

# 1. INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Inhaltsverzeichnis</b> .....	1
<b>2. Zusammenfassung/Summary</b> .....	5
<b>3. Einleitung</b> .....	7
<b>3.1 Signaltransduktion</b> .....	7
3.1.1 Die klassische zytoplasmatische Kaskade.....	10
3.1.1.1 Die Raf-Familie.....	12
3.1.2 Streß-Kinasekaskaden.....	13
3.1.3 Brückenproteine.....	15
<b>3.2 Die Serin/Threonin Kinasen Cot und Tpl-2</b> .....	17
<b>3.3 Gegenstand der Arbeit</b> .....	19
<b>4. Material</b> .....	21
<b>4.1 Geräte</b> .....	21
<b>4.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper</b> .....	22
4.2.1 Chemikalien.....	22
4.2.2 Enzyme.....	23
4.2.2.1 Restriktionsenzyme.....	23
4.2.2.2 Sonstige Enzyme.....	24
4.2.3 Molekulargewichtsmarker.....	24
4.2.3.1 Molekulargewichtsmarker für Proteine.....	24
4.2.3.2 Molekulargewichtsmarker für DNA.....	24
4.2.4 Reagenziensätze (Kits).....	24
4.2.5 Antikörper.....	25
<b>4.3 Bakterienstämme, Hefestämme, Baculoviren und Plasmide</b> .....	26
4.3.1 Bakterienstämme.....	26
4.3.2 Hefestämme.....	26
4.3.3 Baculoviren.....	27
4.3.4 Plasmide.....	27
4.3.4.1 Eukaryotische Klonierungs- und Expressionsvektoren.....	27
4.3.4.2 Hefe Two-Hybrid Plasmide.....	28
4.3.4.3 Säuger Expressions-Konstrukte.....	29
4.3.4.4 Hefe Two-Hybrid Konstrukte.....	31
4.3.5 Two-Hybrid cDNA-Bibliotheken.....	31
<b>4.4 Medien zur Aufzucht von Bakterien und Hefen</b> .....	32
4.4.1 Bakterienmedien.....	32
4.4.2 Hefe-Medien.....	32
<b>4.5 Versuchstiere und Zellmaterial</b> .....	33
4.5.1 Versuchstiere.....	33
4.5.2 Zellmaterial .....	33
<b>4.6 Medien für die Zellkultur</b> .....	34
<b>4.7 Verbrauchsmaterialien</b> .....	35
<b>4.8 Puffer und Lösungen</b> .....	35
<b>4.9 Sonstiges</b> .....	38

<b>5. Arbeitsmethoden</b>	39
<b>5.1 Molekularbiologische Methoden</b>	39
5.1.1 Bakterienkulturen	39
5.1.2 Herstellung ultrakompetenter Bakterien	39
5.1.3 Konstruktion von Expressionsplasmiden	40
5.1.3.1 Restriktionsverdau von DNA	40
5.1.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen	40
5.1.3.3 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	41
5.1.3.4 Herstellung von blunt-end DNA-Fragmenten	41
5.1.3.4.1 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden durch Klenow- Behandlung	41
5.1.3.4.2 Verdau von 3'-überhängenden DNA-Enden durch T4- Polymerase Verdau	41
5.1.3.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit Calf Intestinal Phosphatase	41
5.1.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	42
5.1.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten	42
5.1.3.8 Transformation kompetenter DH5 $\alpha$	42
5.1.4 Plasmidisolation aus <i>E.coli</i>	43
5.1.4.1 Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus <i>E.coli</i> (kleiner Maßstab)	43
5.1.4.2 Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus <i>E.coli</i> (großer Maßstab)	43
5.1.4.3 Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E.coli</i> für Zellkultur- Transfektionsexperimente	44
5.1.4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	44
5.1.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR	44
5.1.6 Erstellung von Punktmutationen mit Hilfe des QuickChange <sup>TM</sup> Site Directed Mutagenesis Kit	45
5.1.7 Automatische DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377 Integrated Thermal Cycler	45
<b>5.2 Zellkultur</b>	45
5.2.1 Baculovirus-Expressionssystem	45
5.2.1.1 Aufzucht von Sf-9-Zellen	46
5.2.1.2 Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren	46
5.2.2 293/NIH-Zellkultur	46
5.2.2.1 Transfektion mit Expressionsplasmiden in Säugerzellen	47
5.2.2.1.1 Transiente Transfektion nach der Calciumphosphatmethode	47
5.2.2.1.2 Transfektion durch Lipofectamine (Lipofektion)	47
5.2.2.2 Retroviren als effiziente Vektoren für den Gentransfer in Säugerzellen	48
5.2.2.2.1 Virustitration	48
5.2.2.2.2 Soft-Agar-Klonierung	49
5.2.3 PC12-Zellen	50
5.2.4 32D-Zellen/Survival-Assay	50
5.2.5 Herstellung primärer Milztumorzelllinien	50
<b>5.3 Molekularbiologisches Arbeiten mit Proteinen</b>	50
5.3.1 Gewinnung von Zell-Lysaten	50
5.3.1.1 Gewinnung von Sf9-Zell-Lysaten	50
5.3.1.2 Gewinnung von 293-Zell-Lysaten	51
5.3.1.3 Gewinnung von Zell-Lysaten aus Mausorganen	51
5.3.2 Western-Blots	51

