durch einen Mangel an Polyaminen zustande kommt. Desweiteren kann beobachtet werden, dass Spermin (Spur 5) das pDerk-Signal unter den Kontrollwert reduziert. Die Verfütterung von Spermin und Putrescin (Spur 4) führt zu einem pDerk-Signal, dessen Intensität zwischen den Signalen bei Verfütterung der einzelnen Polyamine liegt. Bei diesem Versuchsaufbau haben Putrescin und Spermidin in *Drosophila* also einen aktivierenden Effekt auf den MAPK-Signalweg, während Spermin einen inhibitorischen Effekt hat. Dieser kann durch zusätzliches Verabreichen vom Putrescin abgemildert werden, wie es auch schon im Abschnitt 3.3.2 für das verwendete Zellkultursystem gezeigt wurde.

3.5.2 Die Überexpression eines DCK2 β -Proteins mit mutierter saurer Schleife

interferiert mit der polyaminabhängigen Regulation des MAPK-Signalwegs

Im Abschnitt 3.5.1 konnte gezeigt werden, dass Polyamine auf Ebene des gesamten Organismus spezifisch auf den MAPK-Signalweg wirken. Damit konnte aber nicht gezeigt werden, dass dieser Effekt auf eine Beeinflussung von DCK2 zurückzuführen ist. Die Abhängigkeit der Wirkung von Polyaminen auf den MAPK-Signalweg von deren Bindung an DCK2 sollte durch das Verhalten des MAPK-Signalwegs bei Expression von wildtypischem DCK2 β und DCK2 $\beta^{D55A,E57A}$ mit Mutationen in der sauren Schleife überprüft werden. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Mutationen an diesen Stellen die Phosphorylierungsaktivität des CK2-Holoenzym beeinflussen (Meggio et al., 1994). Die Phosphorylierungsaktivität von CK2 α bezüglich Calmodulin wird durch wildtypisches CK2 β zu 91 % inhibiert, wohingegen CK2 β mit Alaninsubstitutionen an den Positionen 55 und 57 diese Phosphorylierung nur um 30 % reduziert. Desweiteren zeigte diese Studie, dass durch Zugabe von Polylysin die erwähnte Phosphorylierungsaktivität im Falle von wildtypischem CK2 um das 12-fache gesteigert werden kann, während die Aktivität von CK2 mit mutiertem CK2 β nur um das 1,2-fache gesteigert wird. Nachdem Polylysin ein polybasisches Molekül ist und wie Polyamine die Phosphorylierungsaktivität von CK2 erhöht (Leroy et al., 1997a), kann davon ausgegangen werden, dass Mutationen an den Positionen 55 und 57 auch mit der Bindung von Polyaminen an CK2 interferieren. Für beide Transgene, die unter UAS-Kontrolle stehen, konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind den homozygot lethalen Phänotyp des X-chromosomalen DCK2 $\beta^{\Delta A26-2L}$ -Nullallels rückgängig zu machen, wenn sie mit Hilfe des ubiquitären Tubulin-Gal 4 Promotors in Fliegen überexprimiert werden (E. Jauch, nicht veröffentlicht). Allerdings entstanden bei Kreuzungen deutlich weniger weibliche Fliegen, die homozygot für das DCK2 $\beta^{\Delta A26-2L}$ -Nullallel sind, als bei einer zufälligen Chromosomenverteilung in den Gameten zu erwarten wäre, so dass Kreuzungen in einem sehr grossen Masstab nötig gewesen wären, um die erforderliche Anzahl an Fliegen zu erhalten.

Deshalb wurden Versuche mit DCK2 β -Transgenen durchgeführt, die mit Hilfe des ubiquitären Tubulin-Gal 4 Promotors vor einem wildtypischen Hintergrund überexprimiert wurden. 3-4 Tage alte weibliche Fliegen, die wildtypisches DCK2 β oder DCK2 $\beta^{D55A,E57A}$ mit dem Tubulin-Promotor überexprimieren, wurden 5 Stunden ohne Nahrung und anschließend 23 Stunden mit Vollmedium, Saccharose in PBS oder Saccharose-Lösung mit 10 μ M Putrescin gehalten. Durch Anfärben der Lösungen und Überprüfung des Abdomens nach entsprechender Färbung wurde die Aufnahme der jeweiligen Lösung sichergestellt. Die Mengen von aktiviertem pDERK, DERK,

Drosophila-PCNA (DPCNA) und DCK2 β in den Lysaten von jeweils 11 Fliegen wurden auf Immunoblot-Ebene untersucht (Abbildung 23). PCNA (Proliferierende Zellen nukleäres Antigen) ist ein Cofaktor der DNA-Polymerase δ , der in der S-Phase des Zellzyklus akkumuliert (Kurki et al., 1987). Dadurch ist PCNA als vergleichender Marker für proliferierende Zellen geeignet.

Im Falle der Überexpression von wildtypischem DCK2 β ist eine Abnahme des pDERK-Signals bei Verfütterung der Saccharose-Lösung (Spur 2) gegenüber der Kontrolle (Spur 1), sowie eine Zunahme von phosphoryliertem DERK bei Aufnahme von Putrescin (Spur 3), wie auch in Abschnitt 3.5.1, zu beobachten. Dagegen ist im Fall der Überexpression von DCK2 $\beta^{D55A,E57A}$ (Spuren 4-6) das Grundniveau des pDERK-Signals relativ niedrig, und es ist keine deutliche Änderung des pDERK-Signals als Reaktion auf Verfütterung von Saccharose-Lösung oder Saccharose-Lösung in Kombination mit Putrescin festzustellen.

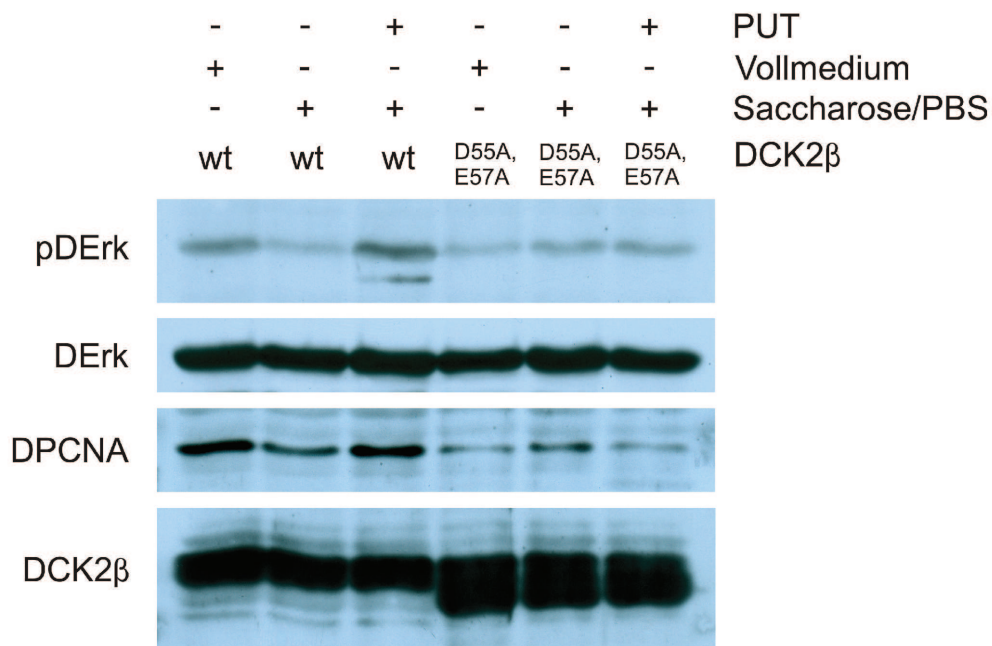


Abbildung 23) Die Überexpression von DCK2 β mit Mutationen in der sauren Schleife interferiert mit der polyaminabhängigen Regulation des MAPK-Signalwegs. Wildtypisches DCK2 β (wt) und DCK2 $\beta^{D55A,E57A}$, bei der Aspartat 55 und Glutamat 57 innerhalb der sauren Schleife durch Alanin ersetzt wurden (D55A,E57A), wurden mit dem Tubulin-Promotor überexprimiert. 3-4 Tage alte weibliche Fliegen wurden nach 5 Stunden ohne Nahrung 23 Stunden mit Vollmedium, 15 % Saccharose in PBS oder 10 μ M Putrescin in Saccharose-Lösung gefüttert. Die anschließende Immunoblot-Analyse der Lysate zeigt im Falle von wildtypischem DCK2 β eine Abnahme des pDERK-Signals bei Verwendung von 15 % Saccharose in PBS und eine Zunahme bei gleichzeitiger Verabreichung von Putrescin. Bei Überexpression von DCK2 $\beta^{D55A,E57A}$ sind die pDERK- und DPCNA-Mengen (Proliferationsmarker) erniedrigt und die polyaminabhängige Regulation des MAPK-Signalwegs und der Proliferation aufgehoben.

Auch das DPCNA-Signal ist bei Expression von wildtypischem DCK2 β bei Aufnahme einer Saccharose/PBS-Lösung im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt (vgl. Spur 2 mit Spur 1), während die Aufnahme von Putrescin zum Anstieg des Signals (Spur 3) auf Kontrollniveau führt. Die Proliferation wird also in *Drosophila* von Polyaminen beeinflusst. Bei Überexpression von DCK2 $\beta^{D55A,E57A}$ ist die Menge an DPCNA stark reduziert, und keine Reaktion auf Verfütterung von Polyaminen feststellbar. Die Expression eines DCK2 β -Transgens, dessen Polyaminbindungsstelle mutiert ist, interferiert also mit der polyaminabhängigen Modulation des MAPK-Signalwegs sowie mit der Modulation der Proliferation, wobei nicht abschließend geklärt werden konnte, ob der weitgehende Verlust der Beeinflussbarkeit der DpERK- und DPCNA-Signale auf Mutationen in der sauren Schleife oder auf unterschiedlich starke Expression der Transgene zurückzuführen ist.

3.5.3 Die polyaminabhängige Steuerung des MAPK-Signalwegs ist abhängig von der DCK2 Kinaseaktivität

In dem hier dargestellten Versuch sollte überprüft werden, ob die Polyamin-abhängige Regulation des MAPK-Signalwegs von der DCK2-Kinaseaktivität abhängt. Zur Reduktion der Polyaminmenge wurden weibliche 3-4 Tage alte Fliegen der Linie Wildtyp Berlin 6 Stunden ohne Verfügbarkeit von Nahrung und Flüssigkeit, und anschließend 24 Stunden in PBS mit 15 % Saccharose gehalten. Anschließend wurden Fliegenlysate unter Verwendung von Homogenisierungspuffer (10 mM Tris, pH 7,5; 2 mM EDTA; 5 mM EGTA) ohne Phosphataseinhibitoren hergestellt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Lysate unter Zugabe von 1 mM GTP, 0,01 % des CK2-Inhibitors Heparin und 10 μ M Putrescin (wo angegeben) in 1x CK2 Kinasepuffer für 20 Minuten bei 30 °C. Die Analyse der DpERK- und pDpERK-Signale auf Immunoblot-Ebene ist in Abbildung 24 dargestellt. Putrescin führt zu einer Zunahme des pDpERK-Signals gegenüber der Kontrolle (vgl. Spur 3 mit 1), wodurch die Polyaminabhängigkeit des MAPK-Signalwegs gezeigt werden konnte. Die Zugabe von Heparin führt zu einer Reduktion des Signals, wodurch die Abhängigkeit des Signals von DCK2 gezeigt werden konnte.

