

**Charakterisierung
der Dlk/CDC5 Interaktion
und
der Genstruktur des *Dlk* Gens**

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Harald Engemann
aus
Salzgitter-Bad
Bonn (Juli) 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtman
2. Referent: Priv. Doz. Dr. Otto Traub

Tag der Promotion: 11. September 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

Für
meine Mutter,
Ute
und
Lena Pauline

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	VI
1.	Einleitung	1
1.1.	Proteinkinasen	1
1.2.	Die DAP Kinase Familie	2
1.2.1.	Die DAP Kinase	4
1.2.2.	Die <u>DAP</u> -like <u>K</u> inase (Dlk)	5
1.2.2.1.	Substrate der Dlk	10
1.2.2.2.	Interaktionspartner der Dlk	10
1.2.2.2.1.	Prostate apoptosis response gene-4 (Par-4)	11
1.2.2.2.2.	Apoptosis antagonizing transcription factor (AATF)	12
1.2.2.2.3.	CDC5	12
1.3.	Zielsetzung der Doktorarbeit	14
2.	Material	15
2.1.	Chemikalien	15
2.2.	Kits	15
2.3.	Allgemeine Stammlösungen und Puffer	15
2.4.	Kultur von Säugerzellen, Insektenzellen, Hefen und Bakterien	15
2.4.1.	Kultur von Säugerzellen	15
2.4.1.1.	Zelllinien	15
2.4.1.2.	Medien für die Kultur von Säugerzellen	16
2.4.2.	Kultur von Insektenzellen	16
2.4.3.	Kultur von Hefestämmen	16
2.4.3.1.	Hefestämme	16
2.4.3.2.	Medien für die Kultur von Hefestämmen	17
2.4.3.3.	Lösungen zur Transformation von Hefezellen	17
2.4.4.	Kultur von Bakterienstämmen	18
2.4.4.1.	Bakterienstämme	18
2.4.4.2.	Medien für Bakterienstämme	18

2.4.4.3.	Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien_____	18
2.5.	Lösungen für die DNA-Aufbereitung und –Analyse_____	19
2.6.	Lösungen zur Protein-Aufbereitung und –Analyse_____	20
2.7.	Biologisches Material_____	21
2.7.1.	Plasmide_____	21
2.7.2.	Cosmide_____	22
2.7.3.	Oligonukleotide_____	22
2.7.4.	Antikörper_____	24
2.7.5.	Rekombinante Proteine_____	24
3.	Methoden_____	25
3.1.	Methoden der Nukleinsäure-Analytik_____	25
3.1.1.	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation_____	25
3.1.2.	DNA Präparation_____	25
3.1.2.1.	Analytische Plasmid Präparation (Minipräparation)_____	25
3.1.2.2.	Präparative Plasmid Präparation (Maxipräparation)_____	25
3.1.2.3.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA_____	25
3.1.2.4.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen_____	26
3.1.2.5.	Reinigung und Konzentrierung von DNA_____	26
3.1.2.6.	Konzentrationsbestimmung von DNA_____	26
3.1.3.	Modifikationen von DNA_____	26
3.1.3.1.	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen_____	26
3.1.3.2.	Auffüllung überhängender DNA-Enden_____	26
3.1.3.3.	Dephosphorylierung/Phosphorylierung von DNA-Fragmenten_____	27
3.1.3.4.	Ligation von DNA-Fragmenten_____	27
3.1.4.	<i>Polymerase-chain-reaction</i> (PCR)_____	27
3.1.5.	Southern-Blot Analysen_____	28
3.1.5.1.	Herstellung radioaktiv markierter Sonden_____	28
3.1.5.2.	Southern-Blot Analysen_____	28
3.1.5.3.	Autoradiographie_____	28
3.1.6.	Präparation von RNA aus Zellkulturen_____	29
3.1.7.	Umschreiben von RNA in cDNA_____	29
3.2.	Methoden der Zellkultur_____	29
3.2.1.	Säugerzellen_____	29

3.2.1.1.	Kultur von Säugerzellen_____	29
3.2.1.2.	Transiente Transfektion von Säugerzellen_____	29
3.2.1.3.	Fluoreszenzmikroskopie von Säugerzellen_____	30
3.2.2.	Insektenzellen_____	30
3.2.2.1.	Kultur von Insektenzellen_____	30
3.2.2.2.	Infizierung von Insektenzellen_____	30
3.3.	Methoden der Protein-Analytik_____	31
3.3.1.	Präparation von Zellextrakten_____	31
3.3.1.1.	Zellextrakte für Luciferase Analysen_____	31
3.3.1.2.	Zellextrakte für Dual-Luciferase Analysen_____	31
3.3.1.3.	Zellextrakte von Sf9 Insektenzellen_____	31
3.3.2.	Proteinbestimmung nach Bradford_____	31
3.3.3.	Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen aus Sf9-Zellen_____	31
3.3.4.	<i>In-vitro</i> Transkription und Translation_____	32
3.3.5.	<i>In-vitro</i> Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen_____	32
3.3.6.	<i>In-vitro</i> Nachweis der Substratspezifität von Kinasen_____	32
3.3.7.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen_____	32
3.3.7.1.	Vorbereitung der Proben_____	32
3.3.7.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)_____	32
3.3.7.3.	Fluorographie_____	33
3.3.7.4.	Coomassie-Färbung_____	33
3.3.8.	Das <i>Yeast-Two-Hybrid-System</i> _____	33
3.3.8.1.	Transformation von Hefen_____	33
4.	Ergebnisse _____	34
4.1.	Analyse der Dlk und CDC5 Interaktionen_____	34
4.1.1.	Isolierung der Ratten CDC5 cDNA_____	34
4.1.2.	<i>In-Vitro</i> Interaktionsanalysen zwischen Dlk und CDC5_____	36
4.1.3.	Kartierung der Interaktionsdomänen_____	36
4.1.4.1.	Expression von CDC5 im Baculovirus System_____	39
4.1.4.2.	<i>In-Vitro</i> Phosphorylierungsanalysen von CDC5_____	40
4.1.5.	RT-PCR Expressionsanalysen_____	42
4.1.6.	Subzelluläre Lokalisation_____	43
4.1.7.	Analyse des Kern-Lokalisations-Signals von CDC5_____	44

4.1.8.	Analyse der Dimerisierungsdomäne von CDC5_____	46
4.1.9.	Kolokalisationsanalysen mit Kernproteinen (PML, PSP-1)_____	48
4.1.10.	Kolokalisationsanalysen mit Spleißfaktoren_____	49
4.1.11.	<i>In-Vitro</i> Phosphorylierung von SC35 und ASF/SF2_____	52
4.1.12.	Caspase-2 Mini-Gen Spleiß-Analysen_____	52
4.2.	Genomische Struktur des <i>Dlk</i> Gens_____	55
4.2.1.	Isolierung des Promotors des <i>Dlk</i> Gens in der Ratte_____	55
4.2.2.	Promotor Analysen des <i>Dlk</i> Gens_____	57
4.2.3.	Vergleichende Genstruktur-Analysen der <i>Dlk</i> Homologen_____	60
4.2.4.	Vergleichende Genstruktur-Analysen in der <i>DAPK</i> Familie_____	64
4.2.5.	Generierung einer induzierbaren <i>Dlk</i> knock-out Maus_____	65
4.2.5.1.	Klonierungsstrategie des <i>Dlk</i> /ZIP-Kinase Targetingvektors_____	65
4.2.5.2.	Überprüfung des <i>Dlk</i> /ZIP-Kinase Targetingvektors_____	75
4.2.5.3.	Homologe Rekombination und knock-out des <i>Dlk</i> Gens_____	76
4.2.5.4.	Isolierung des murinen <i>Dlk</i> Gens_____	80
5.	Diskussion _____	82
5.1.	CDC5 als neuer Interaktionspartner der Dlk_____	82
5.1.1.	Interaktionen zwischen CDC5 und Dlk_____	82
5.1.2.	Kartierung der Interaktionsdomänen_____	83
5.1.3.	CDC5 ist kein Substrat der Dlk_____	84
5.1.4.	Lokalisation von CDC5_____	84
5.1.5.	Homodimerisierung von CDC5_____	86
5.1.6.	<i>In-vivo</i> Interaktionen zwischen der Dlk und CDC5_____	86
5.1.7.	Biologische und biochemische Funktion von CDC5_____	86
5.1.8.	Biologische Funktion der Dlk_____	91
5.1.9 .	Biologische Funktion der Dlk/CDC5 Interaktion_____	93
5.2.	Genomische Struktur des <i>Dlk</i> -Gens_____	94
5.2.1.	Promotor Analysen des <i>Dlk</i> Gens_____	95
5.2.2.	Vergleichende Genstruktur-Analysen der <i>Dlk</i> Homologen_____	96

5.3.	Ausblick_____	98
5.3.1.	Dlk/CDC5 Interaktion_____	98
5.3.2.	<i>Dlk</i> Promotoranalysen und <i>Dlk</i> knock-out in der Maus_____	99
6.	Zusammenfassung_____	101
7.	Literaturverzeichnis_____	102
8.	Anhang_____	109
	Veröffentlichungen, Posterpräsentationen, Vorträge_____	109
	Danksagung_____	110
	Erklärung_____	111

II. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
AATF	<i>Apoptosis-antagonizing transcription factor</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
Abb.	Abbildung	N-	amino-
APS	Ammoniumpersulfat	NEM	N-Ethylmaleinimid
AS	Aminosäure	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>	NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	Noc	Nocodazol
bidest.	bidestilliert	NP-40	Nonidet P-40
bp	Basenpaare	OD	Optische Dichte
BSA	Bovines Serum-Albumin	PAA	Polyacrylamid
bzw.	beziehungsweise	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
C	Cytosin	Par-4	<i>Prostate apoptosis response 4 gene-4</i>
C-	carboxy-	PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
CDC5	<i>Cell division cycle 5</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
cDNA	copy DNA, komplementäre DNA	PEG	Polyethylenglykol
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> , alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm	Pen/Strep	Penicillin /Streptomycin
Ck2	<i>Casein kinase 2</i>	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentration
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid	PLP	Phosphat-Lysispuffer
DAP	<i>Death associated protein</i>	PML	<i>promyelocytic leukemia</i>
DAPK	<i>Death associated protein kinase</i>	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Dlk	<i>DAP-like kinase</i>	Rb	Retinoblastomprotein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	RT	Raumtemperatur
dGTP	Desoxyguanintriphosphat	RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Ser	Serin
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	SR-Protein	<i>Serine-arginine protein</i>
DTE	Dithioerythritol	SV40	<i>Simian Virus 40</i>
DTT	Dithiothreitol	T	Thymin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	Thr	Threonin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	TAE	Tris-Acetat-EDTA
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat	TE	Tris-EDTA
eEF-2	<i>eukaryotic translation elongation factor 2</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ES	Embryonale Stammzellen	T _m	mittlere Schmelztemperatur
et al.	et alteri	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat	U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität) über Nacht
FCS	fötales Kälberserum	üN	Umdrehungen pro Minute
G	Guanin	Upm	Ultraviolett
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	UV	Volumen pro Volumen
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>	v/v	vergleiche
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	vgl.	Wiederholung(en)
kb	Kilobasenpaare	Wdh.	Masse pro Volumen
kDa	Kilodalton	w/v	Wildtyp
LB	Luria-Bertani	wt	
LT	<i>Large T-Antigen</i> , großes T-Antigen von SV40		
LZ	Leuzin-Zipper		
mind.	mindestens		
MLC	<i>myosin light chain</i>		
mod.	modifiziert		

Die gängigen SI Einheiten sowie Symbole für chemische Elemente wurden in dieses Abkürzungsverzeichnis nicht mit aufgenommen, da sie als hinlänglich gebräuchlich und bekannt erachtet wurden.

1. Einleitung

1.1. Proteinkinasen

Proteinkinasen kontrollieren durch die spezifische Modifikation ihrer Substrate viele zelluläre Prozesse wie die Signaltransduktion, den Metabolismus, die Transkription, den Verlauf des Zellzyklus, die Organisation des Cytoskeletts und die Zelladhäsion, die Apoptose und die Differenzierung. Die Protein Phosphorylierung durch membran-durchspannende Rezeptor-Kinasen spielt auch eine bedeutende Rolle in der interzellulären Kommunikation während des Zellwachstums und der Differenzierung, der Homöostase und in der Wirkungsweise des Nerven- und Immunsystems. Die Proteinkinasen gehören zu den größten Genfamilien in Eukaryonten. Die vollständige Entschlüsselung des humanen Genoms erlaubte vor kurzem die Identifizierung von 518 humanen Proteinkinasen, die somit über 1,7 % aller humanen Gene repräsentieren [1].

Man unterscheidet Proteinkinasen, die in der Plasmamembran verankert sind (z.B. die Rezeptortyrosinkinasen), Proteinkinasen, die überwiegend im Zytoplasma und solche, die im Zellkern lokalisiert sind. Die Klassifikation der Proteinkinasen kann nach ihrer Akzeptoraminosäure in die Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen erfolgen. Daneben gibt es noch Histidin/Arginin/Lysin-, Cystein- und Aspartat/Glutamat-Kinasen, welche aber in Eukaryonten eine untergeordnete Rolle spielen, während in Prokaryoten die Phosphorylierung an Histidinresten überwiegt. Als Phosphatgruppendonor dient meistens ATP und nur in seltenen Fällen GTP.

Die Klassifikation der Proteinkinasen lässt sich in einem "Kinomstammbaum" darstellen [1]. Man ordnet die Proteinkinasen in folgende Familien ein: Die AGC-Familie (beinhaltet die PKA, PKG und PKC-Kinasefamilie), die CAMK-Familie (Calcium/Calmodulin abhängigen Proteinkinasen), die CK1-Familie (Casein Kinase 1-Familie), die CMGC-Familie (beinhaltet CDK-, MAPK-, GSK3-, CLK-Kinasefamilie), die STE-Familie (beinhaltet die Homologen der Hefe Sterile 7,11 und 20 Kinasefamilien), die TK-Familie (Tyrosin-Kinasen) und die TKL-Familie (Tyrosin-Kinase-like Kinasen).

Trotz aller Unterschiede bezüglich Substratspezifität, Regulation und Aktivierung zeigen die eukaryotischen Kinasen einen hohen Homologiegrad im katalytischen Kern [3;4]. Diese Domäne, die je nach Proteinkinase aus ca. 250 bis 300 Aminosäuren besteht, bindet Substrat

und Cosubstrat und katalysiert die Phosphorylierungsreaktion. Bestimmte Sequenzunterschiede in diesem Bereich sind zum Teil für die Substratspezifität verantwortlich [3;5]. Aufgrund einer vergleichenden Analyse der Aminosäuresequenzen bekannter Proteinkinasen wird der katalytische Kern in 12 Subdomänen gegliedert, die durch weniger konservierte Sequenzen getrennt werden [6]. Diese enthalten abhängig von der jeweiligen Proteinkinasespezies Deletionen oder Insertionen. Außerhalb des katalytischen Kerns schließen sich oft regulatorische Domänen an, die N- oder C-terminal liegen können. Durch diese Bereiche, die innerhalb einer Subfamilie Ähnlichkeiten in der Sequenz aufweisen können, aber im Vergleich mit anderen Subfamilien keine Homologie zeigen, werden die individuellen Eigenschaften von Proteinkinasen begründet. Diese Regionen sorgen zusammen mit bestimmten Resten des katalytischen Kerns für die Substratspezifität und für die Interaktion mit allosterischen Regulatoren (z.B. second messengers) oder Regulatorproteinen (z.B. Calmodulin oder Cycline). Darüber hinaus können sie durch die Assoziation mit bestimmten Zellkomponenten (z.B. Membranen, Zellgerüst) oder über in der Sequenz enthaltene Kerntransportsignale für die subzelluläre Lokalisation sorgen. Ebenfalls bekannt ist, dass Teile dieser Bereiche Pseudosubstratsequenzen darstellen können, wodurch eine Autoinhibition der jeweiligen Proteinkinase bewirkt werden kann [7].

Eine Untergruppe der CAMK Gruppe des Kinomstammbaumes bildet die Familie der DAP Kinasen (Review [1;8;9]). Auf diese Subfamilie wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.2. Die DAP Kinase Familie

Die DAP-Kinase Familie besteht aus den folgenden 5 Mitgliedern: Die DAPK (**D**eath-**a**ssociated **p**rotein **k**inase), die DRP-1/DAPK2 (**D**AP kinase-**r**elated **p**rotein 1/**D**eath-**a**ssociated **p**rotein **k**inase 2), die Dlk/ZIP Kinase (**D**AP like **k**inase/**Z**ipper-**i**nteracting **P**rotein kinase), sowie die DRAK1 und DRAK2 (**D**AP kinase-**r**elated **a**poptosis-inducing protein kinase 1 und 2).

Alle 5 Mitglieder der DAP-Kinase Familie sind nach Überexpression in kultivierten Zellen imstande Apoptose zu induzieren, wobei diese apoptotische Wirkung von der enzymatischen Aktivität dieser Kinasen abhängt. Alle 5 Kinasen werden ubiquitär in zahlreichen Geweben exprimiert (Review [8;9]).

Die Sequenzhomologie der 5 Kinasen beschränkt sich weitgehend auf die N-terminal gelegenen Kinasedomänen. Die Kinasedomänen der Dlk und der DRP-1/DAPK2 zeigen dabei mit 83,3 % bzw. 79,8 % eine sehr hohe Sequenzhomologie gegenüber der DAPK. Im Gegensatz dazu sind DRAK1 und DRAK2 entfernter verwandt mit der DAPK mit einer Sequenzhomologie von nur 48,5 % bzw. 51,9 %. Die nachfolgenden C-terminalen Regionen aller 5 Kinasen sind sehr unterschiedlich und sind verantwortlich für die regulatorischen Funktionen und verschiedenen Interaktionen jeder einzelnen Kinase (Abb. 1).

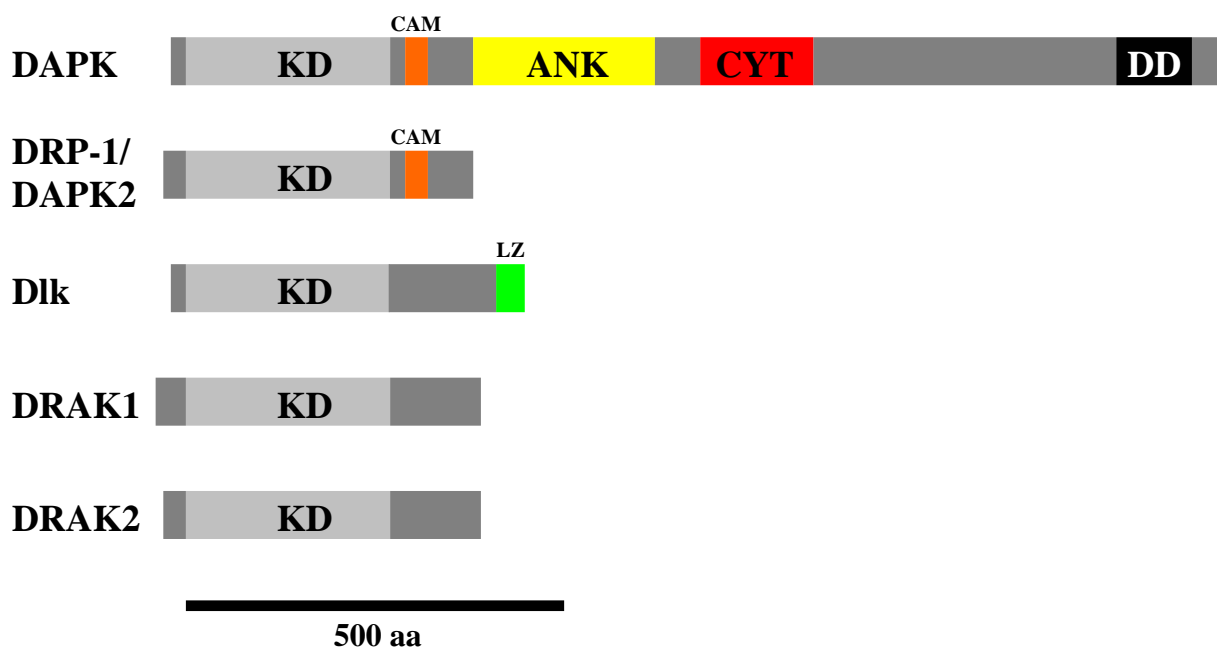


Abb. 1. Schematische Darstellung und struktureller Aufbau der Mitglieder der DAP Kinase Familie: DAP Kinase (DAPK), DAP kinase related protein 1/DAP kinase 2 (DRP-1/DAPK2), DAP like kinase (Dlk), DAP kinase related apoptosis inducing protein kinase 1 und 2 (DRAK1 und DRAK2). KD (hellgrau) kennzeichnet die hoch konservierte Kinasedomäne aller fünf Kinasen, und CAM (orange) zeigt die Ca²⁺/Calmodulin bindenden Regionen der DAPK1 und DRP-1/DAPK2. ANK (gelb) und CYT (rot) sind die Ankyrin wiederholende Region bzw. die Zytoskelett-bindende Region der DAPK. DD (schwarz) bezeichnet die Todesdomäne der DAPK. Der C-Terminal gelegene Leuzin-Zipper der Dlk ist mit LZ gekennzeichnet.

Die DAP-Kinase Familienmitglieder zeigen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen. Die Dlk ist ein Kernprotein [10] und kolokalisiert mit so genannten „PML bodies“ [11], wohingegen DRAK1 und DRAK2 Kernproteine ohne spezifische Lokalisation sind [12]. Im Gegensatz dazu ist die DAPK stark assoziiert mit den Aktin Filamenten des Cytoskeletts, während DRP-1/DAPK2 ein lösliches cytoplasmatisches Protein ist [13;14].

1.2.1. Die Death-associated protein kinase (DAPK)

Die DAPK ist ein Protein von 160 kD und besteht aus der N-terminalen Kinase Domäne und dem C-terminalen Bereich. Dieser C-terminale Bereich enthält eine Ca^{2+} /Calmodulin Bindungsregion, eine Ankyrin Region bestehend aus 8 Wiederholungen, eine für die Interaktion mit den Aktin Filamenten des Cytoskeletts verantwortliche Region und eine Todesdomäne [15].

Die DAPK ist eine Apoptose fördernde Ser/Thr Kinase, die von einer Vielzahl von apoptotischen Signalen einschließlich $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, Fas, aktiviertes c-Myc, E2F-1 oder durch Abtrennung der Zelle von der extrazellulären Matrix (Anoikis) aktiviert wird [15-19]. Dabei scheint die DAPK in der apoptotischen Signalkaskade unmittelbar den p19ARF/p53-abhängigen apoptotischen Kontrollpunkt zu aktivieren [19]. Die Zelltod fördernden Effekte der DAPK sind abhängig von deren katalytischer Aktivität, der korrekten intrazellulären Lokalisation und der Gegenwart der Todesdomäne [15;17]. Die DAPK phosphoryliert MLC *in vitro* und *in vivo*. Diese Phosphorylierung findet vorzugsweise an Ser19 statt und wird durch Ca^{2+} und Calmodulin stimuliert [20]. Die C-terminal gelegene Todesdomäne der DAPK wird für die Induktion der Apoptose benötigt [17]. Spezifische Bindungspartner der Todesdomäne wurden bis jetzt nicht identifiziert, aber es konnte gezeigt werden, dass alleine die Überexpression der Todesdomäne Zellen in einer dominant negativen Art und Weise vor der Apoptose schützt, die durch $\text{TNF-}\alpha$, den Fas Liganden oder durch die Überexpression von FADD/MORT1 induziert wurde [17]. Die DAPK scheint deshalb eine wichtige Rolle im Signalweg der Todesrezeptor vermittelten Apoptose zu spielen. Des Weiteren wird die durch eine konstitutiv aktive Mutante der DAPK induzierte Apoptose durch Bcl2 inhibiert [17]. Dies suggeriert, dass die DAPK auch in die durch die Freisetzung von proapoptischen Faktoren der Mitochondrien aktivierten inneren apoptotischen Signalwege involviert ist.

Zusätzlich zu der Todesdomäne enthält die C-terminale Region der DAPK einen Serinreichen Bereich, der eine autoinhibitorische Funktion ausübt. Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch intramolekulare Interaktionen [21]. So konnte gezeigt werden, dass die Autophosphorylierung der DAPK ihre apoptotische Wirkung der DAPK in wachsenden Zellen unterdrückt. Diese Autophosphorylierung betrifft Ser308 innerhalb der Ca^{2+} /Calmodulin Bindungsregion und verringert die Affinität zu Ca^{2+} /Calmodulin. Ebenso korreliert die Autophosphorylierung umgekehrt mit der Substrat-Phosphorylierung. Durch die Dephosphorylierung wird die Inhibition aufgehoben, was zur Induktion der Apoptose führt

[22]. Es wird angenommen, dass die DAPK auf den Wechsel der cytosolische Ca^{2+} -Konzentration reagiert, der während der Apoptose stattfindet [23;24].

Die DAPK wird zumindest zum Teil auf der transkriptionellen Ebene reguliert. So konnte gezeigt werden, dass die Transkription der DAPK während der Induktion der Apoptose mit $\text{IFN-}\gamma$ ansteigt [16]. Ebenso deutet eine erhöhte Transkriptionsrate der DAPK während der transienten Vorderhirn-Ischämie auf eine Verbindung der DAPK mit dem neuronalem Zelltod hin [25]. Des weitern konnte gezeigt werden, dass Onkogene wie überexprimiertes c-Myc und E2F-1 den DAPK Proteinpegel in murinen embryonalen Fibroblasten hochregulieren [19]. In vielen Tumorzellen ist die Expression der DAPK unterdrückt [26]. In einigen von diesen Zelllinien ist eine anomale DNA Methylierung im Promotorbereich für die Minderung der Genexpression verantwortlich [27].

1.2.2. Die DAP-like Kinase (Dlk)

Die Dlk wurde isoliert bei dem Versuch neue Kinasen zu identifizieren, die an der Wachstumskontrolle oder der SV40 „large“ T vermittelten Transformation beteiligt sind. Hintergrund ist die Induktion bzw. Aktivierung von Proteinkinasen durch SV40 „large“ T Antigen, die ihrerseits wiederum den Phosphorylierungsstatus von Rb, dem wichtigsten negativen Regulator am Restriktionspunkt des Zellzyklus, oder p53, einem Induktor der Apoptose, kontrollieren [28-31].

Unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden, abgeleitet aus den konservierten und für Serin/Threonin spezifischen Subdomänen VI und VIII oder X, wurde mit Hilfe der RT-PCR und einer cDNA Bibliothek aus der Ratte die Dlk cDNA von 1514 bp mit einem offenem Leseraster von 448 aa isoliert, die in „Northern Blot“ Analysen einem Gesamttranskript von 1700 nt entsprachen [10]. Zeitgleich wurde das murine Homologe der Dlk, ZIP Kinase, in einem Hefe Zwei-Hybrid-System als Interaktionspartner des Leuzinzippers des Transkriptionsfaktors ATF4 identifiziert [32]. Der Einfachheit halber wird im Folgenden nur noch die Bezeichnung Dlk anstatt Dlk/ZIP Kinase verwendet.

Die Dlk hat eine molekulare Masse von 52 kDa und besteht aus einer N-terminal gelegenen Kinasedomäne und einer Arginin-reichen (22 %) C-terminalen Domäne, die ein NLS und einen C-terminal gelegenen Leuzin-Zipper enthält (Abb. 2). Die Dlk der Ratte ist

hochkonserviert zu den murinen (99,7 %) und humanen (86 %) Orthologen. Dies weist darauf hin, dass die Dlk eine wichtige Funktion ausübt.



Abb. 2. Schematische Darstellung der DAP-like kinase (Dlk) mit den strukturellen Motiven. Die Dlk enthält eine Kinasedomäne (hellgrau) im N-terminalen Bereich (1-275 aa) und eine Arginin-reiche C-terminale Domäne (276-448 aa) mit einem Leuzin-Zipper (LZ, grün) an dessen Ende. Des Weiteren besitzt die Dlk ein Kernlokalisationssignal (NLS, schwarz).

In „Northern Blot“ Analysen konnte gezeigt werden, dass die Dlk mit einer mRNA von 1.7 kb ubiquitär im Gewebe des Herzens, Gehirns, Skelettmuskels, Hodens sowie der Milz, Lunge, Leber und Niere exprimiert wird [10]. Eine UV Bestrahlung von normalen Zellen in einer die Apoptose induzierenden Dosis führte zu einer Reduzierung der Transkription der Dlk [10].

Als GFP-Fusionsprotein zeigt die Dlk eine punktuelle Verteilung in sogenannten „speckles“ im Zellkern [10]. Die Expression von C-Terminal verkürzten Deletionsmutanten der Dlk ergab, dass die C-Terminal gelegene NLS der Dlk notwendig und ausreichend für den Kerntransport ist [11]. Für die punktuelle Verteilung im Zellkern, welche vermutlich eine Assoziation mit bestimmten Kernstrukturen oder –komplexen repräsentiert, sind der Leuzin-Zipper sowie die Kinaseaktivität der Dlk notwendig, da entsprechende Mutanten (Dlk Δ C1 und Dlk K42A) eine diffuse Verteilung im Zellkern aufweisen [11].

Bis heute wurde eine Beteiligung der Dlk an der Regulation von 4 zellulären Prozessen identifiziert. Zu diesen Prozessen gehören a) die Apoptose, b) die Mitose (speziell die Cytokinese), c) die Transkription und d) die Zell-Polarität und –Motilität.

a) Apoptose

Die Überexpression des GFP-Dlk-Fusionsproteins zeigte weder in REF52.2 Zellen noch in NIH 3T3 Zellen Symptome der Apoptose [11]. Dagegen wurde von Kawai et al. mit FLAG-

Epitop gekoppelter muriner ZIP-Kinase eine Apoptoseinduktion beobachtet [32]. Die Ursachen für diese Unterschiede sind bis heute nicht aufgeklärt.

Die Dlk kann jedoch unter drei Bedingungen die Apoptose auslösen, die alle mit einer Umverteilung der Dlk aus dem Kern in das Cytoplasma verbunden sind.

1. Die C-terminale Verkürzung der Dlk um 110 AS (Deletionsmutante Dlk Δ C2), was die NLS und den Leuzin-Zipper beinhaltet, führte zu einer Umverteilung ins Cytoplasma, insbesondere zu einer Assoziation mit Aktinfilamenten, einhergehend mit der Induktion der Apoptose [11]. Eine Relokalisation dieser Deletionsmutante in den Zellkern (durch Anfügen der heterologen NLS des SV40 T Antigens) hob auch die apoptotische Aktivität auf [11].

2. Die Koexpression der Dlk und des proapoptotischen Par-4 führt ebenfalls zu einer Relokalisation der Dlk vom Nukleus ins Cytoplasma. Es kommt zu einer Kolokalisation von Dlk und Par-4 an den Spannungsfasern des Zytoskelettes, einhergehend mit einer dramatischen Reorganisation des Zytoskeletts und morphologischen Symptomen der Apoptose analog wie bei der Deletionsmutante Dlk Δ C2 [33].

3. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bei einer Koexpression der DAPK und der Dlk ihre katalytischen Domänen interagieren [34]. Dabei phosphoryliert die DAPK den extrakatalytischen Bereich der Dlk an 6 verschiedenen Aminosäureresten. Diese Hyperphosphorylierung der Dlk führt ebenso zur Relokalisation der Dlk in das Cytoplasma, einhergehend mit einer Trimerisierung und der Induktion der Apoptose [34].

Der mögliche Mechanismus der Apoptoseinduktion wurde durch die Expression der Dlk in humanen D283 Medullablastomzellen näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Apoptoseinduktion der Deletionsmutante Dlk Δ C2 a) in der frühen Phase Caspase unabhängig ist, b) über die Cytochrom C Freisetzung der Mitochondrien erfolgt und c) durch das antiapoptotisch wirkende Bcl-xL inhibiert werden kann [8;35].

Als GFP-Fusionsprotein zeigt die Dlk eine partielle Kolokalisation mit den sogenannten PML-„bodies“. Detailliertere Untersuchungen zeigten kürzlich, dass die Dlk in den PML-„bodies“ mit dem proapoptotischen Protein Daxx kolokalisiert und interagiert. Unter dem Einfluss von apoptotischen Stimuli wie As₂O₃ und IFN- γ assoziiert die Dlk verstärkt mit

diesen Strukturen. Die Assoziation von Dlk und Daxx wird durch die Koexpression von Par-4 noch verstärkt. Die durch die siRNA-Technik verminderte Expression von Dlk, Daxx oder Par-4 führte zu einer verminderten Aktivierung der Caspasen und der einhergehenden Apoptose. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Dlk mit ihren Interaktionspartnern Daxx und Par-4 einen neuen nuklearen Signalweg der Apoptose vermittelt [36].

b) Mitose

Durch die Erzeugung einer kontinuierlich GFP-Dlk exprimierenden MCF-7 Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die Dlk nicht in erster Linie in die Apoptoseinduktion, sondern in mitotische Prozesse involviert ist. Während der Interphase zeigt die Dlk eine diffuse wie auch punktuelle Verteilung im Zellkern. Im Gegensatz dazu ist die Dlk während der Mitose stark assoziiert mit den Centrosomen, den Centromeren und dem kontraktilen Ring, aber nicht mit der Mitosespindel [37]. Die Assoziation der Dlk mit den Centrosomen besteht während des gesamten Zellzyklus, wird aber während der Mitose bedeutend verstärkt, wobei das GFP-Dlk-Signal mit dem von γ -Tubulin korreliert. Die Koimmunopräzipitation der Dlk mit γ -Tubulin deutet auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine bzw. auf die gemeinsame Zugehörigkeit zu einem Proteinkomplex hin.

Die Kolokalisation mit den Centromeren beschränkt sich von der Prophase bis zu der frühen Anaphase und korreliert mit einer spezifischen Phosphorylierung des Histons H3 an Position Thr11 [38]. Bisher war nur die Phosphorylierung von H3 an Position Ser10 beschrieben, welche für den Ablauf der Mitose eine bedeutende Rolle zu spielen scheint. In Säugetierzellen initiiert die Phosphorylierung von H3 an Ser10 in der pericentromeren Region und breitet sich dann über die ganzen Chromosomenarme aus [39]. Ser10-phosphoryliertes H3 scheint jedoch von den Centromeren ausgeschlossen zu sein, indem es dort durch das verwandte CENP-A ersetzt wird [40-42]. Möglicherweise ist die Centromer spezifische Phosphorylierung an Thr11 durch die Dlk eine weitere Möglichkeit der Zelle, centromeres Chromatin für anschließende mitotische Abläufe zu markieren [37].

Während der Cytokinese assoziiert die Dlk mit dem kontraktilen Aktin-Myosin Ring und kolokalisiert mit an Ser19-phosphoryliertem MLC, einem *in-vitro* Substrat der Dlk [10;43], was auf eine Beteiligung an der Cytokinese hinweist. Diese Annahme wird unterstützt durch weitere Analysen, die zeigten, dass die um 173 AS C-Terminal verkürzte Deletionsmutante

Dlk Δ C3 mehrkernige Zellen generiert. Diese Befunde deuten auf einen Einfluss der Dlk auf die Regulation oder Koordination der Mitose und Cytokinese hin [37].

c) Transkription

Eine weitere Funktion von nuklearem Dlk scheint die Regulation der Transkription zu sein. Diese Hypothese wird gefestigt durch die Interaktionen der Dlk mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (ATF4, AATF und STAT3) und die partielle Kolokalisation mit PML-*bodies*. Ein direkter Einfluss auf die Transkription konnte bisher jedoch nur für STAT3 gezeigt werden. STAT3 wird aktiviert durch Cytokine und Wachstumsfaktoren und besitzt eine wichtige Funktion während des Zellwachstums, der Apoptose sowie der Zelltransformation und ist konstitutiv aktiv in verschiedenen Tumorzellen. Es wird angenommen, dass die STAT3/Dlk Interaktion bzw. die Phosphorylierung von STAT3 (an Ser727) durch die Dlk die Transkriptionsaktivität von STAT3 moduliert [44].

Die Identität der punktuellen Strukturen, mit denen die Dlk assoziiert, ist bislang nicht geklärt. Diese sogenannten „*speckles*“ ähneln dem Verteilungsmuster von Replikations-, Transkriptions- oder Spleiß-Zentren [10]. Allerdings konnte bisher keine Kolokalisation der Dlk mit Replikationsfaktoren oder RNA-Polymerase II nachgewiesen werden. Dagegen zeigte sich eine partielle Kolokalisation mit den PML-„*bodies*“ [11], die in die Regulation der Transkription und der Apoptose involviert sind [45-47].

d) die Zell-Polarität und -Motilität

Eine weitere Funktion der Dlk scheint die Regulation der Zell-Polarität und -Motilität zu sein. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Dlk überwiegend für Phosphorylierung von MLC verantwortlich ist. Ein Knock-out von endogenem Dlk mittels der siRNA-Technik resultierte in einem Defekt des Cytoskeletts und somit in einem Defekt der Zellpolarität, sowie einem Verlust der Migrationseffizienz der Zelle. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von MLC durch die Dlk zu der Bildung von stabilen Myosin Filament Formationen in den sogenannten *stress fiber* Strukturen führt. Somit könnte die Dlk durch die Phosphorylierung von MLC die dynamische Reorganisation von Myosinstrukturen fördern und damit die Zellpolarität beeinflussen und die Zellmotilität unterstützen [48]

1.2.2.1. Substrate der Dlk

Neben MLC, STAT3 und H3 (s.o.) wurden auch die „Core“-Histone H2A und H4 als exogene Substrate in *in-vitro* Kinaseanalysen identifiziert [10].

Weitere Substrate der Dlk wurden mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid* Systems isoliert, allerdings sind nicht alle Interaktionspartner der Dlk zugleich Substrate der Dlk. So phosphoryliert die Dlk *in-vitro* bisher nur den Interaktionspartner Par-4 [33].

Mit Hilfe eines Phagen-Peptid-Displays wurden kürzlich auch p21^{waf1} und Mdm2 als weitere Substrate der Dlk identifiziert [49]. p21^{waf1} ist ein Genprodukt, das nach DNA-Schäden durch p53 induziert wird und einen Wachstumsarrest ausübt [50]. Die Dlk phosphoryliert p21^{WAF1} an Thr145 *in-vitro* [49]. Die Phosphorylierung von Mdm2 durch die Dlk konnte allerdings nur an Peptiden, aber nicht am Gesamtprotein gezeigt werden.

Aufgrund der bekannten Substrate (H3, MLC, p21^{WAF1}) konnte mit Hilfe von Sequenzvergleichen der unmittelbaren Umgebung der jeweiligen Phosphorylierungsstelle eine Konsensussequenz für die Dlk erstellt werden. Sie lautet **Rxx(S/T)y** (x = beliebig; Y = nicht Prolin) und ist ebenso als Motiv in Par-4 vorhanden (K.H. Scheidtmann, unpublizierte Ergebnisse). Bestimmte Aminosäurereste, die diese Phosphoakzeptorstelle umgeben, können allerdings die Spezifität der Dlk beträchtlich beeinflussen [49]. Eine schematische Übersicht der Substrate sowie der Interaktionspartner der Dlk zeigt Abb. 3.

1.2.2.2. Interaktionspartner der Dlk

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern der Dlk, die möglicherweise als Regulatoren oder als Zielproteine agieren, wurde das *Yeast-Two-Hybrid* System verwendet. Die auf diese Weise isolierten Interaktionspartner der Dlk sind Par-4 [33], sowie die Transkriptionsfaktoren ATF4 [32;33], AATF [51] und CDC5 (Dissertation Grit Page, 2000). Weitere Interaktionspartner der Dlk sind MYPT1 (Myosin phosphatase targeting subunit 1)[52;53], p21^{WAF1} [49], Daxx [36] und STAT3 [44] (siehe oben und Abb. 3).

1.2.2.2.1. Prostate apoptosis response gene-4 (Par-4)

Par-4 wurde ursprünglich als ein nach der Induktion der Apoptose induziertes *Response*-Gen in Prostatakarzinom-Zellen identifiziert [54]. Par-4 aus der Ratte umfasst 332 aa, die ein Molekulargewicht von 38 kDa ergeben. Par-4 besitzt zwei NLS, zeigt aber dennoch in den meisten Zelltypen und Geweben eine cytoplasmatische Verteilung [55-57].

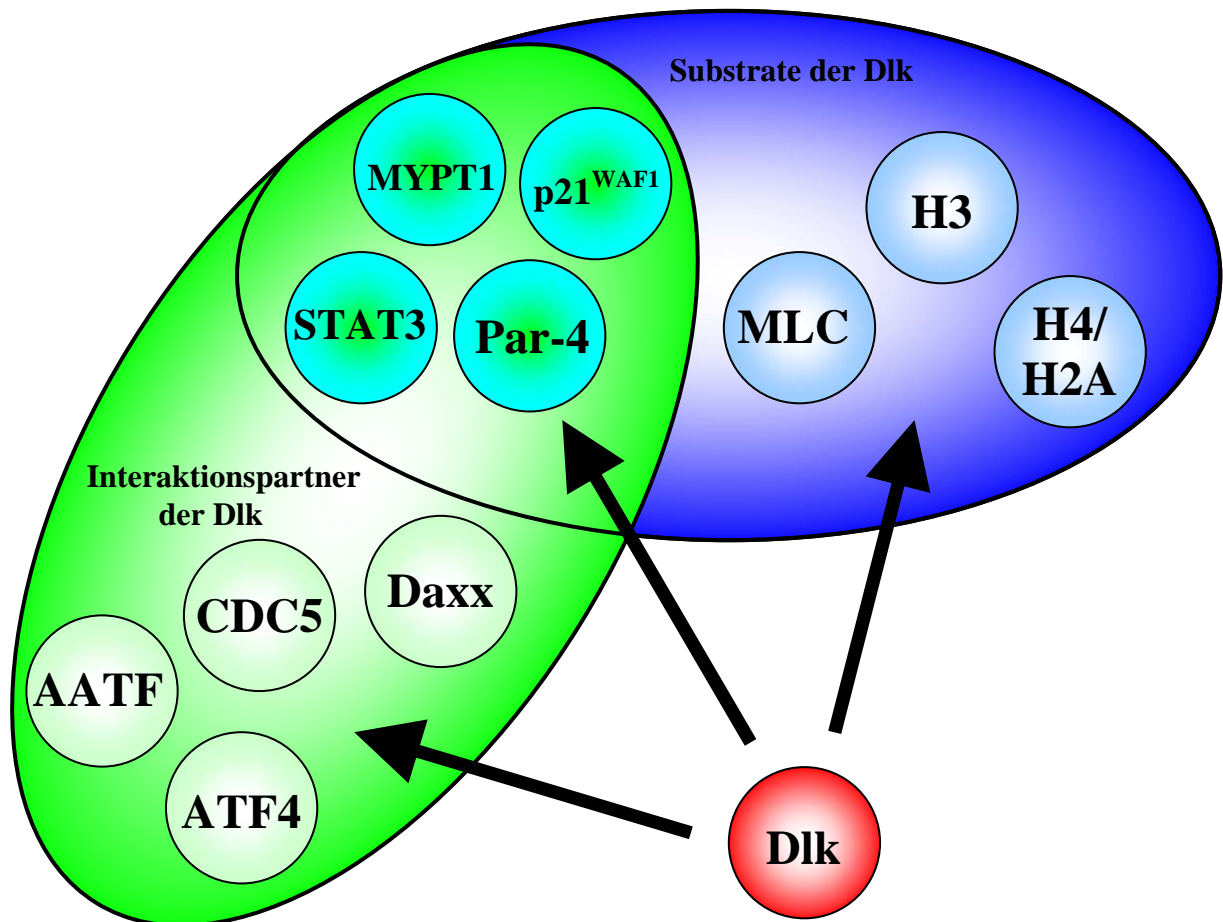


Abb. 3. Schematische Darstellung der Interaktionspartner und Substrate der Dlk

In der blauen Ellipse sind die *in-vitro* Substrate MLC, H2A, H4 und H3 der Dlk dargestellt. Die grüne Ellipse zeigt die *in-vitro* Interaktionspartner AATF, ATF4, CDC5 und das proapoptotische Daxx. Die Schnittmenge beider Ellipsen stellt die Proteine dar, die zugleich Interaktionspartner und Substrat der Dlk sind. Es handelt sich dabei um das p53 *response* Genprodukt p21^{WAF1}, das mit Hilfe des Phagen-Peptid-Displays identifiziert wurde, sowie das proapoptotische Par-4, den Transkriptionsfaktor STAT3 und MYPT1.

Die Dlk interagiert durch eine Arginin-reiche Region zwischen den Aminosäuren 337 und 417 mit dem Leuzin-Zipper von Par-4 und phosphoryliert Par-4 *in-vitro* [33]. Die Koexpression von Dlk und Par-4 führt zu einer Relokalisation der Dlk vom Nukleus ins Cytoplasma, einhergehend mit morphologischen Symptomen der Apoptose [33]. Neben der Dlk existieren der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor WT1 [58] und die PKC Isoformen λ/ι und ζ [59] sowie AATF [51;60] als Par-4 Interaktionspartner. Par-4 induziert

von sich aus keine Apoptose sondern sensibilisiert Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli. Diese Wirkung kommt durch eine Herunter-Regulation von Bcl-2 (über die Hemmung von WT1) und von NF κ B (über die Hemmung von PKC ζ) zustande [58;59;61].

1.2.2.2.2. Apoptosis antagonizing transcription factor (AATF)

AATF ist ein nukleares Phosphoprotein von 523 Aminosäureresten, welches ubiquitär exprimiert wird. Am N-Terminus besitzt AATF eine extrem saure Domäne, die in GAL4-basierenden Reporter-Gen-Analysen eine Transaktivierungaktivität zeigt [51]. AATF wird nicht durch die Dlk phosphoryliert und kolokalisiert mit dieser nicht in „Speckles“. Interessanterweise kann AATF jedoch den apoptotischen Effekt von Dlk Δ C2 und der Koexpression von Dlk und Par-4 inhibieren [51], sowie auch mit Par-4 direkt interagieren [60].

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von der Hefe bis zum Menschen vermutet man, dass AATF eine wichtige Funktion ausübt. So zeigte sich eine Knock-Out Mutante des murinen Homolog von AATF als embryonal letal mit dem Tag E3.5 [62]. Durch die Identifizierung des humanen Homolog von AATF (CHE-1) als einem Interaktionspartner der Untereinheit 11 der RNA Polymerase II wurde vermutet, dass AATF als Adapter-Protein zwischen spezifischen und den generellen Transkriptionsfaktoren fungiert [63].

Humanes AATF weist außerdem eine Bindung an das Tumorsuppressor Protein RB auf und inhibiert den inaktivierenden Effekt von Rb auf die E2F-vermittelte Transkription, die den Übergang von der G1- in die S-Phase induziert [63]. Dieser Effekt basiert vermutlich auf der Verdrängung von HDAC1 aus dem RB/E2F-Komplex [64]. Demzufolge besitzt AATF eine wichtige Funktion bei der Regulierung des Zellzyklus. Diese Hypothese wird weiterhin durch den Befund unterstützt, dass AATF bei der TGF β -induzierten Differenzierung herunterreguliert wird [65].

Weitere Untersuchungen zeigten, dass AATF als ein Koaktivator von verschiedenen Steroid-Hormonrezeptoren fungiert [66;67].

1.2.2.2.3. CDC5

CDC5 wurde als ein potentieller Interaktionspartner der Dlk mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid* System identifiziert (Dissertation Grit Page, 2000). Bevor die Interaktion in dieser Dissertation genauer analysiert wurde, war folgendes über CDC5 bekannt.

Erstmals wurde CDC5 in *Schizosaccharomyces pombe* als ein Gen beschrieben, das in die Regulation des G2/M-Übergangs involviert ist [68]. CDC5 aus *S. pombe* sollte nicht verwechselt werden mit CDC5 aus *Saccharomyces cerevisiae*, einer Polo-ähnlichen Kinase, die eine wichtige Funktion in diversen mitotischen Prozessen wie der Reifung des Centrosoms, der Formierung der Spindel und dem Metaphase/Anaphase-Übergang ausübt (CDC5 aus *S. pombe* wird in *S. cerevisiae* als Cef1p bezeichnet)[69-73].

Die *S. pombe* CDC5 Homologen sind strukturell und funktionell durch die gesamte Evolution hindurch hochkonserviert, wobei die Homologen aus *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* (Humanes CDC5 wird als CDC5-like bezeichnet) sogar die Fähigkeit besitzen, einen Gendefekt in *S. pombe* zu komplementieren [74;75].