5.3.2.1	Vorbereitung der Proben.....	51
5.3.2.2	Autrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
5.3.2.3	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten).....	52
5.3.2.4	Färbung der Membran mit Ponceau S.....	53
5.3.2.5	Immundetektion von Proteinen.....	53
5.3.2.5.1	Western-Blots stripfen.....	53
5.3.3	Präzipitations- und Coimmunopräzipitationsexperimente.....	53
5.3.4	Kinase-Assays.....	54
5.3.5	Reportergen Assays.....	54
<b>5.4</b>	<b>Molekularbiologisches Arbeiten mit RNA.....</b>	<b>55</b>
5.4.1	RNA-Extraktion.....	55
5.4.2	cDNA-Synthese.....	55
5.4.3	RT-PCR.....	55
<b>5.5</b>	<b>Two-Hybrid Screen.....</b>	<b>56</b>
5.5.1	Amplifikation von cDNA-Bibliotheken.....	57
5.5.2	Hefe-Transformation und Two-Hybrid-Tests.....	57
5.5.2.1	Transformation von <i>S.cerevisiae</i> mit Plasmiden.....	58
5.5.2.2	Direkte Two-Hybrid Tests.....	58
5.5.2.3	Transformation von <i>S.cerevisiae</i> für Two-Hybrid cDNA- Bibliothek-Screens.....	58
5.5.2.3.1	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	59
5.5.2.4	X-Gal Filterassay.....	59
5.5.2.5	Bait-Verlustkultur.....	60
5.5.3	DNA-Gewinnung, Sequenzierung und Identifikation.....	60
5.5.3.1	Plasmidisolierung aus Hefezellen.....	60
5.5.3.2	Transformation mit Plasmid-Isolaten aus Hefezellen.....	61
5.5.3.3	Identifikation von cDNA-Sequenzen durch computergestützten Datenbankvergleich.....	61
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
<b>6.1</b>	<b>Untersuchungen zur Rolle von Cot in der klassischen zytoplasmatischen Kinasekaskade.....</b>	<b>62</b>
<b>6.2</b>	<b>Die Rolle von Cot in Stresskinasekaskaden.....</b>	<b>64</b>
<b>6.3</b>	<b>Effekte von Cot auf Transformation, Differenzierung und Apoptose.....</b>	<b>70</b>
<b>6.5</b>	<b><i>in vivo</i> Untersuchungen der Effekte von onkogenem Cot .....</b>	<b>74</b>
<b>6.6</b>	<b>Two-Hybrid.....</b>	<b>81</b>
6.6.1	Test der Two-Hybrid Konstrukte auf korrekte Klonierung und Funktionalität im Two-Hybrid Assay.....	81
6.6.2	Screen einer 14,5 Tage Mausembryo cDNA-Bibliothek.....	81
6.6.2.1	Die kleine GTPase Ran und ihre Funktion im Kern-Im- und Export.....	82
6.6.2.2	Untersuchungen zur Ran-Cot-Interaktion in Säugerzellen und Effekte auf die Cot-Aktivität.....	84
6.6.2.3	Das Hitzeschockprotein Hsp84.....	88
6.6.3	Screen einer Jurkat T-Zell-Bibliothek.....	88
6.6.3.1	Maus-Caspase 7 (Mch3).....	89
6.6.3.2	Der Rel/NF- $\kappa$ B Signalweg.....	90
6.6.3.3	Interaktions- und Aktivierungsstudien der Bindung zwischen NF- $\kappa$ B1-p105 und Cot.....	93

<b>7. Diskussion</b> .....	97
7.1 Die Rolle von Cot in verschiedenen Signaltransduktionswegen.....	97
7.2. Transformationspotential von Cot <i>in vivo</i> .....	101
7.3 Identifikation neuer Cot Interaktionspartner mittels des Two-Hybrid Systems.....	103
7.3.1 Die Rolle der Cot/NF- $\kappa$ B-Interaktion im NF- $\kappa$ B-Signalweg.....	103
7.3.1.1 Cot und NF- $\kappa$ B und ihre Wirkung auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose.....	107
7.3.2 Ran als Interaktionspartner von Cot.....	108
<b>8. Abkürzungen</b> .....	111
<b>9. Literatur</b> .....	113
<b>Anhang</b> .....	126
Danksagung.....	126
Lebenslauf.....	127
Verzeichnis eigener Publikationen.....	128
Erklärung.....	129