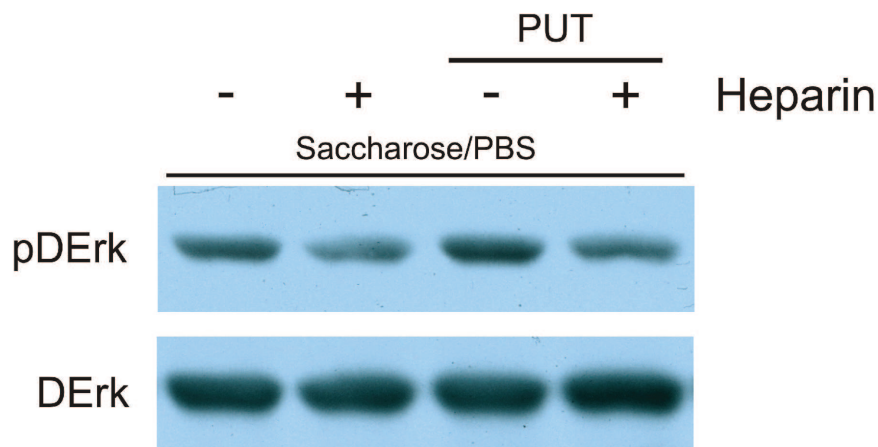


Abbildung 24) Die polyaminabhängige Steuerung des MAPK-Signalwegs ist abhängig von der DCK2-Kinaseaktivität. 3-4 Tage alte Fliegen des Stammes Wildtyp Berlin wurden 6 Stunden gehungert und anschließend 24 Stunden in PBS mit 15 % Saccharose gehalten. Lysate der Fliegen wurden nach Zugabe von 1 mM GTP, 0,01 % des CK2 Inhibitors Heparin und 10 μ M Putrescin für 20 Minuten bei 30 °C in 1x CK2 Kinasepuffer inkubiert. Gegenüber der Kontrolle (Spur 1) nimmt die Menge an pDerk nach Putrescin-Zugabe zu (Spur 3). Der CK2 Inhibitor Heparin reduziert das pDerk-Signal und zeigt die Abhängigkeit der Reaktion von DCK2 (Spuren 2, 4).

Nachdem die Ergebnisse unter Verwendung des vorhergegangenen Versuchsaufbaus im Falle von Spermidin und Spermin im Vergleich zu anderen durchgeführten Versuchen widersprüchlich waren (nicht gezeigt), wurde zur Aufklärung der spezifischen Wirkung von Polyaminen auf den MAPK-Signalweg in Abhängigkeit von DCK2 ein anderer Ansatz gewählt. Hierzu wurden 3 Tage alte weibliche Fliegen der Linie Wildtyp Berlin 6 Stunden ohne Zugang zu Nahrung oder Flüssigkeit und anschließend 24 Stunden unter Verfügbarkeit von filtriertem Leitungswasser gehalten. Dem Wasser waren Farbe und wo angegeben 100 μ M Polyamine und 20 μ M TBB beigefügt (Abbildung 25). Für Ansätze ohne TBB wurde stattdessen das TBB-Lösungsmittel Ethanol zugegeben, so dass die Ethanol-Konzentration in jedem Ansatz 4 ‰ betrug. Die Auswahl der Fliegen erfolgte durch positive Selektion von Fliegen mit gefärbtem Abdomen. Je 15 Fliegen wurden in Homogenisierungspuffer, der Protease- und Phosphataseinhibitoren enthielt, lysiert. Die Lysate wurden nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE auf Immunoblot-Ebene bezüglich der Mengen von aktiviertem pDerk und DErk überprüft (Abbildung 25).

Das Verfüttern von Putrescin führt zu einer deutlichen Steigerung des pDerk-Niveaus (Spur 4), während Spermidin zu einer geringeren und Spermin zur geringsten Aktivität des MAPK-

Ergebnisse

Signalwegs führt (Spuren 6, 8). Die Zugabe des CK2-Inhibitors TBB führt jeweils im Vergleich zur Aufnahme von Wasser, Putrescin- und Spermidin-Lösung zu einer Erniedrigung des Signals (Spuren 3, 5, 7), während im Falle von Spermin eine unerwartete Erhöhung des pDERK-Signals beobachtet werden kann (Spur 9). Wie schon unter 3.3.1 für Schneider S2 Zellen gezeigt, haben Polyamine auch auf Ebene des gesamten Organismus spezifische DCK2-abhängige Auswirkungen auf den MAPK-Signalweg.

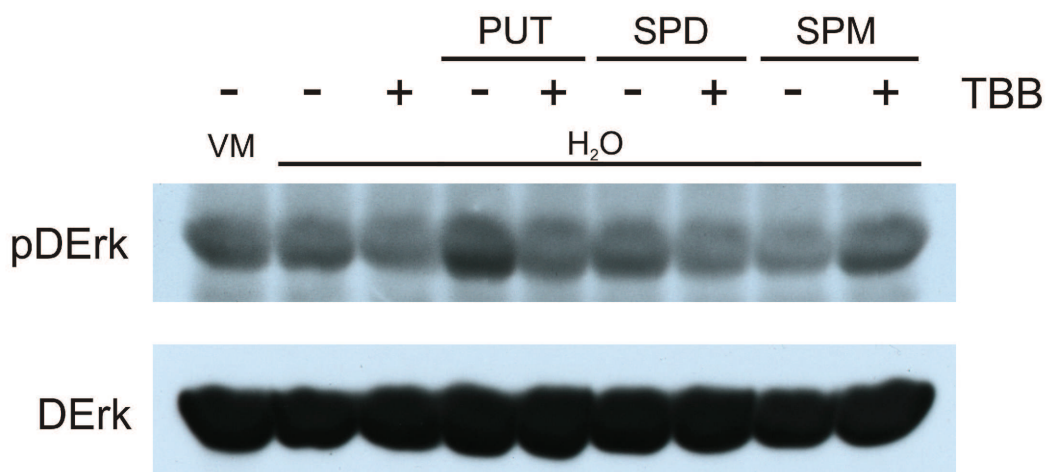


Abbildung 25) Die spezifische Regulation des MAPK-Signalwegs ist abhängig von der DCK2 Kinaseaktivität. 3 Tage alte weibliche Fliegen der Linie Wildtyp Berlin wurden 6 Stunden gehungert und anschließend 24 Stunden unter Verfügbarkeit von filtriertem Leitungswasser gehalten. Dem Wasser waren wo angegeben 100 μ M Polyamine und 20 μ M TBB beigefügt. Nach Lyse der Fliegen in Homogenisierungspuffer unter Verwendung von Protease- und Phosphataseinhibitoren wurden die Lysate durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Immunoblot-Ebene auf die Mengen von aktiviertem pDERK und DERK hin überprüft. Während Putrescin zu einer deutlichen Verstärkung des pDERK-Niveaus führt, ist der Effekt bei Spermidin weniger ausgeprägt, während das Verfüttern von Spermin zu einer deutlichen Abnahme von aktiviertem pDERK führt. TBB zeigt durch seine Beeinflussung der Signale die DCK2 Abhängigkeit der Reaktion.

4. Diskussion

4.1 DCK2 ist Teil des DKSR-Komplexes und phosphoryliert DRaf an Serin 11

Die ubiquitäre Proteinkinase CK2 liegt überwiegend als heterotetrameres Holoenzym in Zellen vor und phosphoryliert Serin- und Threoninreste in unmittelbarer Umgebung saurer Aminosäurereste (Chantalat et al., 1999). Dabei ist eine negative Ladung an der Position +3 in nahezu 90 % und an Position +1 in 75 % der Fälle vorhanden (Pinna, 2002). Das Ergebnis einer weblogo-Proteomanalyse legt nahe, dass mehr als 20% der im menschlichen Phosphoproteom vorhandenen Phosphorylierungsstellen durch CK2 verursacht werden (Salvi et al., 2009). Aufgrund der grossen Anzahl und Diversität von CK2-Substraten, sowie der Tatsache, dass CK2 in nahezu jedem zellulären Kompartiment vorliegt (Faust und Montenarh, 2000), wird davon ausgegangen, dass alle oder zumindest die meisten physiologischen Vorgänge von CK2 abhängig sind. Die CK2-abhängige Phosphorylierung kann durch Lokalisation, Assoziation von Kinase und Substrat, sowie durch Bindung von Polyaminen an CK2 β reguliert werden (Litchfield, 2003).

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der Verlust der regulatorischen DCK2 β -Untereinheit in Vorläuferzellen (Neuroblasten) der Pilzkörper zu verkleinerten Pilzkörpern führt (Thomas Raabe, nicht veröffentlicht). Aus DCK2 β defizienten Neuroblasten generierte Neurone sind in der Lage zu differenzieren und zu überleben, weshalb der Phänotyp vermutlich durch Proliferationsdefekte zustande kommt. Ein ähnlicher Phänotyp kann bei Modulation von Polyamintitern beobachtet werden (Eike Jauch, nicht veröffentlicht), weshalb vermutet werden kann, dass in beiden Fällen eine Deregulation von DCK2 der Grund für verkleinerte Pilzkörper ist. In weiteren Vorversuchen zeigte sich, dass die Modulation von Polyamintitern Auswirkungen auf den MAPK-Signalweg hat (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der MAPK-Signalweg ist ein klassischer Signaltransduktionsweg, durch den extrazelluläre Signale über die Zellmembran transferiert und schrittweise über die Kinasen Raf, Mek und Erk weitergeleitet werden. Er reguliert Differenzierung, Proliferation, Apoptose und nimmt Einfluss auf den zellulären Metabolismus (Mc Kay & Morrison, 2007). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass CK2 an das Gerüstprotein KSR in Maus bindet (Ritt et al., 2007) und KSR sowie humanes B- und C-Raf phosphoryliert. In dieser Arbeit sollte zunächst überprüft werden, ob das auch in *Drosophila* der Fall ist.

Im Abschnitt 3.1.1 konnte durch Immunpräzipitationen aus Schneider S2 Zellen gezeigt werden, dass überexprimiertes DCK2 α und endogenes DCK2 β in *Drosophila* an endogenem DKSR

assoziiert sind. Durch diesen Versuch konnte aber nicht beantwortet werden, ob DCK2 als funktionelles heterotetrameres Holoenzym vorliegt. Ritt et al. (2007) konnten zusätzlich zur Bindung des Holoenzym an KSR in Pulldown-Versuchen zeigen, dass auch CK2 α und CK2 β als einzelne rekombinante Proteine mit KSR assoziieren. Deshalb und aufgrund der hohen Homologie von Säuger- und *Drosophila*-CK2-Proteinen ist die Bildung des Holoenzym möglicherweise auch in *Drosophila* keine notwendige Voraussetzung für die Interaktion von DCK2 α und DCK2 β mit DKSR. Andererseits konnte in der hier vorliegenden Arbeit im Abschnitt 3.2 gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität von an DKSR assoziiertem DCK2 α durch Polyamine beeinflusst wird. Nachdem die Beeinflussung der DCK2-Kinaseaktivität durch Bindung von Polyaminen an DCK2 β und unter Strukturänderung des Holoenzym stattfindet (Leroy et al., 1997a/b), kann davon ausgegangen werden, dass in *Drosophila* das funktionelle DCK2-Holoenzym an DKSR assoziiert.