Hinweise für eine Funktion von CDC5 im G2/M Übergang sind zum einen die verkürzte G2-Phase und die reduzierte Zellgröße nach der Überexpression von humanem CDC5 in Säugetierzellen, sowie der Wechsel von CDC5 vom Cytoplasma in den Nukleus nach der Zugabe von Serum in Serum-ausgehungerte Zellen, die für CDC5 eine Funktion im Mitogen-Aktivierten Signalweg in Säugetierzellen impliziert [76].

CDC5 ist ein Phosphoprotein und besteht bei den Spezies der Mammalia aus 802 Aminosäuren und enthält mehrere putative Phosphorylierungsstellen für die Kinasen CKII, MAPK, sowie PKA und PKC [76]. Als charakteristische Elemente enthält es zwei sogenannte Myb-„repeats“, einen Myb-„like repeat“ [77], vier putative NLS [78], eine prolinreiche hydrophile Region, die Ähnlichkeit zu bekannten Transaktivierungsdomänen aufweist [79;80] und eine sogenannte regulatorische Domäne im C-terminalen Bereich [75;76;81]. In dem Transkriptionsfaktor Myb bilden diese sogenannten Myb-„repeats“ eine „helix-turn-helix“ Struktur und repräsentieren die DNA-Bindungsdomäne. Diese hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Myb legte die Vermutung nahe, dass es sich bei CDC5 auch um einen Transkriptionsfaktor handelt. Dies wird zum einen bestätigt durch die Fähigkeit von CDC5, alleine an DNA zu binden und zum anderen durch die Transaktivierung von Gal4-abhängigen Reportergenen mit CDC5 durch Gal4-DNA-Bindungsdomäne-CDC5 Fusionsproteine [82].

Dagegen konnte kürzlich gezeigt werden, dass CDC5 am Spleißen von pre-mRNA beteiligt ist [73;83;84].

1.3. Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Tatsache, dass CDC5 ein nukleares Phosphoprotein ist und sowohl an der Transkription sowie an der Spleißreaktion von pre-mRNA beteiligt ist, ließ vermuten, dass die Interaktion zwischen der Dlk und CDC5 diese beiden Prozesse in einer bisher unbekanntem Funktionsweise miteinander verknüpft.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teile sollte nach der Isolierung der gesamten CDC5 cDNA die Interaktion zwischen Dlk und CDC5 verifiziert werden. Ferner sollten die Interaktionsdomänen innerhalb beider Proteine kartiert werden. Anschließend sollte die biologische Funktion dieser Interaktion untersucht werden, insbesondere hinsichtlich des Einflusses der Dlk auf die Funktion von CDC5 in der Spleißreaktion von pre-mRNA im allgemeinen, sowie das alternative Spleißen bestimmter pre-mRNAs.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die genomische Struktur des *Dlk* Gens der Ratte ermittelt sowie der für die Transkription notwendige regulatorische Bereich isoliert und charakterisiert werden. Anschließend sollte die relative Transkriptionsstärke des regulatorischen Bereiches sowie transkriptionelle Elemente in dem selbigen ermittelt werden. Die genomische Intron/Exon Struktur des *Dlk* Gens der Ratte sollte mit den noch zu ermittelnden Intron/Exon Strukturen der anderen Mitgliedern der DAP Kinase Familie innerhalb eines Organismus sowie zwischen verschiedenen Spezies verglichen werden. Die Sequenzidentifizierung des *mus musculus Dlk (ZIPK)* Gens aus Datenbanken sollte im weiteren dazu dienen, die Synthesestrategie eines „Knock-out“-Targetingvektors für einen konditionalen „Knock-out“ des *Dlk (ZIP Kinase)* Gens in der Maus zu entwickeln.

2. Material

2.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Biomol, Biozym, Roth, Fluka, La Roche (ehemals Boehringer Mannheim), Invitrogen, Merck, Serva und Sigma. Enzyme wurden von den Firmen NEB, La Roche, Promega, Peqlab und Qiagen bezogen. Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler bezogen.

2.2. Kits

Folgende Kommerzielle Reagenzien-Sätze wurden im Rahmen dieser Arbeit laut Anleitung des Herstellers verwendet.

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
DNeasy Mini Kit	Isolierung genomischer DNA	Qiagen
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Messung von Promotorstärken / Spleissanalysen	Promega
JETSTAR Plasmid Purifikation Kit	Isolierung von Plasmid DNA	Genomed
JETSTAR Gel Extraction Kit	Gelextraktion von linearer DNA	Genomed
Primer Extension System – AMV Reverse Transkriptase	Isolierung des 5´-Bereiches von mRNA Transkripten	Promega
QIAquick Gel Extraction Kit	Gelextraktion von linearer DNA	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Isolierung gesamtzellulärer RNA	Qiagen
T7-Sequencing Kit	DNA Sequenzierung	Amersham Pharmacia
Megaprime DNA Labelling Kit	Markierung von DNA Sonden	Amersham Pharmacia
TNT [®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	<i>In-vitro</i> Transkription/ Translation	Promega
Baculo-Gold System	Infektion von Insektenzellen	PharMingen

2.3. Allgemeine Stammlösungen und Puffer

Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, in sterilem, zweifach destilliertem Wasser (A.bidest.) angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

PBS⁺ (pH 7,2)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	0,7 mM	CaCl ₂
	0,5 mM	MgCl ₂
SDS-Stammlösung (10 %)	1 g Natriumdodecylsulfat in 10ml A.bidest	

2.4. Kultur von Säugerzellen, Insektenzellen, Hefen und Bakterien

2.4.1. Kultur von Säugerzellen

2.4.1.1. Zelllinien

Folgende Zelllinien mit der Beschreibung der Herkunft und Accession No des German National Resource Centre for Biological Material (DSMZ) bzw. des European Collection of Cell Cultures (ECACC) wurden in dieser

Arbeit verwendet. Weiterführende Informationen über diese Zelllinien erfährt man über die Internetadressen des DSMZ (www.dsmz.de) und des ECACC (www.ecacc.org.uk) unter Angabe der jeweiligen Accession No..

Zelllinie	Histologische Herkunft	Spezies	Accession No
208F	Fibroblasten	Ratte	ECACC 85103116
HeLa	Epithelzellen	Mensch	ECACC 93021013
MCF-7	Brustkarzinomzellen	Mensch	DSM ACC 115
PC12	Phäochromozytom	Ratte	DSM ACC 159
REF52.2	Embryofibroblasten	Ratte	
Saos-2	Epithel ähnliche Zellen	Mensch	ECACC 89050205
HM1	embryonale Stammzellen	Maus	

2.4.1.2. Medien für die Kultur von Säugerzellen

Die Medien für Säugerzellen wurden von Sigma bezogen, das FCS von Seromed. Die Medien DEMEM und RPMI enthielten 1 % Glutamin, 1000 mg/ml Glucose, sowie 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (0,6 % Penicillin, 0,4 % Streptomycin in PBS⁺) und wurden mit 5 oder 10 % FCS bzw. HS komplementiert. Jede Zelllinie wurde entsprechend der Anleitungen auf den entsprechenden Datenblättern des DMSZ und des ECACC mit den jeweiligen Medien und entsprechenden CO₂-Atmosphären bei 37 °C kultiviert. Die verwendeten Zellkultur-Lösungen sind nachfolgend zusammengefasst.

Trypsin-Lösung (pH 7,8)	136,9 mM	NaCl
	5,4 mM	KCl
	5,5 mM	Glucose
	0,7 mM	EDTA
	0,4 %	Trypsin
PBS⁻ (pH 7,2)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
Pen/Strep (100x, pH 8,2)	60 %	Penicillin
	40 %	Streptomycin

2.4.2. Kultur von Insektenzellen

Die SF9 (*Spodoptera frugiperda*) Insektenzellen wurden in dieser Arbeit für das Baculovirus-Expression-System verwendet. SF9 Zellen wurden in serumfreiem SF900 Medium (Gibco BRL) mit 50µg/ml Gentamycin bei 37 °C kultiviert.

2.4.3. Kultur von Hefestämmen

2.4.3.1. Hefestämme

Hefestamm	Genotyp	Reporter-gene	auxotrophe Marker	Ref.
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112,</i>	<i>HIS3,</i>	<i>trp1,</i>	James et al,
<i>S.cerevisiae</i>	<i>ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ,</i>	<i>ADE2,</i>	<i>ura3,</i>	1996
	<i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,</i>	<i>lacZ</i>	<i>leu2</i>	
	<i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,</i>			
	<i>ura3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>			

2.4.3.2. Medien für die Kultur von Hefestämmen

YPD-Medium (für 1 l) (Komplettmedium)	10 g Hefeextrakt 20 g Pepton 2 % Glucose	
Aminosäure- und Nährstoffmix für Hefestämme (AS-Mix)(10x) (ohne Adenin, Histidin, Tryptophan und Leucin)	200 mg/l 1000 mg/l 1000 mg/l 300 mg/l 300 mg/l 200 mg/l 500 mg/l 4000 mg/l 2000 mg/l 300 mg/l 200 mg/l 1500 mg/l	L-Arginin-HCl L-Aspartat L-Glutamat L-Isoleucin L-Lysin-HCl L-Methionin L-Phenylalanin L-Serin L-Threonin L-Tyrosin L-Uracil L-Valin
SD-Medium (für 1 l)	1,7 g 5 g 18 g add 830 ml H ₂ O, autoklavieren	Hefe Stickstoff (Basis) (ohne AS und (NH ₄) ₂ SO ₄) Ammoniumsulfat Agar
nach Bedarf :	+ 100 ml + 40 ml + 5 ml + 5 ml + 5 ml + 5 ml + 30 ml	AS-Mix 50 % Glucose Adeninhemisulfat (4 g/l) L-Histidin (4 g/l) L-Leucin (20 g/l) L-Tryptophan (4 g/l) 1 M 3-Amino-Triazol (nur bei Platten ohne Histidin)

2.4.3.3. Lösungen zur Transformation von Hefezellen

LiAc/TE	100 mM 10 mM 1 mM	LiAc Tris-HCl EDTA, pH 7,5
PEG/LiAc/TE	40 % 100 mM 10 mM 1 mM	PEG 3350 LiAc Tris-HCl EDTA, pH 7,5
Transformationansatz	50 µl je 1 µg 50 µg 300 µl	Hefe-Suspension (OD ₆₀₀ = 0,6) Plasmid-DNA Heringssperma-DNA (denaturiert bei 100 °C, 10 min) PEG/LiAc/TE

2.4.4. Kultur von Bakterienstämmen

2.4.4.1. Bakterienstämme

<i>E. Coli</i>-Stamm	Genotyp	Referenz.
Dh5 α	<i>F</i> , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>hsdR17</i> ($r_k^- m_k^-$), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan et al, 1983
XL1 blue-MRF	Δ (<i>mcr</i>)183, Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q , Δ M15, Tn10 (Tet ^r)]	Jerpseth et al, 1992

2.4.4.2. Medien für Bakterienstämme

Die hier aufgeführten Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit A. bidest angesetzt und autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Rotrandfilter 0,2 μ m, Schleicher & Schüll) und den Medien nach Abkühlung auf 55°C zugegeben. Bei der Verwendung der Medien für Agarplatten erfolgte vor dem Autoklavieren die Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar.

LB-Medium (pH 7,0)	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Trypton
	ad 1 l	A. bidest.
NZY-Medium (ph 7,5)	5 g	NaCl
	2 g	MgSO ₄
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Caseinhydrolysat
	ad 1 l	A. bidest.
DYT-Medium (pH 7,0)	5 g	NaCl
	10 g	Hefeextrakt
	10 g	Trypton
	ad 1 l	A. bidest.
YB-Medium	10 mM	KCl
	20 mM	MgSO ₄
	in DYT-Medium	

Nach dem Autoklavieren wurden die Medien gegebenenfalls vor dem Gebrauch mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

	<u>Stammlösung:</u>	<u>Gebrauchskonzentration:</u>
Ampicillin:	50 mg/ml	100 μ g/ml
Kanamycin:	10 mg/ml	70 μ g/ml

2.4.4.3. Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien

Folgende Lösungen wurden zur Herstellung von kompeten Bakterien verwendet.

TFB I	30 mM	Na-Acetat
	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	NaCl
	10 mM	CaCl ₂
	15 % (v/v)	Glycerin

TFB II	10 mM	MOPS ph 7,0
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	NaCl
	15 % (v/v)	Glycerin

2.5. Lösungen für die DNA-Aufbereitung und -Analyse

Lösungen für die Isolierung der DNA aus Bakterien in geringem Maßstab (Minipräparation).

P1-Puffer	50 mM	Tris-HCl
	10mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A ph 8,0
P2-Puffer	1 % (w/v)	SDS
	200 mM	NaOH
P3-Puffer	3 M	K-Acetat pH 5,5

Weiter Lösungen für die DNA-Aufbereitung und Analyse.

DNA-Ladepuffer (6x)(pH 7,9)	0,25 %	Xylenblau
	0,25 %	Cyanol FF
	105 mM	EDTA
	100 mM	Na-Acetat
	0,2 M	Tris-Eisessig
	30 %	Glycerin
Denhardt´s Reagenz (50x)	1 %	BSA
	1 %	Ficoll
	1 %	Polyvinylpyrrolidon
Ethidiumbromid-Stammlsg. (10 mg/ml)	1 %	Ethidiumbromid
		Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C
SSC (20x) (pH 7,5)	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
	60 mM	EDTA
	6 %	SDS
(Prä-)Hybridisierungslösung	50 %	Formamid <small>deionisiert</small>
	4 x	SSC
	5 x	Denhardt´s Reagenz
	1 %	SDS
		sterilfiltrieren; bei -20 °C lagern, vor der Anwendung auf 42 °C erwärmen und 50 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA (sowie denaturierte, markierte Sonde) hinzugeben.
TAE-Puffer (10x) (pH 7,9)	2 M	Tris-Eisessig
	1 M	Na-Acetat
	50 mM	EDTA
TE (pH 8,0)	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris-HCl

2.6. Lösungen zur Protein-Aufbereitung und -Analyse

Buffer J	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	140 mM	NaCl
	1 %	DOC
	1 %	NP-40
	0,1 %	SDS
	1 mM	DTT
	1 µg/ml	Aprotinin
Imac-50 bzw. -300	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
	0,5 M	NaCl
	10 %	Glycerin
	1 mM	PMSF
	5 mM	β-Mercaptoethanol
	50 bzw. 300 mM	Imidazol
Kinase-Puffer	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
	100 mM	NaCl
	8 mM	MgCl ₂
	2 mM	MnCl ₂
	1 mM	DTT
	1 mM	PMSF
	2 µCi	γ- ³² P-dATP (3000 Ci/mmol, Amersham)
PLP (Phosphat-Lysis Puffer)	20 mM	Na ₃ PO ₄ pH 8,0
	140 mM	NaCl
	3 mM	MgCl ₂
	0,5 %	NP-40
	1 mM	DTT
	50 µM	Leupeptin oder Aprotinin
TBS	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	50 mM	NaCl
Lysispuffer (pH 7,8) (für Luciferase-Analysen)	77 mM	K ₂ HPO ₄
	23 mM	KH ₂ PO ₄
	0,2 %	Triton X-100
	1 mM	DTT
Luciferasereagenz	20 mM	Tricin
	2,67 mM	MgSO ₄
	0,1 mM	EDTA
	530 µM	ATP
	1,07 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂
	270 µM	Coenzym A
	470 µM	D-Luciferin

Folgende Lösungen wurden für die SDS-PAGE verwendet.

SDS-Probenpuffer (1x)	0,25 mM	Tris-HCl pH 6,8
	40 mM	DTT
	6,6 % (w/v)	SDS
NEM	25 mg	NEM
	0,66 ml	H ₂ O
	0,33 ml	Glycerin, gesättigt mit Bromphenolblau

Sammelgel	1,25 ml 3 ml 0,75 ml 15 µl 5 µl	Sammelgelpuffer (pH 6,8) H ₂ O _{bidest} Acrylamidlösung APS (10 %, w/v) TEMED
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 % (w/v)	Tris-HCL pH 6,8 SDS
Trenngel (10 %)	4 ml 6,7 ml 5,3 ml 80 µl 4 µl	Trenngelpuffer (pH 8,8) H ₂ O _{bidest} Acrylamidlösung APS (10 %, w/v) TEMED
Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris-HCL pH 8,8 SDS
Elektrophoresepuffer	0,19 M 25 mM 0,5 mM	Glycin Tris-HCl SDS

2.7. Biologisches Material

2.7.1. Plasmide

Folgende kommerzielle Klonierungs und Expressionsvektoren wurden verwendet.

Bezeichnung		Anwendung
pBluescript SK II ⁽⁺⁾	(Stratagene)	Klonierungs und Expressionsvektor
pCR [®] II-TOPO	(Invitrogen)	Klonierungsvektor für PCR-Produkte
pEGFP-C1	(Clontech)	Expressionsvektor mit N-terminalem GFP
pDsRED1-C1	(Clontech)	Expressionsvektor mit N-terminalem DsRED
pGAD424	(Clontech)	Hefe-Expressionsvektor mit der Transaktivierungsdomäne von GAL4
pBD-P53	(Clontech)	Kontroll-Hefe-Expressionsvektor mit p53
pAD-LT	(Clontech)	Kontroll-Hefe-Expressionsvektor mit Large T
pCMV-Tag2	(Stratagene)	Expressionsvektor mit N-terminalem FLAG-Signal
pVL1392HIS	(Summers et al 1987)	Baculovirus Transfer Vektor mit N-terminalem His-Signal
pRL-CMV	(Promega)	Reporterkonstrukt mit dem <i>Renilla Luciferase</i> Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors
pGL3-Promotor	(Promega)	Reporterkonstrukt mit dem <i>Firefly Luciferase</i> Gen unter Kontrolle des SV40-Promotors
pGL3-Basic	(Promega)	Reporterkonstrukt mit dem <i>Firefly Luciferase</i> Gen ohne Promotor

Bereits existierende Expressionsplasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung		Anwendung
pBD-Dlk wt	(Page et al 1999)	Hefe-Expressionsvektor von Dlk wt mit DNA Bindungsdomäne von GAL4 (BD)
pBD-Dlk ΔC1	(Page et al 1999)	Hefe-Expressionsvektor von Dlk ΔC1 mit BD
pBD-Dlk ΔC2	(Page et al 1999)	Hefe-Expressionsvektor von Dlk ΔC2 mit BD
pBD-Dlk ΔC3	(Page et al 1999)	Hefe-Expressionsvektor von Dlk ΔC3 mit BD
pGFP-Dlk wt	(Kogel et al 1998)	Expressionsvektor von GFP-Dlk wt
pGFP- Dlk ΔC1	(Kogel et al 1999)	Expressionsvektor von GFP- Dlk ΔC1
pGFP-Dlk-K42A	(Kogel et al 1999)	Expressionsvektor von GFP- Dlk-K42A
pFLAG-Dk wt	(Boosen 2000)	Expressionsvektor von FLAG-Dlk wt
pFLAG-Dlk-K42A	(Boosen 2000)	Expressionsvektor von FLAG-Dlk-K42A

Bezeichnung		Anwendung
pVL1392His-AATF	(Page et al 1999b)	Baculovirus Transfer Vektor mit Dlk und N-terminalem His-Signal
pVL1392His-Dlk	(Kogel et al 1998)	Baculovirus Transfer Vektor mit Dlk und N-terminalem His-Signal

2.7.2. Cosmide

Für die Isolierung des gesamten murinen *Dlk* Gens wurden freundlicherweise vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, www.rzpd.de) in Berlin folgende Filter einer genomischen murinen Cosmid-Bibliothek zur Verfügung gestellt:

NAME: Library 129/ola mouse cosmid
LIBRARY NO: 121
CREATOR: Carola Burgtorf, Annette Poch, Michael Wiles
SOURCE: Spleen
VECTOR: Lawrist 7
HOST: Dh5 α

Nach erfolgter Hybridisierung mit einer murinen *Dlk* spezifischen Sonde wurden ebenfalls folgende klonierte Cosmide des Typs Lawrist 7 als Dh5 α -Bakterienkultur vom RZPD zur Verfügung gestellt. Die Nomenklatur der Klone entspricht denen des RZPD.

MPMGc121 O 05103 Q 2
MPMGc121 P 1098 Q 2
MPMGc121 P 08271 Q 2
MPMGc121 P 07275 Q 2
MPMGc121 N 19275 Q 2
MPMGc121 M 07288 Q 2
MPMGc121 I 12291 Q 2
MPMGc121 F 22359 Q 2

2.7.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Nachstehend sind die Sequenzen aller verwendeter Oligonukleotide sowie deren Verwendung aufgelistet.

Für die Isolierung der kodierenden cDNA von *CDC5* aus *rat norvegicus*.

S/K-CDC5-100-120S 5'-CCCGGGTACCAAGATGCCCGGATTATGA-3'
 S/B-CDC5(2524-03)AS 5'-CCCGGGATCCTCTGTGCTTCAGAACTTTG-3'

Für die Synthese von Teilfragmenten von *CDC5* für das Hefe-*two hybrid* System.

*Sma*CDC5aa 1 S 5'-TCCCCCGGGGATGCCCCGGATTATGATCAAA-3'
*Sma*CDC5aa 105 S 5'-TCCCCCGGGGGACAAAAGTCCCAAAGGGA-3'
 CDC5aa658AS 5'-CGCGGATCCTAGTTGTAAGCTTCACTGGAGAGT-3'
 CDC5aa500AS 5'-CGCGGATCCTACTTCTCCGCATTTCTGGCAG-3'
 CDC5aa377AS 5'-CGCGGATCCTAAGTGTCCACATTGGTCAAGGC-3'
 CDC5aa104AS 5'-CGCGGATCCTACAGGAGGAATTCATAGTGCTC-3'

Für Expressionanalysen von *Dlk*, *CDC5* und *GAPDH*.

hrDlk-472-489S 5'-TCAAGCAGATCCTGGACG-3'
 hrDlk-1041-1024AS 5'-CGGCATGCTTGAGTGCG-3'
 hrCDC5-315-332S 5'-CTCTTGCACTTGGCCAAG-3'
 hrCDC5-736-716AS 5'-TTATAATCAACTCCTCTCTTC-3'
 rat GAPDH for 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'
 rat GAPDH rev 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

Für die Isolierung eines genomischen Bereiches des murinen *Ich-1* Gens.

CAS2-*Hind III*-S 5'-CCCAAGCTTGCTAACTGTCCAAGTCTACAG-3'
 CAS2-*BspH I*-AS 5'-CGAGCTCTCATGAGGTCGACACCTCTATCTGTG-3'

Für die Größenbestimmung der Exons bzw. Introns des *rat norvegicus Dlk* Gens.

Dlk-cDNA 156-175 S 5'-ATGGGAGAGGAGCTTGGCAG-3'
 Dlk-cDNA 194-176 AS 5'-CACGATGGCGAACTGGCCG-3'
 Dlk-cDNA 516-536 S 5'-ATCGCGCACTTTGACCTGAAG-3'
 Dlk-cDNA 557-537 AS 5'-CAGCAACATGATGTTCTCCGG-3'
 Dlk-cDNA 648-666 S 5'-GGCACGCCAGAGTTCGTCG-3'
 Dlk-cDNA 688-667 AS 5'-TTCATAGTTTACAATCTCAGGGG-3'
 Dlk-cDNA 694-715 S 5'-TTGGCTTGGAAGCTGATATGTG-3'
 Dlk-cDNA 735-716 AS 5'-AGGTGATGACGCCGATGCTC-3'
 Dlk-cDNA 723-742 S 5'-GGCGTCATCACCTACATCCT-3'
 Dlk-cDNA 760-743 AS 5'-GGGGAAGCCCCGCTCAGG-3'
 Dlk-cDNA 875-895S 5'-GCTGCTGGTCAAAGATCCCAA-3'
 Dlk-cDNA 915-896 AS 5'-GTGCGATGGTCATCCTCCTC-3'
 Dlk-cDNA 921-941 S 5'-CTGGAGCATTCTGGATCAAG-3'
 Dlk-cDNA 959-942 AS 5'-GTCCTCACGCCGGCGAAC-3'
 Dlk-cDNA 1512-1491 AS 5'-GTGGAAAGTAGCTTTATTCTGG-3'

Für die Isolierung des Promotors des *Dlk* Gens sowie die Synthese von Promotorkonstrukten.

T3Primer+5'GG 5'-GGAATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
 T7Primer 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
 Dlk-cDNA134-115AS 5'-CTCCTGCCTGAACGTGGACA-3'
 Dlk-cDNA110-90AS 5'-GCTGTCTTCTGCAGGATTCT-3'
 Dlk-Pro-2128-2147 S 5'-CCCGGGCTAGCTTTCCGGGTGAGACGTGATC-3'
 Dlk-Pro-2172-2189 S 5'-CCCGGGCTAGCTGGGGGCGTGTGCGAACG-3'
 Dlk-Pro-2072-2090 S 5'-CCCGGGCTAGCTCAACGCCCAGTTACGCCG-3'
 Dlk-Pro-1043-1061 S 5'-CCCGGGCTAGCTTCACTGCCGACCTTCG-3'
 Dlk-Pro-1243-1261 S 5'-CCCGGGCTAGCTGGTACTGCCACACGCTGC-3'
 Dlk-Pro-1628-1648 S 5'-CCCGGGCTAGCAACTCTTCTGTGGTTGAACCC-3'
 Dlk-Pro-1938-1958 S 5'-CCCGGGCTAGCCAATCACATGAGAGTAAGG-3'
 Dlk-Pro-2238-2220 AS 5'-CCCGGGAAGCTTAGAGCCTCCGGTGCAAACC-3'
 Dlk-Pro-3140-3121 AS 5'-CCCGGGAAGCTTGTCTTCTGCAGGATTCTGG-3'
 Dlk-Enh-S 5'-CCCGGGTACCTCAACGCCCAGTTACGACG-3'
 Dlk-Enh-AS 5'-CCCGGGCTAGCGGAAACTGGATGCCCCAC-3'
 Dlk-Enh-(REV) 5'-CCCGGGAGATCTCAACGCCCAGTTACGCCG-3'
 Dlk-Sil-S 5'-CCCGGGTACCTGGTACTGCCACACGCTGC-3'
 Dlk-Sil-AS 5'-CCCGGGCTAGCATTACTCCAATGATTTCGCACAG-3'
 Dlk-Sil-(REV) 5'-CCCGGGAGATCTGGTACTGCCACACGCTGC-3'

Für die Synthese eines *Dlk/ZIP-Kinase* knock-out Targetingvektors (siehe Abschnitt 4.2.5.1.) sollten folgende Primer verwendet werden. *Sense* bzw. *antisense* Primer sind mit (s) bzw. (as) gekennzeichnet. Sequenzbereiche der Primer, die mit der DNA-Matrize (HTGs Maus Klons RP23-85K13 (Accession No.: A073822; enthält das *Dlk/ZIP-Kinase* Gen), *LacZ*-Reportergen mit Kernlokalisierungssignal und pBluescript SK II⁽⁺⁾-Vektor) in der jeweiligen PCR hybridisieren sind grau unterlegt. Unterstrichene Bereiche innerhalb der Primer sind Linkersequenzen für *LoxP*-sites und *frt*-sites. Kursiv gedruckte Bereiche innerhalb der Primer sind Linkersequenzen für Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen.

Pri HE01 (as):

5'-ACCCCCGGGAATTCATTATTTTTGACACCAGACCAACT-3'

Pri HE02 (as):

5'-CCATCGATCAATTGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCAAAGCTTCCGGCTCGTATGTTGT-3'

Pri HE03 (s):

5'-TCCCCCGGGGTAACCTTTGATGCTTATACAGTGGA-3'

Pri HE04 (s):

5'-GGGATTAAGCTTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTGCAGACAGGGTGTCTCACT-3'

Pri HE05 (as):

5'-ATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATAAGCTTTAATCCCAGCACTCGGGA-3'

Pri HE06 (as):

5'-TCCCCCGGGCAATTGGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCAGCCTTGCACGTCTCTATGTG-3'

Pri HE07 (s):

5'-TCCCCCGGGGTACCAGGTTAGCACCCCTTGA-3'

Pri HE08 (s):

5'-ACCCCCGGGAATTCACCCCCAGACCCCGACC-3'

Pri HE09 (as):

5'-ACCCCCGGGCCGCGGCCTTGAAATCAGAGATCTGT-3'

Pri HE10 (s):

5'-TCCCCCGGGGTACCAGACGTTGATAGCACACG-3'

Pri HE11 (as):

5'-ACCCCCGGGCCGCGGATCTATCTAATCCTTCATCCA-3'

Pri HE12 (s):

5'-CATAGATGAAGCTCTTGCGTGC-3'

Pri HE13 (as):

5'-AGTGACACTCTGTACAGAAGC-3'

2.7.4. Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Verwendung	Herkunft
α -Flag	mAb aus der Maus, spezifisch gegen das Flag-Epitop des pCMV-Tag-Vektors	Stratagene
α -PML (mAb 5E10)	mAb aus der Maus, spezifisch gegen PML	Dr.S.Stamm, Institut für Biochemie, Erlangen
α -SC35	mAb aus der Maus, spezifisch gegen SC35	BD Bioscience
α -U5-116	polyklonaler Ab aus der Maus gegen das Mitglied U5-116 kD der snRNP-Familie	Dr.R.Lührmann, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen

Sekundäre Antikörper

Name	Verwendung	Herkunft
G α M-Cy ^{TM3}	Ziege- α -Maus-(IG(H+L), konjugiert an Cy ^{TM3})	Dianova (Hamburg)

2.7.5. Rekombinante Proteine

Folgende rekombinante und aufgereinigte Proteine wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Name	Herkunft
His-gekoppeltes ASF/SF2	Dr.S.Stamm, Institut für Biochemie, Erlangen
GST-gekoppeltes SC35	Dr.R.Lührmann, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen

3. Methoden

3.1. Methoden der Nukleinsäure-Analytik

3.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Zur Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation wurde ein Protokoll verwendet, das Transformationsraten von $\geq 5 \times 10^8$ transformierte Kolonien pro μg Plasmid-DNA ermöglicht (Hanahan et al., 1983).

Eine einzelne Kolonie der Wirtsbakterien wurde in 2,5 ml YB-Medium über Nacht kultiviert. Mit 50 μl der stationären Bakterienkultur wurden 5 ml YB-Medium angeimpft (1:100 Verdünnung) und bei 37 °C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,8$ inkubiert (225 Upm). Diese gesamte Vorkultur wurde zu 100 ml vorgewärmten YB-Medium gegeben und bis zu einer OD_{600} von 0,45 bis 0,55 bei 37 °C erneut kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf zwei 50 ml Röhren (Falcon) aufgeteilt, 5 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5000 Upm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde vollständig entfernt. Die Zellen wurden bei 4 °C in jeweils 10 ml TFB I (4 °C) resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert (5000 Upm, 5 min, 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Sedimente bei 4 °C in je 2 ml TFB II (4 °C) aufgenommen, die beiden Ansätze zusammengegeben, und jeweils 100 μl Bakteriensuspensionen in ein 1,5 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff oder in einer Ethanol/Trockeneis-Mischung schockgefroren und waren bei -70° C mehrere Monate lagerbar.

Für die Transformation wurden die kompetenten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Bei einer Retransformation wurden ca. 1 ng Plasmid-DNA, ansonsten der gesamte Ligationsansatz mit 50 μl der Bakterien vermischt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 60 Sekunden im Wasserbad und sofortige Abkühlung auf Eis (2 min). Zu den Ansätzen wurden 450 μl LB-Medium pipettiert und diese eine Stunde inkubiert (37 °C, 250 Upm) um die Ausprägung der Antibiotika-Resistenz zu ermöglichen. Anschließend wurden 100 μl und 400 μl der Bakteriensuspension auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.2. DNA Präparation

3.1.2.1. Analytische Plasmid Präparation (Minipräparation)

Zur Präparation eines Plasmid-DNA-Konstruktes in geringem Maßstab wurde die Methode nach Birnboim und Doly (1979, mod.) verwendet. Es wurden 3 ml-Kulturen von *E. coli* in LB-Medium über Nacht angezogen. Anschließend wurden die Zellen aus 1 ml Kultur durch Zentrifugation (5 min, 16000 \times g, RT) geerntet. Nach gründlichem Entfernen des Mediums wurde das Zellpellet in 100 μl P1-Puffer resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 100 μl P2-Puffer lysiert. Die Fällung der Proteine und der mit Proteinen besetzten genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 100 μl eiskaltem P3-Puffer, sofortiges vorsichtiges Mischen und anschließende Zentrifugation (5 min, 16000 \times g, 4 °C). Der Überstand wurde zur Fällung der Plasmid-DNA mit 0,7fachem Volumen Isopropanol (RT) versetzt und erneut für 10 min wie oben zentrifugiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, erneut für 5 min wie oben pelletiert und nach dem Trocknen in 10 – 20 μl TE aufgenommen. Bei dieser Methode wurde eine Ausbeute von ca. 10 μg DNA pro Ansatz erreicht.

3.1.2.2. Präparative Plasmid Präparation (Maxipräparation)

Größere Mengen an Plasmid-DNA (100 bis 200 μg) mit hohem Reinheitsgrad wurden mit dem Reagenziensatz der Firma Genomed („JET-STAR Plasmid DNA Purification Kit“) isoliert. Die Präparation erfolgte exakt nach den Angaben des Herstellers.

3.1.2.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Fragmentgrößen der aufzutrennenden DNA wurden Gele mit Konzentrationen von 0,8 - 2,0 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer

verwendet. Vor dem Gießen der Gele wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml (w/v) zugegeben, um die DNA bei Bestrahlung durch UV-Licht sichtbar zu machen. Als Größenstandards wurden 100 bp-DNA-Marker und 1 kb-DNA-Marker der Firma Peqlab verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V in TAE-Puffer durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente in einem UV-Transilluminator (Image Master VDS, Pharmacia) detektiert.

3.1.2.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das DNA-Fragment unter UV-Licht (302 nm) mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Reagenziensatz der Firma Genomed („JETSTAR Gel Extraction Kit“) nach Herstellerangaben verwendet.

3.1.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA

Diese Fällung von DNA wurde zur Konzentrierung oder Umpufferung eingesetzt: Zur DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5faches Volumen Ethanol abs. (-20 °C) gegeben. Der gut durchmischte Ansatz wurde zur Präzipitation 10 min bei -70 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde sedimentiert (13.000 Upm, 4 °C, 30 min), mit 2,5fachem Volumen 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (13.000 Upm, 4 °C, 10 min) und bei 50 °C getrocknet. Die DNA wurde dann im gewünschten Volumen TE oder H₂O_{bidest} gelöst.

3.1.2.6. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich durch Messen der Absorption von UV-Licht nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz bestimmen, da die Purine und Pyrimidine der Nukleinsäurebasen aromatische Ringsysteme mit einem Absorptionsmaximum von 260 nm enthalten. Es wurde eine Verdünnung der zu messenden Probe (RNA, DNA oder Oligonukleotide) in H₂O_{bidest} oder TE (Gesamtvolumen 500 µl) und die Extinktion bei 260 und 280 nm gegen H₂O_{bidest} bzw. TE als Nullwert vermessen (Spektralphotometer: z.B. Beckman DU®640). Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Konzentration berechnet. Eine Absorptionseinheit entspricht bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentration von 50 µg/ml DNA, 20 µg/ml Oligonukleotide und 40 µg/ml RNA oder einzelsträngiger DNA. Auch Phenol und die aromatischen Aminosäuren absorbieren im kurzwelligen Bereich (280 nm), so dass durch Bilden des Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ eine Abschätzung des Reinheitsgrades der Probe möglich ist. Erfolgreich aufgereinigte Proben zeigen einen Quotienten von 1,8 bis 2,0 bei DNA und von 1,9 bis 2,0 bei RNA.

3.1.3. Modifikationen von DNA

3.1.3.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Anzahl der Enzym-Einheiten (U), die für eine Restriktion von DNA erforderlich waren, wurde nach folgender Formel abgeschätzt:

$$\frac{U}{\mu\text{g} \times \text{h}} = \frac{\text{Länge des } \lambda\text{-Genoms (48,5 kb)}}{\text{Länge der Proben-DNA}} * \frac{\text{Anzahl der Schnittstellen in der Proben DNA}}{\text{Anzahl der Schnittstellen im } \lambda\text{-Genom}}$$

Die Inkubationsbedingungen wurden gemäß den Herstellerangaben gewählt. Bei Doppelrestriktionen wurde dasjenige Puffersystem gewählt, das für beide Enzyme die günstigsten Inkubationsbedingungen bot oder eine sequentielle Restriktion durchgeführt.

3.1.3.2. Auffüllung überhängender DNA-Enden

Viele Restriktionsendonukleasen erzeugen bei der Spaltung von DNA-Molekülen 3'- oder 5'-überhängende Enden. Häufig sind die erzeugten Enden von DNA-Fragmenten, die im Weiteren verbunden werden sollen, nicht kompatibel. In diesen Fällen können die Enden durch Auffüllen (5'-überhängende Enden) mit Hilfe des Klenow-

Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* oder durch Abbau (3'-überhängende Enden) mittels der T4 DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 geglättet werden.

Zu 20 µl hitzeinaktiviertem Restriktionsansatz (0,1 – 4 µg DNA) wurden jeweils 10 µl Glättungsansatz gegeben, bestehend aus 1,0 µl hochsalziger Restriktionpuffer (10fach konzentriert), 3,0 µl DTT (10 mM), 0,5 µl dNTPs (2 mM), 4,5 µl H₂O_{bidest} und 2 U Klenow-Fragment (bzw. 2 U T4 DNA Polymerase). Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37 °C für 15 min. Anschließend wurde das Klenow-Enzym bzw. die T4 Polymerase im Ansatz durch 15 minütige Inkubation bei 75 °C hitzeinaktiviert.

3.1.3.3. Dephosphorylierung/Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Rezirkulation von linearisierter Vektor-DNA bei der Ligation zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatgruppen der DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgte direkt im Restriktionsansatz oder nach Aufnahme der DNA in Phosphatase-Puffer (CIP-Puffer) mit 0,5-1 U alkalischer Phosphatase pro pmol 5'-Enden. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase durch die Zugabe von 25 mM EGTA sowie einer Hitzeinaktivierung für 15 min bei 75 °C.

Um DNA Moleküle mit 5'-OH-Enden zu phosphorylieren, wurden in 45 minütiger Inkubation die 5'-Phosphatgruppen in einem 50 µl Ansatz mit 1 mM ATP, 3 bis 6 U T4-Polynukleotid-Kinase (PNK), ca. 10 pmol DNA und PNK-Puffer angehängt. Das Enzym wurde durch 10 minütige Erwärmung auf 95 °C inaktiviert.

3.1.3.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine Ligationsreaktion wurde die T4-DNA-Ligase und der mitgelieferte 10fach Ligase-Puffer von Roche verwendet. Es wurden 25 - 50 ng linearisierte Vektor-DNA und im Verhältnis 1 : 2, 1 : 3, und 1 : 4 Insert-DNA eingesetzt. Je nach Gesamtvolumen (10 – 15 µl) wurde der Ansatz mit und 1 – 1,5 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) versetzt, bei glatten DNA-Fragmenten über Nacht bei 16 °C im Wasserbad, bei überhängenden DNA-Fragmenten bei 37 °C oder RT inkubiert und im Anschluss für die Transformation eingesetzt.

3.1.4. Polymerase chain reaction (PCR)

Um DNA-Fragmente *in-vitro* zu amplifizieren und gegebenenfalls nach Bedarf zu modifizieren, wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt durch wiederholte Folgen von Denaturierung, Anlagerung synthetischer Oligonukleotide (MWG) und Strang-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Je nach Anwendung wurden die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Promega), das *Expand Long Template PCR System* (Roche) oder das *GC-rich PCR System* (Roche) verwendet. Die Schmelztemperatur T_m der synthetischen Oligonukleotide wurde nach folgender vereinfachten Formel berechnet:

$$T_m = [(A/T \times 2) + (G/C \times 4)] - 5$$

wobei A/T die Anzahl der Adenine/Thymine und G/C die Anzahl der Guanine/Cytosine des Oligonukleotides angibt. Der PCR-Reaktionsansatz unter Verwendung der Taq-Polymerase setzte sich im allgemeinen wie folgt zusammen und wurde unter angegebenen Bedingungen durchgeführt:

PCR-Ansatz		PCR-Bedingungen	
Matrizen-DNA	1-10 ng	1. Denaturierung	95 ° 5 min
Oligonukleotide	je 50 pmol	2. Denaturierung	95 ° 5 min
10 x Puffer	5 µl	3. Hybridisierung	T_m 1 min
MgCl ₂	1,5 mM	4. Elongation	72 ° X min
dNTP-Gemisch	je 200 µM	5. Elongation	72 ° 7 min
Polymerase	0,5-2,5 U		
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl		
		- 30-35 Wdh der Schritte 2 - 4	
		- X = 1 min/kb PCR-Produkt	

Bei der Anwendung des *Expand Long Template PCR System* (Roche) oder das *GC-rich PCR System* (Roche) wurden die PCR-Ansätze und PCR-Bedingungen nach den Angaben des Herstellers gewählt.

3.1.5. Southern-Blot Analysen

3.1.5.1. Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Zur radioaktiven Markierung von Doppelstrang DNA-Fragmenten wurde die Zufallsstart-Methode (random primed oligolabelling) verwendet. Diese Methode dient der radioaktiven DNA-Markierung mit Hilfe unspezifisch bindender Hexanukleotid-Startermoleküle, an denen die Klenow-DNA-Polymerase die Zweitstrangsynthese und damit den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide (α - ^{32}P -dCTP) startet. Es wurde der Reagenziensatz „*Megaprime-DNA-labelling system*“ (Amersham) nach Herstellerangaben verwendet. Eingesetzt wurden 50 ng linearisierter Sonden-DNA und 20 μCi α - ^{32}P -dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham) pro Ansatz. Um die freien dNTPs abzutrennen, wurde über eine Sephadex G50-Säule zentrifugiert (5 min, RT, 1500 Upm). Das Eluat wurde 3 min zur Denaturierung der Sonde gekocht, auf Eis gestellt und für die Hybridisierung (Abschnitt 3.1.5.2.) eingesetzt.

3.1.5.2. Southern-Blot Analysen

Prähybridisierung:

Die Nylonmembran-Filter mit gebundenen Nukleinsäuren einer genomischen Cosmid-Bibliothek aus der Maus (RZPD, Berlin) wurden mit der DNA-Seite nach innen gerollt und in eine Hybridisierungsröhre gelegt. Für die verwendeten Membranen von 16 x 24 cm wurden Hybridisierungsröhren dementsprechender Größe verwendet. Es wurden 10ml auf 42 °C erwärmte Hybridisierungslösung und 50 μl denaturierte, gescherte Heringssperma-DNA hinzugefügt. Letztere diente zur Verminderung unspezifischer Bindungen der markierten Sonde („Blockieren“) an die Membran. Die Prähybridisierung erfolgte für 3 bis 18 h bei 42 °C.

Hybridisierung:

Die Prähybridisierungslösung wurde durch 10 ml auf 42 °C erwärmte Hybridisierungslösung ausgetauscht. Denaturierte markierte Sonden- und Heringssperma-DNA (100 °C, 10 min) wurden hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte für 16 bis 24 h bei 42 °C im Rollinkubator.

Waschen:

Die Hybridisierungslösung wurden entsorgt und die Membran zunächst für 10 min bei 42 °C mit 2fach SSC/0.1% DS in der Hybridisierungsröhre gewaschen. Anschließend erfolgten mehrerer Waschschrte mit abnehmender SSC-Konzentration in verschließbaren Plastikschüsseln bei 60 °C (Wasserschüttelbad) zur Entfernung unspezifisch gebundener und überschüssiger Sonde.

15 min	2,0 x SSC/ 0,1% SDS
2 x 15 min	1,0 x SSC/ 0,1% SDS
2 x 10 min	0,5 x SSC/ 0,1% SDS
2 x 10 min	0,2 x SSC/ 0,1% SDS
2 x 5 min	0,1 x SSC/ 0,1% SDS

Das Waschen wurde beendet, wenn weder die Aktivität der Membran weiter abnahm, noch die Waschlösung messbare Strahlung aufwies. Die Aktivität der Membran wurde ab dem ersten Waschschrte bei einer 0,5fachen SSC-Konzentration gemessen und anschließend wurde jeweils entschieden, ob weitere Waschschrte durchgeführt wurden. Die Membran wurde nach Beenden des Waschens luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt.

3.1.5.3. Autoradiographie

Die eingeschweißte Membran wurde zwischen zwei Röntgenfilmen (Röntgenfilm X-OMAT AR; Kodak) in einer Filmkassette bei -70 °C gelagert. Der obere Film wurde nach einem Tag Exposition entwickelt, der untere, je nach Signalstärke des ersten Films, nach 2 bis 28 Tagen. Anhand der Position der Signale auf dem Röntgenfilm bzw. Filter konnten die Cosmid-Klone bestimmt werden.

3.1.6. Präparation von RNA aus Zellkulturen

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurde eine konfluente LP dreimal mit eiskaltem PBS⁺ gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde 1 ml Trizol[®] (Invitrogen) mit dem Gummischaber auf der Schale verteilt. Das Lysat wurde vorsichtig mit einer Pipette auf- und abpipettiert und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Die Extraktion von Proteinen und genomischer DNA erfolgte durch Zugabe von 200 ml Chloroform, gründliches Mischen und nachfolgender Phasentrennung durch 3 min Inkubation bei RT und 5 minütiger Zentrifugation bei 16000 x g. Die obere, wässrige Phase wurde zur Fällung der RNA mit 500 ml Isopropanol versetzt und 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit eiskaltem 70%igem Ethanol und Zentrifugation (10 min, 9000 x g, 4 °C) wurde die RNA leicht angetrocknet und bei 65 °C in RNase-freiem TE gelöst.

Alternativ erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

3.1.7. Umschreiben von RNA in cDNA

Jeweils 1 - 2µg denaturierte Gesamt-RNA (70 °C für 3 min) wurde in einem Volumen von 20 µl mit dem Oligonukleotid-Primer „Oligo dT“ wie folgt revers transkribiert:

5 mM	MgCl ₂
50 mM	KCl
10 mM	Tris-HCl pH 8,3
2,5 mM	je dNTP
50 pmol	Oligo dT
2,5 U	Reverse Transkriptase
1,7 U	RNase-Inhibitor

Der Ansatz wurde 40 min bei 41 °C und 10 in bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. In der daran anschließenden PCR wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA waren, cDNA-Fragmente, die innerhalb der Primer lagen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter den zuvor beschriebenen Bedingungen für die Taq-Polymerase (Abschnitt 3.1.4.) Die Amplifikationsprodukte (nach 30 - 35 Zyklen) wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert.

3.2. Methoden der Zellkultur

3.2.1. Säugerzellen

3.2.1.1. Kultur von Säugerzellen

Die Kultur von Säugerzellen erfolgte bei 37 °C je nach Zelllinie in einer 5%- oder 10%igen CO₂-Atmosphäre. Zum Passagieren der Zellen, die als adhärenente Monolayer wachsen, wurden die Zellen mit PBS⁺ gewaschen, mit Trypsin abgelöst, bei 150 x g sedimentiert und je nach Zelllinie mit frischem Medium in einem Verhältnis von 1 : 2 bis 1 : 15 verdünnt. Für eine längerfristige Lagerung von Zellen wurden exponentiell wachsende Zellen nach der Trypsinierung in vorgekühltes Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen und schrittweise abgekühlt (2 h bei -20 °C, über Nacht bei -70 °C), bevor sie in flüssigem Stickstoff (-180 °C) längerfristig gelagert wurden.

3.2.1.2. Transiente Transfektion von Säugerzellen

Zur Transfektion von Säugerzellen wurde das JetPEI-Transfektionsreagenz (Qbiogene) verwendet. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden $1,7 \times 10^4$ Zellen auf runden Deck-Gläschen in Kulturgefäßen mit passenden Vertiefungen (1,5 cm Ø) ausplattiert. Für diese Zellkulturgefäße wurden Transfektionsansätze von 50 µl je Vertiefung angesetzt. Es wurde zunächst eine Lösung von 500 ng DNA in 25 µl 150 mM NaCl sowie eine Verdünnung von 1 µl Transfektionsreagenz in 25 µl 150 mM NaCl angesetzt. Beide Lösungen wurden gründlich

gemischt, 30 min bei RT inkubiert und anschließend zu 450 µl Medium je Vertiefung in die Kulturschale pipettiert. Für Zellkulturgefäße von 5 cm Ø wurden die Transfektionsansätze entsprechend den obigen Angaben auf 200 µl, für Gefäße von 10 cm Ø auf 500 µl hochgerechnet. Der Transfektionsansatz konnte bis zur Analyse (maximal 48 h) auf den Zellen verbleiben.

3.2.1.3. Fluoreszenzmikroskopie von Säugerzellen

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen auf runden Deckgläschen in passenden Zellkulturgefäßen mit passenden Vertiefungen (1,5 cm Ø) ausplattiert. Es wurden je nach Zelllinie 1,5 - 2,5×10⁴ Zellen je Vertiefung ausplattiert.

Die Fixierung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte 24 bis 48 h nach der Transfektion. Für eine Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Zellen einmal mit PBS⁺ gewaschen und anschließend für 20 min in 3% Paraformaldehyd in PBS⁺ bei RT inkubiert. Das Paraformaldehyd wurde durch Waschen mit PBS⁺ von den Zellen entfernt.

Nach der Fixierung der zu analysierenden Zellen konnten diese mit spezifischen Antikörpern „gefärbt“ werden. Alle Inkubationen wurden bei RT auf dem Schüttler durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die fixierten Zellen zunächst für 1 h in 5% Magermilchpulver in PBS⁺ mit 1% Ziegenserum und 0,1% Triton X-100 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺ gewaschen und anschließend für 1 h in 200 µl der Erstantikörperverdünnung in PBS⁺ mit 1% Ziegenserum und 0,1% Triton X-100 inkubiert. Es folgten drei 10minütige Waschschrte in PBS⁺. Der Erstantikörper wurde durch Cy3-fluoreszenzmarkierte Anti-Maus-Antikörper (Dianova) nachgewiesen. Die Zweitantikörperinkubation erfolgte für 30 min in einer Verdünnung von 1 : 2000 in PBS⁺ mit 1% Ziegenserum und 0,1% Triton X-100. Nach der Zweitantikörperinkubation folgten drei weitere 10minütige Waschschrte mit PBS⁺.

Die Anfärbung von Zellkernen für die Immunfluoreszenzanalysen erfolgte mit dem fluoreszierenden DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid, Sigma). Die fixierten Zellen wurden für 5 min bei RT mit 0,1% Triton X-100 in PBS⁺ permeabilisiert, für 15 min in 0,25 µg/ml DAPI in PBS⁺ inkubiert und anschließend zweimal für 10 min mit PBS⁺ gewaschen.

Bevor die Deckgläschen mit den fixierten Zellen auf Objektträger montiert wurden, wurden die Zellen einmal mit H₂O _{bidest.} gewaschen, um die Bildung von Salzkristallen zu verhindern. Dann wurde das Einbettmedium (PERMAFLUOR *Aqueous Mounting Medium*, Immunotech) auf die Objektträger getropft und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten luftblasenfrei auf das Einbettmedium gelegt. Die Objektträger wurden vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am Axiophot (Zeiss, Oberkochen) mit folgenden Filtern:

GFP Filter	FT 510, BP 450-490, LP 515-565
Cy3, Texas-Red Filter	FT 580, BP 546, LP 590
DAPI Filter	FT 396, BP 365, LP 397

3.2.2. Insektenzellen

3.2.2.1. Kultur von Insektenzellen

Spodoptera frugiperda (Sf9) Insektenzellen wurden als Monolayer in 250 ml Zellkulturflaschen mit TC100-Medium komplettiert und mit 10% FCS bei 27 °C kultiviert. Die Zellen wurden durch Abklopfen von der Oberfläche gelöst und passagiert. Sf9 Zellen wurden für die Transfektion von Baculovektoren und für die Reinigung und Vermehrung von rekombinanten Baculoviren, sowie zu der Expression von rekombinanten Proteinen eingesetzt.

3.2.2.2. Infizierung von Insektenzellen

Die Erzeugung rekombinanter Baculoviren erfolgte durch die Kotransfektion von Baculo-Gold-DNA (PharMingen) und pVL1392His-CDC5 bzw. pVL1392His-Dlk und pVL1392His-AATF mit Hilfe des Transfektionsreagenz (Cellfectin, Invitrogen) laut Herstellerangaben. Nachdem die Zellen 1 h bei 27 °C transfiziert wurden folgte die Zugabe von frischem Medium und die Inkubation der Zellen für 5 Tage bei 27 °C. Der Zellüberstand wurde geerntet, steril filtriert (Ø 0,45 µm) und bei 4 °C gelagert. Mit 1 ml Überstand wurde eine neue Platte 70%-konfluenten Zellen infiziert und für weitere 5 Tage inkubiert. Der Überstand dieser ersten Runde der Virusamplifikation wurde wiederum geerntet und mit 1 ml dieser Lösung wurde eine neue Platte für

die 2. Runde der Virusamplifikation infiziert. Nach 3 – 4 Tagen waren die meisten Zellen lysiert und der Überstand enthielt einen hohen Titer an rekombinanten Viren. Der Überstand wurde geerntet und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. 300 µl von diesem Hoch-Titer-Virusstock wurden nun für die Infektion von Sf9 Zellen und die Expression von rekombinanten Proteinen in Sf9 Zellen eingesetzt.

3.3. Methoden der Protein-Analytik

3.3.1. Präparation von Zellextrakten

3.3.1.1. Zellextrakte für Luciferase Analysen

Die mit dem Luciferase-Reportergen (*Firefly Luciferase*) transfizierten Zellen wurden zweimal mit PBS⁺ gewaschen und mit 200 µl Lysispuffer pro Platte 15 min auf der Wippe bei RT inkubiert. Die Zellextrakte wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Für eine Standardisierung der Ansätze wurde der Proteingehalt nach Bradford (Abschnitt 3.3.2.) bestimmt und die Extrakte entsprechend mit dem Lysispuffer verdünnt. Die Extrakte wurden entweder direkt analysiert oder bei -70 °C gelagert.

Die Messung der *Firefly* Luciferaseaktivität erfolgte mit 20 µl Zellextrakt durch Zugabe von 100 µl Luciferasereagenz für 10 sec in einem Lumat LB9501 Luminometer (Berthold).

3.3.1.2. Zellextrakte für Dual-Luciferase Analysen

Die mit beiden Luciferase-Reportergenen (*Firefly Luciferase* und *Renilla Luciferase*) transfizierten Zellen wurden mit dem Reagenziensatz der Firma Promega („Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System“) nach Herstellerangaben lysiert und anschließend direkt analysiert oder bei -70 °C gelagert.

Die kurz aufeinander folgende Messung der *Firefly* Luciferaseaktivität sowie der *Renilla* Luciferaseaktivität erfolgte mit dem Reagenziensatz der Firma Promega („Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System“) nach Herstellerangaben mit 20 µl Zellextrakt für jeweils 10 sec ebenfalls in einem Lumat LB9501 Luminometer (Berthold).

3.3.1.3. Zellextrakte von Sf9 Insektenzellen

Die Sf9 Insektenzellen wurden zweimal mit PBS⁺ gewaschen und anschließend bei 4 °C für 15 min mit dem Phosphat-Lysis Puffer lysiert. Die Zellkerne wurden dann durch Zentrifugation sedimentiert und der cytoplasmatische Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellkerne in Buffer J resuspendiert und wieder extrahiert durch die Zugabe von 0,5 M NaCl für 15 min. Danach wurden die verbleibenden Kernstrukturen bei 14.000 x g abzentrifugiert und der Überstand mit den rekombinanten Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die His-gekoppelten rekombinanten Proteine direkt aufgereinigt oder bei -70 °C gelagert.

3.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung von Zellextrakten wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt. Es wurden 800 µl einer 1 : 80 – 1 : 800-Verdünnung der Zellextrakte mit 200 µl *Protein Assay Dye Reagent* (Bio-Rad) versetzt, gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OD_{595 nm} gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde anhand einer zuvor erstellten Eichreihe mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (0 - 20 µg/ml) ermittelt.

3.3.3. Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen aus Sf9-Zellen

His-gekoppelte Proteine aus der Proteinfraction von Sf9-Zellen (Abschnitt 3.3.1.3.) wurden mit Hilfe der Affinitätschromatographie an Ni-NTA (Qiagen) laut Herstellerangaben aufgereinigt. Nach der Elution mit Imac-300 wurde die Protein-Lösung bei -70 °C gelagert.

3.3.4. *In-vitro* Transkription und Translation

Die *in-vitro* Transkription/Translation wurde mit dem TNT[®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Da in diesem System die T3- oder T7-Polymerase verwendet wird, musste die zu transkribierende cDNA in einem Vektor vorliegen, in dem entweder ein T3- oder ein T7-Promotor vor der Multiplen Klonierungsstelle liegt. Für einen Translationsansatz wurde 1 µg DNA eingesetzt. Für die radioaktive Markierung des *in-vitro* translatierten Proteins wurden 4 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml, 1000 Ci/mmol) zugegeben. Die *in-vitro* Transkription/Translation erfolgte während einer 90minütigen Inkubation bei 30 °C. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 20 µg RNase A behandelt und mit 1 µg Leupeptin versetzt.

3.3.5. *In-vitro* Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Dieses Experiment wurde durchgeführt um die Interaktion der Dlk mit dem im *Two-Hybrid*-System identifizierten CDC5 zu bestätigen. Dazu wurde das in Sf9 Zellen rekombinant exprimierte und aufgereinigte His-gekoppelte Dlk bzw. His-gekoppelte AATF an Ni-Agarose gebunden. CDC5 wurde *in-vitro* translatiert und dabei radioaktiv markiert (Abschnitt 3.3.4.). Nun wurden zu jeder Bindungsreaktion 4 µl radioaktiv markiertes CDC5 in 200 µl PLP gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 4 °C rotiert und anschließend zweimal mit PLP und zweimal mit Buffer J gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine von der Ni-Agarose erfolgte durch die Zugabe von 30 µl 2fach SDS-Probenpuffer und einer Inkubation für 5 min bei 60 °C. Danach wurden die eluierten Proteine 3 min gekocht, mit 10 µl NEM versetzt und direkt durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

3.3.6. *In-vitro* Nachweis der Substratspezifität von Kinasen

Der *in-vitro* Nachweis der Substratspezifität von Kinasen wurde durchgeführt mit aufgereinigter His-gekoppelter Dlk sowie mit den zu untersuchenden aufgereinigten Substraten. Die Kinasereaktion erfolgte für 30 min bei 30 °C mit 2 µCi γ -³²P-dATP (3000 Ci/mmol, Amersham) in dem Kinasepuffer (Abschnitt 2.6.) in einem Volumen von 12 µl. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von EDTA (pH 8,0) bis zu einer Endkonzentration von 10 mM gestoppt und anschließend mit Hilfe der SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.7.2.) analysiert.

3.3.7. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

3.3.7.1. Vorbereitung der Proben

Proteinproben für die Gelelektrophorese wurden in 1 × SDS-Probenpuffer aufgenommen oder mit 2 × SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100 °C denaturiert, wobei das im Probenpuffer enthaltene DTT eine Aufspaltung der Disulfidbrücken bewirkt. Um eine Reoxidation der Disulfidbrücken zu verhindern, wurde den Proben 1/3 Volumen NEM zugesetzt, das zu einer Alkylierung der Sulfhydryl-Gruppen führt. Die Inkubation mit NEM erfolgte für 15 min bei RT.

3.3.7.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen wurde durch eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1979) durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, indem SDS an die Proteine angelagert wird, was zu einer der Länge der Aminosäurekette proportionalen negativen Ladung der Proteine führt und deren Eigenladung maskiert, so dass diese vernachlässigt werden kann. Die Proteine wurden bei der Elektrophorese zunächst in einem Sammelgel mit 4,5 % Polyacrylamid und einem pH-Wert von 6,8 bei 17 mA auf eine Lauffront konzentriert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann in Abhängigkeit von ihrer Molekularmasse und ihrer Nettoladung in einem Trenngel mit einer Polyacrylamid-Konzentrationen von 7,5 - 12,5 %, und einem pH-Wert von 8,8 bei einer Stromstärke von 34 mA. Als Molekulargewichts-Standard wurde ein vorgefärbter Protein-Marker der Firma Biorad verwendet. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel je nach Versuchsansatz unterschiedlich weiterbehandelt. Der Nachweis nicht-radioaktiv markierter Proteine erfolgte durch die Färbung mit Coomassie-Brilliant Blue (Abschnitt 3.3.7.4). Zum Nachweis [³⁵S]-markierter Proteine wurde mit Gel eine

Fluorographie (Abschnitt 3.3.7.3.) durchgeführt. Anschließend wurde das Gel getrocknet (40 min bei 80 °C unter Vakuum).

3.3.7.3. Fluorographie

Mit Hilfe der Fluorographie wurde die schwache β -Strahlung von [³⁵S]-markierten Proteinen genutzt, um einen Fluoreszenzfarbstoff anzuregen und so die Schwärzung eines Röntgenfilms zu verstärken. Zu diesem Zweck wurde das SDS-Gel zunächst durch Inkubation in 25 % (v/v) Isopropanol und 10 % (v/v) Essigsäure fixiert (1 h bei RT) und anschließend zweimal 20 min in DMSO gewaschen. Es folgte die Inkubation (2 h bei RT) in der Fluoreszenzfarbstoff-Lösung (Rotifluoroszint, Roth). Durch 30 min wässern wurde der Fluoreszenzfarbstoff ausgefällt. Anschließend wurde das Gel getrocknet (Abschnitt 3.3.7.2.). Die Banden wurden durch die Exposition eines Röntgenfilms (X-OMAT AR, Kodak) detektiert.

3.3.7.4. Coomassie-Färbung

Das Gel wurde 30 min in einer Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) gefärbt. Nach der Entfärbung in 10 % Ethanol mit 10 % Essigsäure bis zu der gewünschten Intensität wurde das Gel getrocknet (Abschnitt 3.3.7.2.).

3.3.8. Das *Yeast-Two-Hybrid*-System

Das *Yeast-Two-Hybrid*-System wurde zu der *in-vivo* Kartierung der Interaktionsdomänen bezüglich der Interaktion der Dlk und CDC5 angewendet. Es basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell unabhängigen Domänen bestehen. So enthält der GAL4-Transkriptionsaktivator der Hefe eine DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und eine transkriptionsaktivierende Domäne (AD). Die DNA-BD erkennt und bindet an eine als UAS („*upstream activating sequence*“) bezeichnete Sequenz stromaufwärts von GAL4-responsiven Domänen, während die AD mit anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie interagiert, die an der Initiation der Transkription beteiligt sind. Beide Domänen, die im Normalfall Teile eines einzigen Proteins sind, werden gleichermaßen zur Aktivierung eines Gens benötigt. Werden beide jedoch in derselben Wirtszelle infolge einer Manipulation getrennt exprimiert, kommt es zu keiner direkten Interaktion von DNA-BD und AD und somit auch zu keiner Aktivierung GAL4-responsiver Gene. Im *Yeast-Two-Hybrid*-System wurden zwei verschiedene Klonierungsvektoren benutzt, um getrennte Fusionen dieser beiden GAL4-Domänen mit Teilen von der Dlk und CDC5 zu konstruieren, deren Interaktionsdomänen genauer analysiert werden sollten.

Der in dieser Arbeit verwendete Hefestamm enthielt in seinem Genom drei Reportergene (*Ade2*, *His3* und *LacZ*) unter Kontrolle von unterschiedlichen GAL4-induzierbaren Promotoren (Gal1, Gal2 und Mel1). Des Weiteren ist er auxotroph für die Aminosäuren Adenin, Tryptophan, Histidin und Leucin, was eine effiziente Selektion ermöglicht. Eine erfolgreiche Transformation beider Klonierungsvektoren, die unter anderem die Gene für die Synthese von Leucin und Tryptophan enthalten, wurde nachgewiesen durch das Wachstum der transformierten Hefezellen auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan. Anschließend war eine direkte Interaktion von verschiedenen Fragmenten von der Dlk und CDC5 durch das Wachstum dieser Hefezellen auf SD-Medium ohne Adenin oder Histidin nachweisbar.

3.3.8.1. Transformation von Hefen

Vor der eigentlichen Transformation wurden kompetente Hefezellen hergestellt. Dazu wurde eine Übernachtskultur in 50 ml YPD Medium auf eine $OD_{600} = 0,2$ verdünnt und bei 30 °C inkubiert bis zu einer OD_{600} von 0,6. Die Zellen werden dann 5 min bei 2000 Upm sedimentiert, zweimal mit H₂O und einmal mit LiAc/TE gewaschen und in 1 ml LiAc/TE aufgenommen. Anschließend wurde der Transformationsansatz, der sich wie unter Abschnitt 2.4.3.3. angegeben zusammensetzt, zu den kompetenten Hefezellen gegeben und unter Schütteln 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42 °C. Danach wurden die Zellen für 30 sec bei 14000 Upm sedimentiert, in 100 μ l H₂O aufgenommen und auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan ausplattiert. Da die verwendeten Plasmide Gene enthalten, die für die Synthese von Leucin und Tryptophan benötigt werden, konnten nur die Hefezellen, die beide Plasmide aufgenommen haben, in Abwesenheit dieser Aminosäuren wachsen. Um eine Interaktion der exprimierten Teilfragmente von der Dlk und CDC5 zu untersuchen, wurden die Hefekolonien nach 3 bis 5 Tagen auf SD-Medium ohne Adenin und ohne Histidin ausgestrichen und einer Wachstumsanalyse unterzogen.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse der Dlk und CDC5 Interaktionen

Zu Beginn der Arbeit lagen bereits einige Erkenntnisse über mögliche Interaktionspartner der Dlk vor. So wurde in einem herkömmlichen Hefe „*two-hybrid*“- System mit dem GAL4-Dlk Fusionsprotein verschiedene cDNAs isoliert, die für die Transkriptionsfaktoren ATF4, AATF sowie das proapoptotische Protein Par-4 kodieren. Diese waren durch verschiedene Experimente bereits als Interaktionspartner der Dlk bestätigt [33;51]. Ein weiterer cDNA-Klon mit einer Länge von 795 bp, der identisch war mit dem 3' Bereich des Homologs des *S. pombe* CDC5-like Gens aus der Ratte und ein offenes Leseraster von 264 Kodons aufwies, wurde in dieser Arbeit charakterisiert. Dabei galt es zunächst die gesamte kodierende Sequenz zu klonieren, die Interaktion zu bestätigen und deren biologische Auswirkung zu untersuchen. Eine schematische Darstellung von CDC5-like mit den strukturellen Motiven zeigt Abbildung 4. Zur Vereinfachung wird im Folgenden das CDC5-like Protein als CDC5 bezeichnet.

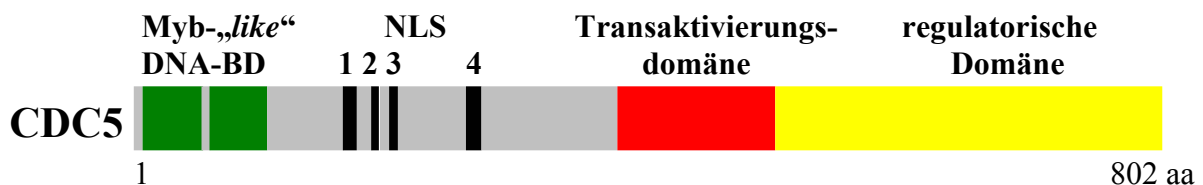


Abb. 4. Schematische Darstellung von CDC5 mit den strukturellen Motiven

CDC5 besteht aus 802 aa und ist ein Phosphoprotein mit mehreren putativen Phosphorylierungsstellen für die Kinasen CkII, MAPK, sowie PKA und PKC. Es enthält eine Myb-,like-DNA-Bindungsdomäne (BD, grün) bestehend aus zwei Myb-,repeats“ bzw. einem Myb-,like-repeat“, sowie vier Kernlokalisationssignalen (NLS, schwarz), eine funktionelle Transaktivierungsdomäne (rot) und eine C-terminal gelegene regulatorische Domäne (gelb).

4.1.1. Isolierung der Ratten CDC5 cDNA

Aufgrund von GenBank-Analysen wurde die vollständige Länge der CDC5 cDNA mit 2847 bp und einem offenem Leseraster von 802 Aminosäuren bestimmt (GenBank accession no. AF000578.2). Diese Länge ist annähernd 550 bp kürzer als die entsprechenden humanen und murinen cDNAs. Die Isolierung der CDC5 cDNA erfolgte mittels PCR mit einer cDNA

Bibliothek aus 208F Fibroblasten. Die verwendeten Primer (siehe Abschnitt 2.7.3.) wurden abgeleitet aus der veröffentlichten cDNA Sequenz im Bereich kurz vor dem Startcodon und in unmittelbarer Nähe hinter dem Stopcodon. Das PCR-Produkt mit einer Länge von 2425 bp wurde in den pBluescript SK II⁽⁺⁾-Vektor kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalysen waren vollständig konform mit der publizierten cDNA. Die vollständige Verifizierung der isolierten CDC5 cDNA erfolgte durch ein *in-vitro* gekoppeltes Transkriptions/Translations System. Das Translationsprodukt hatte eine Größe von 105 kDa (Abb. 5A, Spur 2), entsprechend der zuvor berechneten Größe. Der leere pBluescript SK II⁽⁺⁾-Vektor führte zu keinem Produkt (Abb. 5A, Spur 1).

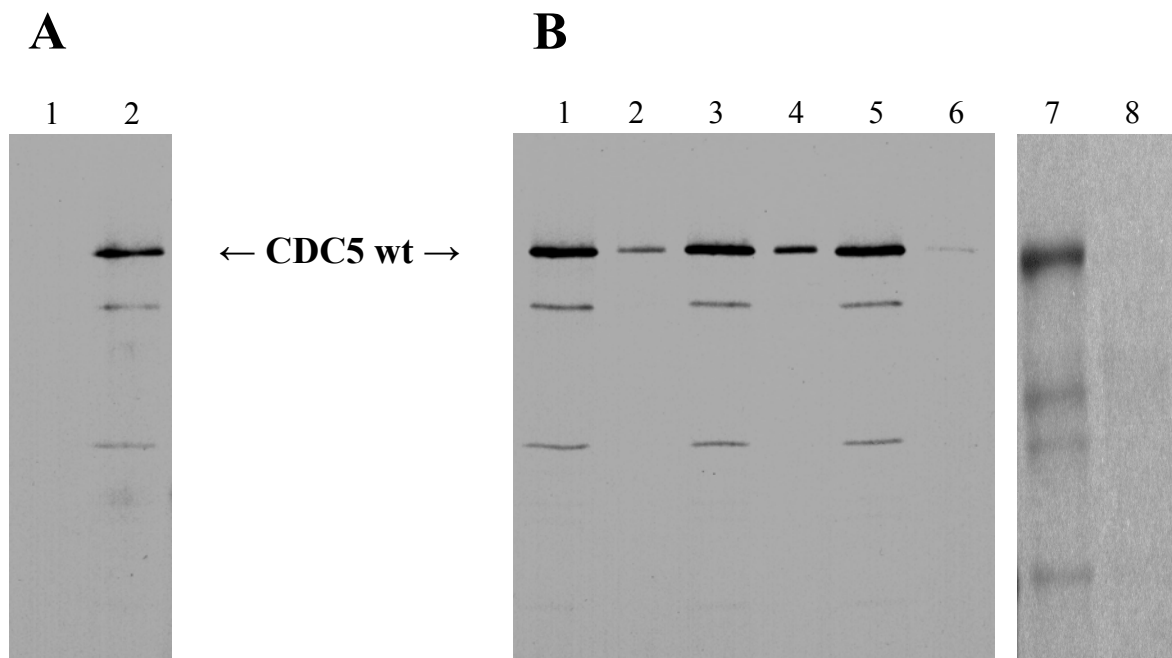


Abb. 5. *In-vitro* Translation von CDC5 und Bindungsanalysen von CDC5 mit der Dlk

A: Verifizierung der isolierten CDC5 cDNA erfolgte durch ein *in-vitro* gekoppeltes Transkription/Translation System. Das mit [³⁵S] Methionin markierte Translationsprodukt wurde auf einem 10% SDS-PAGE analysiert und hat eine Größe von 105 kDa (Spur 2). Der leere pBluescript⁺-Vektor führte zu keinem Translationsprodukt (Spur 1).

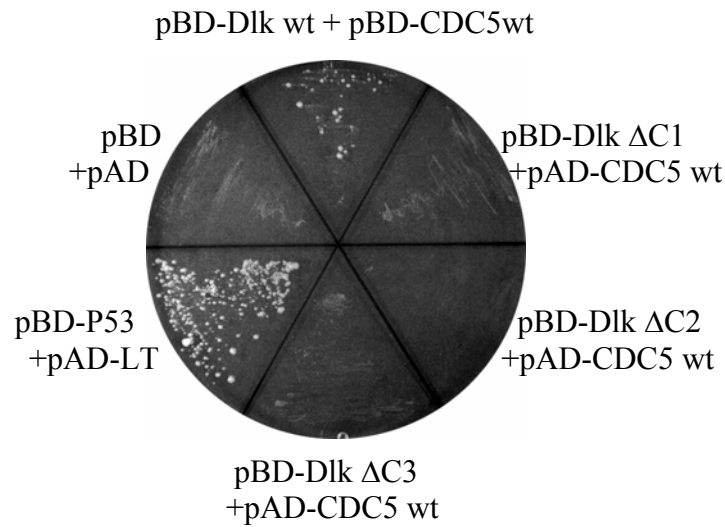
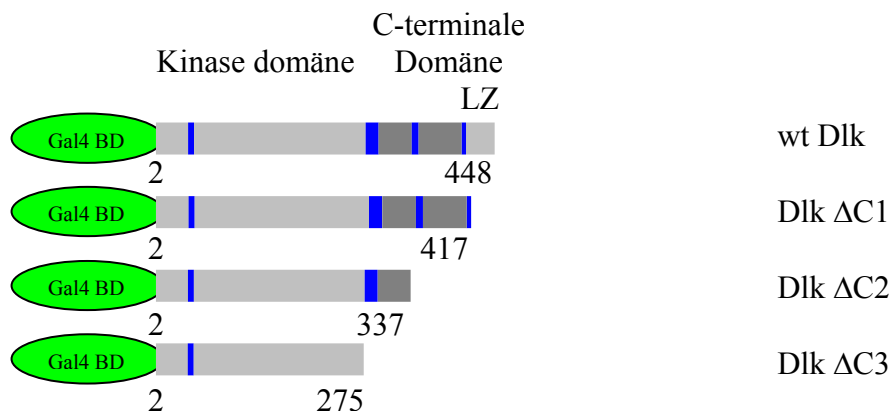
B: *In-Vitro* Interaktionsanalysen zwischen Dlk und CDC5. [³⁵S] Methionin markiertes CDC5 wurde mit aus dem Baculovirussystem gewonnenem und aufgereinigtem His-Tag gekoppeltem Dlk inkubiert, anschließend über Ni-Agarose eluiert und auf einem 10% SDS-PAGE analysiert. Spur 2 zeigt die Dlk/CDC5 Interaktion. Ebenso zeigt Spur 4 die Bindung von CDC5 mit His-Tag gekoppeltem AATF. Die Negativkontrollen zeigten keine Bindung von CDC5 an reine Ni-Agarose (Spur 6) bzw. an mit uninfizierter Baculovirus Zellextrakt abgesättigte Ni-Agarose (Spur 8). Die Spuren 1, 3, 5 und 7 zeigen ein Aliquot des eingesetzten [³⁵S] Methionin markierten CDC5 in der jeweils folgenden Bindungsanalyse.

4.1.2. *In-Vitro* Interaktionsanalysen zwischen Dlk und CDC5

Die Verifizierung der Interaktion zwischen CDC5 und Dlk erfolgte über einen *in-vitro* Bindungsassay. Hierzu wurde CDC5 *in-vitro* in einem gekoppelten Transkription/Translation System synthetisiert und mit [³⁵S] Methionin markiert und anschließend mit aus dem Baculovirussystem gewonnenem und aufgereinigtem His-Tag gekoppelter Dlk inkubiert. Anschließend wurde das His-Tag gekoppelte Dlk mit seinem neuen potentiellen Interaktionspartner CDC5 erneut an Ni-Agarose aufgereinigt. Als Negativkontrollen wurde His-AATF und uninfiltrierter Insektenzellextrakt verwendet. Die *in-vitro* Bindungsansätze wurden anschließend auf einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet (Abb. 5B). Diese Interaktionsanalysen zeigten, dass CDC5 spezifisch an His-Tag gekoppeltes Dlk bindet, aber nicht an reine Ni-Agarose bzw. an mit uninfiltriertem Baculovirus Zellextrakt abgesättigte Ni-Agarose. Überraschenderweise wurde auch eine Interaktion von CDC5 mit His-Tag gekoppeltem AATF nachgewiesen, welches ursprünglich als Negativkontrolle gedacht war.

4.1.3. Kartierung der Interaktionsdomänen

Nachdem die Interaktion zwischen Dlk und CDC5 *in-vitro* verifiziert werden konnte, sollten im Folgenden die Interaktionsdomänen zwischen diesen beiden Proteinen kartiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Deletionsmutanten von CDC5 und Dlk hergestellt und in einem Hefe „*two-hybrid*“-System verwendet. CDC5 Deletionsmutanten sowie CDC5 wt wurden mittels PCR synthetisiert und an die GAL-4 Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert, wie es in Abbildung 7B schematisch dargestellt ist. Die CDC5 Deletionsmutanten wurden so gewählt, dass immer weitere Struktur motive deletiert wurden. So beinhalteten die CDC5 Deletionsmutanten eine Verkürzung um die regulatorische Domäne (CDC5 1-500), um die Transaktivierungsdomäne (CDC5 1-377), sowie um den Bereich mit den 4 putativen NLSs zwischen der Myb-, „*like*“-DNA-Bindungsdomäne und der Transaktivierungsdomäne (CDC5 1-104). Zwei weitere CDC5 Deletionsmutanten beinhalteten hauptsächlich nur die regulatorische Domäne (CDC5 483-802) bzw. nur den N-terminalen Bereich der regulatorischen Domäne, bestehend aus 177 aa (CDC5 483-659). Die Dlk Deletionsmutanten sowie Dlk wt, gekoppelt an die GAL-4 Bindungsdomäne (BD), standen bereits aus früheren Interaktionskartierungs-Analysen der Dlk mit anderen Interaktionspartnern zur Verfügung [33] (Abb. 6B). Die Dlk Deletionsmutanten wurden ebenfalls so gewählt, dass immer weitere

A**B****Abb. 6.** Kartierung der Interaktionsdomäne von Dlk mit CDC5 wt durch „two-hybrid“-Analysen

A: Interaktionen von Gal4-AD-CDC5 wt mit Gal4-BD-Dlk Varianten. Gezeigt werden Hefe Kolonien, die auf Adenin defizienten Agarplatten wuchsen als das Ergebnis von funktionellen Interaktionen der Dlk und CDC5 Proteine. Die Kotransfektion von Gal4-BD mit Gal4-AD diente als Negativkontrolle, die von Gal4-BD-p53 mit Gal4-AD-Large T als Positivkontrolle.

B: Das Schema zeigt die verschiedenen Dlk Varianten mit der Lokalisation der katalytischen Domäne und des Leucin Zippers (in hellgrau), der nicht-katalytischen Domäne in dunkelgrau und die putativen in blau. Die funktionelle NLS ist die dem C-Terminus am nächsten gelegene.

Struktur motive deletiert wurden. So beinhalteten die Dlk Deletionsmutanten eine Verkürzung um den Leucin Zipper (Dlk Δ C1), um die argininreiche C-terminale Domäne (Dlk Δ C2), sowie den kompletten Bereich außerhalb der Kinasedomäne der Dlk (Dlk Δ C3). Danach wurde das CDC5 wt Konstrukt einzeln mit den Dlk Konstrukten (Dlk wt, Dlk Δ C1, Dlk Δ C1, Dlk Δ C3) sowie das Dlk wt Konstrukt einzeln mit den CDC5 Konstrukten (CDC5 wt, CDC5 1-500, CDC5 1-377, CDC5 1-104, CDC5 483-802, CDC5 483-659) in Hefezellen kotransformiert.

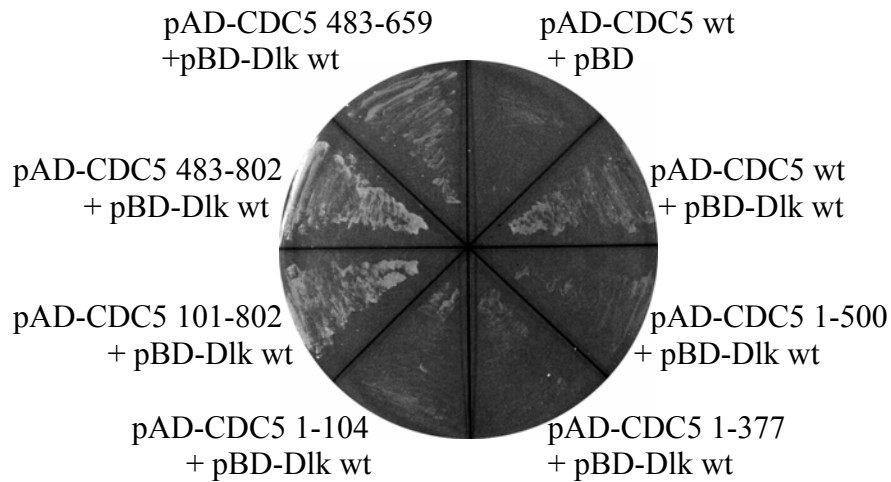
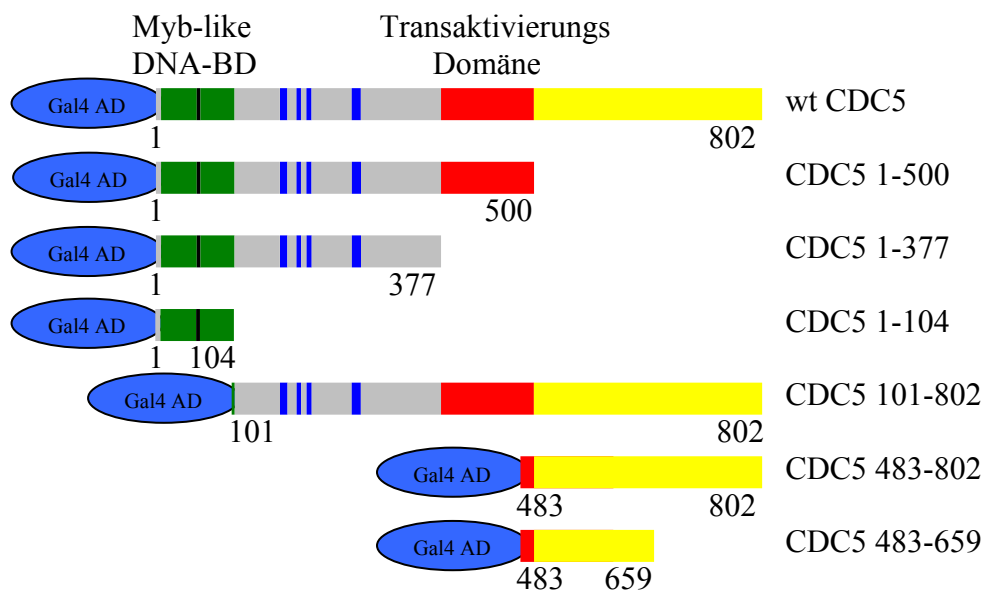
A**B**

Abb. 7 Kartierung der Interaktionsdomäne von CDC5 mit Dlk wt durch „two-hybrid“ Analysen

A: Interaktionen von Gal4-BD-Dlk wt mit Gal4-AD-CDC5 Varianten. Gezeigt werden Hefe Kolonien, die auf Adenin defizienten Agarplatten wuchsen als das Ergebnis von funktionellen Interaktionen der Dlk und CDC5 Proteine. Die Kotransfektion von Gal4-BD mit Gal4 AD-CDC5 wt diente als Negativkontrolle.

B: In dem Schemata von CDC5 werden die Myb Wiederholungen in grün, die Aktivierungsdomäne in rot und die möglichen NLS's in blau gezeigt. Der C-terminale Teil von CDC5 mit der Dlk verantwortlichen Interaktionsdomäne ist in gelb gekennzeichnet.

Die Hefezellen wurden nun mit Tryptophan- und Leucin-Mangel-Medium auf die Kotransformation hin selektioniert und anschließend die möglichen Interaktionen der

einzelnen Konstrukt-Kombinationen mittels der Adenin Autotrophie (Abb. 6A und 7A) und der β -Galactosidase Aktivität hin analysiert. Da CDC5 in der Literatur auch als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde [76], wurde das CDC5 wt Konstrukt alleine mit der GAL-4 Bindungsdomäne als Kontrollansatz in Hefezellen kotransformiert und auf Transaktivierung der Adenin-Synthese und der β -Galactosidase Aktivität hin analysiert. Es zeigte sich bei diesem Kontrollansatz (Abb. 7A) sowie bei dem allgemeinen Kontrollansatz mit der GAL-4 Aktivierungs- und GAL-4 Bindungsdomäne (Abb. 6A) keine Transaktivierung. Somit beruhten alle detektierten Transaktivierungen auf einer Interaktion der Dlk und CDC5 bzw. derer Deletionsmutanten.

Die Ergebnisse zeigten, dass auf Seiten der Dlk nur gesamt Dlk mit CDC5 wt interagiert, aber nicht Dlk Δ C1, die entsprechend um den Leucin Zipper verkürzt ist. Weitere C-terminale Deletionen innerhalb der Dlk zeigten dementsprechend keine Wechselwirkungen mit CDC5 wt (Abb. 6A). Dieses Ergebnis zeigte die Notwendigkeit des Leucin Zippers für die Wechselwirkung bezüglich der Dlk. Hinsichtlich CDC5 wurden Interaktionen detektiert zwischen Dlk wt und der im N-Terminus um 100 Aminosäuren verkürzten Mutanten CDC5(101-802), aber nicht mit Mutanten, denen im C-terminalen Bereich 302 oder mehr Aminosäurereste fehlten (Mutanten CDC5(1-500), CDC5(1-377) und CDC5(1-104); Abb. 7A). Unter Berücksichtigung, dass der CDC5 cDNA Klon aus der Hefe „*two-hybrid*“ Analyse die kodierende Region von Kodon 427 bis 690 umfasste, konnte man nun schließen, dass die Interaktionsdomäne von CDC5 mit der Dlk zwischen den Aminosäureresten 427 und 690 positioniert ist. Diese Annahme sollte mit zwei weiteren Deletionskonstrukten bestätigt werden, die aus den CDC5 Bereichen von Aminosäure 483 bis 659 (CDC5(483-659)) bzw. 483-802 (CDC5(483-802)) konstruiert wurden. Beide Mutanten zeigten Interaktionen mit Dlk wt, wobei die Interaktion der größeren Mutante stärker war. Dieses Ergebnis implizierte additive Interaktionsdomänen zwischen den Aminosäureresten 500 bis 659 und 660 bis 802.

4.1.4.1. Expression von CDC5 im Baculovirus System

Für biochemische Untersuchungen wurde ein rekombinanter Baculovirus hergestellt, der für His-Tag gekoppeltes CDC5 wt kodiert. CDC5 wurde in *SF9* Zellen exprimiert und die verschiedenen Zellfraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Es zeigte sich, dass CDC5 größtenteils mit Kernstrukturen assoziierte und sich in der schwer löslichen Kernfraktion anhäufte (Abb. 8, Spur 3), sowie es auch die im Baculovirus exprimierte Dlk und dessen Aufreinigung zeigte [10]. CDC5 wurde nun aus den Kernfraktionen über Ni-Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt (Abb. 8, Spur 8).

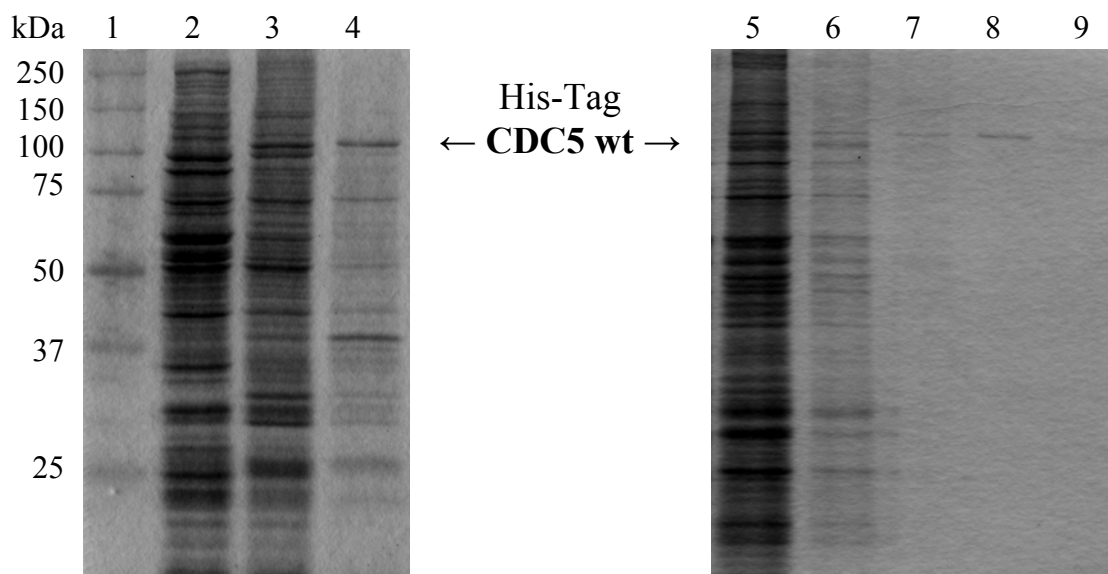


Abb 8. Expression und Aufreinigung von His-Tag gekoppelten CDC5 aus *SF9* Zellen
SF9 Zellen wurden infiziert mit His-Tag CDC5 Baculovirus und 2 Tage nach der Infektion geerntet. Die Zellen wurden lysiert und sequentiell extrahiert in eine cytoplasmatische Fraktion (Spur 2) und eine Kernfraktion (Spur 3). Der verbleibende Rest mit unlöslichen Kernstrukturen wurde ebenfalls mit auf ein 10%iges SDS-PAGE aufgetragen (Spur 4). Die Kernfraktion und der Rest zeigten ein Expressionsprodukt von ca. 105 kDa (vgl. Spur 1; Größenmarker) entsprechend der Größe von CDC5 wt.
 His-Tag gekoppeltes CDC5 der Kernfraktion (Spur 5) wurde aufgereinigt mittels Affinitätschromatographie mit Ni-Agarose. Die beladene Matrix wurde dreimal mit IMAC 50 gewaschen. Spur 6 und 7 zeigt die Matrix nach dem 1. und 3. Waschschrift. His-Tag gekoppeltes CDC5 wurde anschließend mit IMAC 300 von der Matrix eluiert (Spur 8). Restliches CDC5 wurde in einem letzten Eluat gewonnen (Spur 9).

4.1.4.2. *In-Vitro* Phosphorylierungsanalysen von CDC5

Es war bekannt, dass CDC5 ein Phosphoprotein ist und ein Substrat von CDK's darstellt [85;86]. Zusätzlich besitzt CDC5 Konsensus-Phosphorylierungs-stellen für CK2, PKA, PKC und MAP Kinase. Aufgrund der Interaktion von CDC5 mit Dlk wurden folgende Phosphorylierungsanalysen durchgeführt, die zeigen sollten, ob CDC5 ein Substrat der Dlk ist. Zu diesem Zweck wurde je aufgereinigtes His-Tag gekoppeltes Protein von CDC5 (Abb. 8, Spur 8; Abb. 9A, Spur 4) und Dlk (Abb. 9A, Spur 5) in *in-vitro* Kinaseanalysen verwendet. Als Kontrollansatz diente aufgereinigtes His-Tag gekoppeltes CDC5 ohne Dlk, sowie Dlk ohne CDC5. Das Ergebnis dieser Versuche zeigte, dass CDC5 in der Gegenwart von Dlk (Abb. 9A, Spur 2), sowie auch ohne Dlk (Abb. 9A, Spur 3) in gleichen Ausmaßen phosphoryliert wurde. Da CDC5 keine eigene Kinasedomäne besitzt und so keiner Autophosphorylierung unterliegt, war anzunehmen, dass CDC5 nicht durch die Dlk, sondern durch eine mitaufgereinigte Kinase phosphoryliert wurde. Zusätzlich erschien in den Ansätzen mit CDC5 Ansätzen mit und ohne Dlk eine phosphorylierte Proteinbande mit einer Größe von 28 kDa. Diese Bande wurde nicht gesehen in dem Ansatz der alleinig Dlk enthielt

(Abb. 9A, Spur 1) und die Autophosphorylierung der Dlk zeigte. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden exogene Substrate (MLC und Histone) nur durch die Dlk phosphoryliert, aber nicht durch die CDC5-assoziierte Kinase.

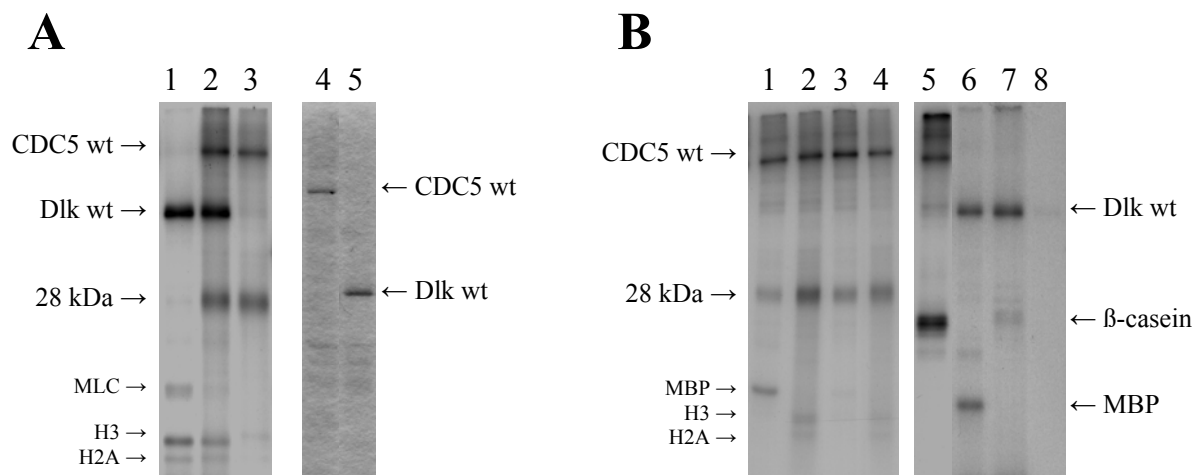


Abb. 9. *in-vitro* Phosphorylierungsanalysen von Dlk mit CDC5 als potentielles Substrat

A: Mit Ni-Agarose affinitätaufgereinigtes His-CDC5 (Spur 4) und His-Dlk (Spur 5) aus rekombinanten Baculovirus infizierten *Sf9* Zellen. Die aufgereinigten Proteine wurden mit einer 10%igen SDS-Page getrennt und mit Coomassie Blue gefärbt oder einzeln untersucht in *in-vitro* Phosphorylierungsanalysen (Spur 1: His-Dlk; Spur 3: His-CDC5) und in Kombination (Spur 2) mit einer 13.5% SDS-PAGE. Als exogene Substrate dienten MLC und eine Histon-Mischung.

B: CDC5 wird phosphoryliert durch die assoziierte CK2. Aufgereinigtes His-CDC5 (Spur 1-5) und His-Dlk (Spur 6-8) wurden in Kinasereaktionen in der Gegenwart von ATP (Spur 1, 2, 5, 6 und 7) oder GTP (Spur 3, 4 und 8) untersucht. Als exogene Substrate dienen MBP (Spur 1, 3, 6 und 8), eine Histon-(H3/H2A)-Mischung (Spur 2 und 4) oder dephosphoryliertes β-Casein (Spur 5 und 7). Die Reaktionsansätze wurden mit einer 13.5%igem (Spur 1-5) oder einer 10%igen (Spur 6-8) SDS-PAGE analysiert. Die 28 kDa Bande repräsentiert wahrscheinlich die β-Untereinheit der CK2 [2].

Die genauere Identifizierung der mitaufgereinigten Kinase erfolgte durch den Einsatz von geläufigen Substraten von Kinasen, wie z.B. dem Myelin Basis Protein (MBP) oder einer Mischung von den Histonen H3 und H2A in den Reaktionsansätzen. Mit diesen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass die CDC5-assoziierte Kinase MBP stark und die Histone H3 und H2A nur sehr schwach phosphoryliert (Abb. 9B, Spur 1 und 2). Diese Substratspezifität unterscheidet sich damit deutlich von der der Dlk, die MBP (Abb. 9B, Spur 6) und die Core-Histone H3 und H2A in gleichem Ausmaß phosphoryliert (Abb. 9A, Spur 1). Aufgrund der Kenntnis, dass CK2 im Baculovirussystem eine oft mitaufgereinigte Kinase ist [51], wurde in weiteren Ansätzen GTP anstatt ATP als Phosphat-Donor verwendet und β-Casein als zusätzliches Substrat eingesetzt. Es zeigte sich, dass die mitaufgereinigte Kinase von CDC5 MBP bzw. H3/H2A ebenso unter Verwendung von GTP phosphoryliert (Abb. 9B, Spur 3 bzw. 4), wie es auch unter Verwendung von ATP für MBP bzw. H3/H2A gezeigt werden konnte (Abb. 9B, Spur 1 bzw. 2). Nur war die Phosphorylierung von MBP mit ATP stärker .