Rekombinantes DRaf wird durch DCK2 *in vitro* phosphoryliert, wie durch die Abnahme der Phosphorylierung nach Zugabe des spezifischen CK2-Inhibitors TBB zu Kinasereaktionen mit KSR-Immunpräzipitaten, sowie durch Inkubation von DRaf mit GST-DCK2 α (3.1.2) gezeigt werden konnte. Die Phosphorylierung von DRaf durch GST-DCK2 α lässt ausserdem den Schluss zu, dass die DRaf-Phosphorylierung direkt und nicht durch Aktivierung einer weiteren DKSR-assoziierten Kinase stattfindet. Zusätzlich konnte in allen Kinasereaktionen, bei denen immunpräzipitiertes DKSR eingesetzt wurde ein Phosphorylierungssignal beobachtet werden, das durch Inhibition von DCK2 abgeschwächt wird. Die Position dieses Signals im Acrylamidgel lässt die Vermutung zu, dass es sich um DKSR (exemplarisch unter 3.1.1 gezeigt) handelt. Ob es sich bei diesem Signal tatsächlich um DKSR handelt, wurde nicht abschliessend untersucht, allerdings führte eine Suche nach potentiellen Phosphorylierungsstellen unter Verwendung des NetPhos K1.0 Vorhersageprogramms (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) zur Identifizierung einer Reihe möglicher DCK2-Phosphorylierungsstellen in DKSR. Durch *in vitro*-Mutagenesen der potentiellen Phosphorylierungsstellen und Inkubation in Kinasereaktionen mit DCK2 α oder Massenspektrometrische Untersuchungen des phosphorylierten Proteins könnte die Frage, ob DKSR durch DCK2 phosphoryliert wird, beantwortet werden.

Die Aktivierung von Raf ist ein komplexer Prozess, an dem eine Reihe von Phosphorylierungen, Dephosphorylierungen, Proteininteraktionen, Konformationsänderungen und Änderungen der Lokalisation beteiligt sind (zusammengefasst in Udell et al., 2010). In diesem Zusammenhang sind auch die in Vertebraten Raf-Proteinen und *Drosophila* DRaf konservierten Regionen CR1-CR3 von Bedeutung (vergleiche Abbildung 17). CR1 beinhaltet eine Cystein-reiche Domäne

(CRD) sowie eine Ras bindende Domäne, die an der Membranassoziation sowie an der Bindung von Ras beteiligt sind, was zur Aktivierung von Raf führt. CR2 ist eine Serin-/Threonin-reiche Region. Es konnte gezeigt werden, dass die Kinasen PKA und Akt Serin 259 innerhalb der CR2-Domäne von C-Raf phosphorylieren können, was zur Inaktivierung von C-Raf durch Stabilisierung der geschlossenen Konformation nach Bindung von 14-3-3-Proteinen führt. Die geschlossene Konformation zeichnet sich durch intramolekulare Interaktion des regulatorischen Bereichs, der CR1 und CR2 beinhaltet, mit der Kinasedomäne innerhalb von CR3 aus. Unmittelbar N-terminal zu CR3 befindet sich in den Vertebraten Raf-Proteinen und in DRaf die N-Region (“negative charge regulatory region”), von der man annimmt, dass sie die Konformation der Kinasedomäne und deren Interaktion mit dem regulatorischen Bereich moduliert (Udell et al., 2010). Die humanen Raf-Proteine werden an Serin 446 (B-Raf) bzw. Serin 338 (C-Raf) in der N-Region von CK2 phosphoryliert (Ritt et al., 2007). DRaf ist das einzige Raf-Protein in *Drosophila* und besitzt eine hohe Homologie zum humanen B-Raf-Protein bezüglich der Lage funktioneller Domänen und seiner Aminosäuresequenz. Auch in DRaf ist mit Serin 417 ein Serin vorhanden, dessen Position und Sequenzumgebung Serin 446 von B-Raf ähnelt (zusammengefasst in Abbildung 17).

Um die DCK2-Phosphorylierungsstelle in DRaf zu identifizieren, wurden Kinasereaktionen mit rekombinantem GST-DRaf und GST-DCK2 α , sowie Massenspektrometrische Untersuchungen (Jens Pfannstiel, Iris Klaiber; Universität Hohenheim) durchgeführt. Bei einer Sequenzabdeckung von 61 % bezüglich der GST-DRaf-Sequenz (Abbildung 18) konnte nach Verdau des Proteins mit Trypsin nur ein phosphoryliertes Peptid identifiziert werden, dass die Aminosäuren 1-28 von DRaf umfasst, während ein Peptid, dass Serin 417 beinhaltet nur in nicht-phosphorylierter Form vorliegt, *in vitro* also nicht phosphoryliert wird. Die Auswertung der MS/MS-Daten des fragmentierten phosphorylierten Peptids (Punkt 3.4.1) ließ darauf schließen, dass Serin 11 in DRaf von DCK2 phosphoryliert wird. Nach Überprüfung potentieller Phosphorylierungsstellen unter Verwendung des NetPhos K1.0 Programms sollten Serin 5 und Serin 11 neben Serin 417 bezüglich einer Phosphorylierung durch DCK2 untersucht werden. Im Vergleich zu nicht mutiertem GST-DRaf nimmt die Phosphorylierung nur im Falle von GST-DRaf^{S11D} ab, was bestätigt, dass Serin 11 *in vitro* von DCK2 α phosphoryliert wird (Abbildung 20), während Serin 5 und Serin 417 nicht phosphoryliert werden. Nachdem das Phosphorylierungssignal bei Verwendung von GST-DRaf^{S11D} im Vergleich zu GST-DRaf etwa um die Hälfte reduziert ist, handelt es sich bei Serin 11 vermutlich um eine von zwei Phosphorylierungsstellen. Eine weitere Phosphorylierungsstelle könnte durch Massen-

spektrometrische Untersuchungen identifiziert werden, wenn eine Protease benutzt werden kann, die zur Entstehung anderer Peptide führt, als es bei der Verwendung von Trypsin zur Identifizierung von Serin 11 in DRaf der Fall war. Weiterhin könnte die Überprüfung unterschiedlicher DRaf-Proteinfragmente, in Kombination mit *in vitro*-Mutagenesen potentieller Phosphorylierungsstellen, durch Kinasereaktionen mit DCK2 α zu einer schrittweisen Einschränkung und Identifizierung einer weiteren Phosphorylierungsstelle führen. Die Durchführung von *in vitro*-Kinasereaktionen geschieht normalerweise unter optimalen Bedingungen für die Kinase und wird mit in Bakterien exprimierten und aufgereinigten Proteinen durchgeführt, deren Faltung sich von Proteinen, die in eukaryotischen Zellen exprimiert wurden unterscheiden kann. Dadurch kann sich die Oberflächenexposition von Aminosäuren im Protein von Proteinen *in vivo* unterscheiden. Weiterhin fehlen in diesen Ansätzen möglicherweise Faktoren, die die Phosphorylierung beeinflussen, wodurch *in vitro*-Phosphorylierungsstellen nicht notwendigerweise auch *in vivo* vorhanden sein müssen.

Um die Funktionalität der Phosphorylierung zu überprüfen wurden nach Klonierung und *in vitro*-Mutagenese von Zellkulturkonstrukten DRaf-, DRaf^{S11A}- und DRaf^{S11D}-Fusionsproteine in Schneider S2 Zellen überexprimiert (Abschnitt 3.4.3). Dabei wird die Phosphorylierung von Serin 11 durch den Austausch von Serin mit Aspartat bzw. die nicht-phosphorylierte Form durch den Austausch mit Alanin imitiert. In diesem Experiment konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von DRaf zu einer verstärkten Erk-Aktivierung führt. Ebenfalls verstärkend wirkt die Überexpression von DRaf^{S11D}, während DRaf^{S11A} bereits in relativ geringen Mengen die Aktivierung von Erk im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen unterdrückt. Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphorylierung an Serin 11 einen aktivierenden Effekt auf den MAPK-Signalweg *in vivo* hat, während die Unterdrückung der Phosphorylierung zu einer Inhibition der Erk-Aktivierung führt. Die Phosphorylierung an Serin 11 ist also eine Voraussetzung für maximale Signalstärken des MAPK-Signalwegs in dem untersuchten Zellkultursystem. Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit der Beobachtung, dass das Verhindern der Bindung von CK2 an KSR in Vertebraten zu einer Inhibition der Raf- und Erk-Phosphorylierung führt (Ritt et al., 2007), wobei die Phosphorylierung von KSR durch CK2 die Aktivierung von Erk nicht beeinflusst. Bezüglich der Phosphorylierung von C-Raf wurde darüber spekuliert, ob die Phosphorylierung an Serin 338 *in vivo* durch PAK-Proteine (p21-aktivierte Kinasen) stattfindet (Wellbrock et al., 2004). Im Fall von PAK1 spricht dagegen, dass Reduktion der PAK1-Proteinmenge durch siRNA die Rezeptortyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung von Serin 338 nicht hemmt (Zang et al., 2008). Eine Reihe verschiedener Beobachtungen lässt außerdem

die Vermutung zu, dass auch PAK3 unter physiologischen Bedingungen nicht für die Phosphorylierung von Serin 338 verantwortlich ist. PAK3 wird unter Bedingungen, welche die Phosphorylierung von Serin 338 stimulieren, nicht aktiviert (Chiloeches et al., 2001). Die Überexpression von aktiviertem Cdc42, das aktivierend auf PAK3 wirkt, führt nur in Kombination mit der Überexpression von PAK3 zu einer Verstärkung der Phosphorylierung von Serin 338. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Aktivitätszustand von PAK3 keinen Einfluss auf die Höhe der C-Raf Kinaseaktivität hat. In Säugerzellen ist die KSR-1 vermittelte Rekrutierung von CK2 eine Voraussetzung für die Phosphorylierung von Ser 338 (Ritt et al., 2007). Für die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2 *in vivo* sprechen weiterhin die Ergebnisse unter 3.3, bei denen gezeigt werden konnte, dass die Inhibition der DCK2-Kinaseaktivität in *Drosophila* Zellen zu einer deutlichen Abnahme der DERK-Aktivierung führt. CK2 phosphoryliert Serin- und Threoninreste in unmittelbarer Umgebung saurer Aminosäurereste, wobei ein saurer Aminosäurerest an Position +3 bezüglich der Phosphorylierungsstelle besonders kritisch ist (Pinna, 2002). Die Sequenzumgebung der CK2-Phosphorylierungsstellen von Vertebraten Raf-Proteinen und DRaf unterscheiden sich (vergleiche Abbildung 17). In A-Raf und C-Raf liegen an den Positionen +2 und +3 bezüglich der CK2-Phosphorylierungsstelle Tyrosinreste vor, deren Phosphorylierung durch Src-Kinasen eine Voraussetzung für die Phosphorylierung und Aktivierung durch CK2 ist (zusammengefasst in Udell et al., 2010). Dagegen liegen an den Positionen +2 und +3 von B-Raf saure Aspartatreste vor, was vermutlich der Grund für die konstitutive Phosphorylierung von Serin 446 durch CK2 (Tran et al., 2005; Ritt et al., 2007) und die im Vergleich zu C-Raf erhöhte Grundaktivität von B-Raf ist (Udell et al., 2010). An den Positionen +2 und +3 bezüglich Serin 417 in der N-Region von DRaf liegen saure Glutamatreste vor, so dass eine Phosphorylierung durch Src-Kinasen hier nicht möglich ist. Interessanterweise liegt aber an Position +3 bezüglich Serin 11 in DRaf ein Tyrosinrest vor, so dass eine Beeinflussung der DCK2-vermittelten Phosphorylierung von Serin 11 durch Phosphorylierung von Tyrosin 14 durch Src-Kinasen vorstellbar ist. Die Analyse von Tyrosin 14 unter Verwendung des NetPhos K 1.0-Vorhersageprogramms führte zu dem Ergebnis, dass dieser Tyrosinrest mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,47 durch Src-Kinasen phosphoryliert wird. Ob Src-Kinasen tatsächlich Tyrosin 14 phosphorylieren und ob die Phosphorylierung von Serin 11 durch DCK2 dadurch moduliert wird, könnte durch Überprüfung der Phosphorylierung von Tyrosin 14 durch Src-Kinasen in Kinasereaktionen und Überprüfen der Auswirkung der Reduktion der Src-Kinaseaktivität in Zellen nach RNAi-Behandlung oder nach Behandlung mit Src-spezifischen

Inhibitoren auf die Phosphorylierung von Serin 11 herausgefunden werden.