Ebenso wurde CDC5 und das 28 kDa Protein mit GTP als Phosphat-Donor phosphoryliert (Abb. 9B, Spur 3 bzw. 4). Zusätzlich phosphoryliert die CDC5 assoziierte Kinase β -Casein (Abb. 9B, Spur 5). Im Gegensatz dazu diente GTP nicht als Phosphat-Donor für Dlk (Abb. 9B, Spur 8) und ebenso war β -Casein mit ATP ein sehr schwaches Substrat für Dlk (Abb. 9B, Spur 7) im Gegensatz zu MBP (Abb. 9B, Spur 6).

Die letzte Verifizierung, dass CDC5 durch CK2 phosphoryliert wird, erfolgte unter Verwendung des CK2 spezifischen Inhibitors Heparin (daten nicht gezeigt). Die Phosphorylierung von CDC5 und β -Casein mit ATP bzw. GTP wurde durch Heparin effizient unterdrückt. Dlk, die unter diesen Bedingungen nicht inhibiert wird, war dennoch nicht in der Lage CDC5 zu phosphorylieren. Diese Daten zeigten, dass das CDC5 aus *SF9* Zellen stark mit CK2 assoziiert ist und ebenso effizient durch CK2 phosphoryliert wird. Die phosphorylierte 28 kDa Proteinbande zeigte mit großer Wahrscheinlichkeit die regulatorische β -Untereinheit der Insekten CK2, die durch die eigene katalytische α -Untereinheit phosphoryliert wird [2]. Andererseits schien CDC5 kein Substrat der Dlk zu sein, zumindestens nicht in *in-vitro* Systemen.

4.1.5. RT-PCR Expressionsanalysen

Für weiterführende Experimente wie z.B. die Zelllokalisations- und *in-vivo* Interaktionsanalysen mittels Fluoreszenzmikroskopie sollte nun die Expression von CDC5 und Dlk in verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Dies sollte sicherstellen, dass die Zelllinien, mit denen die Fluoreszenzanalysen durchgeführt werden sollten, kaum endogenes CDC5 bzw. Dlk exprimieren, um so die Bildung von Artefakten und somit von Fehlinterpretationen aufgrund einer Überexpression von endogenem und exogenem CDC5 bzw. Dlk zu vermeiden. Die verwendeten Primer (siehe Abschnitt 2.7.3.) wurden aus einem Sequenzabschnitt der jeweiligen cDNA entnommen, die bei der Ratte und dem Menschen identisch waren.

Die RT-PCR Analysen in Bezug auf CDC5 zeigten eine gleich schwache Transkription in den 3 getesteten Rattenzelllinien (REF52.2, 208F, PC12), in demselben Ausmaß wie in den humanen HeLa Zellen (Abb. 10A). In humanen MCF-7 Zellen konnten keine CDC5 Transkripte detektiert werden, wo hingegen die humanen Saos-2 Zellen eine höhere Transkriptionsmenge an CDC5 zeigten als die GAPDH Kontrolle (Abb. 10A). Die Dlk RT-PCR Analysen ergaben eine geringe Transkriptionsmenge in den REF52.2-, 208F-, Saos-2, MCF-7-Zellen und eine höhere Transkriptionsmenge in den PC12-Zellen (Abb. 10B). In HeLa-Zellen wurden anfänglich keine Dlk-Transkripte detektiert (Abb. 10B). Dies stand im

Widerspruch zu der Arbeitsgruppe von Maki Murata-Hori [87], die aus HeLa-Zellen die humane Dlk-cDNA isoliert hatten. Um diesen Widerspruch aufzuklären wurde in weiteren RT-PCR Analysen bezüglich der Dlk die Zyklenzahl von 35 auf 40 erhöht. Neben HeLa-Zellen wurden auch die humanen medulloblastoma Zellen D-283 mit in die Analyse miteinbezogen; die zuvor negativ auf endogenes Dlk getestet wurden [8]. Bei dieser hohen Zyklenzahl bzw. sensitiveren Nachweismethode konnten letztendlich Dlk-Trankripte in beiden Zelllinien (HeLa und D-283) identifiziert werden (Abb. 10C), allerdings nicht in dem Maße wie in den parallel getesteten PC12-Zellen.

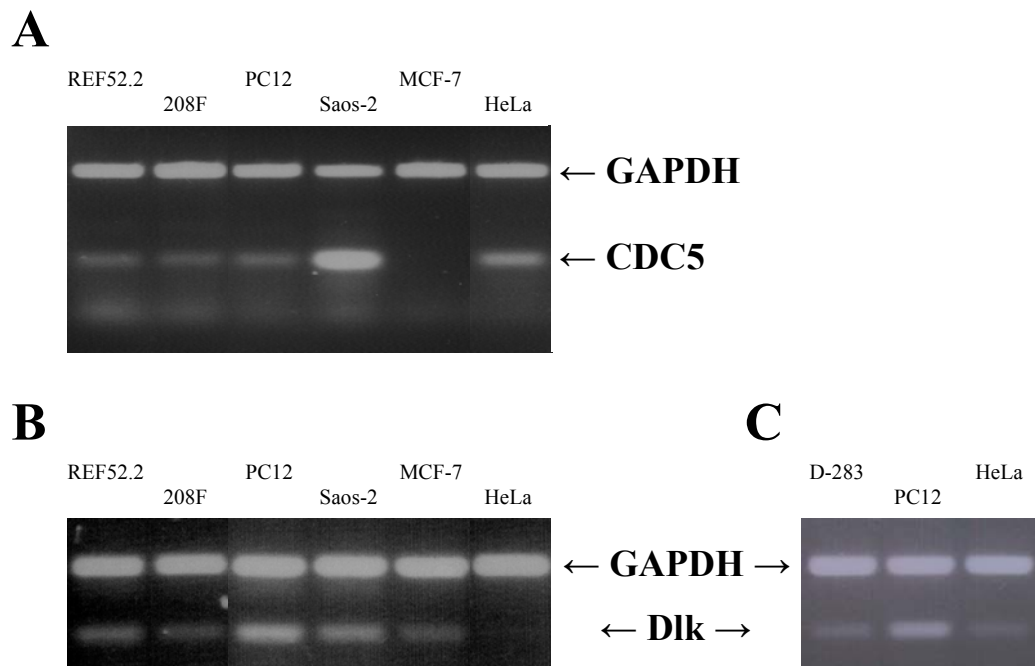


Abb. 10. RT-PCR Expressionanalysen von CDC5 und Dlk in verschiedenen Zelllinien

A: Expressionsanalysen von CDC5 in verschiedenen Zelllinien aus der Ratte und dem Menschen. Die RT-PCRs wurden mit 15 Zyklen ($T_m = 56^\circ\text{C}$) und direkt im Anschluß mit weiteren 20 Zyklen ($T_m = 50^\circ\text{C}$) durchgeführt, um dem CDC5-Produkt (Primer- $T_m = 56^\circ$) einen Vorteil bei der Amplifikation gegenüber dem GAPDH-Produkt zu ermöglichen, welches als Kontrolle diente. Das CDC5 RT-PCR Produkt hatte eine Größe von 113 bp.

B: Expressionsanalysen von Dlk in verschiedenen Zelllinien aus der Ratte und dem Menschen. Die RT-PCR Bedingungen entsprachen denen der CDC5 RT-PCR Analysen (siehe A). Das Dlk RT-PCR Produkt hatte hingegen eine Größe von 174 bp.

C: Erweiterte Expressionsanalysen von Dlk in den Zelllinien D-283, PC12 und HeLa. Die RT-PCRs wurden allerdings mit 15 Zyklen ($T_m = 56^\circ\text{C}$) und direkt im Anschluß mit weiteren 25 Zyklen ($T_m = 50^\circ\text{C}$) im Gegensatz zu 20 Zyklen bei A) und B) durchgeführt. Mit diesen erweiterten und somit sensitiveren RT-PCR Bedingungen konnte endogenes Dlk auch in D-283- und HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

4.1.6. Subzelluläre Lokalisation

Eine mögliche *in-vivo*-Interaktion von CDC5 und Dlk wurde als nächstes mittels Koexpression in REF52.2 Zellen und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dlk wurde als

GFP-gekoppeltes Fusionsprotein und CDC5 als dsRED- oder FLAG-gekoppeltes Fusionsprotein exprimiert. Für die Fluoreszenz Analysen wurden alle Plasmidkonstrukte in minimalen Mengen verwendet (≤ 50 ng DNA) um Artefakte durch eine Überexpression zu vermeiden. Expression von CDC5 alleine zeigte eine punktuelle Kernverteilung (Abb. 11A, C oder D; jeweils oben), in Übereinstimmung mit vorherigen Publikationen [83]. Dieses Verteilungsmuster ähnelte dem des Dlk (Abb. 11B) [10]. Nach der Koexpression beider Proteine wurde diese Vermutung durch eine eindeutige Kolo-kalisation in Kernpunk-tchen bestätigt (Abb. 11C). Diese stringente Kolo-kalisation von CDC5 konnte nicht mit der um den Leuzin Zipper deletierten Mutanten Dlk Δ C1 (siehe Abb. 11D) detektiert werden. In diesem Fall, zeigt Dlk Δ C1 für gewöhnlich mehr eine diffuse Kernverteilung, wie es auch zuvor schon beobachtet wurde [11], während CDC5 die punktuelle Verteilung beibehält (Abb. 11D). Dieses Ergebnis korrelierte mit den gewonnenen Daten aus dem Hefe „two-hybrid“ Analysen, die zeigten, dass die Interaktion von Dlk mit CDC5 durch seinen Leuzin Zipper vermittelt wird. Im Gegensatz dazu schien die Assoziation von CDC5 in so genannten Kern-„speckles“ nicht von der Dlk abhängig zu sein.

4.1.7. Bestimmung des Kern-Lokalisations-Signals von CDC5

Aufgrund der primären Proteinstruktur von CDC5 und dem Vergleich mit bekannten Sequenzmotiven erkannte man 4 putative Kernlokalisations-signale (NLS's), die zwischen den Aminosäureresten 165 und 271 lagen. Die Kartierung der funktionellen NLS erfolgte durch die Synthese zweier Deletionsmutanten, die die Reste 1-254 (FLAG-N-CDC5) bzw. 255-802 (FLAG-N-CDC5) beinhalteten, und so die NLS's 1-3 von NLS 4 separierte (Abb. 12A). Die Deletionskonstrukte wurden als FLAG-gekoppelte Fusionsproteine in REF52.2 Zellen exprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Es zeigte sich, dass beide Mutanten effizient in den Zellkern transportiert wurden (Abb. 12B, 12C) und somit eine oder mehrere der NLS's 1-3 in dem Konstrukt FLAG-N-CDC5 und NLS 4 in der Mutante FLAG-C-CDC5 ausreichend waren für den direkten Kerntransport. Allerdings wiesen beide Deletionsmutanten eine diffuse Kernverteilung anstatt einer punktuellen Verteilung gegenüber dem CDC5 wildtyp auf. Dies suggerierte, dass das vollständige CDC5 bzw. der Bereich um die Aminosäurereste 240- 270 für die Assoziation mit den sogenannten Kern-„speckles“ benötigt wird.

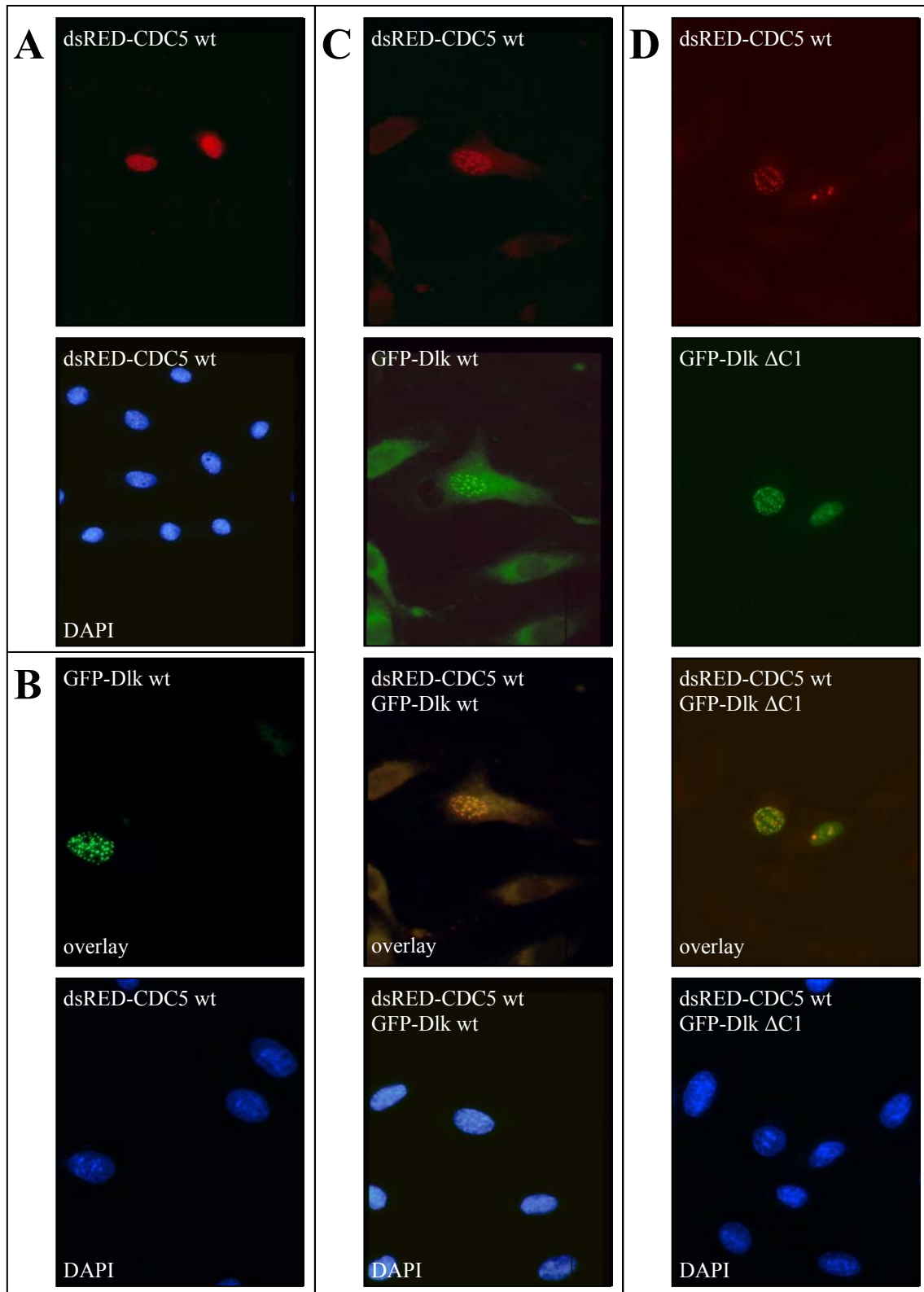


Abb. 11. Koexpression und subzelluläre Lokalisation von CDC5 und Dlk
 REF52.2 Zellen wurden transfiziert mit kodierenden Expressionsplasmiden für dsRED-CDC5 wt (A), GFP-Dlk wt (B) und kotransfiziert mit dsRED-CDC5 wt und GFP-Dlk wt (C) bzw. GFP-Dlk Δ C1 (D) (siehe Schema Abb. 2 B). Nach 20 h wurden die Zellen fixiert und nukleare DNA mit DAPI angefärbt. Jede Bilderreihe zeigt das individuelle fluoreszierende Protein, die entsprechende DAPI-Färbung und, im Falle von kotransfizierten Zellen (C und D), die überlagerten Bilder von dsRED-CDC5 wt und GFP-Dlk wt bzw. GFP-Dlk Δ C1.

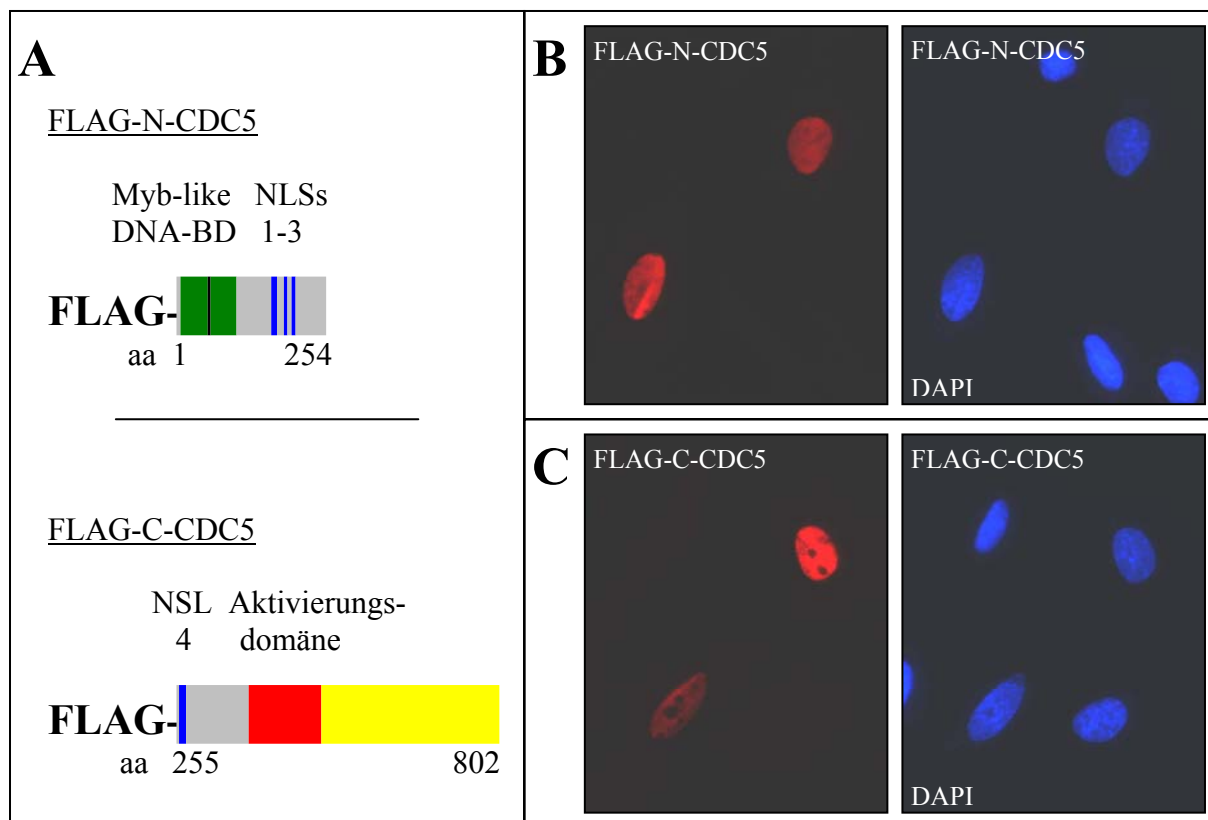


Abb. 12. Zelluläre Lokalisation von Deletionsmutanten von CDC5

A: Die schematische Darstellung zeigt die verwendeten Deletionsmutanten von CDC5 zur Kartierung der funktionellen NLSs. Zur Unterscheidung von GFP- bzw. dsRED gekoppelten Fusionsproteinen, wurden FLAG gekoppelte Fusionsproteine verwendet.

B - C: Die Deletionsmutanten FLAG-N-CDC5 (Aminosäure 1-254) und FLAG-C-CDC5 (Aminosäure 255-802) wurden in REF52.2 Zellen exprimiert. 20 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Fusionsproteine durch indirekte Immunfluoreszenz mit anti-FLAG M-2 als primären und Cy3-konjugierten sekundären Antikörpern detektiert (jeweils links). Zusätzlich wurden die Zellen mit DAPI angefärbt, um die Zellkerne zu visualisieren (jeweils rechts).

4.1.8. Analyse der Dimerisierungsdomäne von CDC5

In weiteren Analysen, die zeigen sollten inwieweit die Dlk das zelluläre Verteilungsmuster der CDC5 Deletionsmutanten (siehe Abb. 12A) beeinflusst, wurden diese in REF52.2 Zellen koexprimiert mit Dlk wildtyp oder mit der um den Leuzin Zipper verkürzten Mutante Dlk Δ C1. Interessanterweise zeigte sich, dass nach der Koexpression von Dlk wt das C-terminale Fragment (Abb. 13-1A), aber nicht das N-terminale Fragment (Abb. 13-1B) von CDC5 wieder eine punktuelle Kernverteilung aufwies. Diese Relokalisation war nicht mit Mutante Dlk Δ C1 zu sehen (Abb. 13-1C, D), wie es mit den gewonnenen Daten aus den Hefe „two-hybrid“ Analysen zu erwarten war. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass Dlk CDC5 über das C-terminale Ende von CDC5 in die so genannten Kern-„speckles“ rekrutieren kann.

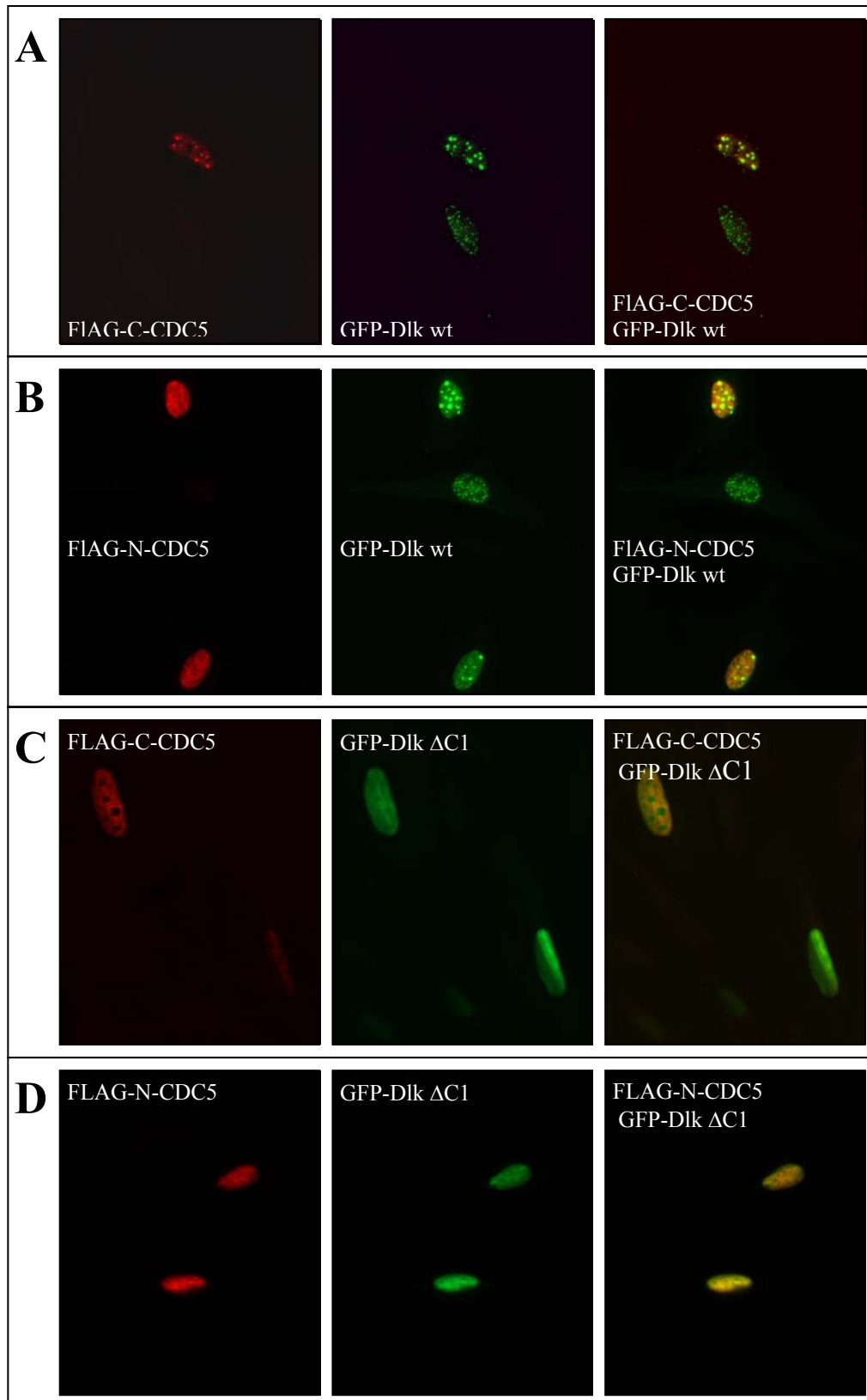


Abb. 13-1. Analyse der Dimerisierungsdomäne von CDC5
 Die Deletionsmutanten FLAG-C-CDC5 (A und C) und FLAG-N-CDC5 (B und D) (siehe Schema **Abb. 9 A**) wurden in REF52.2 Zellen koexprimiert mit GFP-Dlk wt (A und B) bzw. GFP-Dlk Δ C1 (C und D). 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die FLAG-Fusionsproteine durch indirekte Immunfluoreszenz (siehe **Abb. 9**) visualisiert. Die rechten Bilder zeigen die Überlappung der beiden vorherigen Bilder.

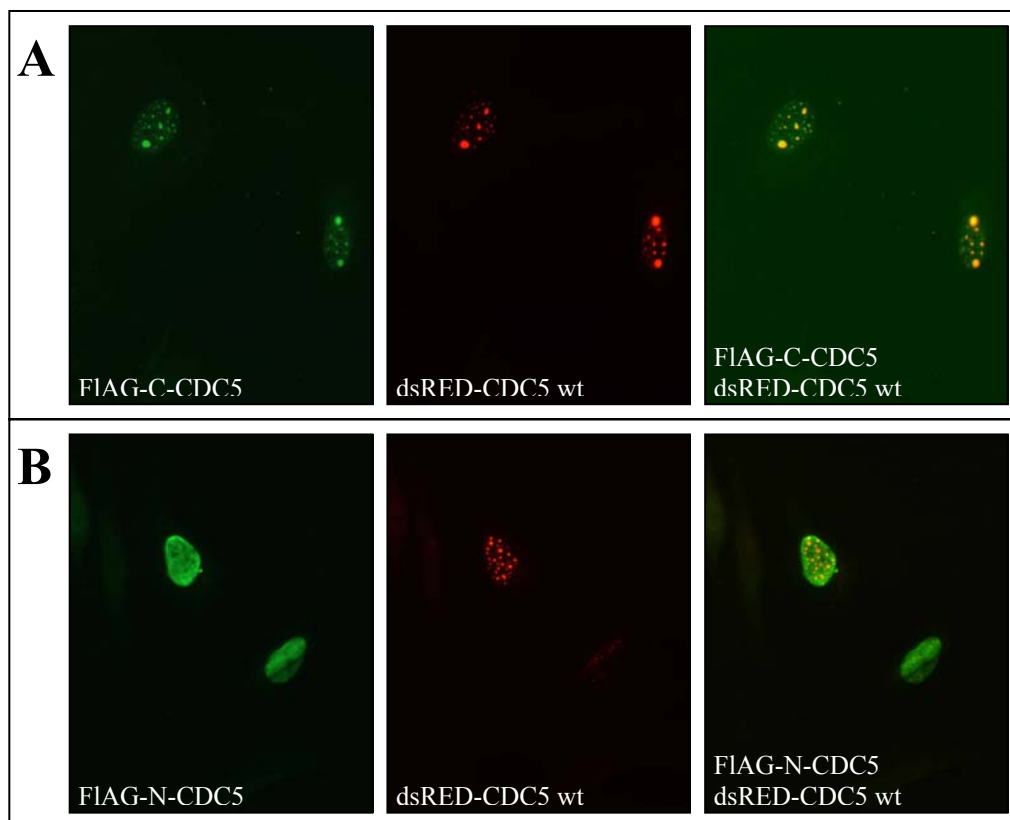


Abb. 13-2. Analyse der Dimerisierungsdomäne von CDC5

Die Deletionsmutanten FLAG-C-CDC5 (**A**) und FLAG-N-CDC5 (**B**)(siehe Schema **Abb. 9 A**) wurden in REF52.2 Zellen koexprimiert mit dsRED-CDC5 wt (**A** und **B**). 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die FLAG-Fusionsproteine durch indirekte Immunfluoreszenz (siehe **Abb. 9**) visualisiert. Die rechten Bilder zeigen die Überlappung der beiden vorherigen Bilder.

Aufgrund der Symmetrie des DNA Bindungsmotives von CDC5, wurde in einer früheren Publikation [88] angenommen, dass CDC5 Homodimere bilden kann. Diese Hypothese wurde nun überprüft durch die Verwendung der zuvor beschriebenen Deletionsmutanten von CDC5 und CDC5 wildtyp. Sollte CDC5 die Fähigkeit zur Homodimerisierung besitzen, so würde eine Koexpression einer der Deletionsmutanten mit dem Wildtyp zu einer punktuellen Kern Relokalisation der Mutanten führen. Dies war tatsächlich der Fall für das C-terminale Fragment (Abb. 13-2A), aber nicht für das N-Terminale Fragment (Abb. 13-2B) von CDC5. Diese Tatsache bewies, dass CDC5 die Fähigkeit zur Homodimerisierung über das C-terminale Ende besitzt.

4.1.9. Kolokalisationsanalysen mit Kernproteinen (PML, PSP-1)

Es wurde in einer vorherigen Publikation gezeigt, dass Dlk partiell mit PML „bodies“ kolokalisiert [11]. Diese Strukturen repräsentieren eine Ansammlung von verschiedenen Proteinen, die insbesondere in der Zellzyklus Regulation, der transkriptionellen Regulation

und der Apoptose involviert sind [89;90]. Um zu zeigen in welchem Ausmaß CDC5 mit der Lokalisation von PML „bodies“ korreliert, wurden REF52.2 Zellen mit dsRED-CDC5 wt transfiziert, nach 24 h fixiert, indirekten Immunfluoreszenz Analysen gegen das PML Protein unterzogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Analysen ergaben, das CDC5 in einem ähnlichem Ausmaß mit PML „bodies“ assoziiert ist (Abb. 14), wie es zuvor für die Dlk gezeigt werden konnte [11].

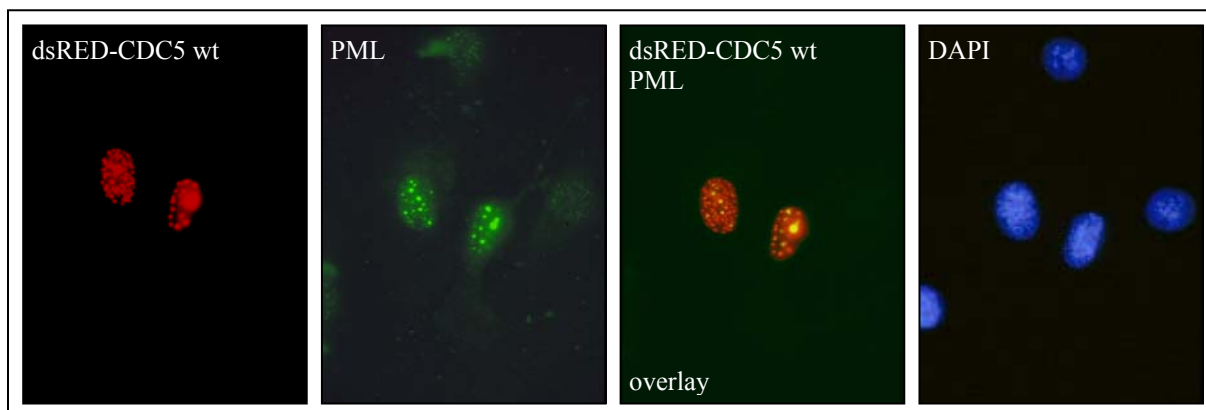


Abb. 14. CDC5 kolokalisiert teilweise mit PML “bodies“

Die Expression von dsRED-CDC5 wt und die Visualisierung von endogenem PML mittels indirekter Immunofluoreszenz in REF52.2 Zellen zeigte die partielle Kolokalisation von CDC5 mit PML “bodies“ im Zellkern (verdeutlicht durch die DAPI Anfärbung von nuklearer DNA im rechtem Bild).

Im Weiteren wurden auch *in-vivo* Kolokalisations Analysen mit weiteren Kernproteinen durchgeführt, unter anderem mit PSP1 (Paraspeckle Protein 1). Dieses Protein wurde bei einer proteomischen Analyse von aufgereinigten humanen Nucleoli neben einer Vielzahl von anderen Proteinen entdeckt [91]. Es zeigte eine punktuelle Kernverteilung, ähnlich dem von Dlk und CDC5, und wurde mir von Herrn A.I. Lamond als GFP-gekoppeltes Fusionsprotein zur Verfügung gestellt. Die Koexpression von PSP1 mit Dlk bzw. CDC5 zeigte allerdings keine korrelierende *in-vivo* Kolokalisation (Daten nicht gezeigt).

4.1.10. Kolokalisationsanalysen mit Spleißfaktoren

Humanes CDC5 zeigte eine Kolokalisation mit dem Spleiß-Faktor SC35 [83], einem Mitglied der SR Protein Familie, der im Allgemeinen als Marker von Spleißosomen und „speckles“ verwendet wird [92;93]. In vergangenen Analysen konnte jedoch keine Kolokalisation der Dlk mit SC35 oder dem U5-116 Protein, einer weiteren Komponente des Spleißosoms, beobachtet werden [11]. Aufgrund der Tatsache, dass Dlk eindeutig mit CDC5 im Zellkern kolokalisierte, wurde diese Thematik erneut analysiert. Dazu wurden CDC5 und Dlk als

GFP gekoppelte Fusionproteine nach transients Transfektion in REF52.2 Zellen visualisiert und endogenes SC35 bzw. U5-116 durch indirekte Immunfluoreszenz mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Die individuelle subzelluläre Verteilung von SC35 (Abb. 15A) und

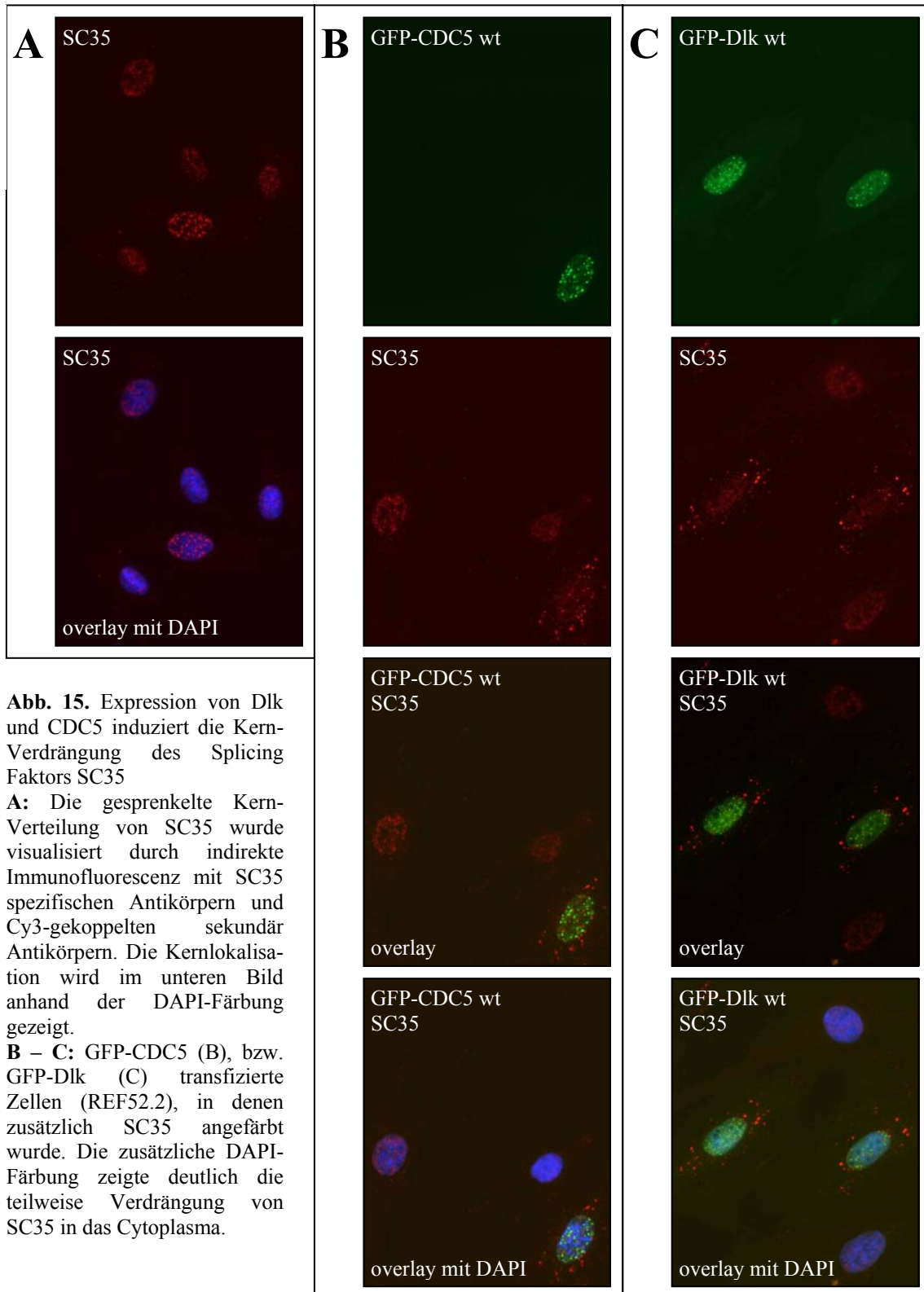
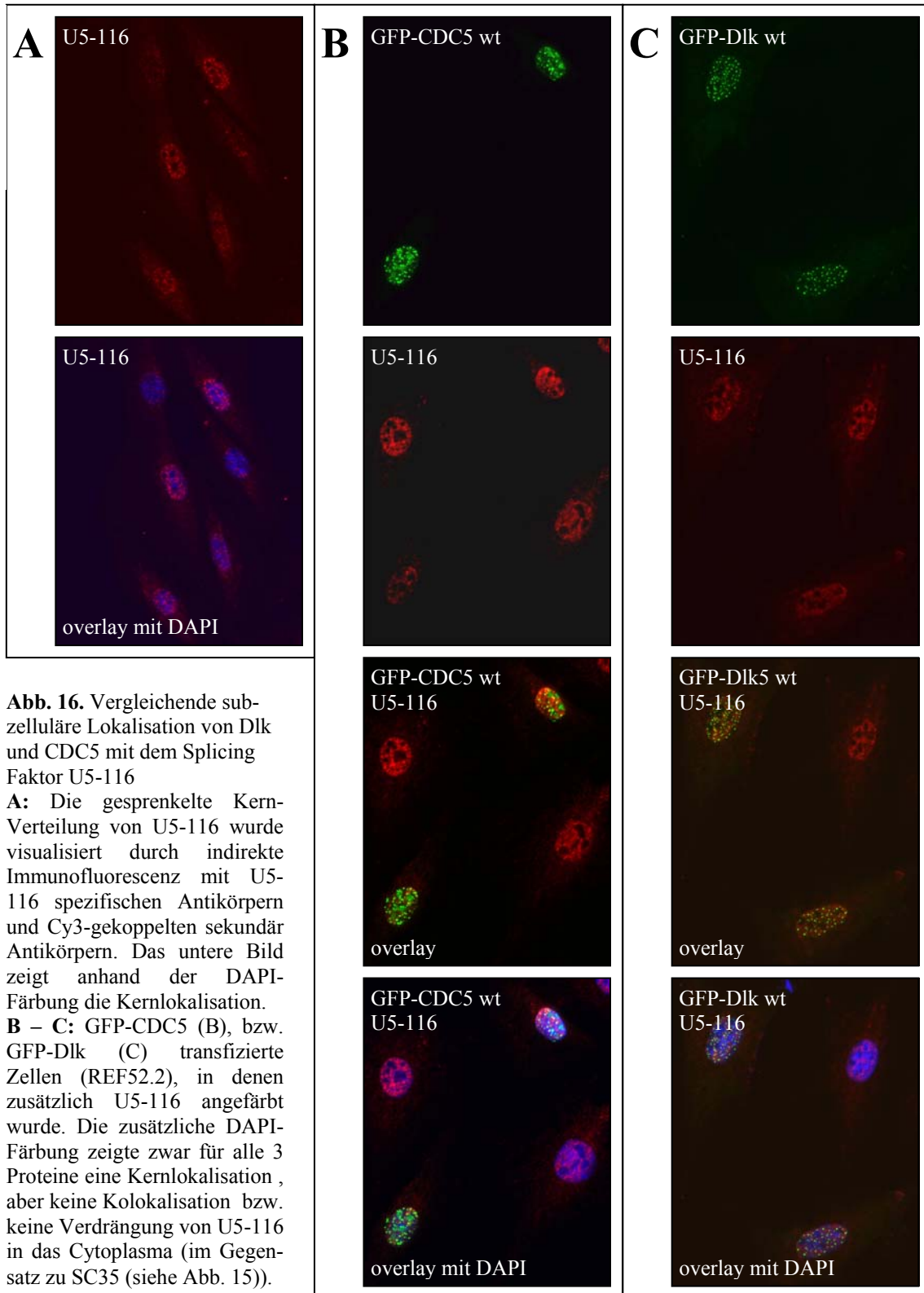


Abb. 15. Expression von Dlk und CDC5 induziert die Kern-Verdrängung des Splicing Faktors SC35

A: Die gesprenkelte Kern-Verteilung von SC35 wurde visualisiert durch indirekte Immunofluoreszenz mit SC35 spezifischen Antikörpern und Cy3-gekoppelten sekundär Antikörpern. Die Kernlokalisation wird im unteren Bild anhand der DAPI-Färbung gezeigt.

B – C: GFP-CDC5 (B), bzw. GFP-Dlk (C) transfizierte Zellen (REF52.2), in denen zusätzlich SC35 angefärbt wurde. Die zusätzliche DAPI-Färbung zeigte deutlich die teilweise Verdrängung von SC35 in das Cytoplasma.



U5-116 (Abb. 16A) zeigte eine punktuelle Zellkernlokalisierung, ähnlich dem von CDC5 und Dlk (Abb. 11A und B). Die Analyse der mit CDC5 und Dlk transfizierten Zellen offenbarte allerdings aufgrund der Überlagerungen der einzelnen Fluoreszenzbilder keine Kolokalisation der CDC5- und Dlk spezifischen „speckles“ mit den SC35-spezifischen (Abb. 15B und C)

und den U5-116-spezifischen punktuellen Verteilungsmustern (Abb. 16B und C). Anstatt einer Kolo-kalisation wurde allerdings nach der Expression von sowohl GFP-CDC5 als auch GFP-Dlk eine starke Umverteilung von endogenem SC35 detektiert. So wurde SC35 größtenteils aus dem Zellkern verdrängt und punktuell an cytoplasmatischen Strukturen detektiert. Diese Verdrängung war spezifisch für SC35, da dieser Effekt bei endogenem U5-116 nicht sichtbar war. Vielmehr zeigte CDC5 bzw. Dlk gegenüber U5-116 ein unterschiedliches punktuell-Verteilungsmuster im Kern.

4.1.11. *In-Vitro* Phosphorylierung von SC35 und ASF/SF2

Die Kernverdrängung von SC35 durch die Dlk und CDC5 sollte nun im Weiteren näher untersucht werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Verdrängung von SC35 durch die Phosphorylierung von SC35 oder anderer Faktoren durch die Dlk vermittelt wird. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurde aufgereinigtes GST-gekoppeltes SC35 Fusionsprotein und das der SR Proteinfamilie verwandte ASF/SF2 Protein einer *in-vitro* Kinase Reaktion mit der Dlk unterzogen. Abbildung 17 (Spur 2) zeigt, dass ASF/SF2 effizient durch die Dlk phosphoryliert wurde, wohingegen das GST-gekoppelte SC35 Fusionsprotein nur ein schwaches Substrat war (Daten nicht gezeigt).

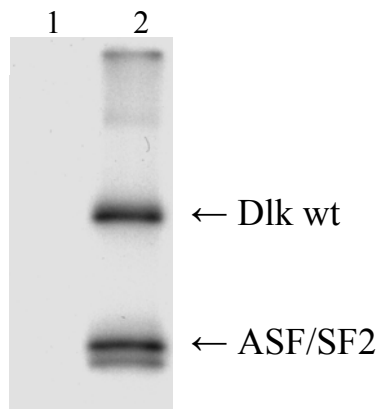


Abb. 17. Dlk phosphoryliert ASF/SF2
His-gekoppeltes Dlk wurde inkubiert mit His-gekoppelten ASF/SF2 in einer *in-vitro* Standard Kinase-reaktion. Die Produkte wurden auf einem 10%-SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Spur 1 diente als Negativkontrolle, indem ASF/SF2 ohne Dlk inkubiert wurde. Spur 2 zeigt neben der autophosphorylierten Dlk auch phosphorylierte ASF/SF2.

4.1.12. *Caspase-2* Mini-Gen Spleiß-Analysen

Über die Regulation des alternativen Spleißens ist bis heute wenig bekannt. Es gibt Hinweise, dass bestimmte Spleißfaktoren, insbesondere SR-Proteine, bestimmte Spleiß-Stellen in der pre-mRNA aufgrund der umgebenden Sequenz erkennen und für das Spleißosom als Spleiß-Stelle markieren. Die Regulation dieser Spleißfaktoren erfolgt am Beispiel der SR-Proteine über die sogenannten SR-Kinasen (z.B. SRPK1 und SRPK2). Eine Phosphorylierung von

SR-Proteinen führt zu einer Delokalisierung dieser von *naszierender* RNA und somit zu einer fehlenden Kennzeichnung alternativer Spleiß-Stellen für das Spleißosom [94]. Prominente Vertreter der SR-Proteine sind die Spleißfaktoren SC35 und ASF/SF2. In der Literatur wurde beschrieben, dass SC35 als Spleißfaktor das Exon-„*skipping*“ im *Caspase-2* Gen der Maus sowie auch im humanen Homologen beeinflusst [95-97]. SC35 induziert dabei das Spleißen eines 61 bp langen alternativen Exons aus der *Caspase-2* mRNA, wobei ein für die Translation offenes Leseraster von 435 Aminosäureresten entsteht. Das entstandene Translationsprodukt, das so genannte *Caspase-2L*, induziert die Apoptose in der Zelle. Behält hingegen die *Caspase-2* mRNA das 61 bp Exon entsteht auf Grund eines entstandenen Stopcodons (TGA) ein erheblich kürzeres Translationsprodukt (so genannte *Caspase-2S*) mit 312 Aminosäureresten, welches die Zelle vor dem Zelltod bewahrt. Zusammenfassend kann man bezüglich dieses Hintergrundes sagen, dass SC35 indirekt an der Regulation der Apoptose beteiligt ist.

In den folgenden Untersuchungen wurde ein *Caspase-2* Mini-Gen Spleiß-System etabliert, das zeigen sollte, welchen Einfluss die Dlk/CDC5-vermittelte SC35 Verdrängung aus dem Nukleus in das Cytoplasma auf das alternative Spleißen von SC35 spezifischen Zielgenen hat.

Um ein *Caspase-2* Mini-Gen Spleiß-System zu etablieren wurde genomische DNA aus der Maus isoliert und mittels PCR ein 3077 bp großes Fragment aus dem *Caspase-2* Gen amplifiziert. Dieses Fragment enthielt den 3' Bereich des 6. Exons, das alternative Exon (61 bp) und den 5' Bereich des 7. Exons, sowie die entsprechenden Introns. Dieses Fragment wurde in den pGL3-Promotor Vektor (Promega) hinter dem SV40-Promotor und vor der *Firefly Luciferase* kodierenden Sequenz inseriert (Abb. 18A). Exon 6 enthielt ein Startcodon (ATG), welches ohne das Spleißen des alternativen Exons im gleichen Leseraster des *Luciferase* Gens lag und somit die Expression der Luciferase erfolgte. Wurde hingegen das alternative Exon herausgespleißt stand das Startcodon im Leseraster zu einem Stopcodon im 7ten Exon und die Luciferase Expression wurde verhindert. Es sei erwähnt, dass das Exon-„*skipping*“ bei dem Vektorkonstrukt also eine entgegengesetzte Wirkung bezüglich der Translation der *Caspase-2* mRNA in der Zelle hatte.

Im Folgenden wurden REF52.2 Zellen alleine mit dem *Caspase-2* Mini-Gen Spleiß-Vektor und in verschiedenen Kombinationen mit FLAG-gekoppelten Fusionsproteinen von CDC5 und Dlk bzw. diverser Mutanten dieser beiden Proteine transient transfiziert. Als

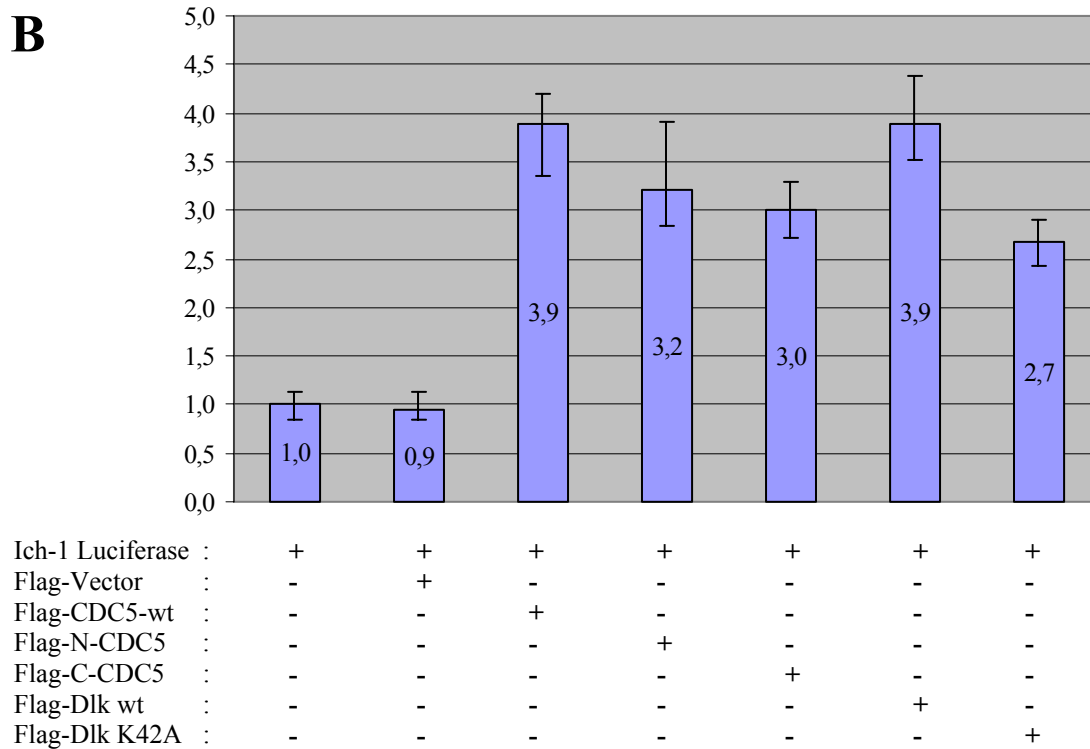
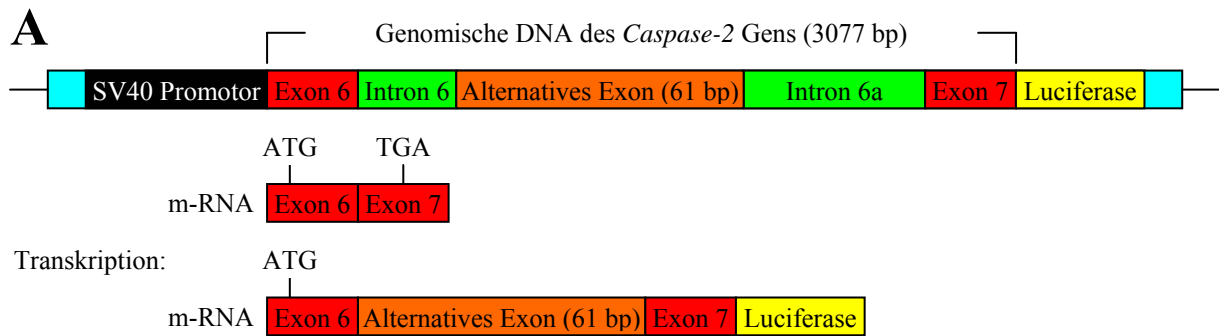


Abb. 18. *Caspase-2* Mini-Gen Spleiß-Analysen in Abhängigkeit von CDC5 und Dlk

A: Schematische Darstellung des *Caspase-2* Mini-Gen Spleiß-Vektors, ausgehend vom pGL3-Promotor Vektor (Promega). In den Vektor wurde ein Teil des *Caspase-2* Gens inseriert. Die Transkription und das Exon *skipping* des alternativen Exons erzeugte ein Stopcodon, so dass die Luciferase nicht exprimiert wurde. Wurde das alternative Exon beibehalten, entstand eine Rasterverschiebung, so dass Luciferase exprimiert wurde.

B: REF52.2 Zellen wurden mit dem *Caspase-2* Mini-Gen Spleiß-Vektor mit verschiedenen CDC5 und Dlk Konstrukten transfiziert und 48 h nach der Transfektion Luciferase-Analysen („Dual-Luciferase® Reporter Assay System“; Promega) unterzogen. Die Werte resultierten aus 2 unabhängigen Messreihen mit jeweils 4 Ansätzen. Der (leere) Flag-Vector diente als Negativkontrolle.

Negativkontrolle diente die Expression des FLAG Epitopes. In allen Ansätzen wurde zur Standardisierung der Transfektionseffizienz *Renilla Luciferase* kotransfiziert („Dual-Luciferase® Reporter Assay System“; Promega). CDC5 wt und Dlk wt verminderten das Spleißen des alternativen Exons des *Caspase-2* Gens um fast das vierfache (Abb. 18B). Die CDC5 Deletionsmutanten Flag-N-CDC5 und FLAG-C-CDC5 (Abb. 12A) verminderten das

Spleißen des alternativen Exons um das dreifache, ebenso wie die kinasenegative Mutante DlkK42A der Dlk (Abb. 18B). Bezogen auf die Verhältnisse in der Zelle bedeutete dieses Ergebnis, dass CDC5 wt sowie Dlk wt durch die Verdrängung von SC35 aus dem Nukleus das alternative Spleißen des 61 bp Exons verhindern und somit die Synthese des antiapoptotischen Caspase-2S Translationsproduktes um fast das vierfache fördert. Dies war ebenso der Fall mit den beiden CDC5 Deletionsmutanten Flag-N-CDC5 und FLAG-C-CDC5, sowie der kinasenegativen Mutante DlkK42A der Dlk, die die Synthese des antiapoptotischen Caspase-2S Translationsproduktes um das dreifache fördert.

4.2. Genomische Struktur des *Dlk* Gens

Der zweite Themenschwerpunkt dieser Dissertation war die Aufklärung der genomischen Struktur und die Charakterisierung der transkriptionell relevanten Elemente des *Dlk* Gens. Im Weiteren sollte die genomische Struktur der *Dlk* mit den Strukturen der Homologen aus dem Menschen und der Maus verglichen werden, letzterer mit der Absicht einen Targeting-Vektor zur homologen Rekombination zu konstruieren, um einen generellen konditionalen Knock-out der Dlk in der Maus zu erzeugen.

4.2.1. Isolierung des Promotors des *Dlk* Gens in der Ratte

Zur Isolierung des putativen Promotors und der Transkriptionselemente wurde eine λ -DASH II genomische Ratten Phagenbank durch Southern Blot Analysen auf Sequenzhomologie mit dem 5' Bereich (nt 1 bis 851) der Dlk-cDNA aus der Ratte geprüft. Positive Klone wurden von „falsch“ positiven Klonen mittels Restriktionsanalysen und anschließenden Southern Blot Analysen, sowie durch PCR Analysen mit Dlk spezifischen cDNA Primern differenziert. Einer dieser Klone, der nach allen zuvor genannten Analysen positiv war, enthielt ein 10 kb DNA-Fragment. Dieser wurde im Folgenden genauer untersucht.

Die Isolierung der stromaufwärts des Transkriptionstartpunktes liegenden Sequenz erfolgte nun mit Hilfe der PCR. Dazu wurden auf der einen Seite Primer verwendet, die komplementär zum 5'- bzw. 3'- λ -DASH II-Phagenarm waren und auf der anderen Seite zwei verschachtelte Primer zur Spezifitätskontrolle, die den Nukleotiden 134 – 115 bzw. 110 – 90 der Dlk cDNA entsprachen. Die PCR mit dem zum 5'-Phagenarm komplementären Primer amplifizierte ein Fragment von 3160 bp (bzw. 3136 bp mit dem verschachtelten Dlk cDNA Primer), welches vollständig sequenziert wurde. Der 3' Bereich des PCR-Produktes war kolinear mit der Dlk

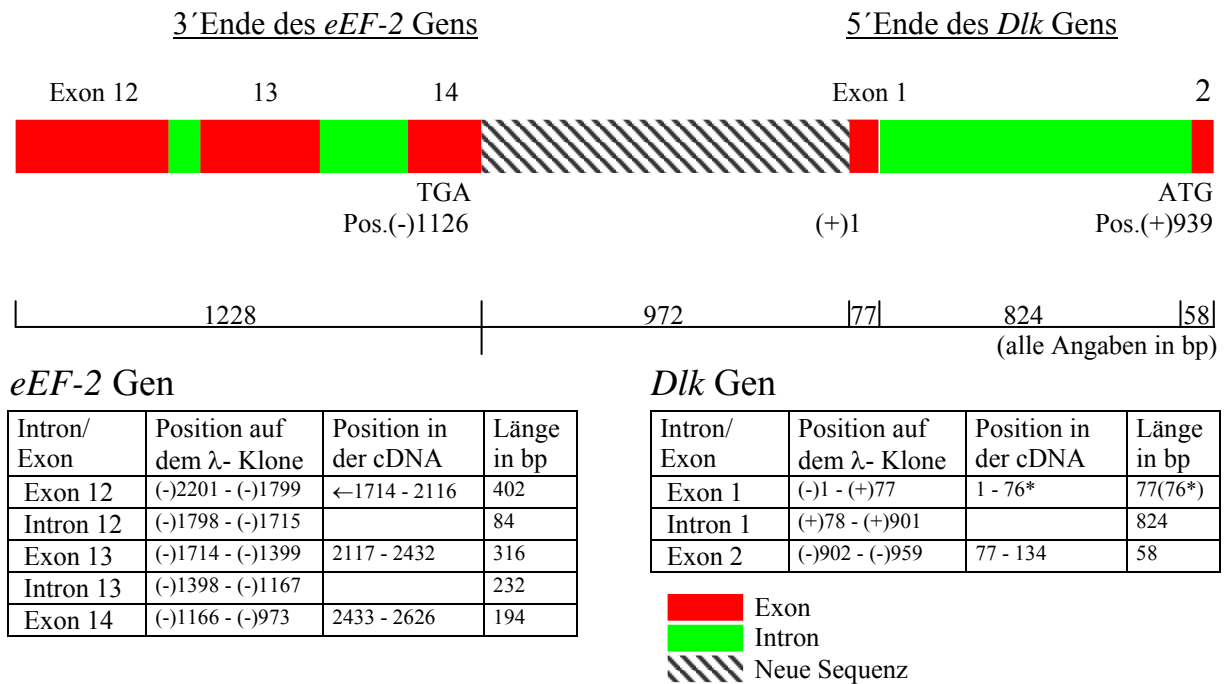


Abb. 19. Isolierung des Promotors des *Dlk* Gens in der Ratte

Oben: Graphische Darstellung der Exons und Introns des *eEF-2* und *Dlk* Gens, sowie die intergenomische Region der isolierten Sequenz.

Unten: Tabellarische Aufstellung der Positionen der jeweiligen Exons und Introns des *eEF-2* und *Dlk* Gens bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt der *Dlk*.

* = Sequenz-Polymorphismus. Die genomische Sequenz enthielt ein zusätzliches Guanin-Nukleotid im Gegensatz zur cDNA.

cDNA von Nukleotid 1 – 76 und 77 – 134 unterbrochen von 824 bp unbekannter Sequenz. Aus diesem Sequenzergebnis konnte man schlussfolgern, dass die Segmente bestehend aus den Nukleotiden 1 – 76 und 77 – 134 der *Dlk* cDNA das Exon 1 und 2 repräsentierten, die durch 824 bp des ersten Introns voneinander getrennt waren. (Abb. 19). Folglich lag der Translationsstartpunkt der *Dlk* an Position 114 der cDNA im 2ten Exon [10]. Die entsprechende genomische DNA zum 1sten Exon enthielt zusätzlich ein Guanin-Nukleotid an der Position 13 im Vergleich zu der cDNA. Diese Tatsache war höchstwahrscheinlich in einem Sequenz-Polymorphismus begründet, der keinerlei Konsequenzen hat, da er in einem nicht kodierenden Bereich der *Dlk* positioniert war. Weitere Sequenzvergleiche mit Datenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information) zeigten, dass der 5' Bereich des 3160 bp Fragments mit 1228 bp dem 3' Ende des *eEF-2* (Eukaryotic Translation Elongation Factor 2) Gens entsprach und nur 972 bp stromaufwärts des 5' Bereichs des *Dlk* Gens gelegen war (Abb. 19). Die gesamte Sequenz des 3160 bp Fragments wurde in der EMBL (European Molecular Biology Laboratory) Datenbank hinterlegt (Accession No.: AJ278147). Zum besseren Verständnis wurde im Weiteren der Transkriptionsstartpunkt der

Dlk auf genomischer Ebene als Nukletid 1 bezeichnet. Dementsprechend erfolgte die Numerierung der in 5'Richtung gelegenen Nukleotide mit negativem Vorzeichen bzw. in 3'Richtung gelegenen Nukleotide mit positiven Vorzeichen.

4.2.2. Promotor Analysen des *Dlk* Gens

In der Annahme, dass die intergenomische Region zwischen des *eEF-2* und *Dlk* Gens den *Dlk* Promotor und regulatorische Elemente enthielt, wurde ein vom 5'Bereich des 14ten *eEF-2* Exons bis Nukleotid +30 erstreckendes 1,2 kb Fragment vor das *Luciferase* Gen des promotorlosen pGL3-Basic Vektor (Promega) inseriert (Abb. 20A, Konstrukt 1).

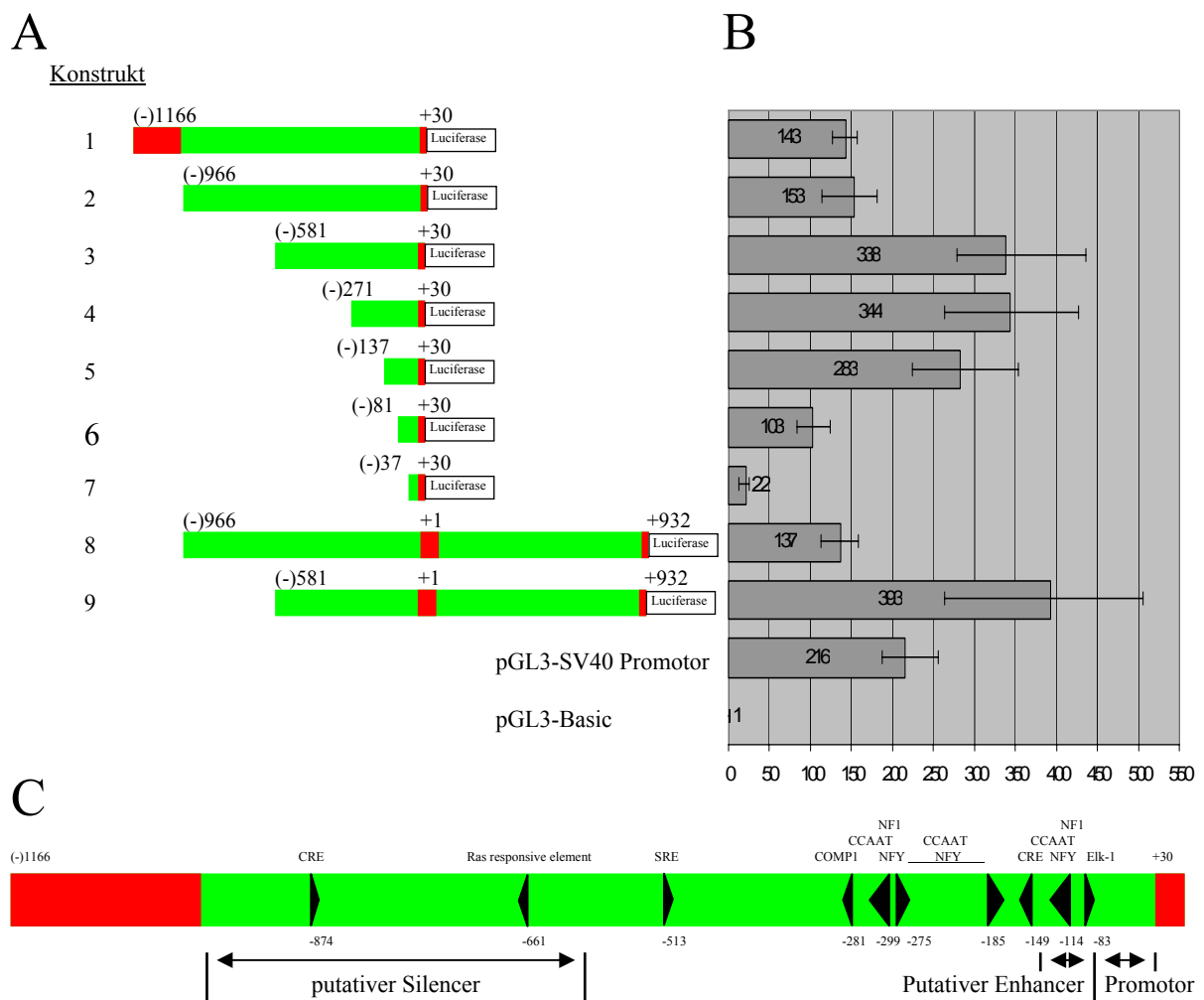


Abb. 20. Dlk Promotoranalysen.

A: Graphische Darstellung der Dlk Promotor Deletionskonstrukte (rot = Exon; grün = Intron) vor dem Luciferase Reportergen. **B:** Relative Luciferaseaktivität der Dlk Promotor Deletionskonstrukte bezüglich des leeren pGL3- Basic Konstrukts. **C:** Mögliche Bindungstellen von Transkriptionsfaktoren, sowie putative transkriptionel regulatorische Elemente im isolierten 5' Bereich der Dlk.

Anschließend wurden REF52.2 Zellen mit diesem Konstrukt transient transfiziert, um die Promotoraktivität zu analysieren. Die Aktivität war mehr als 140mal höher als das Niveau des pGL3-Basic Vektors ohne Promotor (Abb. 20B). Zur genaueren Bestimmung der transkriptionellen Elemente wurden Deletionskonstrukte synthetisiert (Abb. 20A). Im Konstrukt 2 wurde der *eEF2* spezifische Bereich deletiert und enthielt so nur den intergenomischen Bereich von Nukletid -966. Konstrukt 3 und 4 erstrecken sich von -581 bzw. -271, und die Konstrukte 5, 6 und 7 deckten nur noch den Bereich von -137 bzw. -81 und -37 bis zu Position +30 ab. Die transiente Transfektion von Konstrukt 2 ergab wie erwartet eine ähnliche Luciferase Aktivität wie Konstrukt 1. Dies zeigte, dass die *eEF2* Sequenz keinen Einfluss auf die Transkription des *Dlk* Promotors nimmt. Im Gegensatz dazu ergaben die Deletionskonstrukte 3, 4 und 5 eine ca. 2fach höhere Luciferase Aktivität, während die Aktivität von Konstrukt 6 auf das 100fache des Basalniveaus reduziert wurde. Weitere Deletionen bis hin zu Nukleotid -37 (Konstrukt 7) ergaben eine Reduktion in Höhe des Basalniveaus (Abb. 20B). Aufgrund dieser Daten konnte der *Dlk* Promotor dem Segment zwischen den Nukleotiden -37 und -81, ein möglicher Enhancer dem Segment zwischen -82 und -137 und ein putativer Silencer der Region zwischen den Nukleotiden -581 bis -966 zugeordnet werden.

Um Hinweise über die relative Stärke des *Dlk* Promotors zu erhalten, wurde seine Aktivität mit dem des SV40 Promotors (ohne Enhancer, pGL3-Promotor Vektor) verglichen. Dieses Konstrukt zeigte eine höhere Aktivität als der *Dlk* Promoter (Abb. 20A, Konstrukt 6), aber eine schwächere Aktivität als der *Dlk* Promotor mit seinem putativen Enhancer (Abb. 20A, Konstrukt 5) (Abb. 20B). Des Weiteren wurde die Möglichkeit untersucht, dass das erste Intron des *Dlk* Genes regulatorische Elemente enthält. Aus diesem Grunde wurde die Sequenz von +31 bis zum im zweiten Exon gelegenen Nukleotids +932 mit in die Konstrukte 2 und 3 einbezogen, um die Konstrukte 8 bzw 9 zu erhalten (Abb. 20A). Diese Konstrukte ergaben aber eine gleiche Aktivität wie diejenigen ohne Intron 1, was darauf hinwies, das Intron 1 keine transkriptionellen Elemente enthielt. Das schloss aber nicht die Möglichkeit aus, dass solche Elemente weiter stromabwärts lokalisiert sind oder dass diese nur in einem adäquaten zellulären Hintergrund oder unter bestimmten physiologischen Bedingungen aktiv sind.

Um zu verifizieren, ob die zuvor genannten Elemente tatsächlich Enhancer und Silencer repräsentieren, wurde deren Aktivität in verschiedenen Zusammenhängen getestet. DNA Fragmente von Position -966 bis -583 und von -137 bis -77, die den putativen Silencer bzw. Enhancer enthielten, wurden in beiden Orientierungen stromaufwärts vor den enhancerlosen pGL3-Promotor Vektor (enthält SV40 Promotor) kloniert (Abb. 21A). Nach transienter

Transfektion zeigte sich, dass das Enhancer-Element eine 2-3fache Steigerung der Luciferase Expression vermittelte bezüglich des leeren pGL3-Promotor Konstruktes. Dieser Effekt war noch stärker in der umgekehrten Orientierung dieses Elementes. Diese Aktivität wurde auch noch weiter beibehalten nach einer Insertierung von 800 nt zwischen dem Enhancer-Element und dem SV40 Promotor (Abb. 21B). Im Gegensatz dazu konnte das Silencer-Element durch diesen Ansatz nicht verifiziert werden.

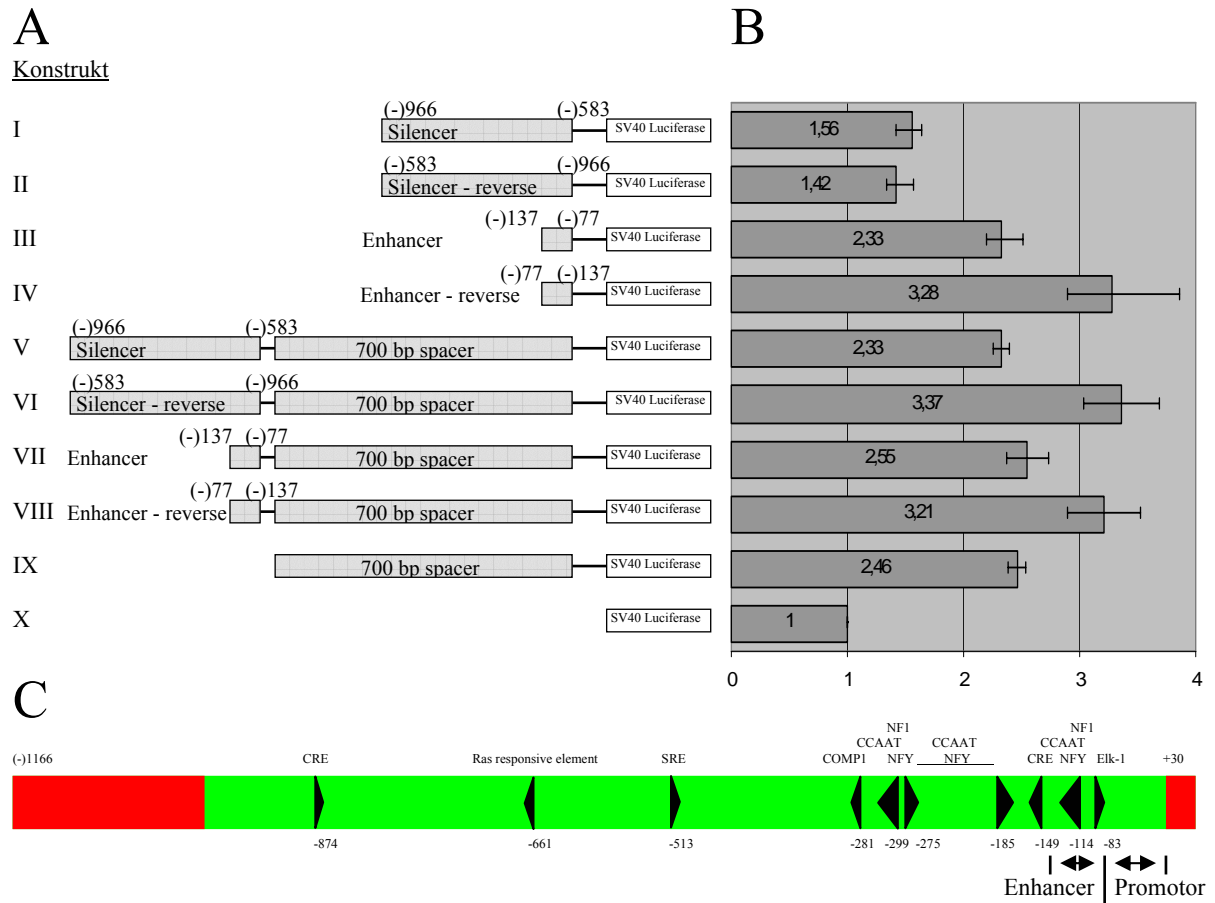


Abb. 21. Verifizierung des Enhancer des *Dlk* Gens

A: Graphische Darstellung der *Dlk* Enhancer bzw. Silencer Konstrukte vor dem Luciferase Reportergen.

B: Relative Luciferaseaktivität der *Dlk* Enhancer bzw. Silencer Konstrukte bezüglich des SV40 Promotor Luciferase (pGL3- Promotor) Konstrukts. **C:** Mögliche Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, sowie der verifizierte Enhancer und Promotor im isolierten 5' Bereich der *Dlk* (rot = Exon; grün = Intron).

Weitere Computer unterstützte Analysen (Matinspector V2.2 mit Transfac 5.0 Datenbank) der transkriptionellen regulatorischen Region der *Dlk* deckten keine typische TATA Box auf, aber verschiedene CCAAT Boxen und potentielle Bindungsstellen für diverse Transkriptionsfaktoren (Elk-1, NF-1/NF-Y, CREB, COMP1, genau so wie ein SRE und ein Ras RE) (Abb. 20C bzw. 21C). Eine Elk-1 und eine CCAAT/NF1/NF-Y Erkennungssequenz waren in der Region des Enhancer lokalisiert. Dieselben 6 Elemente wurden auch an einer

ähnlichen Position in der 5'-stromaufwärts Region der *mus musculus* ZIP Kinase identifiziert, was die Vermutung nahe legte, dass diese funktionell konserviert sind. Es existierten weitere zusätzliche konsensus Bindungsstellen im *Dlk* Gen aus der Ratte für WT-1, AREB-6 und NFκB, die aber nicht in den *Dlk* Homologen aus der Maus und dem Menschen konserviert waren und deshalb nicht in das Schema in Abb. 20C bzw. 21C mit einbezogen worden sind.

4.2.3. Vergleichende Genstruktur-Analysen der *Dlk* Homologen

Zur Aufklärung der kompletten genomischen Struktur der *Dlk* bediente man sich der PCR. Als Template wurde die zuvor beschriebene λ-Phagen DNA (Abschnitt 4.2.1.) und zur *Dlk* cDNA in den Bereichen 88-108nt (sense) und 817-796nt (antisense) korrespondierende Primer verwendet. Es wurde unter diesen Bedingungen ein PCR-Produkt von über 6,3 kb an genomischer Sequenz amplifiziert, im Gegensatz zu den vergleichbaren 730 bp der cDNA. Somit enthielt dieses genomische DNA Fragment ein oder mehrere Introns mit einer Gesamtlänge von mehr als 5,570 kb. Sequenzanalysen von beiden Seiten bestätigten, dass das 5'Ende die *Dlk* cDNA Sequenz von Nukleotid 88 bis 176 enthielt und eine unbekannte Intronsequenz folgte, während das 3'Ende die *Dlk* cDNA Sequenz von Nukleotid 817 bis 744 enthielt und dann ebenfalls unbekannte Intronsequenz aufwies.

Seitdem die Genome des Menschen und der Maus komplett sequenziert worden sind, konnte man nun die Gene der *Dlk* Homologen dieser beiden Spezies aus der Datenbank (HTG GeneBank division) identifizieren und mit deren cDNAs vergleichen. Der Vergleich zeigte eine auffallend ähnliche Organisation bezüglich der Anzahl und Länge der Exons in den *Dlk* Homologen aus dem Menschen und der Maus. Die transkribierte Region des humanen Genes erstreckte sich über 12,660 kb und die des murinen Genes über 8,990 kb. Für die *Dlk* Homologen aus dem Menschen und der Maus konnte durch den Vergleich der cDNA Sequenz mit der entsprechenden genomischen Sequenz 9 Exons und 8 Introns abgeleitet werden. In beiden Fällen befand sich das Startcodon im zweiten Exon. Interessanterweise besaßen alle Exons mit Ausnahme des letzten Exons die gleiche Länge in den Homologen des Menschen und der Maus. Im Gegensatz dazu variierte die Länge der entsprechenden Introns zwischen den beiden Spezies erheblich. Zusätzlich war in beiden Genomen das *eEF-2* Gene das in 5'Richtung benachbarte Gen wie es zuvor auch für das *Dlk* Gene aus der Ratte gezeigt werden konnte. Allerdings differierte die Distanz zwischen den *Dlk* Homologen und dem *eEF-2* erneut. Es sind 3,717 kb im Genom des Menschen und 521 kb im Genom der Maus verglichen mit 972 bp im Genom der Ratte.

Die Ähnlichkeiten zwischen dem murinen und humanen *Dlk* Homologen, insbesondere die identische Länge der Exons suggerierte eine ähnliche Organisation im Gen der Ratte. Aus diesem Grunde wurden Primer verwendet, die vermutlich den 3'- und 5' Enden benachbarter Exons der *Dlk* der Ratte entsprachen, um die korrespondierenden Introns zu amplifizieren (Abb. 22). Jedes Primer-Paar führte zu spezifischen Produkten, die es nun erlaubten die Länge der dazwischen liegenden Sequenzen zu bestimmen (Abb. 22).

Primer Paar Nr.	Position des sense Primer in der cDNA	Position des antisense Primer in cDNA	Produkt Länge (in bp)	Intron		Exon		Intron	
				Nr.	Länge	Nr.	Länge	Nr.	Länge
1	156 - 175	176 - 194	~ 4500	2	~ 4450	-	-	-	-
2	648 - 666	667 - 688	~ 140	4	~ 100	-	-	-	-
3	694 - 715	716 - 735	~ 400	5	~ 370	-	-	-	-
4	723 - 742	743 - 760	~ 680	6	~ 640	-	-	-	-
5	875 - 895	896 - 915	~ 500	7	~ 470	-	-	-	-
6	921 - 941	942 - 959	~ 160	8	~ 120	-	-	-	-
7	156 - 175	537 - 557	~ 4900	2	~ 4450	3	361	3	~ 90
8	516 - 536	667 - 688	~ 350	3	~ 90	4	130	4	~ 100
9	648 - 666	716 - 735	~ 550	4	~ 100	5	49	5	~ 370
10	694 - 715	743 - 760	~ 1100	5	~ 370	6	27	6	~ 640
11	723 - 742	896 - 915	~ 1250	6	~ 640	7	153	7	~ 470
12	875 - 895	942 - 959	~ 650	7	~ 470	8	46	8	~ 120

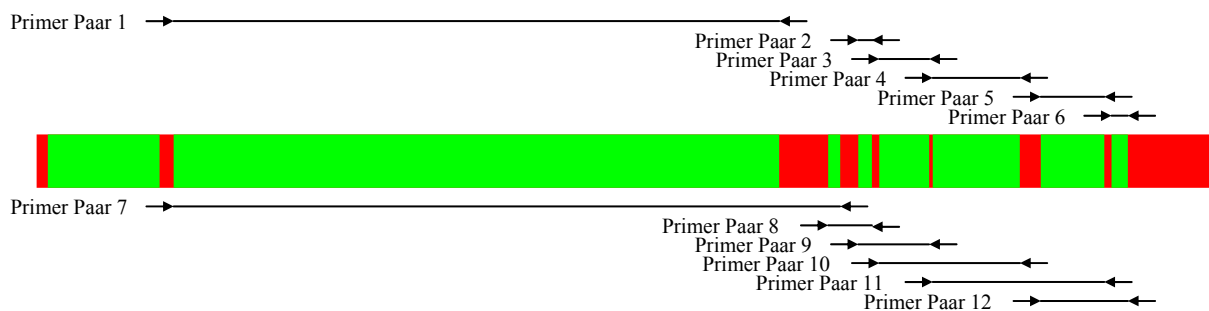


Abb. 22. Bestimmung der Exon/Intron Struktur des *Dlk* Gens aus der Ratte

Aus der Exon/Intron Struktur des *Dlk* Gens aus der Maus und dem Menschen wurden Primerpaare abgeleitet, die den 5'- und 3'- Enden der jeweiligen Exons in der Ratte entsprachen und in PCRs in der Kombination eingesetzt, sodass sie jeweils ein Intron (grün) bzw. 2 Introns und ein Exon (rot) umspannten (unten). Als Template wurde der zuvor isolierte λ -Phagen Klon verwendet. Oben sieht man tabellarisch aufgelistet die Primerpaare, die Position der Primer in der *Dlk* cDNA, die Größe der amplifizierten Fragmente und die rechnerisch ermittelte Länge der korrespondierenden Introns.

Diese Längenverhältnisse wurden des Weiteren durch weitere PCRs mit Primern, die jedes zweite Exon umfassen, bestätigt. Diese Ansätze sollten Fragmente amplifizieren, die 2 Introns und ein Exon mit definierter Größe enthalten (Abb. 22). Jede dieser Reaktionen ergab ein Fragment mit der erwarteten Größe. Dies bestätigte, dass die Exons 3 bis 8 der *Dlk* aus der

Ratte tatsächlich dieselbe Länge hatten wie die *Dlk* des Menschen und der Maus. Die Länge der Introns war annähernd gleich, aber nicht identisch mit denen des Gens der Maus, differierten aber deutlich zu denen des Gens des Menschen.

Intron/Exon Nr.	<i>homo sapiens</i> genome (in bp)	<i>mus musculus</i> genome (in bp)	<i>rattus norvegicus</i> HTGs (in bp)	codons contained in exons ^{a)}
Intergenomische Region	3717	521	972	
Exon 1	193	76	77	–
intron 1	1091	908	824	/
Exon 2	156	71	99	1 – 21
intron 2	4682	5861	4349	/
Exon 3	361	361	361	21 – 141
intron 3	257	82	78	/
Exon 4	130	130	130	142 – 185
intron 4	324	86	86	/
Exon 5	49	49	49	185 – 201
intron 5	201	395	357	/
Exon 6	27	27	27	201 – 210
intron 6	2481	689	615	/
Exon 7	153	153	153	210 – 261
intron 7	904	385	464	/
Exon 8	46	46	46	261 – 276
intron 8	421	83	83	/
Exon 9	1184	573	572 ^{b)}	277 – 454 (hs) 277 – 448 (mm) 277 – 448 (rn)
Gesamt Transkriptlänge	12660 bp	9975 bp ^{b)}	8370 bp	
cDNA Länge	2299 bp	1486 bp	1514 bp	
Ratio:Transkript/cDNA	5.5	6.7 ^{b)}	5.5	

Abb. 23. Tabellarischer Vergleich der Exon/ Intron Längen der *Dlk* des Menschen, der Maus und der Ratte. Dieser Vergleich zeigt anschaulich, dass die Exone 3 bis 8 der *Dlk* in den drei Spezies hoch konserviert sind in ihrer Länge (fett gedruckt), im Gegensatz zu den korrespondierenden Introns.

^{a)} Codons, die auf Intron/Exon Grenzen liegen, wurden dem Exon zugeschrieben, das 2 Nukleotide trägt.

^{b)} Der HTGs Klon enthielt 2 zusätzliche Nukleotide im Vergleich zur cDNA, die nicht berücksichtigt wurden.

Zwischenzeitlich wurde durch vergleichende Computeranalysen mit der Datenbank des Genoms der Ratte ein HTGs Klon (Accession No.: AC120292.4) identifiziert, der das gesamte *Dlk* Gen der Ratte enthielt. Vergleichende Sequenzanalysen dieses Klones mit der *Dlk* cDNA der Ratte bestätigten erneut die zuvor gewonnenen Erkenntnisse. Allerdings besaß

dieser 2 zusätzliche Nukleotide im 3'untranslatierten Bereich des 9ten Exons, die höchstwahrscheinlich auf einen Sequenzierfehler des HTGs Klons zurückzuführen waren. Eine Zusammenfassung aller gewonnenen Daten zeigt Abb. 23.

Diese Daten erlaubten nun die Rekonstruktion des kompletten *Dlk* Gens der Ratte und einen graphischen Vergleich mit den Homologen aus der Maus und dem Menschen (Abb. 24).

Homo Sapiens



Mus Musculus



Rattus Norvegicus

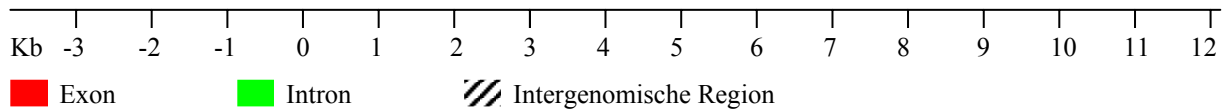


Abb. 24. Graphischer Vergleich des *Dlk* Gens des Menschen, der Maus und der Ratte

Wie zuvor angedeutet fehlte dem *Dlk* Gen aus der Maus das putative erste Exon stromaufwärts des Startcodon enthaltenden Exons. Vermutlich konnte diese Exon noch nicht identifiziert werden, da die *Dlk* cDNA der Maus sich weniger weit zum 5'Ende erstreckte als die korrespondierenden cDNAs aus dem Menschen und der Ratte. Sequenzvergleiche zwischen dem ersten *Dlk*-Exon aus der Ratte und der intergenomischen Region der *Dlk* der Maus zeigten, dass in dem Gen aus der Maus eine nahezu identische Sequenz (57 von 76 bp) 908 bp stromaufwärts vom zweiten Exon existierte (im folgenden als Exon 1 bezeichnet). Andererseits konnte eine solche Sequenzidentität wahrscheinlich aufgrund höherer Divergenz nicht im ersten Exon des Menschen identifiziert werden. Trotz dieser Unstimmigkeiten wurden die Exons und Introns wie die des Gens aus der Ratte bzw. aus dem Menschen nummeriert.

4.2.4. Vergleichende Genstruktur-Analysen in der *DAPK* Familie

Die Dlk zeigte eine hohe Sequenzidentität in der Kinasedomäne mit den 2 anderen Mitgliedern der DAP Kinase Familie [8], DAPK1 und DAPK2 auf. Aus diesem Grunde wurde mittels computerunterstützten Sequenzvergleichen das Genom des Menschen (HTG GeneBank division) auf die genomischer Organisation dieser verwandten Kinasen hin untersucht.

Exon Nr.	<i>DAPK1</i> (in bp)	<i>DAPK2</i> (in bp)	<i>DAPK3</i> (in bp)	<i>DRAK1</i> (in bp)	Proteindomäne
1	227	25	193	323	Kinase- domäne
2	170	98	156	213	
3	222	222	361 (=222+139)	145	
4	139	139	130	127	
5	130	130	49	229	
6	49	49	27		
7	27	27	153		
8	152	153	46		
9	46	46	1182		C- terminale- domäne
10	90	90			
11	93	84			
12	120	677			
13	99				
14	97				
15	100				
16	200				
17	194				
18	100				
19	78				
20	223				
21	189				
22	198				
23	139				
24	121				
25	188				
26	2497				

Abb. 25. Vergleichende Genstrukturanalysen in der *DAPK* Familie im Genom des Menschen
Fett gedruckt sind Exons gleicher Länge in der humanen *DAPK1*, *DAPK2* und *DAPK3* (Homolog des Menschen zur Dlk der Ratte). Diese Übereinstimmung bestand nur für den größten Teil der Exons, die für den N-Terminus kodierten, der die Kinasedomäne beinhaltet.

Im Falle der *DAPK1* und *DAPK2* zeigte sich eine identische Längenverteilung der Exons, die für die Kinasedomäne kodieren. Dies betraf die Exons 4-9 bezüglich *Dlk* und die Exons 5-11 bzw. 3-9 bezüglich *DAPK1* bzw. *DAPK2*, wobei das dritte *Dlk* Exon ein fusioniertes Exon aus den *DAPK1* Exons 3 und 4 bzw. aus den *DAPK2* Exons 3 und 4 zu sein schien (Abb. 25). In der C-terminalen Domäne bestand die *DAPK1* aus 16 und die *DAPK2* aus 4 Exonen im Gegensatz zur *Dlk*, wo nur ein Exon für diesen Bereich kodierte. Dies stand im Einklang mit den verschiedenen Interaktionsmotiven (Ankyrin Wiederholungen, Cytosklett Interaktionsmotif, Todesdomäne, Leuzin Zipper) und regulatorischen Regionen (Calmodulin/ Ca^{2+} Bindemotif) in den 3 Kinasen.

4.2.5. Generierung einer induzierbaren *Dlk* knock-out Maus

Aufgrund der nun bekannten Genstruktur der *Dlk* der Ratte, sowie der Maus, sollte ein genereller konditionaler knock-out in der Maus generiert werden. Der Entschluss zu einem konditionalen knock-out lag in der Annahme begründet, dass ein genereller knock-out im Embryonenstadium letal sei.

4.2.5.1. Klonierungsstrategie des *Dlk*/*ZIP*-Kinase Targetingvektors

Für den konditionalen knock-out des *Dlk* Gens sollten 2 Rekombinationssysteme verwendet werden. Das erste Rekombinationssystem, die Frt-vermittelte Rekombination, sollte nach erfolgter homologer Rekombination des *Dlk*-Targetingvektors in das Genom die Selektionskassette wieder aus dem Genom entfernen. Anschließend sollte das induzierbare Cre Rekombinationssystem den eigentlichen knock-out des *Dlk* Gens vermitteln.

Geplant wurde ein Targetingvektor mit 2 homologen Bereichen zur homologen Rekombination von ca. 2 kb im 5' Bereich vor dem zweiten Exon (enthält das Startcodon) und von ca. 5 kb im 3' Bereich nach dem 8ten Exon (enthält das Stopcodon) des *Dlk*/*ZIP*-Kinase Gens in der Maus. Im Anschluss an den 5' homologen Bereich sollte der Targetingvektor eine loxP-site und dann das 2te bis 8te Exon mitsamt den dazwischen liegenden Introns des *Dlk*/*ZIP*-Kinase Gens enthalten. Nach dem 8ten Exon sollte die von zwei frt-sites eingerahmte Selektionskassette mit dem *HPRT* (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase)-Gen folgen. Grund für die Planung einer Selektionskassette mit 2 gleichgerichteten frt-sites war die anschließende Deletion dieser *HPRT*-Selektionskassette nach erfolgter homologer Rekombination und Selektion mit Hilfe der FLP-Rekombinase, um Artefakte durch die *HPRT*-

Selektionkassette nach der Cre-Rekombinase-vermittelten Deletion des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens zu vermeiden. Im Anschluss an die Selektionskassette sollte die 2te loxP-site (gleichgerichtet mit der ersten loxP-site) und das *LacZ*-Gen mit einem Stopcodon sowie einem Kernlokalisierungssignal folgen, dem wiederum der 3'homologe Bereich folgen sollte, an dessen 5'Ende das 9te Exon der *Dlk/ZIP-Kinase* mit seinem Poly-Adenylierungssignal stehen sollte. Der Grund für das Kernlokalisierungssignal im *LacZ*-Gen lag begründet in der Tatsache, dass es sich bei der *Dlk/Zip-Kinase* um ein Kernprotein handelte (Abb. 26).

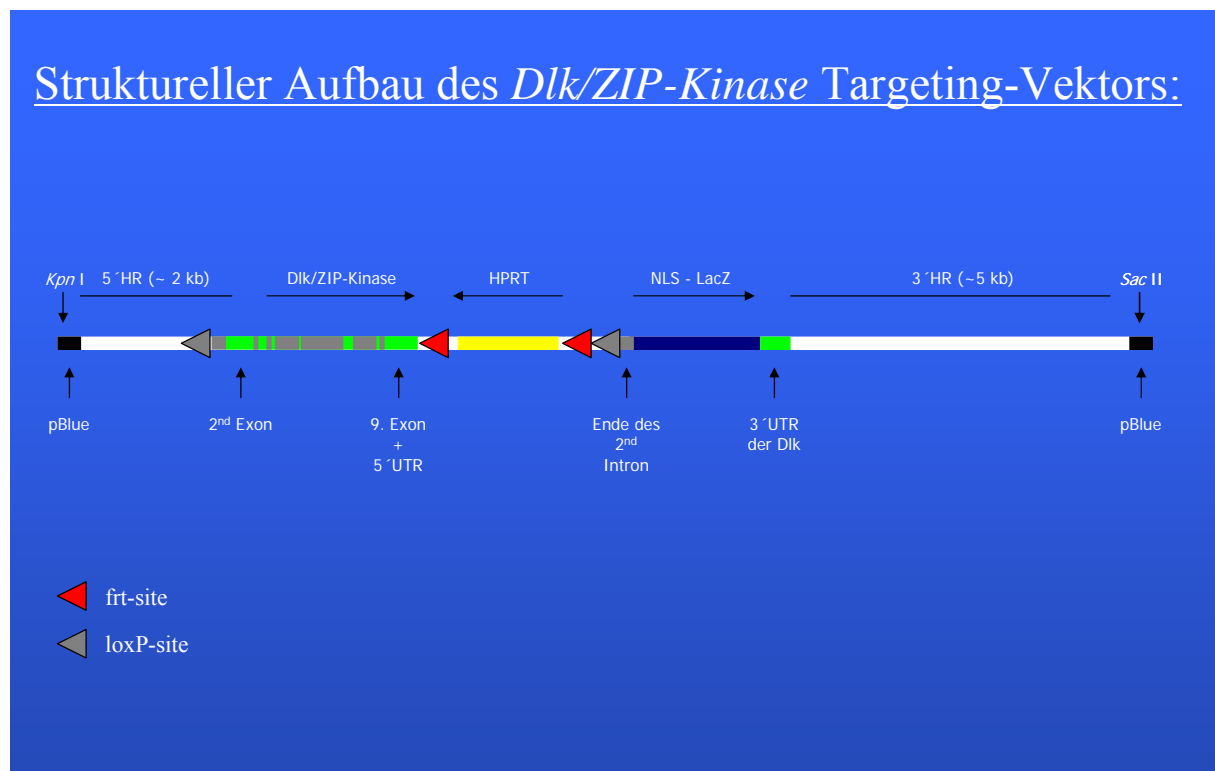


Abb. 26 Struktureller Aufbau des *Dlk/ZIP-Kinase* knock-out Targetingvektors

Der Vektor beginnt mit einer singulären Restriktionsschnittstelle gefolgt von der 5' Homologen Region (HR in grau) und zwei loxP-sites (blau Dreiecke), die das 2te bis 9te *Dlk* Exone (rot) einschließlich der entsprechenden Introns (grün) und die von zwei *frt*-sites (rote Dreiecke) eingerahmte HPRT (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase) Selektionkassette (gelb) umgibt. Im Anschluß sieht das mit einer NLS und der 3' UTR der *Dlk* gekoppelte Reporter *LacZ* (blau) und die 3' Homologe Region mit einer weiteren singulären Restriktionsschnittstelle.