Mechanistisch lässt sich der Unterschied der CK2-Phosphorylierungsstellen in Raf-Proteinen von Mensch und *Drosophila* durch die unmittelbare Sequenzumgebung klären. Während in humanen Raf-Proteinen an Position -1 bezüglich der Phosphorylierungsstelle eine saure Aminosäure auftritt, liegt an dieser Stelle in *D. melanogaster* ein basischer Lysinrest vor (vergleiche Abbildung 17). Es konnte gezeigt werden, dass basische Aminosäuren an den Positionen -1 bis +4 die Phosphorylierung durch CK2 unterdrücken können (Pinna, 2002). Die Phosphorylierungsstellen unterscheiden sich also, während die Phosphorylierung von Raf sowohl in Mensch als auch in *Drosophila* einen aktivierenden Effekt auf den MAPK-Signalweg ausübt. Nachdem davon ausgegangen wird, dass die N-Region die Konformation der Kinasedomäne und deren Interaktion mit dem regulatorischen Bereich moduliert (Udell et al., 2010) und die Phosphorylierung durch CK2 in dieser Region einen aktivierenden Effekt auf die Kinaseaktivität von B- und C-Raf hat (Ritt et al., 2007), ist es wahrscheinlich, dass CK2 in Vertebraten die Aktivität von Raf-Proteinen durch deren Phosphorylierung und der dadurch vermittelten Einnahme einer offenen Konformation reguliert. Die Phosphorylierung von Serin 11 in DRaf weist auf einen anderen Mechanismus der CK2-abhängigen Raf-Aktivierung hin. Nachdem angenommen wird, dass die N-Termini in B-Raf und DRaf die Interaktion mit Ras verstärken (Udell et al., 2010), könnte DCK2 die Ras-abhängige DRaf-Aktivierung durch Beeinflussung der Interaktion von DRas und DRaf regulieren. Um dies zu überprüfen könnten beispielsweise Koimmunpräzipitationen von DRaf, DRaf^{S11A} und DRaf^{S11D} durchgeführt werden und die Menge von daran gebundenem DRas überprüft werden.

Beim Vergleich potentieller CK2-Phosphorylierungsstellen unterschiedlicher Spezies zeigt sich anhand des hohen Grads der Konservierung der Sequenzumgebung der zu Serin 446 äquivalenten Aminosäuren, dass in Vertebraten (*H. sapiens*, *M. musculus*, *G. gallus*, *X. laevis* und *D. rerio*) die CK2-Phosphorylierungsstelle mit grosser Wahrscheinlichkeit in der N-Region vorliegt, während die Sequenzkonservierung in *Drosophiliden* der *melanogaster*-Untergruppe (*D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*) auf eine Phosphorylierung von Serin 11 hinweist. In anderen entfernter verwandten *Drosophiliden* und *Anopheles* sind potentielle CK2-Phosphorylierungsstellen mit hoher Wahrscheinlichkeit an Position 9 oder 11 vorhanden (nach NetPhos K1.0, vgl. Abbildung 26). Diese Vermutung wird durch die grosse Ähnlichkeit der Sequenzumgebung gestützt. Dagegen ist die Sequenzumgebung zum Äquivalent von Serin 417 der überprüften Insekten durch einen basischen Aminosäurerest an Position -1 gekennzeichnet, und wird deshalb vermutlich nicht von CK2 phosphoryliert. Zusätzlich ist in einigen Fällen das

Serin durch eine nicht-phosphorylierbare Aminosäure ausgetauscht. Bei *D. pseudoobscura* enthält das Raf-Protein im Vergleich zu *Drosophila melanogaster* zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus, die möglicherweise durch intrachromosomale Rekombination eingefügt wurden, so dass der Serinrest an Position 99 dem Serinrest an Position 11 der anderen angegebenen *Drosophiliden* entspricht. Der Nachweis der Phosphorylierung und Aktivierung von Raf-Proteinen durch CK2 in unterschiedlichen Spezies würde die organismenübergreifende Bedeutung dieser Signalweiterleitung unterstreichen.

Die Phosphorylierung von Serin 417 und Serin 418 von DRaf findet zumindest *in vitro* nicht durch DCK2 statt, wie die Massenspektrometrische Analyse zeigte (Abschnitt 3.4.1). Dennoch könnten diese Serine durch andere Kinasen phosphoryliert werden.

Um die Funktionalität der verschiedenen Serinreste zu überprüfen könnten durch Klonierung und *in vitro*-Mutagenese Mutanten mit Alanin und Aspartat an den entsprechenden Stellen hergestellt werden und deren Auswirkung auf den MAPK-Signalweg nach Überexpression in Schneider S2 Zellen oder *Drosophila melanogaster* überprüft werden.

Organismus	potentielle CK2-Phosphorylierungsstelle (Wahrscheinlichkeit)	Sequenzumgebung zum Äquivalent von Serin 417
<i>D. melanogaster</i>	Serin 11: GDS SD LYDPL (0,60)	AK S SEENWN
<i>D. pseudoobscura</i>	Serin 97; 99: TES SD SELYD (0,69; 0,61)	DK S SEENWN
<i>D. virilis</i>	Serin 9: PDS E GE LYD (0,66)	AK N SEENWN
<i>D. grimshawi</i>	Serin 9; 11: TES SD SELYD (0,68; 0,60)	AK N SEENWN
<i>A. gambiae</i>	Threonin 9: EDT DE ELDA (0,72)	SK Q SDENWN

Abbildung 26) Vergleich potentieller CK2-Phosphorylierungsstellen verschiedener Insektenpezies. Angegeben sind die Sequenzumgebungen zum Äquivalent von Serin 417 (grün), sowie potentielle CK2-Phosphorylierungsstellen (rot). Die hohe Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierung durch CK2 (nach NetPhos K1.0) wird durch die Position und Anzahl saurer Aminosäuren (D, E), sowie durch die Ähnlichkeit der Sequenzumgebungen gestützt (Sequenzen aus der UniProt-Datenbank; <http://www.uniprot.org/>).

4.2 Polyaminabhängige Steuerung von DCK2 und deren physiologische Bedeutung

Die meisten Proteinkinasen erfüllen ihre Funktion als Teile einer hierarchisch organisierten Signalübertragungskaskade. Im Vergleich dazu scheint CK2 eher modulierende Aufgaben zu übernehmen (Meggio et al., 2003) und verschiedene Signalwege miteinander zu vernetzen (Pinna und Allende, 2009). In den Abschnitten 3.1 und 3.4 konnte gezeigt werden, dass DCK2 an DKSR bindet, DRaf an Serin 11 phosphoryliert und dass die Signalstärke des MAPK-Signalwegs abhängig von der Ladung an der Aminosäureposition 11 ist. Der MAPK-Signalweg wird durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen reguliert. Dazu gehört die Bindung der Kinasen Raf, Mek und Erk an Gerüstproteine wie KSR, wodurch es zu einer Kolokalisation signalrelevanter Komponenten und Signalverstärkung kommt (Roy et al., 2002; Denouel-Galy et al., 1998; Yu et al., 1998;). Die Signalstärke des MAPK-Signalwegs wird zusätzlich durch eine Reihe verschiedener Kinasen und Phosphatasen, sowie durch eine Reihe von Rückkopplungsschleifen beeinflusst (zusammengefasst in Ramos et al., 2008). Neben der Beeinflussung der Signalstärke besteht eine weitere Möglichkeit zur Regulation in der Beeinflussung der Dauer von Signalen, wodurch das Entwicklungsschicksal von Zellen beeinflusst werden kann. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass nur eine anhaltende Erk-Aktivierung durch den Wachstumsfaktor NGF, nicht aber eine transiente Aktivierung durch EGF zu Differenzierung und Neuritenwachstum von Pheochromocytoma-Zellen führt.

Die Bindung von CK2 an KSR ist als konstitutiv beschrieben (Ritt et al., 2007), was gegen eine Regulation DCK2-abhängiger DRaf-Phosphorylierung durch Interaktion von Kinase und Substrat spricht. Eine weitere Möglichkeit die Phosphorylierung durch CK2 zu regulieren besteht in der Bindung von Polyaminen an CK2 β und der davon abhängigen Beeinflussung der CK2-Kinaseaktivität (Leroy et al., 1997a/b). In der hier vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob dies auch für die Phosphorylierung von DRaf gilt, und ob auf diese Weise der Polyaminmetabolismus durch DCK2 mit dem MAPK-Signalweg verknüpft ist. Dazu wurden in einem ersten Schritt DKSR-Immünpräzipitate in *in vitro*-Kinasereaktionen mit rekombinantem GST-DRaf und Polyaminen inkubiert. Im Abschnitt 3.2.1 konnte mit diesem Ansatz gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von DRaf durch DCK2 konzentrationsabhängig von Spermin inhibiert wird (Abbildung 12), wobei die Inhibition bereits bei einer Konzentration von 10 μ M Spermin deutlich ist. Bei Kinasereaktionen in Gegenwart von 100 μ M Polyaminen (3.2.2) zeigte sich, dass nur Spermin inhibierend auf die Phosphorylierung von DRaf wirkt, während Putrescin und Spermidin diese im Vergleich zur Kontrollreaktion nicht inhibieren (Abbildung 13).

Es wurde beschrieben, dass Spermin die Bildung von Strukturen höherer Ordnung des CK2-

Holoenzym, wie eine ringartige Struktur mit der Formel $(CK2\alpha_2\beta_2)_4$ und höher molekulare filamentöse Aggregate, einleiten kann (Valero et al., 1995). Dabei unterscheiden sich auch die katalytischen Aktivitäten, wobei die ringartige Struktur die höchste katalytische Aktivität besitzt. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte überprüft werden, ob die Inkubation mit Polyaminen die Menge von an DKSR assoziiertem DCK2 beeinflusst und eine Änderung der Phosphorylierungsstärke nach sich zieht. Durch Vergleich der eingesetzten immunpräzipitierten Mengen an DKSR, DCK2 α und DCK2 β konnte aber gezeigt werden, dass die Behandlung mit Polyaminen die Menge von Ko-immunpräzipitiertem DCK2 nicht wesentlich beeinflusst und die in die Kinasereaktion eingesetzten Proteinmengen vergleichbar sind (Abbildung 13). Dieses Ergebnis bestätigt eine regulatorische Wirkung von Polyaminen auf die DCK2-Kinaseaktivität, die zumindest weitgehend unabhängig von der Bildung von Strukturen höherer Ordnung ist.

Nachdem CK2 sowohl ATP als auch GTP als Phosphatgruppendonor benutzen kann (Pinna, 1990), wurde der gleiche Versuch wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben in Anwesenheit von GTP durchgeführt (3.2.3). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Spermin-spezifische Inhibition der DCK2-Kinaseaktivität *in vitro* unabhängig vom Phosphatgruppendonor ist, während Putrescin und Spermidin in beiden Fällen keine signifikante Auswirkung auf die Phosphorylierung von DRaf haben (Abbildung 14).