Dieser Aufbau des Targetingvektors gewährleistete nun nach einer erfolgten homologen Rekombination und anschließender FLP-vermittelten Deletion der HPRT-Selektionkassette die Expression der *Dlk/ZIP-Kinase* wt unter der Kontrolle des Promotors der *Dlk/ZIP-Kinase*. Der eigentliche generelle konditionale knock-out der *Dlk/ZIP-Kinase* sollte darin bestehen, dass die Cre-Rekombinase das *Dlk/ZIP-Kinase* Gen zwischen den beiden loxP-sites vom 2ten bis zum 8ten Exon durch Rekombination deletieren sollte. Es wurde dabei besonders darauf

geachtet, dass nach der Cre-Rekombinase vermittelten Deletion des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens das *LacZ*-Reporter gen unter der Kontrolle des Promotors der *Dlk/ZIP-Kinase* stand, sowie das Poly-Adenylierungssignal der *Dlk/ZIP-Kinase* aus dem 9ten Exon enthielt. Somit wurde sichergestellt, dass nach dem generellen konditionalen knock-out der *Dlk/ZIP-Kinase* das *LacZ*-Reporter gen genauso stark und aufgrund von gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren genauso gewebespezifisch transkribiert wird wie die *Dlk/ZIP-Kinase*. Ebenso wurde damit sichergestellt, dass die mRNA des *LacZ*-Reporter gens mit dem *Dlk/ZIP-Kinase*-Poly-Adenylierungssignal genauso stabil war wie die der *Dlk/ZIP-Kinase*. Den geplanten Verlauf des Flp-/Cre-vermittelten generellen konditionalen knock-out des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens zeigt Abbildung 28.

Der Klonierungsstrategie des *Dlk* knock-out Vektors in der Maus lagen die Sequenzdaten des HTGs Maus Klons RP23-85K13 (Accession No.: A073822) zugrunde. Zuerst sollte ein dem *Dlk/ZIP-Kinase* Gen 5' gelegenes 1953 bp großes genomisches Teilfragment mit Hilfe der PCR amplifiziert werden. Als Matrize für diese PCR sollte aus embryonalen Stamm-(ES)-Zellen der Maus (HM1 ES Zellen) isolierte genomische DNA dienen und die aus den Sequenzdaten des HTGs Maus Klons RP23-85K13 abgeleiteten Primer (Pri HE10 und Pri HE11) verwendet werden. Dieses Teilfragment sollte anschließend als Sonde zum Durchsuchen einer genomischen Cosmid Bibliothek der Maus des Stammes 129/ola des RZPG (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) dienen. Des Weiteren sollte dieses Fragment als externe Sonde für die Verifizierung der homologen Rekombination in ES-Zellen sowie in transgenen Mäusen verwendet werden (siehe Abschnitt 4.2.5.3.)

Nachdem positive Cosmid-Klone detektiert und isoliert wurden sollten diese für die weitere Klonierung des Targetingvektors verwendet werden. Grund für die Verwendung von genomischer Cosmid DNA mit dem *Dlk/ZIP-Kinase* Gen war, eine Erhöhung des Anteils des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens in der DNA sicherzustellen, die in folgenden PCRs als Matrize dienen sollte. Unter der Verwendung von komplett genomischer DNA wären diese PCRs aufgrund der geringen Anzahl an *Dlk/ZIP-Kinase* spezifischen Matrizen und der Verwendung von Linker-Primern mit den loxP- und frt-sites (34 bp unspezifisch) kaum möglich gewesen oder hätten eine Artefaktbildung stark begünstigt.

Die Klonierung des Targetingvektors sollte im Weiteren in 6 Schritten erfolgen (Abb. 27-1 bis 27-6), wobei größtenteils diverse PCR Methoden angewandt werden sollten (*ligase mediated* (LM)-PCR, *splicing by overlap extension* (SOE)-PCR).

Im ersten Schritt (Abb. 27-1) sollte eine *frt*-site in dem pBluescript SK II⁽⁺⁾-Vektor mit Hilfe der PCR generiert werden. Der verwendete *sense* Linkerprimer (Pri HE02) setzte sich vom 5' Ende aus gesehen aus einer *Cla*I und *Mfe*I Restriktionsschnittstelle, gefolgt von der 34 bp langen *frt*-site, einer weiteren *Hind*III Restriktionsschnittstelle und einer 20 bp langen pBluescript SK II⁽⁺⁾ spezifischen Sequenz zusammen. Der *antisense* Primer wurde von dem T7-Promotor des pBluescript SK II⁽⁺⁾ abgeleitet. Das entstandene PCR-Produkt sollte anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Cla*I und *Hind*III verdaut werden. Danach sollte dieses Fragment in einem ebenfalls mit *Cla*I und *Hind*III verdauten pBluescript SK II⁽⁺⁾-Vektor ligiert werden. Das bis zu diesem Klonierungsschritt synthetisierte *Dlk*/*ZIP*-Kinase-Targetingvektorkonstrukt zeigt Abbildung 27-2 (erste Skizze oben).

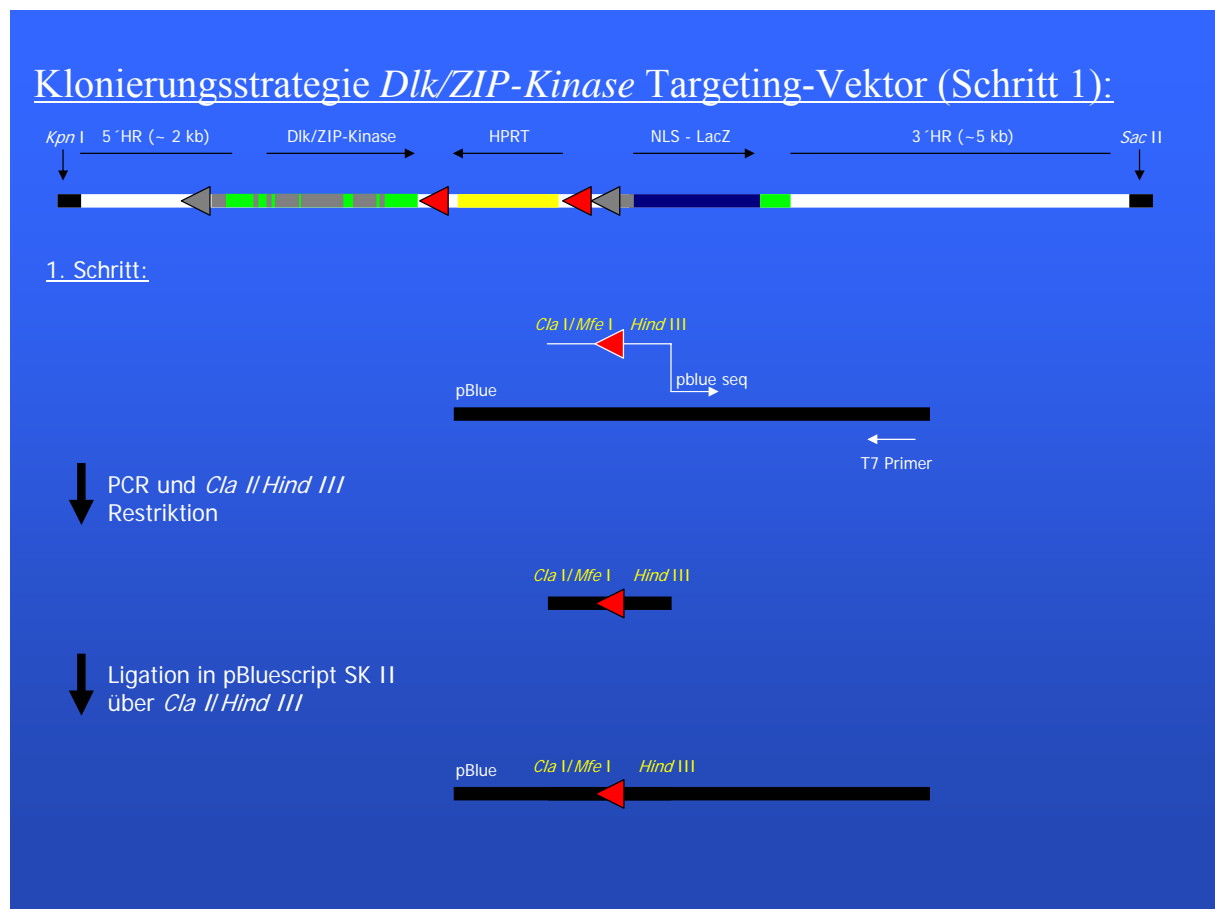


Abb. 27-1 Klonierungsstrategie zur Erzeugung eines *Dlk*/*ZIP*-Kinase Targeting-Vektors (Schritt 1)

Im zweiten Schritt (Abb. 27-2) sollte zuerst mit Hilfe der PCR genau der genomische DNA-Abschnitt des positive Cosmid-Klone amplifiziert werden, der das *Dlk/ZIP-Kinase* Gen enthielt. Die Primer (Pri HE12 und Pri HE13) wurden so gewählt, dass sie mehr als 2 kb im 5' Bereich vor dem zweiten Exon und mehr als 5 kb im 3' Bereich nach dem 9ten Exon des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens positioniert waren. Für diese PCR mit dem *Dlk/ZIP-Kinase* Gen positiven Cosmid-Klone als Matrize wurde ein PCR-Produkt von einer Größe von 12,515 kb erwartet. Anschließend sollte dieses PCR-Produkt als Matrize für eine *nested-PCR* mit einem *HindIII/loxP-site-sense-Linkerprimer* (Pri HE04) und einem *MfeI/frt-site-antisense-Linkerprimer* (Pri HE06) dienen und ein PCR-Produkt von 3,519 kb amplifizieren.

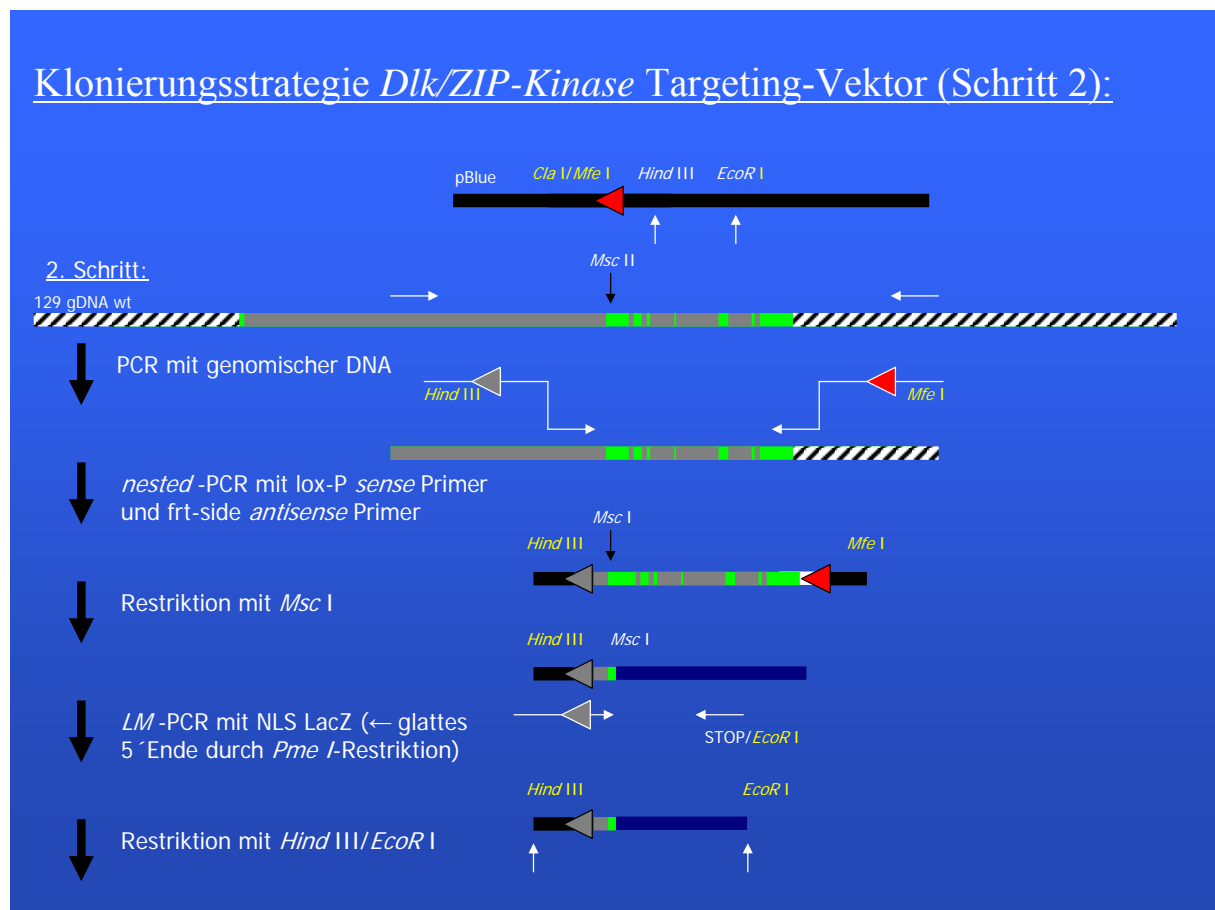


Abb. 27-2 Klonierungsstrategie zur Erzeugung eines *Dlk/ZIP-Kinase* Targeting-Vektors (Schritt 2)

Danach sollte dieses *nested-PCR*-Produkt mit *MscI*, einer singulären Schnittstelle im 2ten Exon des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens, verdaut werden. Im Anschluss an diese Restriktion sollte eine LM-PCR durchgeführt werden. Dazu sollte das zuvor erwähnte Fragment mit seinem 3' glatten-*MscI*-Ende an das 5' glatte-*PmeI*-Ende eines DNA-Fragments ligiert werden, dass das vollständige *LacZ*-Gen mit einem Kernlokalisationsignal enthielt (freundlicherweise von Joachim Degen zur Verfügung gestellt). Im Anschluss sollte eine PCR erneut mit dem

HindIII/loxP-site-*sense*-Linkerprimer (Pri HE04) und einem *EcoRI*-*antisense*-Linkerprimer (Pri HE01), der sich über das Stopcodon des *LacZ*-Gens erstreckte, durchgeführt werden. Das Produkt dieser LM-PCR sollte nun vom 5' Ende aus gesehen eine *HindIII*-Schnittstelle, eine loxP-site, das 2te Exon des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens genau bis zum Startcodon, sowie das *LacZ*-Gen mit einem Kernlokalisierungssignal und einer *EcoRI*-Schnittstelle hinter dem Stopcodon des *LacZ*-Gen enthalten. Wichtig bei diesem Schritt war eine Klonierung des Startcodons des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens im gleichen Leseraster des *LacZ*-Gens. Anschließend sollte dieses Fragment an den Enden mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *EcoRI* verdaut werden und gerichtet in den zuvor im Polylinker mit *HindIII* und *EcoRI* verdauten pBluescript SK II⁽⁺⁾-Vektor mit der eingefügten *frt*-site (Endprodukt aus dem ersten Klonierungsschritt) ligiert werden. Das bis zu diesem Klonierungsschritt synthetisierte *Dlk/ZIP-Kinase*-Targetingvektorkonstrukt zeigt Abbildung 27-3 (erste Skizze oben).

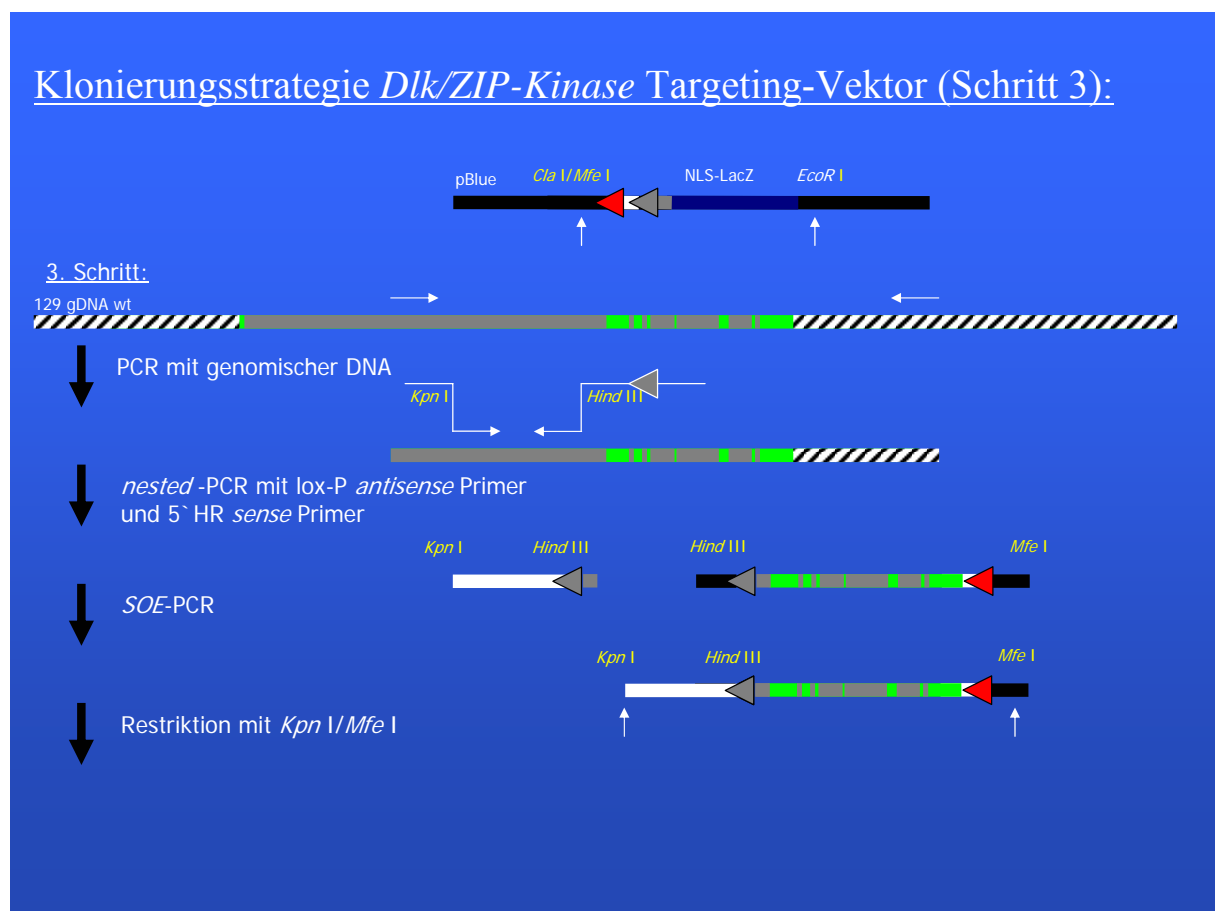


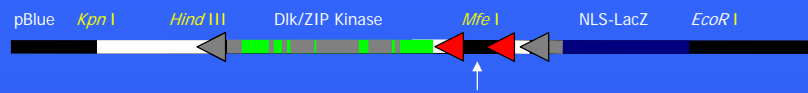
Abb. 27-3 Klonierungsstrategie zur Erzeugung eines *Dlk/ZIP-Kinase* Targeting-Vektors (**Schritt 3**)

Im dritten Schritt (Abb. 27-3) sollte das anfangs des zweiten Klonierungsschrittes 12,515 kb große, mit dem Primerpaar Pri HE12/Pri HE13 amplifizierte und das komplette *Dlk/ZIP*-

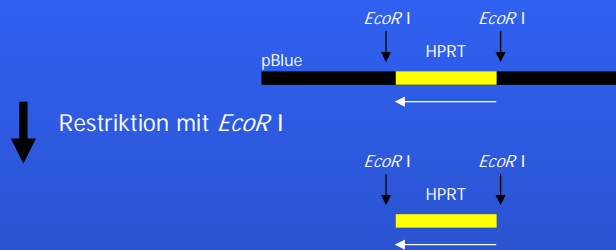
Kinase Gen umfassende PCR-Produkt erneut für eine weitere PCR als Matrize dienen. Mit einem *KpnI*-sense-Linkerprimer (Pri HE03) und einem *HindIII*/loxP-antisense-Linkerprimer (Pri HE05) sollte in dieser PCR der 5' Homologe Bereich vor dem 2ten *Dlk/ZIP-Kinase* Exon mit einer Länge von 2,021 kb und einer *KpnI*-Schnittstelle am 5' Ende und einer *HindIII*-Schnittstelle gefolgt von einer loxP-site am 3' Ende synthetisiert werden. Dieses PCR-Produkt sollte anschließend in einer SOE-PCR mit dem *nested*-PCR Produkt des zweiten Klonierungsschrittes (3,519 kb Fragment mit dem Primerpaar Pri HE04/Pri HE06) und dem *KpnI*-sense-Linkerprimer (Pri HE03) und dem *MfeI*/frt-site-antisense-Linkerprimer (Pri HE06, siehe Klonierungsschritt 2) verwendet werden. Diese SOE-PCR war möglich, da das 3' Ende des PCR-Produkts mit dem 5' Ende des letzten Produkts des zweiten Klonierungsschrittes komplementär ist. Diese Sequenzhomologie beruhte auf den identischen Bereichen innerhalb der loxP-site und der *HindIII*-Schnittstelle des *HindIII*/loxP-antisense-Linkerprimers (Pri HE05) und des *HindIII*/loxP-site-sense-Linkerprimers (Pri HE04). Dieses SOE-PCR-Produkt mit einer Größe von 5,566 kb sollte anschließend an den Enden mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *MfeI* verdaut werden und in das Endprodukt des zweiten Klonierungsschrittes über die *KpnI*-Schnittstelle (aus dem Polylinker des pBluescript SK II⁽⁺⁾-Vektors) und *MfeI*-Schnittstelle (synthetisiert mit *ClaI* /*MfeI*-frt-site/*HindIII*-sense-Linkerprimer (Pri HE02) Schnittstelle ligiert werden. Das bis zu diesem Klonierungsschritt synthetisierte *Dlk/ZIP-Kinase*-Targetingvektorkonstrukt zeigt Abbildung 27-4 (erste Skizze oben).

Im vierten Schritt (Abb. 27-4) sollte die HPRT-Selektionskassette zwischen die beiden frt-sites inseriert werden. Dazu sollte die HPRT-Selektionskassette mit seinem Promotor aus einem pBluescript SK II⁽⁺⁾-Vektorkonstrukt (freundlicherweise von Joachim Degen zur Verfügung gestellt) über zwei *EcoRI*-Schnittstellen herausgeschnitten werden. Dieses Fragment sollte anschließend über die singuläre *MfeI*-Schnittstelle, die isoschizomer zu den *EcoRI*-Schnittstellen ist, des bis dahin bestehenden Vektorkonstruktes inseriert werden. Die Orientierung der HPRT-Selektionskassette in den Targetingvektor sollte dabei ohne Bedeutung sein, wohingegen die Zerstörung der *EcoRI*- und *MfeI*-Schnittstelle durch die Ligation über diese beiden Schnittstellen für die weitere Klonierung und Überprüfung der späteren homologen Rekombination von großer Bedeutung sein sollte. Das bis zu diesem Klonierungsschritt synthetisierte *Dlk/ZIP-Kinase*-Targetingvektorkonstrukt zeigt Abbildung 27-5 (erste Skizze oben).

Klonierungsstrategie *Dlk/ZIP-Kinase* Targeting-Vektor (Schritt 4):



4. Schritt:



Restriktion mit *EcoRI*

Ligation in das zuvor mit *MfeI* verdaute letzte Konstrukt (Schritt 3 unten bzw. siehe oben)

- Richtung der Inserierung der HPRT-Kassette ist nicht von Bedeutung

- Die *MfeI* und *EcoRI* Schnittstellen werden bei der Ligation zerstört
(Wichtig für die weitere Klonierung und Überprüfung der homologen Rekombination)

Abb. 27-4 Klonierungsstrategie zur Erzeugung eines *Dlk/ZIP-Kinase* Targeting-Vektors (Schritt 4)

Im fünften Schritt (Abb. 27-5) sollte der erste Teil des 3' homologen Bereichs der *Dlk/ZIP-Kinase* in den Targetingvektor eingebaut werden. Dazu sollte erneut das anfangs des zweiten Klonierungsschrittes 12,515 kb große, mit dem Primerpaar Pri HE12/Pri HE13 amplifizierte und das komplette *Dlk/ZIP-Kinase* Gen umfassende PCR-Produkt erneut für eine weitere PCR als Matrize dienen. In dieser *nested-PCR* sollte ein *EcoRI-sense*-Linkerprimer (Pri HE08) und ein *SacII-antisense*-Linkerprimer (Pri HE09) eine 4,982 kb große 3' homologe Region des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens amplifizieren, dessen 5' Ende das komplette 9te Exon mit dem Poly-Adenylierungssignal des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens enthält. Anschließend sollte dieses PCR-Produkt am 5' Ende mit *EcoRI* und nach 558 bp mit *BamHI* geschnitten werden. Das neben dem 4,465 kb großen Fragment entstehende 558 bp Fragment sollte dann in das bis dahin bestehende und mit *EcoRI* und *BamHI* linearisierte Vektorkonstrukt gerichtet inseriert werden. Das bis zu diesem Klonierungsschritt synthetisierte *Dlk/ZIP-Kinase*-Targetingvektorkonstrukt zeigt Abbildung 27-6 (erste Skizze oben).

Klonierungsstrategie *Dlk/ZIP-Kinase* Targeting-Vektor (Schritt 5):

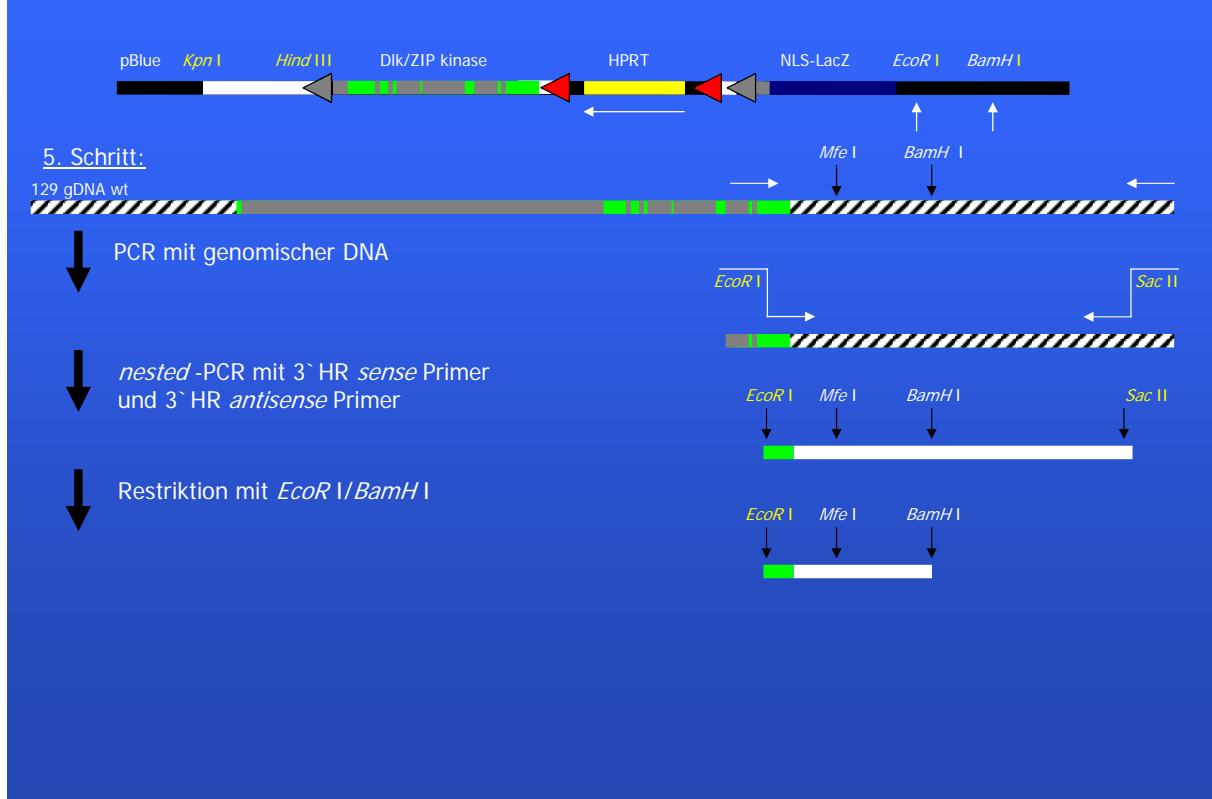


Abb. 27-5 Klonierungsstrategie zur Erzeugung eines *Dlk/ZIP-Kinase* Targeting-Vektors (Schritt 5)

Im sechsten und letzten Schritt (Abb. 27-6) sollte der zweite Teil des 3' homologen Bereichs der *Dlk/ZIP-Kinase* in den Targetingvektor eingebaut werden. Dazu sollte erneut das im 5ten Schritt mit dem *EcoRI-sense*-Linkerprimer (Pri HE08) und dem *SacII-antisense*-Linkerprimer (Pri HE09) in einer *nested*-PCR amplifizierte und den 3' homologen Bereich des *Dlk/ZIP-Kinase* Gen enthaltende Fragment mit einer Größe von 4,982 kb verwendet werden. Dieses sollte nun am 3' Ende mit *SacII* und mit einer 4,782 kb stromaufwärts gelegenen Schnittstelle für *MfeI* verdaut werden. Das entstandene 4,782 große Fragment sollte dann in das bis dahin bestehende und mit *MfeI* und *SacII* linearisierte Vektorkonstrukt gerichtet inseriert werden und somit den 3' homologen Bereich des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens innerhalb des Targetingvektors komplettieren.

Durch diese Klonierungsstrategie besitzt der *Dlk/Zip-Kinase*-knock-out Vektor zwei singuläre Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *SacII*. Diese Singularität ist wichtig für eine Linearisierung des Vektors bzw. für eine komplette Isolierung des inserierten Bereiches des SK II⁽⁺⁾-Vektors. Aufgrund der Linearisierung des Vektors bzw. der

Klonierungsstrategie *Dlk/ZIP-Kinase* Targeting-Vektor (Schritt 6):

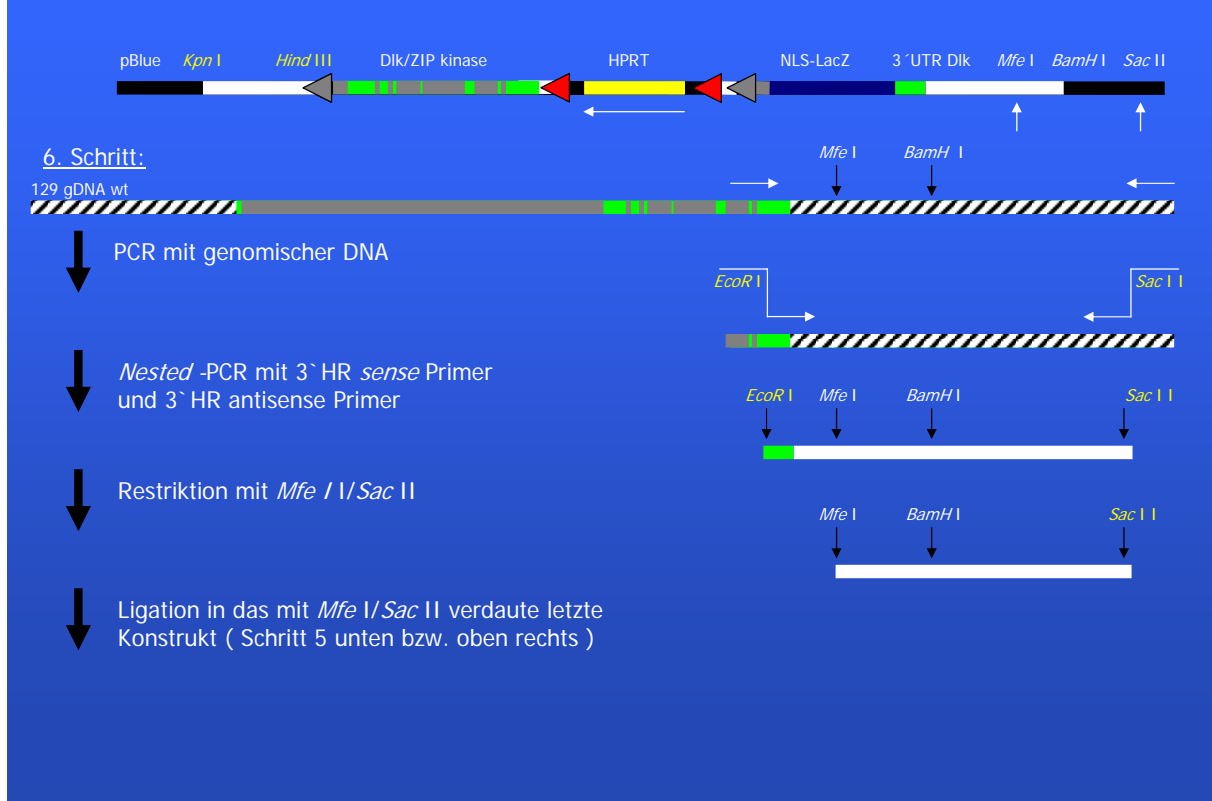


Abb. 27-6 Klonierungsstrategie zur Erzeugung eines *Dlk/ZIP-Kinase* Targeting-Vektors (Schritt 6)

kompletten Isolierung des inserierten Bereiches sollte eine hohe Transfektionrate, sowie eine hohe Rate an homologen Rekombinationen in embryonalen Stammzellen der Maus erfolgen.

Neben dem eigentlichen *Dlk/Zip-Kinase*-Targetingvektor sollte auch noch ein Testvektor hergestellt werden. Dieser sollte dazu dienen, ein PCR-System zu etablieren, das die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen und transgenen Mäusen schnell und einfach detektieren konnte. Dieser Testvektor sollte sich nur um weitere 200 bp stromaufwärts des 5' homologen Bereich des *Dlk/ZIP-Kinase*-Targetingvektors von diesem unterscheiden. Im Detail sollte der Vektor als Positivkontrolle in folgenden PCR-Analysen dienen. Erstens die homologe Rekombination des *Dlk/Zip-Kinase*-Targetingvektors in embryonalen Stammzellen mit einem *sense*-Primer in dem um 200 bp erweiterten 5' homologen Bereich und einem LacZ-spezifischen-*antisense*-Primer. Zweitens die Flp-vermittelte Deletion der HPRT-Selektionskassette sowie die anschließende Cre-vermittelte Deletion des *Dlk/Zip-Kinase* Gens von 2ten bis zum 8ten Exon.

Die Herstellung des Testvektors sollte analog und fast identisch mit der Herstellung des eigentlichen *Dlk/Zip-Kinase*-Targetingvektor erfolgen mit dem einzigen Unterschied im dritten Klonierungsschritt (Abb. 27-3). Dazu sollte in der *nested*-PCR des dritten Klonierungsschrittes anstatt dem *KpnI-sense*-Linkerprimer (Pri HE03) der *KpnI-sense*-Linkerprimer (Pri HE07) verwendet werden, der auf genomischer Ebene 200 bp stromaufwärts vor dem Primer Pri HE03 im 5' homologen Bereich des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens liegt. Danach sollte dieses PCR-Produkt weiter so verwendet werden wie das ursprünglich im dritten Klonierungsschritt amplifizierte PCR-Produkt. Der vierte bis sechste Klonierungsschritt des Testvektors sollte anschließend identisch verlaufen wie die des eigentlichen *DLK/ZIP-Kinase* Targetingvektors (Abb. 27-4 bis 27-6).

4.2.5.2. Überprüfung des *Dlk/ZIP-Kinase* Targetingvektors

Vor der Transfektion in embryonale Stammzellen sollte der *Dlk/ZIP-Kinase* Targetingvektor auf seine funktionellen Elemente und auf die Sequenzhomologie mit dem HTG Maus Klon RP23-85K13 hin überprüft werden. Dazu sollte zuerst der komplette Targetingvektor sequenziert werden und mit der Sequenz des HTGs Maus Klons RP23-85K13 (enthält das gesamte *Dlk/ZIP-Kinase* Gen) bezüglich der 5'- und 3'- homologen Bereiche, sowie der 8 Exons (Exon 2-9) mit den dazwischenliegenden Introns des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens verglichen werden.

Des Weiteren sollten die funktionellen loxP-sites bzw. frt-sites durch eine Transformation des Targetingvektors in Flp bzw. Cre exprimierende *E.Coli* Bakterien überprüft werden. Nach erfolgter Transformation sollte der Flp- bzw. Cre-vermittelte rekombinierte Targetingvektor durch Restriktionsanalysen auf die Deletionen um die HPRT-Selektionskassette bzw. um die HPRT-Selektionskassette plus das *Dlk/ZIP-Kinase* Gen vom zweiten bis zum achten Exon analysiert werden.

Für die Überprüfung des *LacZ*-Gens sollte dieses aus dem Targetingvektor über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *PstI* und *BamHI* herausgeschnitten werden. Dieses Fragment mit einer Länge von 3711 bp sollte über die gleichen Schnittstellen in ein pBluescript SK II⁽⁺⁾-Vektorkonstrukt inseriert werden, dessen endogenes *LacZ*-Gen durch eine Rasterverschiebung des Leserasters durch die Deletion der *HindIII*-Schnittstelle nicht exprimiert wird. Die Inserierung des *LacZ*-Gens des Targetingvektors (3711 bp) führt zu keiner weiteren Verschiebung des Leserasters innerhalb des neuen Vektorkonstruktes, sodass eine Transformation des neuen Vektorkonstruktes in *E.Coli* Bakterien und die Blaufärbung

dieser nach einem X-Gal-Test die Funktionalität des *Lac-Z* Gens aus dem Targetingvektor anzeigen sollte. Weiterhin sollte das *LacZ* enthaltende Fragment in einen Expressionsvektor für Säugerzellen unter der Kontrolle eines starken Promotors kloniert werden. Ein positiver X-Gal-Test im Nukleus von Säugerzellen sollte auch die Funktionalität des Kernlokalisationssignals des *Lac-Z* Gens aus dem Targetingvektor nach der Transfektion des neuen Expressionvektorkonstruktes in Säugerzellen zeigen.

Die Überprüfung der HPRT-Selektionskassette sollte allein schon durch die Transfektion des Targetingvektors in HPRT defizienten embryonalen Stammzellen und durch die anschließende Selektion mit Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-Medium gewährleistet sein.

4.2.5.3. Homologe Rekombination und knock-out des *Dlk* Gens

Nachdem der *Dlk*/ZIP-Kinase Targetingvektor kloniert, sequenziert und dessen funktionelle Elemente überprüft worden sind, sollte der Vektor in HPRT defiziente embryonale Stammzellen transfiziert werden und anschließend eine Rekombination in das Genom der Stammzellen mittels der Selektion durch ein Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-Medium detektiert werden. Positive embryonale Stammzellen sollten mit Hilfe von PCR- und Southern-Blot-Analysen auf eine homologe Rekombination hin untersucht werden. Embryonale Stammzellen mit einer homologen Rekombination des *Dlk*/ZIP-Kinase Targetingvektors sollten anschließend mittels Blastozysteninjektion zunächst chimäre Mäuse erzeugen, aus denen danach eine transgene Mauslinie etabliert werden sollte. Durch die Verpaarung dieser transgenen Mauslinie mit kontinuierlich exprimierenden Flp-Mäusen [98] sollte die Deletion der von zwei *frt*-sites umgebene HPRT Selektionskassette aus den Tieren erreicht werden. Eine letzte Kreuzung der neu entstandenen transgenen Mauslinie mit induzierbaren Cre-Mäusen sollte die induzierbare und ubiquitäre Deletion des von *loxP*-sites begrenzten Sequenzbereiches von Exon 2 bis Exon 8 des *Dlk*/ZIP-Kinase Gens erlauben und damit den Austausch der *Dlk*/ZIP Kinase codierenden Region gegen das *LacZ*-Reportergen mit seinem Kernlokalisationsignal ermöglichen.

Die homologe Rekombination des *Dlk*/ZIP-Kinase Targetingvektors mit dem Genlokus des *Dlk*/ZIP-Kinase Gens, sowie die Flp-vermittelte Deletion der HPRT Selektionskassette und den letztendlich Cre-vermittelten Knock-out des *Dlk*/ZIP-Kinase Gens zeigt Abbildung 28.

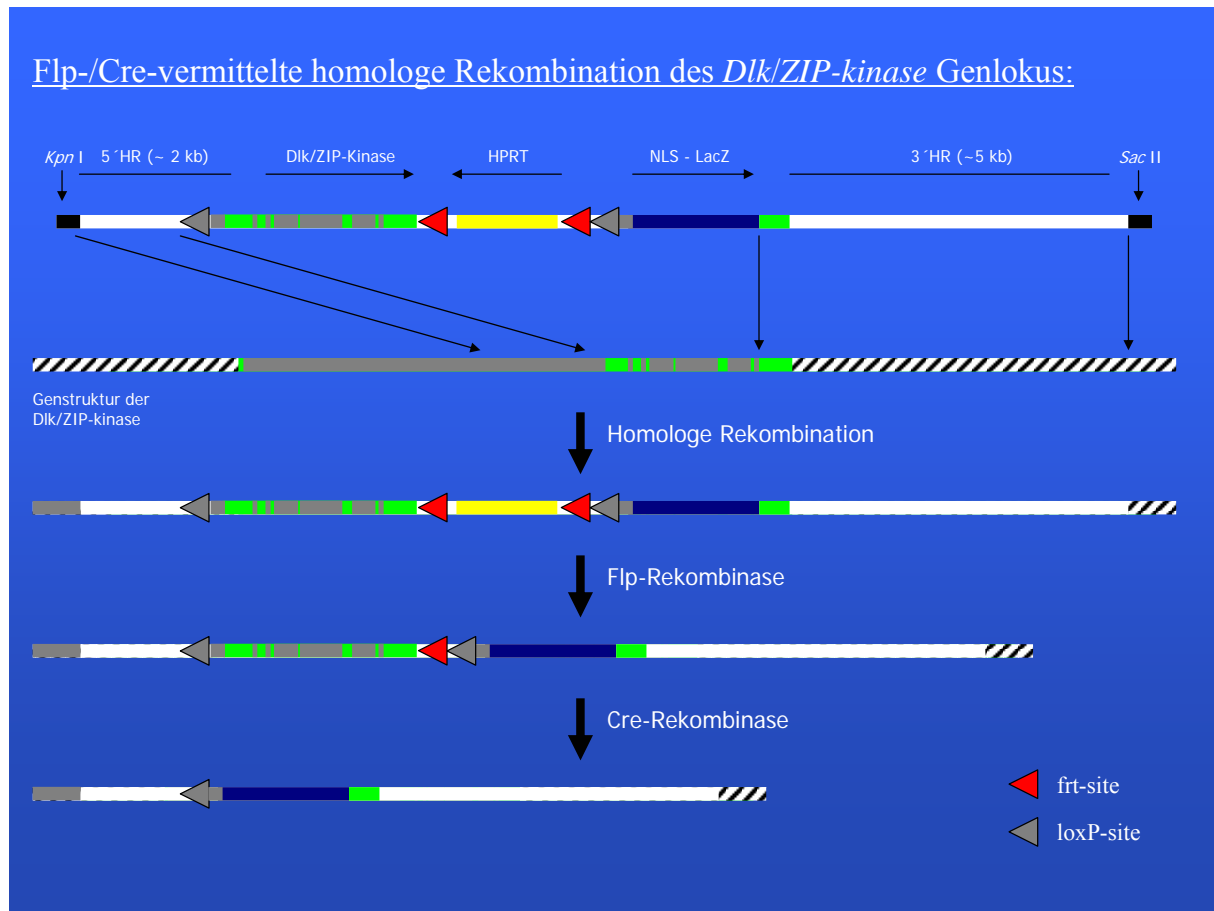


Abb. 28 Homologe Rekombination und konditionaler Cre-vermittelter knock-out des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens
Nach der homologen Rekombination des *Dlk/ZIP-Kinase* Targetingvektors mit dem Genlocus des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens erfolgt die Flp-vermittelte Deletion der HPRT-Selektionskassette. Anschließend erfolgt der *Dlk/ZIP-Kinase* knock-out über die induzierbare Cre-Rekombinase.

Die homologe Rekombination des *Dlk/ZIP-Kinase* Targetingvektors mit dem *Dlk/ZIP-Kinase* Genlocus, sowie die Flp-vermittelte Deletion der HPRT-Selektionskassette und die Cre-vermittelte Deletion des codierenden Bereiches des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens sollte mittels PCR- (Abb. 29-1) und Southern-Blot-Analysen (Abb. 29-2) detektiert werden.

Für die PCR-Analysen sollte ein *sense*-Primer dienen, der kurz vor dem 5' homologen Bereich des *Dlk/ZIP-Kinase* Targetingvektor, aber innerhalb des verlängerten 5' homologen Bereich des *Dlk/ZIP-Kinase* Test-Targetingvektor liegt. Der *antisense* Primer sollte spezifisch mit der ersten 5' gelegenen loxP-site des Targetingvektors hybridisieren. Bei einer homologen Rekombination sollte ein PCR Produkt von einer Größe zwischen 2,222 kb und 2,030 kb je nach Wahl der Position des *sense*-Primers amplifiziert werden. Kein PCR-Produkt oder ein PCR-Produkt, das sich von dem zuvor berechneten unterscheidet, sollte auf keine Rekombination bzw. auf eine nicht-homologe Rekombination deuten. Ebenfalls sollte nach

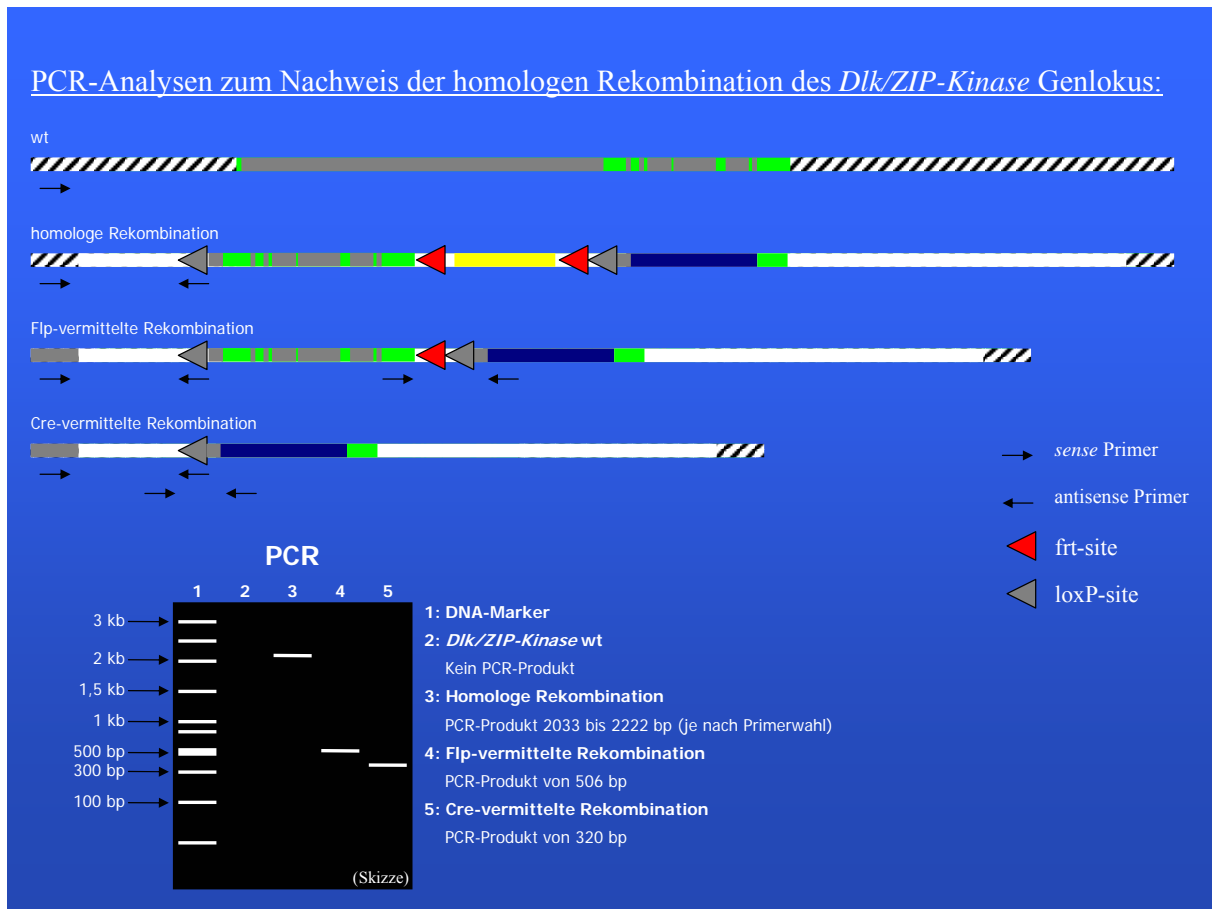


Abb. 29-1 PCR-Analysen zum Nachweis der homologen Rekombination des *Dlk/ZIP-Kinase* Genlokus

der Flp-vermittelten Deletion der HPRT-Selektionskassette bzw. der Cre-vermittelten Deletion der codierenden Sequenz des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens (Exon 2-8) mit dieser Primerkombination ein zwischen 2,222 kb und 2,030 kb großes PCR-Produkt amplifiziert werden. Als Positiv- bzw. als Negativkontrolle sollte der *Dlk/ZIP-Kinase* Test-Targetingvektor bzw. genomische DNA aus embryonalen HM-1 Stammzellen dienen. Neben dem PCR-Nachweis zu der homologen Rekombination sollten auch parallel PCR-Analysen zum Nachweis der folgenden Flp- bzw. Cre-vermittelten Rekombination durchgeführt werden. Nach der Flp-vermittelten Rekombination sollte durch eine PCR mit einem *sense*-Primer am Ende des 8ten Exons des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens und mit einem *antisense* Primer anfangs des *LacZ*-Reportergens ein Produkt von 506 bp amplifiziert werden. Nach der Cre-vermittelten Rekombination sollte in einer PCR mit einem *sense*-Primer vor der ersten loxP-site am 3'Ende des 5'homologen Bereichs und mit einem *antisense* Primer zu Beginn des *LacZ*-Reportergens ein Produkt von 320 bp detektiert werden.