In Lymphozyten von Rindern und in Rattenleber liegen Spermidin und Spermin in einer Konzentration zwischen 0,88 und 1,58 mM vor (Igarashi und Kashiwagi, 2000). Messungen der Polyaminmengen in adulten Fliegen ergaben ungefähr 15 nmol/mg (= mmol/kg; Feuchtgewicht) für Putrescin, 80 nmol/mg Spermidin und 2 nmol/mg Spermin (Eike Jauch, nicht veröffentlicht). Bei einer relativen Dichte (kg/l) von Fliegen im einstelligen Bereich liegt die Polyaminkonzentration in Fliegen also im millimolaren Bereich.

Bei Behandlung verschiedener Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Polyaminkonzentrationen im millimolaren Bereich toxisch für Zellen sein können (Schipper et al., 2000). Für die Toxizität kommen sowohl die Polyamine selbst, sowie Abbauprodukte wie H₂O₂ in Betracht, deren Synthese auch von der Art des verwendeten Serums im Zellmedium und darin vorhandenen Enzymen wie Aminoxidasen abhängt. Bei Inkubation von Drosophila S2 Zellen mit Polyaminen konnte in Vorversuchen eine konzentrationsabhängige Hypertrophie der Zellen sowie das Auftreten kleiner extrazellulärer Membranvesikel beobachtet werden. Diese beginnen je nach Art des Polyamins bei Konzentrationen von 100 μ M bis 500 μ M deutlich zu werden. Außerdem konnte vereinzelt eine Beeinflussung apoptotischer Vorgänge durch Aktivierung von Caspase 3 bei Inkubation von Zellen mit Polyaminen ab einer Konzentration von 0,5 mM beobachtet

werden (nicht gezeigt).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass DCK2 in polyaminabhängiger Weise DRaf phosphoryliert sollte als nächstes überprüft werden, ob Polyamine in Abhängigkeit von DCK2 die Aktivierung der Effektor kinase DERk durch deren Phosphorylierung beeinflussen. Um einerseits toxische Effekte zu verhindern und andererseits für eine Beeinflussung des MAPK-Signalwegs ausreichende Polyaminmengen einzusetzen, wurden Schneider S2 Zellen mit 100 μ M Polyaminen und 10 μ M TBB behandelt. Dabei stellte sich heraus, dass Spermin einen stark inhibierenden Effekt auf die Phosphorylierung von DERk ausübt, während die Auswirkungen von Putrescin und Spermidin im Vergleich zur Kontrolle gering ausfallen (Abbildung 15). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass L1210-DR Zellen nach Inkubation mit DFMO eine Reduktion von Putrescin und Spermidin, eine Zunahme von Spermin sowie eine reduzierte Menge aktivierten pErk-Proteins aufweisen (Flamigni et al., 1999). Zusätzlich zur Beeinflussung des MAPK-Signalwegs durch Polyamine bestätigt die Reduktion der DERk Phosphorylierung nach TBB Zugabe, dass die DERk-Aktivierung in Zellen von DCK2 abhängig ist. Weiterhin unterstützt die Tatsache, dass die Auswirkungen von Polyaminen auf die DCK2-abhängige DRaf-Phosphorylierung und auf die Aktivierung von DERk qualitativ vergleichbar sind die Annahme, dass die beschriebene Phosphorylierung von DRaf dieses aktiviert und zu einer Signalweiterleitung über den MAPK-Signalweg und der damit verbundenen Aktivierung von DERk führt. Polyamine unterscheiden sich aufgrund ihrer Kettenlänge und der Anzahl ihrer Ladungen. Je größer die Anzahl der positiven Ladungen, desto stabiler ist auch die Bindung von Polyaminen an CK2 β (Leroy et al., 1997a). Deshalb könnte argumentiert werden, dass die inhibitorische Wirkung von Spermin, das 4 positive Ladungen besitzt, aufgrund der starken Bindung zu DCK2 β zustande kommt, wogegen die Bindung von Putrescin und Spermidin mit 2 und 3 positiven Ladungen nicht stabil genug ist um einen inhibitorischen Effekt deutlich werden zu lassen. Um dies zu überprüfen wurden Zellen mit Kombinationen von Spermin und Putrescin oder Spermin und Spermidin behandelt (3.3.2). Durch Putrescin und Spermidin wird die Aktivierung von DERk im Vergleich zu nur mit Spermin behandelten Zellen erhöht (Abbildung 16). Dieses Ergebnis bestätigt, dass Polyamine spezifische Wirkungen in Zellen haben und dass die Regulation von DCK2 vom Verhältnis unterschiedlicher Polyamine zueinander abhängt. Durch diesen Versuch kann aber vorerst nicht beantwortet werden, ob ein aktivierender Effekt von Putrescin und Spermidin während deren Bindung und unter einer möglichen für Putrescin und Spermidin spezifischen Strukturänderung des Holoenzym beziehungsweise der Bildung von DCK2-Aggregaten stattfindet, oder ob dieser Effekt primär durch Reduktion der Menge von

an DCK2 β gebundenem Spermin durch Kompetition um die Bindungsstelle zustande kommt. Eine, sehr arbeitsaufwändige und methodisch anspruchsvolle, Möglichkeit den Effekt der unterschiedlichen Polyamine auf die Struktur und Aktivität von CK2 zu überprüfen wäre es die Strukturen des CK2 Holoenzym vor und nach Bindung verschiedener Polyamine, sowie die entsprechenden Kinaseaktivitäten zu vergleichen.

Die Zellkultur ist ein etabliertes System, das zur Überprüfung zellulärer Reaktionen eingesetzt werden kann, sie ist aber nicht mit einem *in vivo* System zu vergleichen. Deshalb wurden weitere Versuche nach Verfütterung von polyaminhaltigen Lösungen in adulten weiblichen Fliegen durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass Spermin auch *in vivo* einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung von DERK hat, der durch gleichzeitige Verfütterung von Putrescin abgemildert werden kann (Abbildung 22). Die Abnahme des pDERK-Signals bei Aufnahme Polyamin- und Aminosäure-freier Lösung, sowie die Signalzunahme bei gleichzeitiger Verfütterung von Putrescin und Spermidin unterstützt die Hypothese, dass ein Mangel an Aminosäuren die zellulären Polyaminkonzentrationen verändert und der MAPK-Signalweg als Reaktion darauf inhibiert wird.

Um die Frage zu beantworten, ob diese Effekte *in vivo* von DCK2 abhängig sind, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Die Verfütterung von Polyaminen und Polyaminen in Kombination mit dem CK2-Inhibitor TBB zeigte neben der DCK2-Abhängigkeit der DERK-Aktivierung, dass nur Spermin, nicht aber Putrescin und Spermidin einen inhibitorischen Effekt auf den MAPK-Signalweg hat, wie es im Abschnitt 3.3.1 bereits für Zellen gezeigt werden konnte. Ein weiterer Versuch wurde in Fliegen durchgeführt, die wildtypisches DCK2 β und DCK2 β mit Mutationen im Bereich der Polyaminbindestelle mit dem ubiquitären Tubulin-Gal4 Promotor überexprimieren (3.5.2). Bei Aufnahme Polyamin- und Aminosäure-freier Lösung durch Fliegen, die wildtypisches DCK2 β überexprimieren, nimmt die Menge an phosphoryliertem DERK im Vergleich zur Kontrolle ab, bei Aufnahme von Putrescin nimmt die Menge an pDERK wieder zu. Die Überexpression von DCK2 β mit Mutationen in der Polyaminbindestelle führt dagegen dazu, dass die Menge phosphorylierten DERK-Proteins nicht wesentlich durch polyaminfreie Nährlösung oder Putrescin beeinflusst wird (Abbildung 23). Die gleichen Effekte wie für den MAPK-Signalweg können in diesem Versuch für die Menge des Proliferationsmarkers DPCNA beobachtet werden. Allerdings ist anhand dieses Versuchs die Aussage, dass polyaminabhängige Effekte auf die Proliferation durch Bindung an DCK2 zustande kommen nicht fundiert, da sich nicht nur die Art der exprimierten Transgene, sondern auch deren Mengen unterscheiden. Interessant ist in diesem Zusammenhang aber, dass diese

polyaminabhängigen Effekte nur in jungen weiblichen Fliegen beobachtet werden konnten, was möglicherweise von der in diesen stattfindenden Oogenese und der damit verbundenen Menge proliferierender Zellen abhängt. Mehrere Beobachtungen deuten darauf hin, dass Polyamine an Zellproliferation beteiligt sind. So sind die Polyamintiter in mehreren Krebsarten erhöht (zusammengefasst in Gerner und Meyskens, 2004), während ihre Synthese in seneszenten Zellen herunterreguliert wird (Chang und Chen, 1989). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Enzymen der Polyaminsynthese das Zellwachstum reduzieren (Thomas & Thomas, 2001). Der ODC-Inhibitor α -DFMO hemmt die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (Neuroblasten) in *Acheta domesticus*, während speziell Putrescin diesen Effekt rückgängig macht (Cayre et al., 1997). Interessanterweise nimmt nach α -DFMO Behandlung nicht nur die Proliferation, sondern auch die Menge von Spermidin ab, während die Menge an Spermin zunimmt. Damit zeigt Spermin nicht nur in Versuchen in der hier vorliegenden Arbeit einen inhibitorischen Effekt auf den MAPK-Signalweg, sondern tritt auch in Neuroblasten, deren Proliferation gehemmt ist in erhöhter Konzentration auf. In einigen Zellzählungsversuchen von Schneider S2 Zellen und bei Überprüfen der DPCNA-Mengen in Fliegen des Stammes Wildtyp Berlin (WTB) nach Verabreichen von Polyaminen (nicht gezeigt), konnten Auswirkungen von Polyaminen in Abhängigkeit von DCK2 auf Proliferation beobachtet werden. Allerdings wurden in Schneider S2 Zellen auch Änderungen der Zellmorphologie und Änderungen der Anzahl toter Zellen beobachtet. Die Variationen der Proliferationsmessungen waren zudem zu hoch um eine fundierte Aussage treffen zu können. Die Vielfältigkeit beobachteter zellulärer Reaktionen deutet darauf hin, dass die Proteinkinase DCK2 die Signalstärke des MAPK-Signalweg zwar in Abhängigkeit von Polyaminen moduliert, physiologische Reaktionen aber von der zellulären Gesamtsituation abhängen. Dadurch, dass Zellen in der Lage sind Polyamine aufzunehmen und ins extrazelluläre Medium abzugeben existiert eine zusätzliche Möglichkeit einer Gewebespezifischen Regulation der Polyamintiter und davon abhängiger zellulärer Reaktionen. Dass dies tatsächlich *in vivo* stattfindet wird durch Versuche gestützt bei denen Milch-produzierenden Ratten 24 Stunden lang Nahrung entzogen wurde (Brosnan et al., 1983). Dabei geht die Spermidinmenge in der Leber auf das 0,84-fache des Kontrollwertes zurück, während die Sperminmenge auf das 1,07-fache ansteigt. Dagegen steigt die Spermidinmenge in der Brustdrüse um das 1,19-fache und die Sperminmenge um das 1,6-fache an. Interessanterweise geht auch die RNS-Menge auf das 0,81-fache des Kontrollwertes zurück. In diesem Fall kann spekuliert werden, dass eine Änderung der Polyaminmengen in der Brustdrüse erforderlich ist um trotz eines Aminosäuremangels die Versorgung des Nachwuchses sicherzustellen. Um