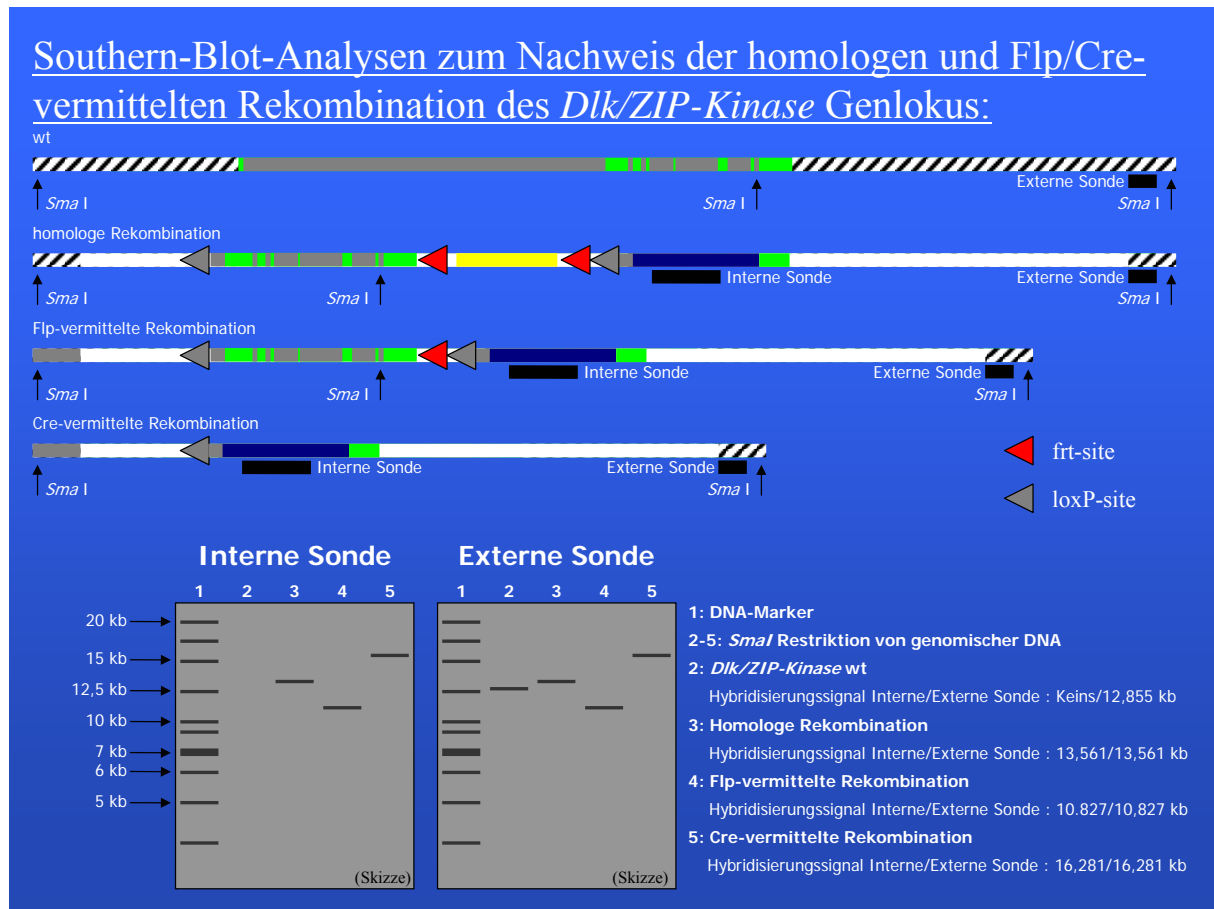


Abb. 29-2 Southern-Blot-Analysen zum Nachweis der homologen und Flp/Cre-vermittelten Rekombination des *Dlk/ZIP-Kinase* Genlokus

Die Southern-Blot-Analysen sollten mit einer im *LacZ*-Reportergen gelegenen internen und einer stromabwärts des 3' homologen Bereiches bezüglich des *Dlk/ZIP-Kinase* Targetingvektors gelegenen externen Hybridisierungsonde durchgeführt werden. Für die interne Hybridisierungssonde sollte als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle der *Dlk/ZIP-Kinase* Targetingvektor bzw. genomische DNA aus Embryonalen HM-1 Stammzellen dienen. Für die externe Hybridisierungssonde sollte als Positiv-Kontrolle genomische DNA aus embryonalen HM-1 Stammzellen dienen.

Mit der internen Sonde, die innerhalb des *LacZ*-Reportergens liegt (verwendet werden sollte das *LacZ*-DNA-Fragment aus dem zweiten Klonierungsschritt des Targetingvektors), sollte nach einer homologen Rekombination und der anschließenden Restriktion von genomischer DNA mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I ein Hybridisierungssignal von 13,561 kb identifiziert werden. Nach der Flp-vermittelten Deletion der HPRT-Selektionskassette bzw. der Cre-vermittelten Deletion des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens (Exon 2-8) sollte das

Hybridisierungssignal der internen Sonde um 2,734 kb auf 10,827 kb verkürzt bzw. um 2,720 kb auf 16,281 kb verlängert sein. Ein Hybridisierungssignal, das nicht dieser Größe entspricht bzw. mehrere Hybridisierungssignale zeigen eindeutig eine nicht-homologe Rekombination bzw. eine multiple Rekombination innerhalb des Genoms an.

Analog sollte mit der externen Sonde, die der Sequenz des HTGs Maus Klons RP23-85K13 (Accession No.: A073822; enthält *Dlk/ZIP-Kinase* Gen) von Position 162448 bis 164378 entspricht (gleiche Sonde wie zum Durchsuchen der genomischen Cosmid Bibliothek der Maus des Stammes 129/ola des RZPG), nach einer homologen Rekombination und der anschließenden Restriktion von genomischer DNA mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* ein Hybridisierungssignal von ebenfalls 13,561 kb identifiziert werden. Nach der Flp-vermittelten Deletion der HPRT-Selektionskassette bzw. der Cre-vermittelten Deletion des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens (Exon 2-8) sollte das Hybridisierungssignal der externen Sonde bei 10,827 kb bzw. bei 16,281 kb liegen. Der wildtyp des *Dlk/ZIP-Kinase* Gens sollte unter diesen Bedingungen ein Hybridisierungssignal von 12,855 kb zeigen.

4.2.5.4. Isolierung des *Dlk* Gens der Maus

Die Isolierung des gesamten murinen *Dlk* Gens erfolgte zunächst durch die Herstellung einer Sonde mit der anschließend ein Phagenscreen durchgeführt werden konnte. Aus diesem Grunde wurde genomische DNA aus embryonalen Stammzellen der Maus des Stammes 129/ola isoliert und als Template für eine PCR verwendet. Mit 2 Primern, die im 3' Bereich des Gens liegen, wurde ein 1953 bp langes DNA Fragment amplifiziert, welches nach Sequenzanalysen dem Bereich von den Nukleotiden 162448 bis 164400 des zuvor beschriebenen murinen HTGs Klons entsprach. Dieses Fragment wurde radioaktiv markiert und diente zum Durchsuchen einer genomischen Cosmid Bibliothek der Maus des Stammes 129/ola des RZPG (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH). Es wurden 8 positive Cosmide detektiert, die im Anschluß mittels PCR Screening mit den zuvor genannten verschachtelten Primern verifiziert wurden. Letztendlich enthielt nur der Cosmid Klon (RZPG-No.: MPMGc121P08271Q2) das *Dlk* Homolog der Maus. Dieser diente nun als DNA-Matrize in PCRs zur Amplifikation der 5' Homologen Region (1973 bp), des murinen *Dlk* Gens vom 2ten bis zum 9ten Exon (3492 bp) und der 3' Homologen Region (4980 bp) (siehe Klonierungsstrategie Abschnitt 4.2.5.1.), sowie einer externen Sonde, die nicht im Bereich der homologen Rekombination liegt, aber zur Verifizierung von positiv homologen Rekombinationen im Genome der Maus von ES-Zellen dienen sollte. Die Erzeugung des *Dlk* knock-out Vektors konnte im Zeitraum dieser Dissertation nicht mehr

durchgeführt werden; die einzelnen Teilfragmente stehen aber weiterhin in unserem Labor zur Verfügung.

5. Diskussion

5.1. CDC5 als neuer Interaktionspartner der Dlk

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung eines neuen Interaktionspartners der Dlk. Mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid* Systems war ein Teil der cDNA (795 bp) des CDC5-Homologen der Ratte isoliert worden (Dissertation Grit Page, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die komplette cDNA von CDC5 mit einem offenem Leseraster von 2425 bp isoliert, welche für ein Polypeptid von 802 aa kodiert und nach Sequenzvergleichen mit verschiedenen Datenbanken zu 100 Prozent mit der publizierten cDNA (GenBank accession no. AF000578.2) konform war. Die Interaktion der beiden Proteine wurde anschließend durch *in-vitro* Bindungs- und Kolokalisationsanalysen *in-vivo* verifiziert. Phosphorylierungsanalysen zeigten, dass CDC5 zumindest *in-vitro* kein Substrat der Dlk ist. Vielmehr wird CDC5 durch die assoziierte CK2 phosphoryliert. Da CDC5 als Spleißfaktor beschrieben war, wurde nach einer Kolokalisation mit SC35 und U5-116 gesucht. Überraschenderweise zeigten sowohl CDC5 als auch die Dlk eine Verdrängung von SC35 in das Cytoplasma anstatt einer Kolokalisation mit SC35. Diese Verdrängung führte in einem Reporterassay für alternatives Spleißen zu einer verstärkten Expression der Spleißvariante Casapase-2L des *Caspase-2* Gens.

5.1.1. Interaktionen zwischen CDC5 und Dlk

Die Interaktion der beiden Proteine konnte durch *in-vitro* Bindungsanalysen gezeigt werden. Die Interaktion von Dlk und CDC5 konnte allerdings nicht durch eine Koimmunpräzipitation bestätigt werden. Gründe für das Versagen dieser Nachweismethode sind höchstwahrscheinlich in der hohen Affinität beider Proteine zu nuklearen und schwer löslichen Kernstrukturen begründet. Das Herauslösen beider Proteine erfordert extreme Extraktionsbedingungen, die wiederum zu einer Dissoziation von Dlk und CDC5 führen. Diese These wird unterstützt durch den Befund, dass die Aufreinigung von rekombinantem His-Tag gekoppeltem CDC5 sowie His-Tag gekoppeltem Dlk nach der Expression in *SF9*-Zellen hohe Salzkonzentrationen der schwerlöslichen und stark Chromatin-angereicherten verbleibenden Fraktion nach der Kernfraktion erforderte.

5.1.2. Kartierungen der Interaktionsdomänen

Die Kartierung der Interaktionsdomänen zwischen der Dlk und CDC5 mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid-System* ergaben eine eindeutige Interaktion des Leuzin-Zippers der Dlk mit CDC5. Dieser Befund zeigte erneut, dass der Leuzin-Zipper der Dlk an multiplen Interaktionen mit verschiedenen Proteinen wie ATF4 [32] und AATF [51], sowie CDC5 beteiligt ist, die aber wiederum in verschiedene Signalwege eingebettet sind. Bis dato wurde ein Arginin-reicher Bereich N-terminal des Leuzin-Zippers als ein weiterer Interaktionsbereich der Dlk identifiziert, welches es der Dlk ermöglicht mit dem Leuzin-Zipper von Par-4 zu interagieren [33]. Jüngste Daten zeigten allerdings, dass auch die katalytische Domäne der Dlk zu einigen Interaktionen fähig ist. So interagiert diese mit der DAPK [34], dem Transkriptionsfaktor STAT3 [44], sowie MYPT1 [52;53](Abb. 30).

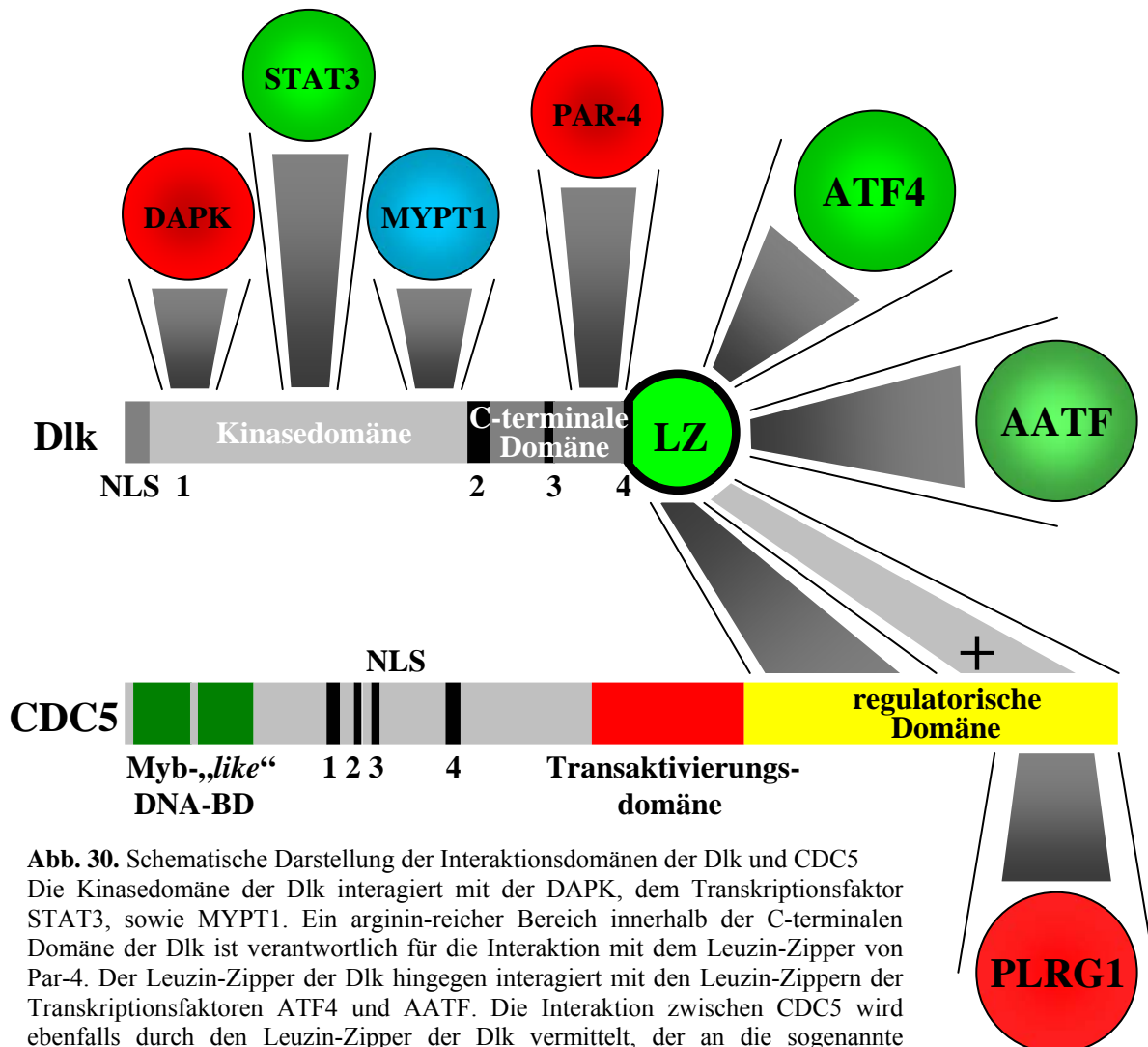


Abb. 30. Schematische Darstellung der Interaktionsdomänen der Dlk und CDC5

Die Kinasedomäne der Dlk interagiert mit der DAPK, dem Transkriptionsfaktor STAT3, sowie MYPT1. Ein arginin-reicher Bereich innerhalb der C-terminalen Domäne der Dlk ist verantwortlich für die Interaktion mit dem Leuzin-Zipper von Par-4. Der Leuzin-Zipper der Dlk hingegen interagiert mit den Leuzin-Zippern der Transkriptionsfaktoren ATF4 und AATF. Die Interaktion zwischen CDC5 wird ebenfalls durch den Leuzin-Zipper der Dlk vermittelt, der an die sogenannte regulatorische Domäne (gelb) von CDC5 bindet. Diese Interaktion bezüglich CDC5 setzt sich zusammen aus einer Hauptinteraktion sowie einer additiven Interaktion (+) innerhalb der sogenannten regulatorischen Domäne von CDC5. Dieser C-terminale Bereich der regulatorischen Domäne von CDC5 interagiert ebenso mit dem Spleißfaktor PLRG1.

Auf Seiten von CDC5 wurde ein Bereich zwischen den Aminosäureresten 500 und 659 als Interaktionsdomäne mit der Dlk identifiziert. Dieses Ergebnis wird im Weiteren bestätigt durch die Kolokalisation der Dlk und der N-terminalen CDC5 Deletionsmutante (aa 255 – 802), wohingegen keine Kolokalisation mit der C-Terminalen CDC5 Deletionsmutante (aa 1 – 254) detektiert werden konnte.

Weitere Analysen im *Yeast-Two-Hybrid*-System zeigten, dass der Bereich von CDC5 zwischen den Aminosäureresten 660 bis 802 die Dlk/CDC5-Interaktion verstärkt. Dieser Bereich von CDC5 interagiert interessanterweise auch mit dem Spleißfaktor PLRG1 [99](Abb. 30).

5.1.3. CDC5 ist kein Substrat der Dlk

Phosphorylierungs-Analysen lieferten keine Anzeichen für eine Phosphorylierung von CDC5 durch die Dlk. Vielmehr wurde CDC5 durch eine mitaufgereinigte Kinase, die anschließend als CK2 identifiziert wurde, phosphoryliert. Diese Befunde schließen jedoch die Möglichkeit einer *in-vivo* Phosphorylierung von CDC5 durch die Dlk nicht aus. Es könnte sein, dass hierfür eine adäquate Umgebung bestehend aus anderen Proteinen und Molekülen, wie z.B. das Spleißosoms benötigt wird. Auch könnte eine Phosphorylierung von CDC5 durch eine andere Kinase, wie z.B. Cdk's, erforderlich sein, um die räumliche Struktur von CDC5 zu ändern und somit der Dlk potentielle Phosphorylierungsstellen zu offenbaren. Analoge Voraussetzungen wurden zuvor schon für die Interaktion von NIPP1 mit CDC5 gezeigt, die nur nach erfolgter Phosphorylierung der interagierenden Domäne von CDC5 durch Cyclin E-Cdk2 zustande kommt [85].

Die Bedeutung der Phosphorylierung von CDC5 ist kaum untersucht. Sie scheint keinen Einfluss auf die Lokalisation im Kern, speziell in nuklearen „speckles“ zu haben. Dies wurde geschlossen, da die Behandlung von Zellen mit Staurosporin keinen Effekt auf die Lokalisation von CDC5 hatte [100]. Allerdings wirkt Staurosporin nicht auf CK2.

5.1.4. Lokalisation von CDC5

Unter dem Aspekt, dass CDC5 als Transkriptions- und/oder Spleißfaktor fungiert, sollte die zelluläre Lokalisation von CDC5 näher untersucht werden. Es zeigte sich, dass CDC5 ein nukleares Phosphoprotein ist, das eine punktuelle, „speckle“-ähnliche Verteilung aufweist. Eine identische zelluläre Lokalisation und Verteilung zeigt sich auch nach der verstärkten

Expression von CDC5 durch die Stimulation mit Prolaktin, Interleukin-2 und FGF-2 [101]. Ohne die transiente Überexpression oder verstärkte Expression durch Stimulanzen scheint CDC5 ein perinukleares [101] bzw. cytoplasmatisches Protein zu sein [76]. Zusammenfassend deutet dies daraufhin, dass CDC5 in geringer zellulärer Konzentration perinuklear bzw. cytoplasmatisch ist, aber in hoher Konzentration möglicherweise durch die Bildung von Homodimeren bzw. Multimeren im Nukleus lokalisiert ist.

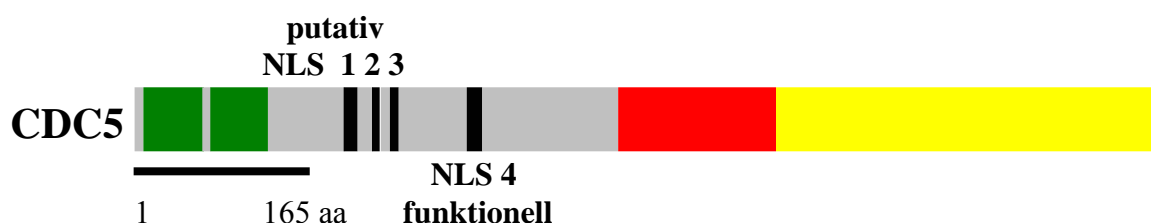


Abb. 31. Schematische Darstellung von CDC5 mit den strukturellen Motiven
CDC5 (802 aa) ist ein nukleares Phosphoprotein mit 4 NLSs (schwarz) und besteht aus einer Myb-,like“-DNA-Bindungsdomäne (grün), einer Transaktivierungsdomäne (rot) und einer sogenannten regulatorische Domäne (gelb).

Für den aktiven Kerntransport des C-Terminus von CDC5 konnte gezeigt werden, dass die NLS 4 wahrscheinlich ausreichend ist für den aktiven Kerntransport. Aufgrund der durchgeführten Experimente bestand weiterhin die Möglichkeit, dass auch eine oder mehrere der NLSs 1-3 funktionell sind, da der N-Terminus von CDC5 ebenfalls in den Zellkern transportiert wird (Abb. 31). Mit den Experimenten einer anderen Arbeitsgruppe [100] wurde allerdings gezeigt, dass der N-Terminus auch ohne die NLSs 1-3 im Zellkern lokalisiert ist, wie auch eine CDC5-Mutante, in der alle vier NLSs deletiert wurden. Im Gegensatz dazu ist der C-Terminus ohne NLS 4 im Cytoplasma lokalisiert. Demzufolge ist die NLS 4 ausreichend für den aktiven Kerntransport. Weiterhin scheinen die NLS 1-3 nicht unbedingt funktionell für einen aktiven Kerntransport zu sein. Vielmehr muss der N-Terminus (aa 1-165) von CDC5 eine bis heute unbekannte Sequenz für den aktiven Kerntransport enthalten oder durch die Assoziation mit einem NLS-enthaltenden Protein in den Zellkern gelangen. Zusammenfassend kann man mit den derzeitigen Untersuchungen sagen, dass CDC5 wt sowohl durch das funktionelle NLS 4 als auch durch eine unbekannte Sequenz im N-Terminus oder durch die Assoziation mit einem NLS-enthaltenden Protein in den Zellkern gelangen könnte (Abb. 31).

Beide in dieser Arbeit verwendeten CDC5 Mutanten, sowohl die C-terminal als auch die N-terminal deletierte Mutante, sind im Gegensatz zu CDC5 wt diffus im Zellkern lokalisiert. Es

scheint, dass das vollständige CDC5 bzw. insbesondere der Bereich um die Aminosäurereste 240- 270 für die Assoziation mit den sogenannten Kern-„speckles“ benötigt wird.

5.1.5. Homodimerisierung von CDC5

Aufgrund der Symmetrie der DNA-Zielsequenz von CDC5 wurde angenommen, dass CDC5 Homodimere bilden kann [88]. Diese Hypothese wurde mit Hilfe der beiden Deletionsmutanten von CDC5 sowie CDC5 wt bestätigt. So zeigte eine Koexpression von CDC5 wt mit N- und C-terminalen Fragmenten von CDC5 eine Umverteilung des C-Terminus von einer diffusen zu einer punktuellen Lokalisation, während der N-Terminus seine diffuse Verteilung beibehielt. Daraus ist zu schließen, dass die Homodimerisierung von CDC5 über die C-terminale Domäne vermittelt wird, wohingegen der N-Terminus eher mit sequenzspezifischen DNA- oder RNA-Elementen interagiert. Ob es sich um eine Dimerisierung von CDC5 handelt, oder ob auch höhere Komplexe entstehen, wurde nicht untersucht.

5.1.6. *In-vivo* Interaktionen zwischen der Dlk und CDC5

Der Nachweis für die *in-vivo* Interaktionen zwischen der Dlk und CDC5 beruhte hauptsächlich auf Kollokalisationsstudien mit GFP- bzw. dsRED-gekoppelten Fusionsproteinen der Dlk bzw. des CDC5 durch Fluoreszenzmikroskopie. Dabei zeigte sich, dass CDC5 und die Dlk perfekt in nuklearen „speckles“ kollokalisieren. Diese *in-vivo* Interaktion wird zum einen durch den Leuzin-Zipper der Dlk und zum anderen durch den C-Terminus von CDC5 vermittelt (siehe Abschnitt 5.1.2.). Dies wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass die Dlk in der Lage ist, den C-Terminus von CDC5 in die nuklearen „speckles“ zu rekrutieren. Ob die Lokalisation von CDC5 in „speckles“ tatsächlich von der Dlk abhängt, könnte durch Ausschalten der Dlk mittels der siRNA-Technik belegt werden.

Wie schon für die Dlk gezeigt [10] kommt es auch bei CDC5 zu einer partiellen Kollokalisation mit PML-*bodies*.

5.1.7. Biologische und biochemische Funktionen von CDC5

Genetische Befunde zeigten, dass CDC5 an der Regulation des G2/M-Übergangs beteiligt ist. Auf welcher biochemischen Aktivität dies beruht ist jedoch nicht vollständig geklärt. Der strukturelle Aufbau von CDC5 mit seinen charakteristischen „Myb-repeats“ ließ vermuten,

dass CDC5 ein Transkriptionsfaktor ist. Neuere genetische und biochemische Untersuchungen deuten dagegen eher auf eine Funktion als Spleißfaktor hin. Im Folgenden sollen noch mal Argumente und Befunde für die eine oder andere Funktion erörtert werden.

Ist CDC5 ein Transkriptionsfaktor?

Ein Hinweis auf eine Funktion als Transkriptionsfaktor basiert auf der Identifizierung einer für CDC5 spezifischen DNA-Zielsequenz (**GATTTAACATAA**), die in Kombination mit einem Reporter gen und CDC5 zu einer spezifischen Transkription führt [88]. Unabhängig von diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von CDC5 mit seiner DNA-Bindungsdomäne bestehend aus dem Myb-homologen Bereich spezifisch an Oligonukleotide, bestehend aus der Myb-Konsensussequenz, binden kann. Diese Interaktion wird weiterhin aufgrund der erhöhten Expression von CDC5 durch Prolaktin oder FGF-2 verstärkt [101]. Unter Verwendung dieser Reporterkonstrukte mit der ermittelten CDC5 spezifischen DNA-Zielsequenz konnte in eigenen Transaktivierungsanalysen weder mit CDC5 eine Transaktivierung detektiert noch ein Einfluss der Dlk gezeigt werden (H. Engemann, unpublizierte Ergebnisse). Ein eindeutiger Beweis für die Funktionalität von CDC5 als Transkriptionsfaktor wäre letztendlich die Identifizierung von CDC5 spezifischen Zielgenen.

CDC5 als Spleißfaktor

Hinweise für die Funktion von CDC5 als Spleißfaktor von pre-mRNA basieren hingegen aus genetischen Untersuchungen innerhalb der Hefe [73;83], sowie die Identifizierung von CDC5 als Bestandteil des Spleißosoms [83;102]. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von CDC5 in einem *in-vitro* Spleiß-System zur Inhibition führt [103]. Allerdings führte die Zugabe von rekombinantem CDC5 nicht wieder zur Reaktivierung der Spleißreaktion. Vermutlich wurden durch die Depletion von CDC5 weitere Faktoren aus dem System entfernt. So konnte gezeigt werden, dass CDC5 und PLRG1 hochkonservierte Komponenten eines Multiproteinkomplexes einer Untereinheit des humanen Spleißosoms sind und deren Interaktion über das C-terminale Ende von CDC5 mit der WD40 Domäne von PLRG1 essentiell für die Spleißreaktion von pre-mRNA ist [99;103;104]. Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass CDC5 ein Teil eines großen Komplexes von mehr als 30 unterschiedlichen Proteinen, unter anderem ASF/SF2 und SC35, ist, wobei die meisten von ihnen als Komponenten des Spleißosoms bekannt waren. Sechs von diesen

Proteinen scheinen mit CDC5 einen festen Hauptkomplex, den so genannten CDC5-Komplex, zu bilden [103]. Zu diesen Proteinen gehören die DNA-abhängige Protein Kinase und die Phosphatasen PP2c und PP1. Es konnte gezeigt werden, dass die „Forkhead“-assoziierte Domäne von NIPP1, eine regulatorische Untereinheit von PP1, mit dem C-terminalen Ende von CDC5 interagiert und somit die *in-vitro* Spleißreaktion von β -Globin pre-mRNA inhibiert. Dabei ist die Inhibition abhängig von der Phosphorylierung von CDC5, wie z.B. durch Cdk2/ Cyclin E [85]. Es wird vermutet, dass NIPP1 entweder die Dephosphorylierung von CDC5 oder eines CDC5-assoziierten Proteins durch PP1 einleitet oder selbst als ein erforderliches Bindeprotein für die Interaktion zwischen CDC5 und PP1 fungiert. Die Dlk wurde nicht in diesem CDC5-Komplex detektiert, was dadurch erklärt werden könnte, dass seine Assoziation mit CDC5 zu schwach ist. Zusätzlich existiert die Möglichkeit, dass die Interaktion vom Phosphorylierungszustand oder vom physiologischen Zustand einer oder mehrerer Interaktionspartner abhängig ist, so wie es für NIPP-1 gezeigt werden konnte [85].

CDC5 scheint direkt oder indirekt an der Regulation des alternativen Spleißens von pro- und antiapoptotischen Faktoren beteiligt zu sein. Über die Regulation des alternativen Spleißens ist bis dato wenig bekannt. Es gibt Hinweise, dass bestimmte Spleißfaktoren, insbesondere SR-Proteine, bestimmte Spleiß-Stellen in der pre-mRNA aufgrund der umgebenden Sequenz erkennen und für das Spleißosom als Spleiß-Stelle markieren. Die Regulation dieser Spleißfaktoren erfolgt am Beispiel der SR-Proteine über die sogenannten SR-Kinasen (z.B. SRPK1 und SRPK2). Eine Phosphorylierung von SR-Proteinen führt häufig zu einer Delokalisierung dieser von *naszierender* RNA und somit zu einer fehlenden Kennzeichnung alternativer Spleiß-Stellen für das Spleißosom [94]. Experimente dieser Arbeit zeigen, dass CDC5 ebenso wie die Dlk das Potential besitzt den Spleißfaktor SC35 ins Cytoplasma zu verdrängen. Obwohl SC35 ein allgemeiner Spleißfaktor ist, kann es ebenso das alternative Spleißen spezifischer pre-mRNAs, wie z.B. die pre-mRNAs von *IgM*, *HIV tat* [105], sowie die von *Caspase-2* beeinflussen [95]. Das alternative Spleißen der pre-mRNA von *Caspase-2* führt zu zwei mRNAs, dem pro-apoptotischen Caspase-2S Transkript und dem anti-apoptotischen Caspase-2L Transkript. Nukleares SC35 begünstigt dabei die apoptotisch wirkende Spleißvariante Caspase-2S. Die Verdrängung von SC35 durch CDC5 ebenso wie durch die Dlk könnte so indirekt die Expression der anti-apoptotisch wirkenden Spleißvariante Caspase-2L fördern (Abb. 32). Die Verdrängung von SC35 aus dem Nucleus durch CDC5 könnte dabei durch eine konkurrierende Interaktion von CDC5 und SC35 mit einem weiteren Protein erfolgen. Dabei wird eine maximale Verdrängung durch CDC5 in

voller Länge erreicht und jeweils 75 Prozent dieser Verdrängung allein durch den N-Terminus bzw. C-Terminus von CDC5. Die Verdrängung von SC35 durch die Teilfragmente von CDC5 wurde nur in den *Caspase2* Mini-Gen Spleißanalysen, aber nicht mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Möglicherweise befindet sich die für die Verdrängung von SC35 verantwortliche Domäne mit einem Teilbereich auf dem N-Terminus und mit dem anderen Teilbereich auf dem C-Terminus von CDC5. Beide Teilbereiche scheinen noch vermindert eine Verdrängung von SC35 aus dem Nukleus zu bewirken. Somit könnte der Wechsel der subzellularen Lokalisation von SC35 in Abhängigkeit von CDC5 oder der Dlk ein regulativer Mechanismus für das alternative Spleißen sein, insbesondere für eine SC35-spezifische Population von pre-mRNAs.

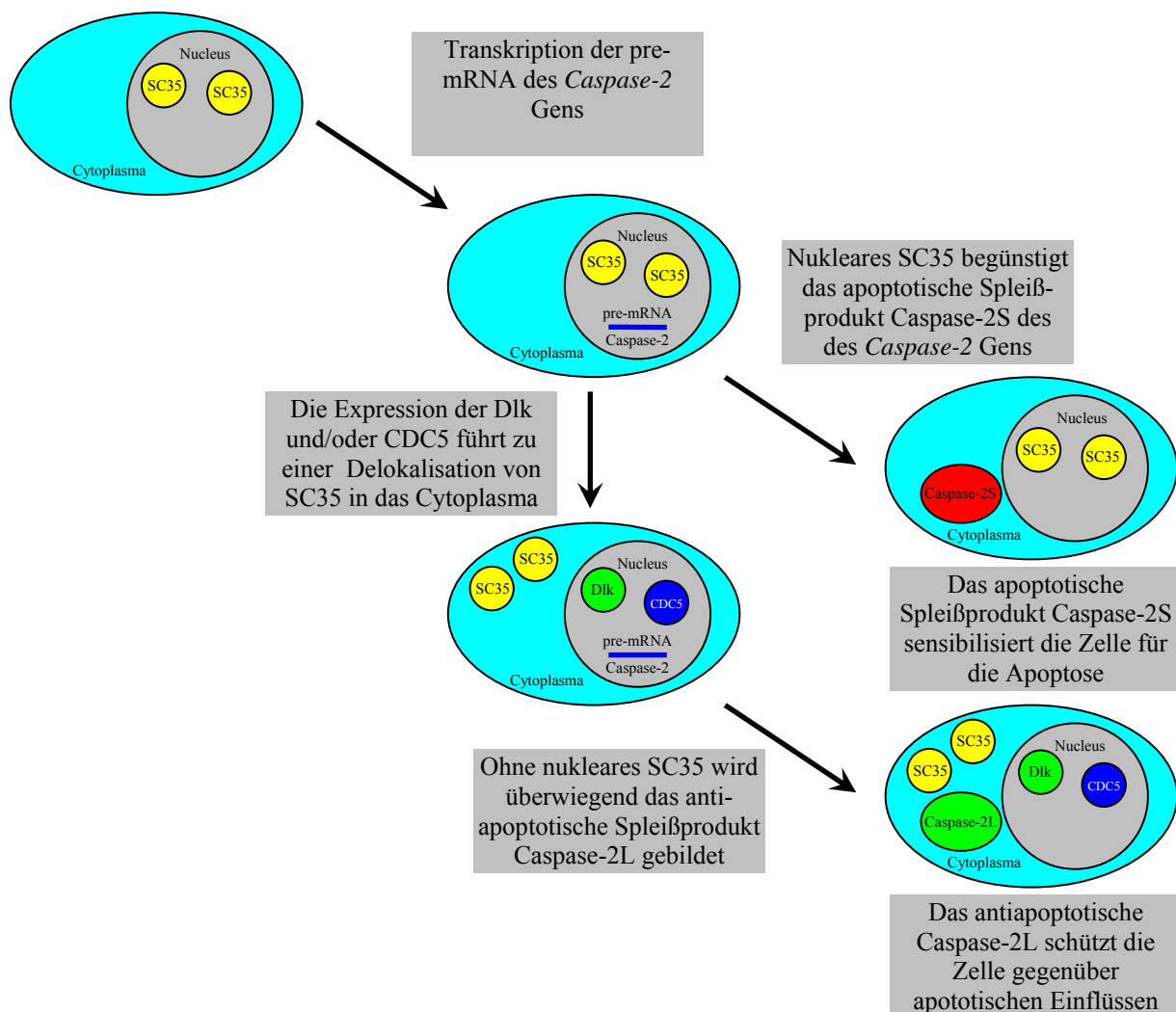


Abb. 32. Modell zur möglichen Rolle von Dlk/CDC5 beim alternativen Spleißen von *Caspase2* prä-mRNA. Das alternative Spleißen der prä-mRNA von *Caspase-2* führt zu zwei mRNAs, dem proapoptischen Caspase-2S Transkript und dem anti-apoptischen Caspase-2L Transkript. Nukleares SC35 begünstigt dabei die Spleißvariante Caspase-2S. Die Verdrängung von SC35 durch CDC5 ebenso wie durch die Dlk verschiebt das Gleichgewicht zugunsten der Spleißvariante Caspase-2L.

Ein Beweis dafür, ob CDC5 an dem Spleißen der pre-mRNA des *Caspase-2*-Transkriptes selbst essentiell beteiligt ist, können die *Caspase-2* Mini-Gen Spleiß-Analysen dieser Arbeit allerdings nicht geben. Dies könnte allerdings durch einen Knock-out von endogenem CDC5 mittels der siRNA-Technik und den hier verwendeten *Caspase-2* Mini-Gen-Spleiß Analysen nachgewiesen werden.

Die verstärkte Expression des anti-apoptischen Faktors Caspase-2L durch CDC5 ist synergistisch mit der antiapoptischen Wirkung von Prolaktin. Dabei führt die Behandlung von Zellen mit dem mitogenen Prolaktin sowie dem nicht-mitogenen FGF-2 zu einer verstärkten Expression von CDC5 [101], sowie der antiapoptischen Gene *Bcl-2*, *Pim-1* und *Bag-1* [106;107]. Interessanterweise führt die Behandlung mit Prolaktin auch zu einer verstärkten Expression des *EF2*-Gens [108], dem in dieser Arbeit identifizierten 5'-gelegenen Gen des *Dlk*-Gens (siehe Abschnitt 5.2.). Eventuell induziert Prolaktin die Expression eines ganzen Clusters von Genen inklusive des *Dlk*-Gens, das in diesem Fall dann auch synergistisch antiapoptisch wirken würde wie CDC5 bzw. Prolaktin.

Die Interaktion von CDC5 mit dem antiapoptischen Transkriptionsfaktor AATF, gezeigt anhand von *in-vitro* Bindungsanalysen, deutet hin auf eine mögliche Verknüpfung von CDC5 mit der Transkription oder auch mit dem Spleißen. Möglicherweise bilden CDC5 und AATF Heterodimere. In diesen Heterodimeren könnte AATF als Kofaktor die Transkription und CDC5 das Spleißen von spezifischen Genen regulieren oder koordinieren.

Welche Rolle spielt CDC5 beim G2/M-Übergang?

Die Beteiligung von CDC5 am G2/M Übergang des Zellzyklus ist zumindest teilweise auf die Funktion von CDC5 als Spleißfaktor zurückzuführen. Neuere Untersuchungen an Säugerzellen zeigten, dass CDC5 essentiell am Spleißen der prä-mRNA von α -Tubulin beteiligt ist. In Abwesenheit von CDC5 erfolgt ein ineffizientes Spleißen der α -Tubulin-mRNA. Dies führt zu einem defekten Microtubuli-Cytoskelett einhergehend mit einem Zellarrest am G2/M-Übergang [109].

Man kann vermuten, dass CDC5 ein allgemeiner Spleißfaktor ist und an der Regulation des Spleißens beteiligt ist. Daneben scheint es aber auch spezielle Spleißvorgänge wie das alternative Spleißen der Caspase-2-Transkripte oder das Spleißen der pre-mRNA von α -

Tubulin während des G2/M-Übergangs zu beeinflussen [68;81;82;109]. Nach der verstärkten Expression von CDC5 durch mitogene (Prolaktin) und nicht-mitogene (FGF-2) Stimulanzen [101] scheint CDC5 also das alternative Spleißen von mitotischen und antiapoptotischen Faktoren zu regulieren.

5.1.8. Biologische Funktion der Dlk

Bis heute wurde eine Beteiligung der Dlk an der Regulation von 4 zellulären Prozessen beschrieben. Zu diesen Prozessen gehören a) die Apoptose, b) die Mitose (speziell die Cytokinese), c) die Transkription und d) die Zell-Polarität und –Motilität.

Anfänglich wurde die Dlk aufgrund ihrer Verwandtschaft zu der DAPK mit proapoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht. Die Beweisführenden Experimente beruhten allerdings nicht auf normalen Bedingungen. Abgesehen von den Forschungsergebnissen einer Arbeitsgruppe ist die apoptotische Wirkung der Dlk streng von der cytoplasmatischen Lokalisation der Dlk abhängig [8;11;33;51]. So zeigt die C-terminal verkürzte Deletionsmutante Dlk Δ C2, sowie die Interaktion von Dlk wt mit Par-4 eine Umverteilung der Dlk in das Cytoplasma, die mit starken Anzeichen der Apoptose einhergeht. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Phosphorylierung der Dlk durch die DAP Kinase zu einer Relokalisation der Dlk in das Cytoplasma führt, wo diese ein weitaus größeres Apoptose-induzierendes Potential besitzt [34].

Im Gegensatz dazu beschrieben Kawai *et al*, dass auch nukleares Dlk Apoptose induzieren kann [32]. In einer weiterführenden Studie wurde gezeigt, dass die Behandlung mit As₂O₃ oder IFN- γ zu einer vermehrten Bildung von PML-Bodies, sowie zu einer Assoziation von Dlk, Daxx und Par-4 mit diesen Strukturen führt. Des Weiteren scheint die Koexpression von Par-4 die Dlk/Daxx Assoziation zu fördern. Umgekehrt vermindert die Reduktion der Expression der Dlk, Daxx und Par-4 mittels der siRNA-Technik die Aktivierung von Caspasen und der Apoptose durch As₂O₃ oder IFN- γ [36]. Auch konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Dlk p21^{WAF1} an Thr145 phosphoryliert. Es wird angenommen, dass diese Modifikation von p21^{WAF1} durch die Dlk zu einem Wechsel der Lokalisation von p21^{WAF1} führen kann und die Zelle so für die Apoptose sensibilisieren könnte [49].

Dlk kann also unter verschiedenen Bedingungen Apoptose auslösen. Unter welchen physiologischen Bedingungen dies geschieht ist aber nicht geklärt. Normalerweise scheint die Dlk eher anti-apoptotisch zu wirken. Tatsächlich führt auch die Ausschaltung der Dlk durch

die siRNA Technik unter anderem zur Apoptose. Auch die möglichen Konsequenzen der Verdrängung von SC35 (siehe Abschnitt 5.1.7.), nämlich die bevorzugte Bildung der anti-apoptotischen Form von Caspase-2 deutet eher auf eine anti-apoptotische Funktion der Dlk hin.

Eine weitere Funktion der Dlk scheint die Beteiligung an der Regulation der Mitose zu sein. Es wird angenommen, dass Dlk eine Centromer-spezifische Histon Kinase ist, deren Funktion es ist, centromeres Chromatin für anschließende mitotische Abläufe zu markieren [38]. Des Weiteren befindet sich die Dlk während der Cytokinese bevorzugt an dem kontraktilen Aktin-Myosin Ring und kolokalisiert dort mit dem an Ser19 phosphorylierten MLC, einem *in-vitro* Substrat der Dlk, das abhängig von seinem Phosphorylierungs-Status sowohl für Strukturänderungen des Aktin-Cytoskelettes als auch für kontraktile Prozesse während der Mitose und Cytokinese, aber ebenso während der Apoptose verantwortlich ist [37]. All diese Befunde deuten auf einen Einfluss der Dlk in der Regulation und Koordination der Mitose und Cytokinese hin.

Eine weitere Funktion von nuklearer Dlk könnte die Regulation der Transkription sein. Darauf weisen die Interaktionen der Dlk mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (ATF4, AATF und STAT-3) und die partielle Kolokalisation mit PML-*bodies*. Für ATF4 gibt es bisher keine Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss der Dlk auf die ATF4-vermittelte Transkription. Dagegen zeigt sich ein verstärkender Effekt der Dlk auf die Androgenrezeptor-vermittelte Transaktivierung, welche durch AATF noch gesteigert wird (P. Leister, unpublizierte Ergebnisse). Ferner zeigten Sato *et al* [44], dass die Dlk auch mit dem Transkriptionsfaktor STAT3 interagieren und dessen Aktivität verstärken kann. STAT3 wird durch Cytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und besitzt wichtige Funktionen während des Zellwachstums, der Apoptose sowie der Zelltransformation. Seine Aktivität wird außer durch die Cytokin-aktivierten JAK-Kinasen auch durch weitere Kinasen moduliert. Es wird angenommen, dass der Einfluss der Dlk auf die Transkriptionsaktivität auf der Phosphorylierung von STAT3 an Ser727 beruht [44].

Eine weitere Funktion der Dlk scheint die Regulation der Zell-Polarität und -Motilität zu sein. Auch in diesem Zusammenhang ist die Phosphorylierung von MLC von Bedeutung. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von MLC durch die Dlk zu der Bildung von stabilen Myosin Filamenten in den sogenannten *stress fiber* Strukturen führt. Somit könnte die Dlk

durch die Phosphorylierung von MLC die dynamische Reorganisation von Myosinstrukturen fördern und damit die Zellpolarität beeinflussen und die Zellmotilität unterstützen [48].

5.1.9. Biologische Funktion der Dlk/CDC5 Interaktion

Die biologische Funktion der Dlk/CDC5 Interaktion lässt zum derzeitigen Wissensstand größtenteils nur Vermutungen zu.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Dlk aufgrund der Interaktion mit CDC5 zu ihren spezifischen Substraten geleitet wird bzw. diese Interaktion die Phosphorylierung von CDC5 assoziierten Proteinen erlaubt. Aufgrund der Tatsache, dass CDC5 einen eigenen CDC5-Komplex innerhalb des Spleißosoms bildet und auch eines der Hauptproteine des Spleißosoms darstellt, besitzt es eine große Anzahl von Interaktionen mit diversen Spleißfaktoren. Aufgrund einer hypothetischen Zielführenden Funktion von CDC5 ergibt sich für die Dlk somit eine gewisse Anzahl von Zielproteinen des Spleißosoms. Insbesondere Spleißfaktoren stellen dann potentielle Phosphoproteine der Dlk dar. So zeigen auch Ergebnisse dieser Arbeit eine starke, sowie eine schwache Phosphorylierung der Spleißfaktoren ASF/SF2 bzw. SC35 durch die Dlk. Diese beiden Spleißfaktoren wurden auch mit Hilfe der Massenspektrometrie als 2 von mehr als 30 unterschiedlichen Proteinen des CDC5-Komplexes des Spleißosoms identifiziert [103]. Interessanterweise interagiert CDC5 mit seinem C-Terminus im Bereich zwischen den Aminosäureresten 706 bis 802 mit PLRG1, einem weiteren Spleißfaktor des Spleißosoms, wobei diese Interaktion essentiell für das Spleißen von pre-mRNA ist. Ferner wurde gezeigt, dass diese Interaktion durch die Aminosäurereste 600 bis 705 von CDC5 verstärkt bzw. stabilisiert wird [99]. Es besteht nun die Möglichkeit, dass die Dlk, die mit fast dem gleichen Sequenzabschnitt von CDC5 interagiert, und PLRG1 um diese Bindungselemente von CDC5 konkurrieren und die Dlk so direkt Einfluss auf das Spleißen von pre-mRNA nimmt.

Trotz der Tatsache, dass CDC5 und die Dlk perfekt in nuklearen „speckles“ kolokalisieren, kann man keine Kolokalisation von CDC5 und der Dlk mit den Spleißfaktoren SC35 oder U5-116 detektieren, die allgemein als Marker für das Spleißosom und nukleare „speckles“ dienen. Weitere wurden allerdings bisher nicht untersucht. Stattdessen wird endogenes SC35 durch eine transiente Überexpression von CDC5 bzw. Dlk aus den nuklearen „speckles“ ins Cytoplasma verdrängt. Die Regulation der intrazellulären Verteilung von SR-Proteinen und der Beeinflussung des pre-mRNA Spleißens durch Phosphorylierung wurde zuvor schon für die Dual-spezifischen Proteinkinasen Clk2 und Clk3, die SR-Kinasen SRPK1 und SRPK2,

sowie für CDC2 und die Topoisomerase I beschrieben [94;110-116]. Dieser Mechanismus ist tatsächlich ein Indiz für SR-Kinasen. Demnach erscheint der Verdrängungseffekt von SC35 durch die Dlk aus den nuklearen „speckles“ in das Cytoplasma sehr analog zu verlaufen, wie es zuvor schon bei anderen SR-Kinasen beobachtet worden ist. Tatsächlich sind sowohl SC35 als auch ASF/SF2 in-vitro-Substrate der Dlk.

Eine weitere interessante Funktion der Dlk/CDC5 Interaktion könnte während der Mitose bestehen. Es gibt Evidenzen dafür, dass die Dlk einen Einfluss auf die Regulation und Koordination der Mitose und der Cytokinese besitzt [37] und CDC5 am Spleißen der pre-mRNA von α -Tubulin während des G2/M Übergangs involviert ist [68;81;109]. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass CDC5 und die Dlk während der G2- und M-Phase durch ihre *in-vivo* Interaktionen Prozesse des G2/M-Übergangs und der Mitose koordinieren und regulieren. So konnte für die Dlk gezeigt werden, dass sie von der Prophase bis zur frühen Anaphase mit den Centromeren assoziiert ist [37]. Andererseits konnte für CDC5 gezeigt werden, dass es während der Metaphase nicht mehr in Spleißosomen, sondern an Kinetochoren und den mitotischen Spindeln lokalisiert ist [100]. Hypothetisch möglich wäre wieder eine Zielführende Funktion von CDC5 bezüglich der Dlk zu den Kinetochoren, um dort Kinetochor-Komponenten zu phosphorylieren.

Allgemein könnte man die Hypothese aufstellen, dass die Dlk *per se* eine Kinase ist, die durch bestimmte Sequenzmotive mit anderen Proteinen interagieren und kommunizieren kann, welche dann die Dlk in bestimmte Zellbereiche rekrutieren, in denen die Dlk anschließend seine spezifischen Substrate phosphoryliert.

5.2. Genomische Struktur des *Dlk*-Gens

Die Aufklärung der genomischen Struktur des *Dlk*-Gens und die Identifizierung regulatorischer Elemente, die für die Transkription des *Dlk* Gens benötigt werden, erfolgte durch eine Durchsuchung einer genomischen Ratten λ -DASH II Phagenbank mit Hilfe von Southern Blot Analysen auf Sequenz Kompatibilität mit dem 5' Bereich (nt 1 bis 851) der Ratten *Dlk* cDNA. Ein positiver Klon der Southern Blot Analysen enthielt ein DNA-Fragment von mehr als 10 kb, das mit Hilfe der PCR genauer analysiert wurde.

Es zeigte sich, dass die Nukleotide 1 – 76 und 77 – 134 der *Dlk* cDNA das Exon 1 und 2 repräsentieren, die durch 824 bp des ersten Introns voneinander getrennt sind. Folglich liegt der Translationsstartpunkt der *Dlk* an der cDNA Position 114 im 2ten Exon [10]. Die entsprechende genomische DNA zum 1sten Exon enthält zusätzlich ein Guanin-Nukleotid an der Position 13 im Vergleich zu der cDNA. Diese Tatsache ist höchstwahrscheinlich in einem Sequenz-Polymorphismus begründet, der keinerlei Konsequenzen hat, da er in einem nicht kodierenden Bereich der *Dlk* positioniert ist. Weitere Sequenzvergleiche mit Datenbanken des NCBI zeigten, dass das *eEF-2* (Eukaryotic Translation Elongation Factor 2) Gen nur 972 bp stromaufwärts vom 1sten Exon des *Dlk* Gens gelegen ist. Interessanterweise konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die Behandlung von Zellen mit dem mitogenen Prolaktin zu einer verstärkten Expression von *eEF-2* [108] und ebenso zu einer verstärkten Expression von *CDC5* [101], dem neu identifizierten Interaktionspartner der *Dlk*, führt. Eventuell induziert Prolaktin die Expression eines ganzen Clusters von Genen inklusive des *Dlk*-Gens. Dies wäre ein Indiz für Einbettung dieser drei Proteine in spezifische Signalwege und/oder einer kooperativen Beteiligung an der Regulation und Steuerung bestimmter zellulärer Prozesse wie z.B. während der Mitose des Zellzyklus.

Der präzise Transkriptionsstartpunkt der *Dlk* konnte mit Hilfe von Primer-Extension Analysen nicht identifiziert werden, da anscheinend das *Dlk* Gen niedrige Transkriptionsraten aufweist oder die Halbwertszeit der *Dlk*-Transkripte sehr niedrig ist, sodass relativ gesehen sehr wenig *Dlk*-Transkripte in der zellulären Gesamt-RNA existieren. Die Gesamtlänge des *Dlk* Transkriptes wurde zuvor durch Northern Blot Analysen mit einer Größe von 1,65 bis 1,7 kb bestimmt [10]. Unter Berücksichtigung, dass der poly(A)-Schwanz von Transkripten durchschnittlich zwischen 150 bis 200 Nukleotide enthält, ist anzunehmen, dass die isolierte *Dlk* cDNA, die ein Polyadenylierungssignal enthält, aber kein poly(A)-Sequenz besitzt, vollständig ist. Somit erscheint die Annahme plausibel, dass das erste Nukleotid der cDNA der Transkriptionsstartpunkt ist.

5.2.1. Promotor Analysen des *Dlk* Gens

In der Annahme, dass die intergenomische Region zwischen dem *eEF-2* Gen und dem Transkriptionsstartpunkt des *Dlk* Gens den *Dlk* Promotor enthält, wurden diverse Fragmente dieses Bereiches in Luciferase-Promotor Analysen verwendet. Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Analysen konnte der *Dlk* Core-Promotor dem Segment zwischen den Nukleotiden -37 und -81, ein Enhancer dem Segment zwischen -82 und -137 zugeordnet werden (Abb. 33).

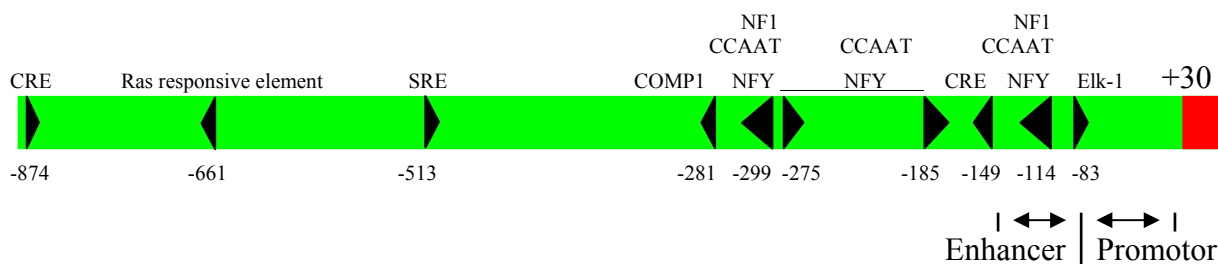


Abb. 33. Grafische Darstellung putativer transkriptioneller Elemente und der verifizierte Enhancer der *Dlk*. Mögliche Bindungsstellen von Transkriptionfaktoren, sowie der verifizierte Enhancer und Promotor im isolierten 5' Bereich der *Dlk* (rot = Exon; grün = Intron). Zifferangaben beziehen sich auf das erste vergleichende Nukleotid aus der cDNA.

Weitere Computer unterstützte Analysen (Matinspector V2.2 mit Transfac 5.0 Datenbank) der transkriptionellen regulatorischen Region der *Dlk* deckten keine typische TATA Box auf, aber verschiedene CCAAT Boxen und potentielle Bindungsstellen für diverse Transkriptionsfaktoren (Elk-1, NF-1/NF-Y, CREB, COMP1), sowie ein SRE und ein Ras RE (Abb. 33). Eine Elk-1 und eine CCAAT/NF1/NF-Y Erkennungssequenz sind in der Region des Enhancer lokalisiert. Dieselben 6 Elemente wurden auch an einer ähnlichen Position in der 5' stromaufwärts Region der *mus musculus* *Dlk* identifiziert, was die Vermutung nahe legt, dass diese funktionell konserviert sind.

5.2.2. Vergleichende Genstruktur-Analysen der *Dlk* Homologen

Die Entschlüsselung der genomischen Struktur *Dlk* Gens aus der Ratte erfolgte mit Hilfe des zuvor erwähnten positiven Phagenklons und PCR-Analysen. Erste Analysen ergaben, dass 730 Nukleotide (Position 88-817) der *Dlk* cDNA über ca. 6,3 kb des Ratten *Dlk* Gens verteilt sind. Dies bedeutet, dass das genomische DNA Fragment ein oder mehrere Introns mit einer Gesamtlänge von ca. 5570 bp beinhaltet.

Seitdem das humane und murine Genom vollständig sequenziert worden sind, bestand nun die Möglichkeit die Intron/Exon Struktur des *Dlk* Gens dieser beiden Spezies miteinander zu vergleichen. Sowohl das humane als auch das murine *Dlk* Homolog besitzen eine hochkonservierte Organisation bezüglich der Anzahl und Länge der korrespondierenden Exons. Die transkribierte Region des humanen Gens erstreckt sich über 11376 bp und das des murinen Gens über 8990 bp. Es wurden für beide Homologen 9 Exons und 8 Introns ermittelt.

Alle Exons mit Ausnahme des ersten und letzten Exons besitzen absolut identische Länge, im Gegensatz zu der teilweise unterschiedlichen Länge der korrespondierenden Introns beider Homologen. Ebenso ist bei beiden Homologen das *eEF-2* Gen das stromaufwärts benachbarte Gen, wie es zuvor schon für das Homolog in der Ratte identifiziert worden ist.

Mit Hilfe des Phagenklon, der die genomische Sequenz des *Dlk* Gens der Ratte enthielt, und PCR-Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das *Dlk* Gen aus der Ratte analog zu seinen Homologen aus dem Menschen und der Maus aus 9 Exons und 8 Introns aufgebaut ist. Abbildung 34 zeigt grafisch den strukturellen Aufbau der *Dlk* Gene in den drei Spezies.

Homo Sapiens



Mus Musculus



Rattus Norvegicus

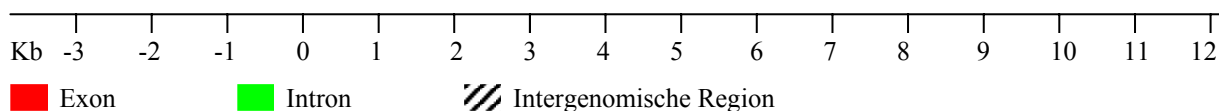


Abb. 34. Graphischer Vergleich des humanen, murinen und ratten *Dlk* Gens

Die Gesamtstruktur des *Dlk* Gens im Menschen, in der Maus und in der Ratte besitzt einige interessante Gemeinsamkeiten. Von den 9 Exons ist das erste Exon untranslatiert, da sich das Startcodon im zweiten Exon befindet. Die Exons 2 bis 8 kodieren die Kinasedomäne der Dlk während das 9te Exon den gesamten C-Terminus der Dlk beinhaltet. Es ist davon auszugehen, dass dieses Exon 9 während der Evolution an ein schon existierendes genomisches Element, das die Kinasedomäne kodiert, durch Rekombination angeheftet wurde. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Kinasedomäne zweier weiterer Mitglieder der humanen DAP-Kinase Familie (*DAPK1* und *DAPK2*) durch 7 Exons kodiert wird. Diese Exons sind von der gleichen Länge wie die korrespondierenden in der Dlk mit dem einzigen Unterschied, dass das Dlk spezifische Exon 3 (361 bp) eine Fusion der entsprechenden Exons 3 (222 bp) und 4 (139 bp) in den *DAPK1* bzw. *DAPK2* mit entsprechender Deletion des dritten Introns zu sein scheint.

Auf der Suche nach Dlk Orthologen im *Drosophila melanogaster* Genom wurde mit Hilfe von Sequenzvergleichen auf DNA-Ebene eine unbekannte und mit *bt* Genprodukt benannte Kinase, sowie eine MLC Kinase mit einer Sequenzidentität bezüglich der Kinasedomäne von 45 bzw. 43 % zu der Kinasedomäne der Dlk identifiziert. Ob die mit *bt* Genprodukt bezeichnete Kinase ein Homolog zu einem der Mitglieder der DAP-Kinase Familie ist oder ein weiteres Mitglied dieser Familie darstellt, müsste in Zukunft noch gezeigt werden. Im Gegensatz dazu enthält das Genom von *C. Elegans* ebenfalls auf DNA Ebene ein vorhergesagtes DAPK Homolog mit 55 % Sequenzidentität innerhalb der Kinasedomäne und noch verbleibenden 39 % Homologie über die restlichen verbleibenden 1430 aa im C-Terminus des Proteins. Die nächsten Homologen in diesem Genom bezüglich der DAPK sind die Proteine Titin, die Dlk/ZIP Kinase und Calmodulin/Ca²⁺ abhängigen Kinasen mit 44 % bzw. 43 % und 42 % Sequenzidentität. Es ist anzunehmen, dass die DAPK und die Dlk in *Drosophila melanogaster* im Gegensatz zu *C. Elegans* nicht zu existieren scheinen, aber die nächsten verwandten Proteine auf genomischer Ebene die MLC- und Calmodulin/Ca²⁺-abhängigen Kinasen sind. In den Genomen der Säugetiere sind ebenfalls die MLC-Kinasen der glatten Muskulatur und die Calmodulin/Ca²⁺ abhängigen Kinasen mit 45 bzw. 41 % Sequenzidentität die nächsten Verwandten der DAPK. Es scheint, dass die Mitglieder der DAP Kinase Familie eine neue Variante der MLC Kinasen darstellen, die durch die Phosphorylierung der MLC spezifische Funktionen und Signale vermitteln.

5.3. Ausblick

5.3.1. Dlk/CDC5 Interaktion

Die funktionelle Bedeutung der Dlk/CDC5 Interaktion ist nicht auf den ersten Blick ersichtlich, da beide Proteine zum größten Teil an unterschiedlichen Prozessen (Spleißen, Transkription, Apoptose, Zellmotilität) beteiligt zu sein scheinen. Einzig an dem G2/M-Übergang während der Mitose scheinen sowohl CDC5 und die Dlk beteiligt zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit ließen die Frage offen, ob CDC5 ein Substrat der Dlk ist. Die Klärung dieses Sachverhaltes könnte weitere Aufschlüsse über die Funktion der Dlk/CDC5 Interaktion geben. Sollte die Dlk CDC5 in der Tat phosphorylieren besteht die Möglichkeit, dass die Dlk CDC5 in ihrer Funktion als Spleißfaktor und als ein Faktor während des G2/M-Übergangs reguliert. In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss der Dlk/CDC5 Interaktion auf PLRG1/CDC5 Interaktion untersucht werden, da sowohl die Dlk als auch PLRG1 mit dem gleichen Bereich von CDC5 interagieren. Ergebnisse dieser Untersuchungen

könnten ergeben, dass die Dlk Einfluss auf die für das Spleißen von pre-mRNA essentielle PLRG1/CDC5 Interaktion hat [99]. Sollte die Dlk CDC5 nachweislich nicht phosphorylieren, müsste man den Aspekt der Zielführenden Funktion von CDC5 bezüglich der Dlk genauer untersuchen. Dabei sollten alle Interaktionspartner von CDC5, sowie alle Proteine des Spleißosoms, insbesondere die des CDC5-Komplexes, in Phosphorylierungsanalysen mit der Dlk untersucht werden.

Weiterhin sollte die Dlk bzw. CDC5-vermittelte Verdrängung von SC35 und die damit verbundene Expression alternativer Spleißprodukte von SC35-beeinflussten Spleißreaktionen mit weiteren Mini-Gen Spleiß-Assays untersucht werden, um letztendlich herauszufinden, in welchem funktionellen Zusammenhang die begünstigten Spleißvarianten stehen.

Im Zusammenhang mit der Vermutung, dass die Dlk einen Einfluss auf die Regulation und Koordination der Mitose und der Cytokinese besitzt [37] und CDC5 in die Regulation des G2/M Übergangs involviert ist [68;81] sowie durch das mitogene Prolaktin verstärkt exprimiert wird [101], liegt die Vermutung nahe, dass CDC5 und die Dlk während der G2- und M-Phase durch ihre *in-vivo* Interaktion bestimmte Prozesse der Mitose und/oder der Cytokinese koordinieren und regulieren. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die Dlk Expression mit der CDC5 Expression koordiniert wird, etwa durch Prolaktin oder FGF-2. Weitere Aufschlüsse über eine mögliche mitose-spezifische Funktion der Dlk/CDC5 Interaktion würden auch Lokalisationanalysen beider Proteine während der G2- und M-Phase ergeben. Diese Analysen könnten zeigen, ob die Dlk durch CDC5 oder umgekehrt CDC5 durch die Dlk während dieser Phasen an spezifische Orte rekrutiert wird.

5.3.2. *Dlk* Promotoranalysen und *Dlk* knock-out in der Maus

Da die biologische Funktion der Dlk bis dato noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, könnten weiterführende Transkriptionsanalysen mit Hilfe des isolierten transkriptionell regulierenden Bereichs des *Dlk*-Gens die möglichen Funktionen der Dlk während der Apoptose und der Mitose weiter bestätigen. In diesem Zusammenhang sollte die Transkriptionsrate der Dlk nach apoptotischen Stimulanzen, sowie mitogenen Faktoren wie Prolaktin und nicht-mitogenen Faktoren wie FGF-2 untersucht werden. Vor allem eine mögliche erhöhte Expressionrate der Dlk unter dem Einfluss von Prolaktin wäre eine Bestätigung eines regulierenden Einfluss der Dlk/CDC5 Interaktion während der Metaphase

der Mitose, da *CDC5* unter dem Einfluss von Prolaktin verstärkt exprimiert wird, ebenso wie das dem *Dlk* Gen 5' gelegene *eEF-2* Gen.

Weiterhin sollten die potentiellen Bindungsstellen für die entsprechenden Transkriptionsfaktoren (Elk-1, NF-1/NF-Y, CREB, COMP1), sowie die putativen responsive elements (SRE, Ras-RE) innerhalb des transkriptionell regulierenden Bereichs des *Dlk*-Gens detaillierter untersucht werden, um Aufschluss über die Regulation der *Dlk* zu erhalten.

Mit der Kenntnis der genomischen Struktur des *Dlk* Gens aus der Maus und der in dieser Arbeit entwickelten Synthesestrategie eines Targeting-Vektors für einen generellen induzierbaren *Dlk* knock-out in der Maus sollte es in Zukunft möglich sein, bisher hypothetisch angenommene Funktionen der *Dlk* zu verifizieren, sowie eventuell neue biologische Funktionen der *Dlk* zu identifizieren.

6. Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Interaktion des Spleißfaktors CDC5 und der Dlk (DAP-like Kinase) durch proteinbiochemische und zellbiologische Methoden untersucht.

Zunächst wurde die komplette cDNA von CDC5 mit Hilfe der PCR aus einer cDNA-Bibliothek der Ratte isoliert. Die Interaktion von CDC5 und der Dlk wurde durch *in-vitro* Bindungsanalysen und *in-vivo* Kolokalisationsanalysen verifiziert. Als Interaktionsdomänen bezüglich der Dlk/CDC5 Interaktion wurden mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid* Systems der Leuzin-Zipper der Dlk und der C-terminale Bereich von CDC5 zwischen den Aminosäureresten 500 und 802 identifiziert. Phosphorylierungsanalysen zeigten, dass CDC5 zumindest *in-vitro* kein Substrat der Dlk ist. Vielmehr wurde CDC5 durch eine Mitaufgereinigte Kinase, die anschließend als CK2 identifiziert wurde, phosphoryliert. Für den aktiven Kerntransport von CDC5 konnte ein funktionelles NLS (NLS 4) und 3 putative NLSs (NLS 1-3) identifiziert werden. Mit Hilfe von CDC5-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass CDC5 Homodimere sowie mit der Dlk Heterodimere bilden kann. Beide Proteine kolokalisieren perfekt in nuklearen „speckles“, die wiederum teilweise deckungsgleich sind mit PML-„bodies“. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der nukleare Spleißfaktor SC35 durch eine transiente Überexpression von CDC5 oder der Dlk in das Cytoplasma verdrängt wird. Mit Hilfe von *Caspase-2* Mini-Gen Spleiß-Analysen konnte gezeigt werden, dass diese Verdrängung von SC35 zu einer erhöhten Expression des antiapoptotischen alternativen Spleißprodukts *Caspase-2L* führt. In Phosphorylierungsanalysen wurde ASF/SF2 bzw. SC35, beides Proteine des CDC5-Komplexes des Spleißosoms, als ein starkes bzw. schwaches Substrat der Dlk identifiziert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der transkriptionell regulierende Bereich des *Dlk*-Gens isoliert. Es konnte ein funktioneller Core-Promotor und Enhancer sowie verschiedene CCAAT Boxen und potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Elk-1, NF-1/NF-Y, CREB, COMP1), sowie ein SRE und ein Ras RE identifiziert werden. Vergleichende Strukturanalysen des *Dlk*-Gens des Menschen, der Maus und der Ratte zeigten eine identische Exon/Intron Struktur in allen drei Spezies. Auch die Größe der kodierenden Exons für die Kinasedomäne der Dlk und weiterer Mitglieder der DAP-Kinase Familie (DAPK1 und DAPK2) sind nahezu identisch und scheinen während der Evolution hochkonserviert zu sein. Mit den Sequenzdaten des *Dlk*-Gens aus der Maus konnte eine Klonierungsstrategie eines Targeting-Vektors für einen generellen induzierbaren Dlk knock-out in der Maus erstellt und ein das *Dlk*-Gen der Maus enthaltender Cosmid Klon isoliert werden.

7. Literaturverzeichnis

1. **Manning,G., Whyte,D.B., Martinez,R., Hunter,T. and Sudarsanam,S.** (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-1934.
2. **Saxena,A., Padmanabha,R. and Glover,C.V.** (1987) Isolation and sequencing of cDNA clones encoding alpha and beta subunits of *Drosophila melanogaster* casein kinase II. *Mol.Cell Biol.*, **7**, 3409-3417.
3. **Hanks,S.K., Quinn,A.M. and Hunter,T.** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
4. **Krebs,E.G.** (1985) The phosphorylation of proteins: a major mechanism for biological regulation. Fourteenth Sir Frederick Gowland Hopkins memorial lecture. *Biochem.Soc.Trans.*, **13**, 813-820.
5. **Hubbard,S.R. and Till,J.H.** (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu.Rev.Biochem.*, **69**, 373-398.
6. **Hanks,S.K. and Quinn,A.M.** (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.*, **200**, 38-62.
7. **Kemp,B.E. and Pearson,R.B.** (1991) Intrasteric regulation of protein kinases and phosphatases. *Biochim.Biophys.Acta*, **1094**, 67-76.
8. **Kögel,D., Prehn,J.H. and Scheidtmann,K.H.** (2001) The DAP kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game. *Bioessays*, **23**, 352-358.
9. **Shohat,G., Shani,G., Eisenstein,M. and Kimchi,A.** (2002) The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases. *Biochim.Biophys.Acta*, **1600**, 45-50.
10. **Kögel,D., Plöttner,O., Landsberg,G., Christian,S. and Scheidtmann,K.H.** (1998) Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene*, **17**, 2645-2654.
11. **Kögel,D., Bierbaum,H., Preuss,U. and Scheidtmann,K.H.** (1999) C-terminal truncation of Dlk/ZIP kinase leads to abrogation of nuclear transport and high apoptotic activity. *Oncogene*, **18**, 7212-7218.
12. **Sanjo,H., Kawai,T. and Akira,S.** (1998) DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J.Biol.Chem.*, **273**, 29066-29071.
13. **Kawai,T., Nomura,F., Hoshino,K., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A. and Akira,S.** (1999) Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulin-dependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity. *Oncogene*, **18**, 3471-3480.
14. **Inbal,B., Shani,G., Cohen,O., Kissil,J.L. and Kimchi,A.** (2000) Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 1044-1054.
15. **Cohen,O., Feinstein,E. and Kimchi,A.** (1997) DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J.*, **16**, 998-1008.
16. **Deiss,L.P., Feinstein,E., Berissi,H., Cohen,O. and Kimchi,A.** (1995) Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev.*, **9**, 15-30.
17. **Cohen,O., Inbal,B., Kissil,J.L., Raveh,T., Berissi,H., Spivak-Kroizaman,T., Feinstein,E. and Kimchi,A.** (1999) DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J.Cell Biol.*, **146**, 141-148.

18. **Inbal,B., Cohen,O., Polak-Charcon,S., Kopolovic,J., Vadai,E., Eisenbach,L. and Kimchi,A.** (1997) DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature*, **390**, 180-184.
19. **Raveh,T., Droguett,G., Horwitz,M.S., DePinho,R.A. and Kimchi,A.** (2001) DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat.Cell Biol.*, **3**, 1-7.
20. **Jin,Y., Blue,E.K., Dixon,S., Hou,L., Wysolmerski,R.B. and Gallagher,P.J.** (2001) Identification of a new form of death-associated protein kinase that promotes cell survival. *J.Biol.Chem.*, **276**, 39667-39678.
21. **Raveh,T., Berissi,H., Eisenstein,M., Spivak,T. and Kimchi,A.** (2000) A functional genetic screen identifies regions at the C-terminal tail and death-domain of death-associated protein kinase that are critical for its proapoptotic activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 1572-1577.
22. **Shohat,G., Spivak-Kroizman,T., Cohen,O., Bialik,S., Shani,G., Berrisi,H., Eisenstein,M. and Kimchi,A.** (2001) The pro-apoptotic function of death-associated protein kinase is controlled by a unique inhibitory autophosphorylation-based mechanism. *J.Biol.Chem.*, **276**, 47460-47467.
23. **Baffy,G., Miyashita,T., Williamson,J.R. and Reed,J.C.** (1993) Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J.Biol.Chem.*, **268**, 6511-6519.
24. **Pinton,P., Ferrari,D., Magalhaes,P., Schulze-Osthoff,K., Di Virgilio,F., Pozzan,T. and Rizzuto,R.** (2000) Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J.Cell Biol.*, **148**, 857-862.
25. **Yamamoto,M., Takahashi,H., Nakamura,T., Hioki,T., Nagayama,S., Ooashi,N., Sun,X., Ishii,T., Kudo,Y., Nakajima-Iijima,S. et al.** (1999) Developmental changes in distribution of death-associated protein kinase mRNAs. *J.Neurosci.Res.*, **58**, 674-683.
26. **Kissil,J.L., Feinstein,E., Cohen,O., Jones,P.A., Tsai,Y.C., Knowles,M.A., Eydmann,M.E. and Kimchi,A.** (1997) DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene*, **15**, 403-407.
27. **Cohen,O. and Kimchi,A.** (2001) DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer. *Cell Death.Differ.*, **8**, 6-15.
28. **Scheidtmann,K.H. and Haber,A.** (1990) Simian virus 40 large T antigen induces or activates a protein kinase which phosphorylates the transformation-associated protein p53. *J.Virol.*, **64**, 672-679.
29. **Wang,H.G., Draetta,G. and Moran,E.** (1991) E1A induces phosphorylation of the retinoblastoma protein independently of direct physical association between the E1A and retinoblastoma products. *Mol.Cell Biol.*, **11**, 4253-4265.
30. **Meek,D.W.** (1994) Post-translational modification of p53. *Semin.Cancer Biol.*, **5**, 203-210.
31. **Muller,E., Boldyreff,B. and Scheidtmann,K.H.** (1993) Characterization of protein kinase activities associated with p53-large-T immune complexes from SV40-transformed rat cells. *Oncogene*, **8**, 2193-2205.
32. **Kawai,T., Matsumoto,M., Takeda,K., Sanjo,H. and Akira,S.** (1998) ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol.Cell Biol.*, **18**, 1642-1651.
33. **Page,G., Kögel,D., Rangnekar,V. and Scheidtmann,K.H.** (1999) Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis. *Oncogene*, **18**, 7265-7273.

34. **Shani,G., Marash,L., Gozuacik,D., Bialik,S., Teitelbaum,L., Shohat,G. and Kimchi,A.** (2004) Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions. *Mol.Cell Biol.*, **24**, 8611-8626.
35. **Kogel,D., Reimertz,C., Dussmann,H., Mech,P., Scheidtmann,K.H. and Prehn,J.H.** (2003) The death associated protein (DAP) kinase homologue Dlk/ZIP kinase induces p1. *Eur.J.Cancer*, **39**, 249-256.
36. **Kawai,T., Akira,S. and Reed,J.C.** (2003) ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains. *Mol.Cell Biol.*, **23**, 6174-6186.
37. **Preuss,U., Bierbaum,H., Buchenau,P. and Scheidtmann,K.H.** (2003) DAP-like kinase, a member of the death-associated protein kinase family, associates with centrosomes, centromeres, and the contractile ring during mitosis. *Eur.J.Cell Biol.*, **82**, 447-459.
38. **Preuss,U., Landsberg,G. and Scheidtmann,K.H.** (2003) Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 878-885.
39. **Hendzel,M.J., Wei,Y., Mancini,M.A., Van Hooser,A., Ranalli,T., Brinkley,B.R., Bazett-Jones,D.P. and Allis,C.D.** (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, **106**, 348-360.
40. **Sullivan,K.F., Hechenberger,M. and Masri,K.** (1994) Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J.Cell Biol.*, **127**, 581-592.
41. **Van Hooser,A.A., Mancini,M.A., Allis,C.D., Sullivan,K.F. and Brinkley,B.R.** (1999) The mammalian centromere: structural domains and the attenuation of chromatin modeling. *FASEB J.*, **13 Suppl 2**, S216-S220.
42. **Van Hooser,A.A., Ouspenski,I.I., Gregson,H.C., Starr,D.A., Yen,T.J., Goldberg,M.L., Yokomori,K., Earnshaw,W.C., Sullivan,K.F. and Brinkley,B.R.** (2001) Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J.Cell Sci.*, **114**, 3529-3542.
43. **Murata-Hori,M., Suizu,F., Iwasaki,T., Kikuchi,A. and Hosoya,H.** (1999) ZIP kinase identified as a novel myosin regulatory light chain kinase in HeLa cells. *FEBS Lett.*, **451**, 81-84.
44. **Sato,N., Kawai,T., Sugiyama,K., Muromoto,R., Imoto,S., Sekine,Y., Ishida,M., Akira,S. and Matsuda,T.** (2005) Physical and functional interactions between STAT3 and ZIP kinase. *Int.Immunol.*, **17**, 1543-1552.
45. **LaMorte,V.J., Dyck,J.A., Ochs,R.L. and Evans,R.M.** (1998) Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95**, 4991-4996.
46. **Quignon,F., De Bels,F., Koken,M., Feunteun,J., Ameisen,J.C. and de The,H.** (1998) PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat.Genet.*, **20**, 259-265.
47. **Wang,Z.G., Ruggero,D., Ronchetti,S., Zhong,S., Gaboli,M., Rivi,R. and Pandolfi,P.P.** (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat.Genet.*, **20**, 266-272.
48. **Komatsu,S. and Ikebe,M.** (2004) ZIP kinase is responsible for the phosphorylation of myosin II and necessary for cell motility in mammalian fibroblasts. *J.Cell Biol.*, **165**, 243-254.
49. **Burch,L.R., Scott,M., Pohler,E., Meek,D. and Hupp,T.** (2004) Phage-peptide display identifies the interferon-responsive, death-activated protein kinase family as a novel modifier of MDM2 and p21WAF1. *J.Mol.Biol.*, **337**, 115-128.
50. **Vogelstein,B., Lane,D. and Levine,A.J.** (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.

51. **Page,G., Lödige,I., Kögel,D. and Scheidtmann,K.H.** (1999) AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS Lett.*, **462**, 187-191.
52. **Endo,A., Surks,H.K., Mochizuki,S., Mochizuki,N. and Mendelsohn,M.E.** (2004) Identification and characterization of zipper-interacting protein kinase as the unique vascular smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *J.Biol.Chem.*, **279**, 42055-42061.
53. **MacDonald,J.A., Borman,M.A., Muranyi,A., Somlyo,A.V., Hartshorne,D.J. and Haystead,T.A.** (2001) Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **98**, 2419-2424.
54. **Sells,S.F., Wood,D.P., Jr., Joshi-Barve,S.S., Muthukumar,S., Jacob,R.J., Crist,S.A., Humphreys,S. and Rangnekar,V.M.** (1994) Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ.*, **5**, 457-466.
55. **Boghaert,E.R., Sells,S.F., Walid,A.J., Malone,P., Williams,N.M., Weinstein,M.H., Strange,R. and Rangnekar,V.M.** (1997) Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues. *Cell Growth Differ.*, **8**, 881-890.
56. **Sells,S.F., Han,S.S., Muthukkumar,S., Maddiwar,N., Johnstone,R., Boghaert,E., Gillis,D., Liu,G., Nair,P., Monnig,S. et al.** (1997) Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Mol.Cell Biol.*, **17**, 3823-3832.
57. **Guo,Q., Fu,W., Xie,J., Luo,H., Sells,S.F., Geddes,J.W., Bondada,V., Rangnekar,V.M. and Mattson,M.P.** (1998) Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat.Med.*, **4**, 957-962.
58. **Johnstone,R.W., See,R.H., Sells,S.F., Wang,J., Muthukkumar,S., Englert,C., Haber,D.A., Licht,J.D., Sugrue,S.P., Roberts,T. et al.** (1996) A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol.Cell Biol.*, **16**, 6945-6956.
59. **Diaz-Meco,M.T., Municio,M.M., Frutos,S., Sanchez,P., Lozano,J., Sanz,L. and Moscat,J.** (1996) The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell*, **86**, 777-786.
60. **Guo,Q. and Xie,J.** (2004) AATF inhibits aberrant production of amyloid beta peptide 1-42 by interacting directly with Par-4. *J.Biol.Chem.*, **279**, 4596-4603.
61. **Fraizer,G., Leahy,R., Priyadarshini,S., Graham,K., Delacerda,J. and Diaz,M.** (2004) Suppression of prostate tumor cell growth in vivo by WT1, the Wilms' tumor suppressor gene. *Int.J.Oncol.*, **24**, 461-471.
62. **Thomas,T., Voss,A.K., Petrou,P. and Gruss,P.** (2000) The murine gene, Traube, is essential for the growth of preimplantation embryos. *Dev.Biol.*, **227**, 324-342.
63. **Fanciulli,M., Bruno,T., Di Padova,M., De Angelis,R., Iezzi,S., Iacobini,C., Floridi,A. and Passananti,C.** (2000) Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb. *FASEB J.*, **14**, 904-912.
64. **Bruno,T., De Angelis,R., De Nicola,F., Barbato,C., Di Padova,M., Corbi,N., Libri,V., Benassi,B., Mattei,E., Chersi,A. et al.** (2002) Che-1 affects cell growth by interfering with the recruitment of HDAC1 by Rb. *Cancer Cell*, **2**, 387-399.
65. **Lindfors,K., Halttunen,T., Huotari,P., Nupponen,N., Vihinen,M., Visakorpi,T., Maki,M. and Kainulainen,H.** (2000) Identification of novel transcription factor-like gene from human intestinal cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **276**, 660-666.
66. **Burgdorf,S., Leister,P. and Scheidtmann,K.H.** (2004) TSG101 interacts with apoptosis-antagonizing transcription factor and enhances androgen receptor-mediated transcription by promoting its monoubiquitination. *J.Biol.Chem.*, **279**, 17524-17534.

67. **Leister,P., Burgdorf,S. and Scheidtmann,K.H.** (2003) Apoptosis Antagonizing Transcription Factor AATF is a novel co-activator of nuclear hormone receptors. *Signal Transduction* **3**, 17-25.
68. **Nasmyth,K. and Nurse,P.** (1981) Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol.Gen.Genet.*, **182**, 119-124.
69. **Kitada,K., Johnson,A.L., Johnston,L.H. and Sugino,A.** (1993) A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as CDC5. *Mol.Cell Biol.*, **13**, 4445-4457.
70. **Ohkura,H., Hagan,I.M. and Glover,D.M.** (1995) The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase *plp1*, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.*, **9**, 1059-1073.
71. **Glover,D.M., Hagan,I.M. and Tavares,A.A.** (1998) Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.*, **12**, 3777-3787.
72. **Nigg,E.A.** (1998) Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **10**, 776-783.
73. **Tsai,W.Y., Chow,Y.T., Chen,H.R., Huang,K.T., Hong,R.I., Jan,S.P., Kuo,N.Y., Tsao,T.Y., Chen,C.H. and Cheng,S.C.** (1999) Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. *J.Biol.Chem.*, **274**, 9455-9462.
74. **Hirayama,T. and Shinozaki,K.** (1996) A *cdc5+* homolog of a higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 13371-13376.
75. **Ohi,R., Feoktistova,A., McCann,S., Valentine,V., Look,A.T., Lipsick,J.S. and Gould,K.L.** (1998) Myb-related *Schizosaccharomyces pombe* *cdc5p* is structurally and functionally conserved in eukaryotes. *Mol.Cell Biol.*, **18**, 4097-4108.
76. **Bernstein,H.S. and Coughlin,S.R.** (1997) Pombe Cdc5-related protein. A putative human transcription factor implicated in mitogen-activated signaling. *J.Biol.Chem.*, **272**, 5833-5837.
77. **Nelson,H.C.** (1995) Structure and function of DNA-binding proteins. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **5**, 180-189.
78. **Boulikas,T.** (1993) Nuclear localization signals (NLS). *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.*, **3**, 193-227.
79. **Mitchell,P.J. and Tjian,R.** (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, **245**, 371-378.
80. **Tjian,R. and Maniatis,T.** (1994) Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell*, **77**, 5-8.
81. **Ohi,R., McCollum,D., Hirani,B., Den Haese,G.J., Zhang,X., Burke,J.D., Turner,K. and Gould,K.L.** (1994) The *Schizosaccharomyces pombe* *cdc5+* gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *EMBO J.*, **13**, 471-483.
82. **Bernstein,H.S. and Coughlin,S.R.** (1998) A mammalian homolog of fission yeast Cdc5 regulates G2 progression and mitotic entry. *J.Biol.Chem.*, **273**, 4666-4671.
83. **Burns,C.G., Ohi,R., Krainer,A.R. and Gould,K.L.** (1999) Evidence that Myb-related CDC5 proteins are required for pre-mRNA splicing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 13789-13794.
84. **McDonald,W.H., Ohi,R., Smelkova,N., Frendewey,D. and Gould,K.L.** (1999) Myb-related fission yeast *cdc5p* is a component of a 40S snRNP- containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 5352-5362.

85. **Boudrez,A., Beullens,M., Groenen,P., Van Eynde,A., Vulsteke,V., Jagiello,I., Murray,M., Krainer,A.R., Stalmans,W. and Bollen,M.** (2000) NIPPI-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry. *J.Biol.Chem.*, **275**, 25411-25417.
86. **Stukenberg,P.T., Lustig,K.D., McGarry,T.J., King,R.W., Kuang,J. and Kirschner,M.W.** (1997) Systematic identification of mitotic phosphoproteins. *Curr.Biol.*, **7**, 338-348.
87. **Murata-Hori,M., Fukuta,Y., Ueda,K., Iwasaki,T. and Hosoya,H.** (2001) HeLa ZIP kinase induces diphosphorylation of myosin II regulatory light chain and reorganization of actin filaments in nonmuscle cells. *Oncogene*, **20**, 8175-8183.
88. **Lei,X.H., Shen,X., Xu,X.Q. and Bernstein,H.S.** (2000) Human Cdc5, a regulator of mitotic entry, can act as a site-specific DNA binding protein. *J.Cell Sci.*, **113 Pt 24**, 4523-4531.
89. **Seeler,J.S. and Dejean,A.** (1999) The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **9**, 362-367.
90. **Zhong,S., Salomoni,P. and Pandolfi,P.P.** (2000) The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat.Cell Biol.*, **2**, E85-E90.
91. **Fox,A.H., Lam,Y.W., Leung,A.K., Lyon,C.E., Andersen,J., Mann,M. and Lamond,A.I.** (2002) Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr.Biol.*, **12**, 13-25.
92. **Huang,S. and Spector,D.L.** (1996) Dynamic organization of pre-mRNA splicing factors. *J.Cell Biochem.*, **62**, 191-197.
93. **Misteli,T. and Spector,D.L.** (1997) Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *trends in cell biology*, **7**, 135-138.
94. **Wang,H.Y., Lin,W., Dyck,J.A., Yeakley,J.M., Songyang,Z., Cantley,L.C. and Fu,X.D.** (1998) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J.Cell Biol.*, **140**, 737-750.
95. **Jiang,Z.H., Zhang,W.J., Rao,Y. and Wu,J.Y.** (1998) Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95**, 9155-9160.
96. **Logette,E., Wotawa,A., Solier,S., Desoche,L., Solary,E. and Corcos,L.** (2003) The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression. *Oncogene*, **22**, 935-946.
97. **Wang,L., Miura,M., Bergeron,L., Zhu,H. and Yuan,J.** (1994) Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell*, **78**, 739-750.
98. **Rodriguez,C.I., Buchholz,F., Galloway,J., Sequerra,R., Kasper,J., Ayala,R., Stewart,A.F. and Dymecki,S.M.** (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat.Genet.*, **25**, 139-140.
99. **Ajuh,P., Sleeman,J., Chusainow,J. and Lamond,A.I.** (2001) A direct interaction between the carboxyl-terminal region of CDC5L and the WD40 domain of PLRG1 is essential for pre-mRNA splicing. *J.Biol.Chem.*, **276**, 42370-42381.
100. **Liu,L., Graub,R., Hlaing,M., Epting,C.L., Turck,C.W., Xu,X.Q., Zhang,L. and Bernstein,H.S.** (2003) Distinct domains of human CDC5 direct its nuclear import and association with the spliceosome. *Cell Biochem.Biophys.*, **39**, 119-132.
101. **Johnson,L.M. and Too,C.K.** (2001) Prolactin, interleukin-2 and FGF-2 stimulate expression, nuclear distribution and DNA-binding of rat homolog of pombe Cdc5 in Nb2 T lymphoma cells. *Mol.Cell Endocrinol.*, **184**, 151-161.

102. **Neubauer,G., King,A., Rappsilber,J., Calvio,C., Watson,M., Ajuh,P., Sleeman,J., Lamond,A. and Mann,M.** (1998) Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat.Genet.*, **20**, 46-50.
103. **Ajuh,P., Kuster,B., Panov,K., Zomerdijk,J.C., Mann,M. and Lamond,A.I.** (2000) Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J.*, **19**, 6569-6581.
104. **Ajuh,P. and Lamond,A.I.** (2003) Identification of peptide inhibitors of pre-mRNA splicing derived from the essential interaction domains of CDC5L and PLRG1. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6104-6116.
105. **Mayeda,A., Sreaton,G.R., Chandler,S.D., Fu,X.D. and Krainer,A.R.** (1999) Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 1853-1863.
106. **LaVoie,H.A. and Witorsch,R.J.** (1995) Investigation of intracellular signals mediating the anti-apoptotic action of prolactin in Nb2 lymphoma cells. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **209**, 257-269.
107. **Murphy,P.R., Limoges,M., Dodd,F., Boudreau,R.T. and Too,C.K.** (2001) Fibroblast growth factor-2 stimulates endothelial nitric oxide synthase expression and inhibits apoptosis by a nitric oxide-dependent pathway in Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology*, **142**, 81-88.
108. **Too,C.K.** (1997) Differential expression of elongation factor-2, alpha4 phosphoprotein and Cdc5-like protein in prolactin-dependent/independent rat lymphoid cells. *Mol.Cell Endocrinol.*, **131**, 221-232.
109. **Burns,C.G., Ohi,R., Mehta,S., O'Toole,E.T., Winey,M., Clark,T.A., Sugnet,C.W., Ares,M., Jr. and Gould,K.L.** (2002) Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.*, **22**, 801-815.
110. **Colwill,K., Feng,L.L., Yeakley,J.M., Gish,G.D., Caceres,J.F., Pawson,T. and Fu,X.D.** (1996) SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J Biol Chem.*, **271**, 24569-24575.
111. **Duncan,P.I., Stojdl,D.F., Marius,R.M., Scheit,K.H. and Bell,J.C.** (1998) The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing. *Exp.Cell Res.*, **241**, 300-308.
112. **Gui,J.F., Tronchere,H., Chandler,S.D. and Fu,X.D.** (1994) Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **91**, 10824-10828.
113. **Kuroyanagi,N., Onogi,H., Wakabayashi,T. and Hagiwara,M.** (1998) Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **242**, 357-364.
114. **Nayler,O., Stamm,S. and Ullrich,A.** (1997) Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases. *Biochem.J.*, **326 (Pt 3)**, 693-700.
115. **Okamoto,Y., Onogi,H., Honda,R., Yasuda,H., Wakabayashi,T., Nimura,Y. and Hagiwara,M.** (1998) cdc2 kinase-mediated phosphorylation of splicing factor SF2/ASF. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **249**, 872-878.
116. **Rossi,F., Labourier,E., Forne,T., Divita,G., Derancourt,J., Riou,J.F., Antoine,E., Cathala,G., Brunel,C. and Tazi,J.** (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature*, **381**, 80-82.

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann möchte ich dafür danken, dass er mir das interessante Thema überlassen hat, immer am Fortgang meines Projektes interessiert war und es mit seinem fachkundigen Rat in die richtige Richtung gelenkt hat.

Herrn Priv. Doz. Dr. Otto Traub danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Meike, Susanne, Ute, Donat, aber vor allem Gerd, Steve, Peter und Karl Heinz möchte ich für die gute Zusammenarbeit, für die bereichernden Diskussionen, für jegliche Unterstützung und für die freundschaftliche Atmosphäre in unserem Labor - und auch außerhalb - danken.

Allen Institutsmitgliedern danke ich sehr für ihre Hilfsbereitschaft.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Mutter, Floh und Volker, Neo und Trinity, sowie meiner zukünftigen Frau Ute und meiner Tochter Lena Pauline, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8. Anhang

Veröffentlichungen

Engemann,H., Heinzel,V., Page,G., Preuss,U. and Scheidtmann,K.H. (2002)
DAP-like kinase interacts with the rat homolog of *Schizosaccharomyces pombe* CDC5 protein, a factor involved in pre-mRNA splicing and required for G2/M phase transition. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1408-1417.

Engemann,H., Kogel,D., Manderscheid,S., Preuss,U. and Scheidtmann,K.H. (2002)
Elucidation of transcriptional elements and the genomic structure of DAP-like kinase. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **973**, 363-367.

Kogel,D., Reimertz,C., Mech,P., Poppe,M., Fruhwald,M.C., Engemann,H., Scheidtmann,K.H. and Prehn,J.H. (2001)
Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. *Br.J.Cancer*, **85**, 1801-1808.

Posterpräsentationen

Engemann, H.G.*, Steve Manderscheid, Donat Kögel, Ute Preuss, Karl Heinz Scheidtmann
Elucidation of Transcriptional Elements and the Genomic structure of DAP-like kinase.
Meeting of the Signal Transduction Society, 30.1-2.2.2002 Louxembourg

Engemann, H.G.*, Page, G., Scheidtmann, KH.
Dlk/ZIP kinase interacts with a homologue of *S. Pombe* CDC5 protein, a factor involved in pre-mRNA splicing and required in G2/M phase transition.
Millennium Meeting of the Signal Transduction Society, 2-5.11.2000 Berlin

Vorträge

Engemann, H.G.
Characterization of the Dlk/ZIP-kinase gene.
Graduiertenkolleg SFB 286 (Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität)
19st April 2002

Engemann, H.G.
Interaction of Dlk/ZIP kinase with CDC5.
Graduiertenkolleg SFB 286 (Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität)
9st Februar 2001

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde und dass sie an der nachstehend aufgeführten Stelle auszugsweise veröffentlicht worden ist.

Engemann,H., Heinzl,V., Page,G., Preuss,U. and Scheidtmann,K.H. (2002)
DAP-like kinase interacts with the rat homolog of *Schizosaccharomyces pombe* CDC5 protein, a factor involved in pre-mRNA splicing and required for G2/M phase transition. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1408-1417.

Engemann,H., Kogel,D., Manderscheid,S., Preuss,U. and Scheidtmann,K.H. (2002)
Elucidation of transcriptional elements and the genomic structure of DAP-like kinase. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **973**, 363-367.

Köln, den 14.Juli.2006

Harald Engemann