spezifische Effekte auf Proliferation, Apoptose oder Differenzierung für die unterschiedlichen Polyamine zu überprüfen ist ein einheitliches und stabiles System nötig. Statt Schneider S2 Zellen zu verwenden, bei denen es sich um eine nicht klonale Zelllinie aus *Drosophila* Embryonen handelt (Schneider, 1972), wäre es möglicherweise hilfreich Versuche mit einer monoklonalen Zelllinie durchzuführen. Weiterhin wäre es interessant CK2-vermittelte polyaminspezifische Effekte auf die Differenzierung von Zellen und auf morphogenetische Vorgänge in *Drosophila* zu untersuchen. Dazu wäre die Entwicklung von Pilzkörper-Neuronen aus Neuroblasten in *Drosophila* ein System in dem sowohl Proliferation als auch Differenzierung stattfindet und für das vielfältige genetische Methoden zur Verfügung stehen. So könnten zelluläre Reaktionen auf die verschiedenen Polyamine in Abhängigkeit unterschiedlicher DCK2 β -Proteine oder zelluläre Reaktionen nach Verlust von DCK2 β *in vivo* untersucht werden. Die Konzentration intrazellulärer Polyamine ist durch eine Vielzahl beteiligter Enzyme, miteinander verknüpfter Signalwege sowie durch die Möglichkeit zur Aufnahme extrazellulärer Polyamine und Abgabe von intrazellulären Polyaminen in das extrazelluläre Medium komplex reguliert. Um zwischen verschiedenen Versuchen vergleichbare Polyamintiter oder über längere Zeit stabile Polyamintiter zu gewährleisten, wäre es deshalb nötig, Polyaminmessungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchzuführen oder Gewebe (isolierte Gehirne) bzw. Zellen in einer polyaminhaltigen Nährlösung zu inkubieren. Durch Kultivierung von Neuroblasten von *Acheta domesticus* in polyaminhaltiger Nährlösung konnte gezeigt werden, dass Putrescin die Proliferation von Neuroblasten erhöht, während Spermidin und Spermin die Differenzierung von Neuronen stimulieren (Cayre et al., 2001). Die Frage, ob diese zellulären Reaktionen von CK2 abhängig sind, könnte durch analoge Versuche mit kultivierten Neuroblasten in Kombination mit der Inhibition der CK2-Aktivität durch RNAi oder durch einen CK2 spezifischen Inhibitor beantwortet werden.

Organismen können als selektiv offene Systeme beschrieben werden, die mit der Umwelt einen stetigen Stoff-, Energie- und Informationsaustausch betreiben und sich an Änderungen der Umweltbedingungen anpassen. Im Laufe der Evolution haben sich mehrfach unterschiedliche Mechanismen herausgebildet, die die Adaption des Stoffwechsels von Organismen und Zellen auf äußere Bedingungen ermöglichen. Bei mehrzelligen Organismen ist zusätzlich der Stoff-, Energie- und Informationsaustausch zwischen den Untereinheiten des lebenden Systems, also zwischen Organen und Zellen, nötig für das Überleben des Gesamtsystems. Neben der Regulierung von Signalwegen durch extrazelluläre Stimuli haben auch Stoffwechselzwischenprodukte innerhalb von Zellen Auswirkungen auf deren Verhalten. Um komplexe und

ressourcenintensive Prozesse einzuleiten muss zuerst sichergestellt werden, dass die Zelle den Prozess erfolgreich abschließen kann. Im Zellzyklus wird beispielsweise an Kontrollpunkten überprüft, ob die vorhergehende Phase erfolgreich abgeschlossen wurde und die Voraussetzungen zur Einleitung der nächsten Phase gegeben sind. Eine einzelne Zelle muss also in der Lage sein Informationen bezüglich ihres Zustandes zu detektieren und leitet daraufhin innerhalb ihrer Möglichkeiten eine zelluläre Reaktion ein, die dem Überleben des Organismus dienlich ist.

In Bezug auf die hier vorliegende Arbeit lässt sich ein Modell postulieren, in dem der Polyaminspiegel über CK2 mit dem MAPK-Signalweg verknüpft ist und verschiedene physiologische Auswirkungen zur Folge hat, die von der zellulären Gesamtsituation abhängen. Dabei sind die Polyaminkonzentrationen und die Relation der Polyamine zueinander das Signal, das die Verfügbarkeit von Aminosäuren repräsentiert. Dieses Signal wird durch Bindung an den Sensor CK2 β und unter Strukturänderung des Holoenzym an den Effektor CK2 α weitergegeben. Der Effekt ist die Modulation der Phosphorylierung von Raf und der davon abhängigen Phosphorylierung der Effektor kinase Erk (Abbildung 27). Auf diese Weise könnten physiologische Vorgänge wie Proliferation, für die Aminosäuren benötigt werden, in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Aminosäuren adaptiv reguliert werden. Wenn ein Organismus beispielsweise einer Hungersituation ausgesetzt ist, könnten durch Inhibition von Proliferation und anderer Prozesse Ressourcen eingespart werden. Dieses Modell wird durch die erwähnten Versuche gestützt, bei denen Nahrungsentzug bei Ratten zu einem relativen Anstieg des Polyamins Spermin im Vergleich zu Spermidin führt (Brosnan et al., 1983), während der inhibitorische Effekt von Spermin auf den MAPK-Signalweg in der hier vorliegenden Arbeit beschrieben wurde.

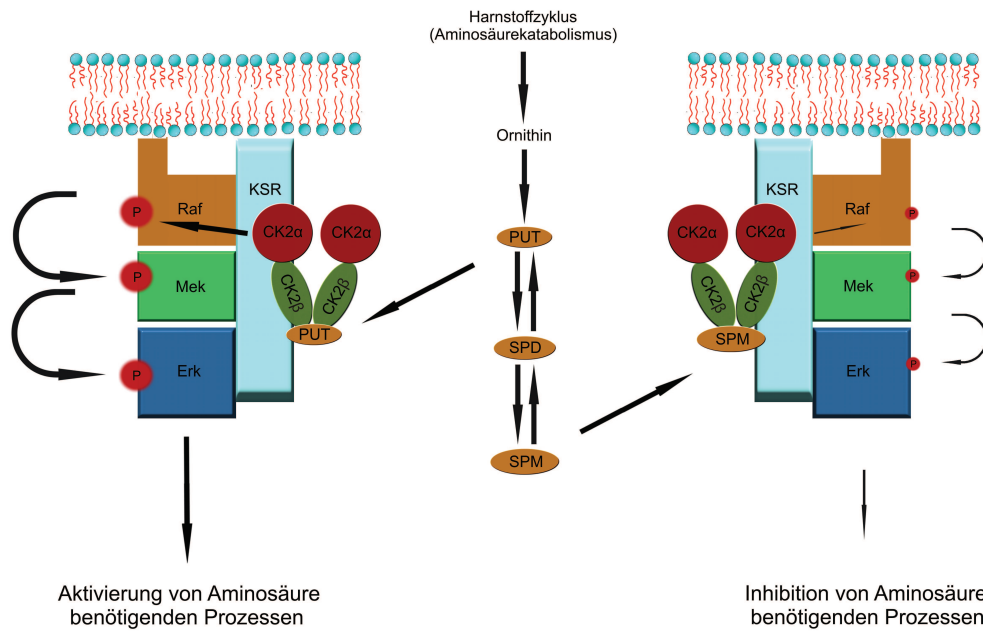


Abbildung 27) Modell eines Signalwegs zwischen Polyaminen, CK2, dem MAPK-Signalweg und der Beeinflussung von Aminosäure-abhängigen Prozessen. Durch den Abbau von Aminosäuren im Harnstoffzyklus und die Polyaminsynthese entstehen Polyamine, deren Menge und Relation zueinander als Signal auf den Aminosäureabbau und damit auf die Verfügbarkeit zellulärer Aminosäuren schließen lässt. Je nach Art des Polyamins (bzw. deren Relation zueinander) wird ein Signal durch den Sensor CK2β erkannt und unter Strukturänderung des CK2 Holoenzym an den Effektor CK2α weitergegeben. Bei Bindung von Putrescin (und Spermidin) ist der Effekt eine relativ starke Phosphorylierung von Raf und Aktivierung von Erk, die Aminosäure benötigende Prozesse aktiviert (links). Dagegen führt die Bindung von Spermin an CK2 zu einer Inhibition von CK2, einem geringfügig aktiven Zustand von Raf und Erk und der Inhibition von Aminosäure benötigten Prozessen.

Zusammenfassung

Die heterotetramere Proteinkinase CK2 nimmt aufgrund der großen Anzahl und Diversität ihrer Substrate, sowie aufgrund ihrer Eigenschaft Signalwege miteinander zu vernetzen eine Sonderstellung innerhalb der Kinasen ein. CK2 beeinflusst Proliferation, Differenzierung und Apoptose, Prozesse an denen auch Polyamine und der MAPK-Signalweg beteiligt sind.

Eine vor kurzem durchgeführte Arbeit beschreibt die Bindung von CK2 an das Gerüstprotein KSR und die Verstärkung des MAPK-Signalwegs durch Phosphorylierung von Raf-Proteinen in Vertebraten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CK2 auch in *Drosophila* mit KSR interagiert und das einzige in *Drosophila* vorhandene Raf-Protein (DRaf) *in vitro* phosphoryliert. Im Gegensatz zur Phosphorylierung der humanen B-Raf und C-Raf Proteine an Serin 446 bzw. Serin 338 innerhalb der „negative charge regulatory region“ (N-Region), führten Kinase-Reaktionen und massenspektrometrische Untersuchungen zur Identifizierung von Serin 11 als CK2 Phosphorylierungsstelle in DRaf, während ein zu Serin 446 in B-Raf äquivalentes Serin in der N-Region in *Drosophila* nicht durch CK2 phosphoryliert wird. Durch Überexpression von DRaf sowie von zwei DRaf-Varianten bei denen Serin 11 durch Alanin oder Aspartat substituiert wurde (DRaf^{S11A} und DRaf^{S11D}) konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass die Ladung an der Aminosäureposition 11 die Funktion von DRaf beeinflusst, wobei eine negative Ladung an dieser Stelle zur Phosphorylierung und Aktivierung der Effektor-Kinase Erk führt.

Die Phosphorylierung durch CK2 ist unabhängig von regulatorischen Botenstoffen ("second messengers"), wird aber durch Bindung von Polyaminen moduliert. Intrazelluläre Polyamine entstammen zum grossen Teil dem zellulären Aminosäurekatabolismus und beeinflussen die Phosphorylierung von DRaf durch CK2 *in vitro*, wobei Spermin ein effizienter Inhibitor der Reaktion ist, während die Effekte von Putrescin und Spermidin gering sind. Auch in *Drosophila* Schneider S2 Zellen und in adulten weiblichen Fliegen hat Spermin einen inhibitorischen, CK2-abhängigen Effekt auf die Aktivierung von Erk. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass Putrescin und Spermidin in der Lage sind die Aktivierung von Erk, im Vergleich zu Zellen die nur mit Spermin behandelt wurden, zu erhöhen. Das spricht dafür, dass die Phosphorylierung von DRaf und die davon abhängige Aktivierung von Erk durch CK2 von der Menge und Relation der verschiedenen Polyamine zueinander abhängt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass der Polyaminmetabolismus über CK2 mit dem MAPK-Signalweg verknüpft ist. Nachdem Polyamine durch Aminosäurekatabolismus

Zusammenfassung

entstehen, kann auf diese Weise der MAPK-Signalweg in Abhängigkeit der Verfügbarkeit zellulärer Aminosäuren reguliert werden. Vorversuche zeigten eine Beeinflussung von Proliferation und Apoptose durch CK2 und Polyamine. Weitere Untersuchungen sind aber nötig um spezifische Einflüsse von Polyaminen und CK2 auf zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose aufzudecken.

Summary

Because of its high number and diversity of substrates, as well as its ability to cross-link signalling pathways, the heterotetrameric protein kinase CK2 has an exceptional position within kinases. CK2 influences proliferation, differentiation and apoptosis, processes in which also polyamines and the MAPK-signalling pathway are involved.

A recent publication delineates binding of CK2 to the scaffold protein KSR and the enhancement of the MAPK-signalling pathway by phosphorylation of Raf-proteins in vertebrates.

In my thesis I could show that CK2 also interacts with KSR in *Drosophila* and phosphorylates the only existing Raf protein in *Drosophila* (DRaf) *in vitro*. In contrast to the phosphorylation of human B-Raf- and C-Raf-proteins on serine 446 respectively serine 338 within the "negative charge regulatory region" (N-region), kinase reactions and mass spectrometric analyses led to the identification of serine 11 as phosphorylation site in DRaf, whereas a serine in the N-region, which corresponds to serine 446 of B-Raf, is not phosphorylated by CK2 in *Drosophila*. In cell culture experiments overexpression of DRaf and two DRaf-variants, in which serine 11 was substituted by alanine or aspartate (DRaf^{S11A} and DRaf^{S11D}), revealed the charge at amino acid position 11 to affect the function of DRaf, with a negative charge leading to phosphorylation and activation of the effector kinase Erk. Phosphorylation by CK2 is independent of second messengers, whereas it is modified by binding of polyamines. Intracellular polyamines mainly derive from cellular amino acid catabolism and modulate the phosphorylation of DRaf by CK2 *in vitro* with spermine being an efficient inhibitor of the reaction, whereas the effects of putrescine and spermidine are minor. In *Drosophila* Schneider S2 cells and adult flies spermine inhibits the activation of Erk in a CK2-dependent way. Furthermore administration of putrescine and spermidine in combination with spermine leads to enhanced Erk activation in cells compared to cells that are treated with spermine. These results suggest that phosphorylation of DRaf and the subsequent activation of Erk by CK2 are dependent on the amount and relative concentrations of polyamines.

Altogether the results of this work demonstrate a role for CK2 in linking polyamine metabolism to the MAPK-signalling pathway. Since polyamines derive from amino acid catabolism, the MAPK-signalling pathway can be regulated dependent on the availability of cellular amino acids. Preliminary experiments point to CK2- and polyamine-dependent effects on proliferation and apoptosis. Further investigations are necessary to reveal specific effects of polyamines and CK2 on cellular processes like proliferation, differentiation and apoptosis.

Literaturverzeichnis

- Abraham, D., Podar, K., Pacher, M., Kubicek, M., Welzel, N., Hemmings, B. A. (2000) Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* **275**: 22300-22304.
- Ackerman, P. and Osheroff, N. (1989) Regulation of casein kinase II activity by epidermal growth factor in human A-431 carcinoma cells. *J Biol Chem* **264**: 11958-11965.
- Anderson, N. G., Li, P., Marsden, L.A., Williams, N., Roberts, T. M., Sturgill, T. W. (1991) Raf-1 is a potential substrate for mitogen-activated protein kinase in vivo. *Biochemistry* **277**: 573-576.
- Bojanowski, K., Filhol, O., Cochet, C., Chambaz, E. M. and Larsen A. K. (1993) DNA topoisomerase II and casein kinase II associate in a molecular complex that is catalytically active. *J Biol Chem* **268**: 22920-22926.
- Bonner, T. I., Kerby, S. B., Sutrave, P., Gunnell, M. A., Mark, G., Rapp, U. R. (1985) Structure and biological activity of human homologs of the raf/mil oncogene. *Mol Cell Biol* **5**: 1400-1407.
- Brosnan, M. E., Farrell, R., Wilansky, H. and Williamson, D. H. (1983) Effect of starvation and refeeding on polyamine concentrations and ornithine decarboxylase antizyme in mammary gland of lactating rats. *Biochem J* **212**: 149-153.
- Buchou, T., Vernet, M., Blond, O., Jensen, H. H., Pointu, H., Olsen, B. B., Cochet C., Issinger, O.G., Boldyreff, B. (2003) Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* **23**: 908-915.
- Burnett, G., Kennedy, E. P. (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* **211**: 969-980.
- Cayre, M., Strambi, C., Charpin, P., Augier, R. And Strambi, A. (1997) Specific requirement of putrescine for the mitogenic action of juvenile hormone on adult insect neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 8238-8242.
- Cayre, M., Malaterre, J., Strambi, C., Charpin, P., Ternaux, J. P. & Strambi, A. (2001) Short- and long-chain natural polyamines play specific roles in adult cricket neuroblast proliferation and neuron differentiation in vitro. *Journal of Neurobiology* **48**: 315-324.
- Chang, Z. F., Chen, K. Y. (1989) Polyamine metabolism and cell-cycle-dependent gene expression in IMR-90 human diploid fibroblasts during senescence in culture. *J Biol Chem* **263**: 11431-11435.
- Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M. J., Chambaz, E. M., Cochet, C., Dideberg, O. (1999) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J* **18**: 2930-2940.

- Chiloeches, A., Mason, C. S., Marais, R. (2001) S338 Phosphorylation of Raf-1 Is Independent of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Pak3. *Mol Cell Biol* **21**(7): 2423-2434.
- Cutler, R. E. Jr., Stephens, R. M., Saracino, M. R., Morrison, D. K. (1998) Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9214-9219.
- Denouel-Galy, A., Douville, E. M., Warne, P. H., Papin, C., Laugier, D., Calothy, G. (1998) Murine Ksr interacts with Mek and inhibits Ras-induced transformation. *Curr Biol* **8**: 46-55.
- Faust, M., Montenarh, M. (2000) Subcellular localization of protein kinase CK2: A key to its function? *Cell Tissue Res* **301**: 329-340.
- Filhol, O., Baudier, J., Delphin, C., Loue-Mackenbach, P., Chambaz, E. M. and Cochet, C. (1992) Casein kinase II and the tumor suppressor protein P53 associate in a molecular complex that is negatively regulated upon P53 phosphorylation. *J Biol Chem* **267**: 20577-20583.
- Flamigni, F., Facchini, A., Capanni, C., Stefanelli, C., Tantini, B., Caldarera, C. M. (1999) p44/42 mitogen-activated protein kinase is involved in the expression of ornithine decarboxylase in leukaemia L1210 cells. *Biochem J* **341**: 363-369.
- Gatica, M., Hinrichs, M. V., Jedlicki, A., Allende, C. C. and Allende, J.E. (1993) Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *FEBS* **315** (2): 173-177.
- Gerner, E. W. and Meyskens, F. L. Jr. (2004) Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* **4**: 781-792.
- Huebner, K., ar-Rushdi, A., Griffin, C. A., Isobe, M., Kozak, C., Emanuel, B. S., Nagarajan, L., Cleveland, J. L., Bonner, T. I., Goldsborough, M. D., Croce, C.M., Rapp, U. (1986) Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromosome in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3934-3938.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (1999) Polyamine transport in *Escherichia coli* and yeast. *Biochem J* **344**: 633-642.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Comm* **271**: 559-564.
- Ikawa, S., Fukui, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Yamamoto, T., Toyoshima, K. (1988) B-Raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol Cell Biol* **8**: 2651-2654.
- Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z. X., and Cantley, L. G. (2004). Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol Cell* **16**: 257-267.
- Jauch, E., Melzig, J., Brkulj, M. and Raabe, T. (2002) In vivo functional analysis of *Drosophila* protein kinase casein kinase 2 (CK2) beta-subunit. *Gene* **298**: 29-39.

- Jaumot, M., Hancock, J. F. (2001) Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* **20**: 3949-3958.
- Kurki, P., Lotz, M., Ogata, K. and Tan, E. M. (1987) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin in activated human T lymphocytes, *J. Immunol.* **138**: 4114-4120.
- Lee, T. & Luo, L. (2001) Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* **24**: 251-254.
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. (2010) Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **141**: 1117-1134.
- Leroy, D., Filhol, O., Delcros, J. G., Pares, S., Chambaz, E. M. & Cochet, C. (1997a) Chemical features of the protein kinase CK2 polyamine binding site. *Biochemistry* **36**: 1242-1250.
- Leroy, D., Heriche, J. K., Filhol, O., Chambaz, E. M. and Cochet, C. (1997b) Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J Biol Chem* **272**: 20820-20827.
- Lin, J. M., Kilman, V. L., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M., Allada, R (2002) A role for casein kinase 2alpha in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* **420**: 816-820.
- Litchfield, D.W. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* **369**: 1-15.
- McDonnell, M. A., Abedin, M. J., Melendez, M., Platikanova, T. N., Ahmed, K., Kelekar, A. (2008) Phosphorylation of murine Caspase-9 by the protein kinase CK2 regulates its cleavage by Caspase-8. *J Biol Chem* **283**: 20149-20158.
- McKay, M. M., Morrison, D.K. (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* **26**: 3113-3121.
- Meggio, F., Boldyreff, B., Issinger, O. G., Pinna, L. A. (1994) Casein kinase 2 down-regulation and activation by polybasic peptides are mediated by acidic residues in the 55-64 region of the beta-subunit. A study with calmodulin as phosphorylatable substrate. *Biochemistry* **33** (14): 4336-4342.
- Meggio, F., Pinna, L. A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* **17**:349-68.
- Meksuriyen, D., Fukuchi-Shimogori, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Toida, T., Imanari, T., Kawai, G., Igarashi, K. (1998) Formation of a complex containing ATP, Mg²⁺ and spermine. Structural evidence and biological significance. *J Biol Chem* **273**: 30939-30944.
- Mischak, H., Seitz, T., Janosch, P., Eulitz, M., Steen, H., Schellerer, M., Philipp, A., Kolch, W. (1996) Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol Cell Biol* **16**: 5409-5418.

- Niefind, K., Issinger, O. G. (2005) Primary and secondary interactions between CK2alpha and CK2beta lead to ring-like structures in the crystals of the CK2 holoenzyme. *Mol Cell Biochem* **274** (1-2): 3-14.
- Niefind, K., Raaf, J., Issinger, O. G. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: Protein kinase CK2: from structures to insights. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1800-1816.
- Noble, C., Mercer, K., Hussain, J., Carragher, L., Giblett, S., Hayward, R., Patterson, C., Marais, R., Pritchard, C. A. (2008) CRAF autophosphorylation of serine 621 is required to prevent its proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* **31**: 862-872.
- Omerovic, J., Laude, A. J. and Prior, I. A. (2007) Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2575-2589.
- Ory, S., Zhou, M., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Morrison, D. K. (2003) Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR-1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* **13**: 1356-1364.
- Pegg, A. E. (2006) Regulation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* **281**:14529–14532.
- Pendeville, H., Carpino, N., Marine, J. C., Takahashi, Y., Muller, M., Martial, J. A. and Cleveland, J. L. (2001) The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol Cellular Biol* **21**: 6549-6558.
- Pérez-Rivas, L. G., Prieto, S. and Lozano, J. (2010) Modulation of Ras signaling by the KSR family of molecular scaffolds. *Emerging Signaling Pathways in Tumor Biology* 2010: 1-23.
- Pinna, L. A. (1990) Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* **1054**(3): 267-284.
- Pinna, L. A. (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci* **115**: 3873-3878.
- Pinna L. A., Allende, J.E. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: an ugly duckling in the kinome pond. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1795-1799.
- Pinna, L. A., (2003) The raison d'être of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2. *Acc Chem Res* **36**: 378-384.
- Pühringer, D. (2004) Funktionelle Analyse verschiedener CK2β-Isoformen in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, angefertigt am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, Würzburg
- Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrançois, M., Sicheri, F. And Therrien, M. (2009) A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* **461**: 542-545.

- Ramos, J. W. (2008). The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 2707-2719.
- Ritt, D. A., Daar, I. O., Morrison, D. K. (2006) KSR regulation of the Raf-Mek-ERK cascade. *Methods in Enzymology* **407**:224-237.
- Ritt, D. A., Zhou M., Conrads T. P., Veenstra T. D., Copeland T. D., Morrison D. K. CK2 Is a component of the KSR1 scaffold complex that contributes to Raf kinase activation (2007). *Curr Biol* **17**: 179-84.
- Rodriguez, F. A., Contreras, C., Bolanos-Garcia, V., Allende, J. E. (2008) Protein kinase CK2 as an ectokinase: The role of the regulatory CK2 β subunit. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 5693-5698.
- Rodriguez-Vicinia, P., Oses-Prieto, J., Burlingame, A., Fried, M., McCormick, F. (2006) A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. *Mol Cell* **22**: 217-230.
- Roux, P. P., and Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 320-344.
- Roy F., Laberge, G., Douziech, M., Ferland-McCollough, D., Therrien, M. (2002) KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev* **16**: 427-438.
- Rushworth, L. K., Hindley, A. D., O'Neill, E. and Kolch, W. (2006) Regulation and Role of Raf-1/B-Raf Heterodimerization. *Mol Cell Biol* **26**(6): 2262-2272.
- Sacks, D. B., (2006) The role of scaffold proteins in MEK/ERK signalling. *Biochem Soc Trans* **34**: 833-836.
- Salvi, M., Sarno, S., Cesaro, L., Nakamura, H., and Pinna, L. A. (2009) Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 847-859.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York, 2nd Edition.
- Sarno, S., Reddy, H., Meggio, F., Ruzzene, M., Davies, S. P., Donella Deana, A., Shugar, D., and Pinna, L. A. (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett.* **496**: 44-48.
- Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A., Weber, M. J. (1998) MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* **281**: 1668-1671.
- Schipper, R. G., Penning, L. C., Verhofstad, A. A. J. (2000) Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin Cancer Biol* **10**: 55-68.

- Schneider, I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **27** (2): 353- 365.
- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H. and Kim, K. (2005) Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J* **24**: 3532-3542.
- Sommercorn, J., Mulligan, A., Lozeman, F. J. and Krebs, E.. (1987) Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. *Proc nat Acad Sci U.S.A.* **84**: 8834-8838.
- St-Denis, N. A., Litchfield, D. W. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell Mol Life Sci* **66**(11-12): 1817-1829.
- Stefanelli, C., Tantini, B., Fattori, M., Stanic', I., Pignatti, C., Clo, C., Guarnieri, C., Caldarera, C. M., Mackintosh, C. A., Pegg, A. E., Flamigni, F. (2002) Caspase activation in etoposide-treated fibroblasts is correlated to ERK phosphorylation and both events are blocked by polyamine depletion. *FEBS Lett* **527**: 223-228.
- Teis, D., Wunderlich, W. and Huber, L. A. (2002) Localization of the MP1-MAPK Scaffold Complex to Endosomes Is Mediated by p14 and Required for Signal Transduction. *Dev Cell* **3**: 803-814.
- Terai, K., Matsuda, M. (2005) Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO Rep* **6**: 251-255.
- Thomas, T. and Thomas, T. J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* **58**: 244-258.
- Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M., Nishida, E. (2004) Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* **7**: 33-44.
- Tran, N. H., Wu, X. and Frost, J. A. (2005) B-Raf and Raf-1 Are Regulated by Distinct Autoregulatory Mechanisms *J Biol Chem* **280** (16): 16244-16253.
- Trembley, J. H., Wang, G., Unger, G., Slaton, J., Ahmed, K. (2009) CK2 – A key player in cancer biology. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1858-1867.
- Tzivion, G., Luo, Z., Avruch, J. (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* **394**: 88-92.
- Udell, M. U., Rajakulendran, T., Sicheri, F., Therrien, M. (2010) Mechanistic principles of RAF kinase signaling *Cell Mol Life Sci* **68**(4):553-565.
- Ueki, K., Matsuda, S., Tobe, K., Gotoh, Y., Tamemoto, H., Yachi., M., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Nishida, E., Kadowaki, T. (1994) Feedback regulation of mitogen-activated protein kinase kinase activity of c-Raf-1 by insulin and phorbol ester stimulation. *J Biol Chem* **269**: 15756-15761.

-
- Yoon, S. and Seger, R. (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**: 21-44.
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Shigemasa, A., Taniguchi, S., Yamamoto, K., Makinoshima, H., Ishihama, A., Igarashi, K. (2004) A Unifying Model for the Role of Polyamines in Bacterial Cell Growth, the Polyamine Modulon. *J Biol Chem* **279**: 46008-46013.
- Yu, W., Fantl, W. J., Harrowe, G., Williams, L. T. (1998) Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* **8**: 56-64.
- Valero, E., De Bonis, S., Filhol, O., Wade, R. H., Langowski, J., Chambaz, E. M., Cochet, C. (1995) Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J Biol Chem* **270**: 8345-8352.
- Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**: 855-867.
- Weber, C. K., Slupsky, J. R., Kalmes, H. A., Rapp, U. R. (2001) Active Ras induces heterodimerization of cRaf and Braf. *Cancer Res* **61**: 3595-3598.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. and Marais, R. (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol Cell Biol* **5**: 875-885.
- Wunderlich, W., Fialka, I., Teis, D., Alpi, A., Pfeifer, A., Parton, R. G. (2001) A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol* **152**: 765-776
- Zang, M., Gong, J., Luo, Lingqi, L., Zhou, J., Xiang, X., Huang, W., Huang, Q., Luo, X., Olbrot, M., Peng, Y., Chen, C., Luo, Z. (2008) Characterization of Ser338 Phosphorylation for Raf-1 Activation *J Biol Chem* **283**: 31429-31437.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Thomas Raabe bedanken, der mir die Bearbeitung des vorliegenden Themas ermöglicht hat und im richtigen Moment die Fokussierung darauf empfohlen hat. Dabei ließ er mir jede fachliche und methodische Unterstützung zukommen. Weiterhin möchte ich mich für die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen bedanken, für seine Geduld und für die wertvolle Unterstützung speziell beim Anfertigen dieser Arbeit und der Publikation.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Prof. Dr. Erich Buchner für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein weiteres Dankeschön gilt den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der AG Raabe und des MSZ für ihre fachliche Unterstützung und den Beitrag zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre:

Bei Eike Jauch möchte ich mich für seine begeisternde Art, Pilzzuchtexperimente und philosophischen Exkursionen bedanken. Benjamin Mentzel möchte ich für seine stete Hilfsbereitschaft im Allgemeinen (speziell was Computer betrifft), sowie für anregende und witzige (Kaffee-)pausen bedanken. Danke auch an Anna: you´re a first-rate lab colleague ("Stayin´ alive"), Kathi, Juliane, Heike, Steffi, Phillip und Theresa. Danke Verena für die freundliche Aufnahme.

Wernher: ohne Dich ist der Parkplatz leider sicherer geworden ;-)

Mein Dank gilt auch Jens und Iris aus Hohenheim für ihre Zeit, ihr Engagement und ihren unkomplizierten - v.a. aber nicht nur fachlichen - Austausch.

Weiterhin möchte ich mich bei Nadine, Vroni und Linda für die Ratschläge und Unterstützung im Umgang mit FACS-Analysen bedanken.

Dank gilt auch:

Anaid dafür, dass Du eine gute Freundin bist, für Deine stete Neugier, Dein Interesse und Deine Unterstützung nicht nur bei Fachlichem.

Susi: für Deine Unterstützung, Freundschaft und zum Beitrag für: "ein weiteres Samenkorn ist aufgekeimt."

Sascha: Du bist seit dem ersten Semester ein guter Freund und unsere verschiedenen Unternehmungen haben meinen Blick geweitet ;-). Danke auch für Deine Korrekturvorschläge.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern und Geschwistern Fritz und Constanze für Ihre stete Hilfsbereitschaft, ihr offenes Ohr und ihre moralische Unterstützung. Danke "meiner gefühlten 2. Familie" Fritz, Isi und Moritz.

Danke auch an Kaja, Benni, Vroni, Melli, Tom, Manuel und David für ihre Unterstützung.

10. Publikationen

Stark, F., Pfannstiel, J., Klaiber, I., Raabe, T. (2011) Protein kinase CK2 links polyamine metabolism to MAPK signalling in *Drosophila*. *Cell Signal* **23**: 876-882

Jauch, E., Wecklein, H., Stark, F., Jauch, M., Raabe, T. (2006) The *Drosophila melanogaster* *DmCK2 β* transcription unit encodes for functionally non-redundant protein isoforms. *Gene* **374**: 142-152

Posterpräsentationen:

Stark, F., Jauch, E., Raabe, T. (2009) Protein kinase CK2 as a modulator in intracellular signalling. *21st European Drosophila Research Conference*, Nice, France

Stark, F., Kungl, T., Mentzel, B., Raabe, T. (2008) Identification of Dynamitin as a new interaction partner of p21-activated kinases. *12th European Drosophila Neurobiology Conference*, Würzburg, Germany VI: 120

11. Abkürzungsverzeichnis

AMD: S-Adenosylmethionin Decarboxylase

ATP: Adenosintriphosphat

AZ: Antizym

AZIN: Antizym Inhibitor

CK2: Casein Kinase 2, (Ser-/Thr-Kinase)

CR1-3: Conserved Region 1-3

DAX: Diamin Exporter

DFMO: Difluoromethylornithin

DNS: Desoxyribonukleinsäure

EGF: Epidermal Growth Factor

Erk: Extracellular signal-regulated kinase, (Ser-/Thr-Kinase)

GDP: Guanosindiphosphat

GEF: Guaninnucleotid Exchange Factor

Grb2: Growth factor receptor binding protein 2

GST: Glutathion-S-Transferase

GTP: Guanosintriphosphat

IGF: Insulin-like Growth Factor

KSR: Kinase Suppressor of Ras

MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MARCM: Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker

mbu: mushroom body undersized

Mek: MAPKK/ Erk-Kinase, (Ser-/Thr-und Tyr-Kinase)

NGF: Nerve Growth Factor

N-Region: Negative charge regulatory region

ODC: Ornithin Decarboxylase

ORF: Open Reading Frame

PAK: p21-aktivierte Kinase

PAO: Polyamin Oxidase

PAGE: Polyacrylamid-Geleektrophorese

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PP1/2A: Protein Phosphatase 1/2A

Raf: Rat fibrosarcoma, (Ser-/Thr-Kinase)
Ras: Rat sarcoma, (GTPase)
RNS: Ribonukleinsäure
SAM: S-Adenosylmethionin
SAMDC: S-Adenosylmethionin Decarboxylase
SDS: Sodiumdodecylsulfate
SH2: Src Homologie 2
SMO: Spermin Oxidase
SMS: Spermin Synthase
SOS: Son Of Sevenless, (Ras-GEF)
Src: Sarcoma, (Tyrosinkinase)
SRM: Spermidin Synthase
SSAT: Spermidin/Spermin Acetyltransferase
TBB: 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
UAS: Upstream Activating Sequence
WTB: Wildtyp Berlin
WTF: Wachstumsfaktor