

**Untersuchungen
zur Funktion
der ZIP Kinase in der Mitose
und der Cytokinese**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Steve Manderscheid

aus

Luxemburg

Bonn 2007

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

Erscheinungsjahr: 2008

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.12.2007

1.Referent: Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann

2.Referent: Priv. Doz. Dr. Otto Traub

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....I

II. Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung..... **1**

1.1. Proteinkinasen und Proteinphosphorylierung.....1

1.2 Die DAP Kinase Familie.....1

1.3 Die Death associated Protein Kinase (DAPK).....2

1.4 Die Dlk/ZIP Kinase.....3

1.4.1 Substrate und Interaktionspartner der Dlk/ZIP Kinase.....4

1.5. Die Regulation der ZIP Kinase.....7

1.6. Funktionen der ZIP Kinase.....9

1.6.1 ZIP Kinase und Apoptose.....9

1.6.2 ZIP Kinase und Transkriptionsregulierung.....10

1.6.3 ZIP Kinase und Zellpolarität und Motilität.....11

1.6.4 ZIP Kinase und Mitose.....12

1.7 Ziel dieser Arbeit.....15

2. Material..... **16**

2.1 Chemikalien.....16

2.2 Kits.....16

2.3 Allgemeine Stammlösungen und Puffer.....16

2.4 Kultur von Säugerzellen und Bakterien.....17

2.4.1 Kultur von Säugerzellen.....17

2.4.1.1 Zelllinien.....	17
2.4.1.2 Medien für die Kultur von Säugerzellen.....	17
2.4.2 Kultur von Bakterienzellen.....	18
2.4.2.1 Bakterienstämme.....	18
2.4.2.2 Medien für Bakterienstämme.....	18
2.4.2.3 Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien.....	19
2.5 Lösungen für die DNA Aufbereitung und Analyse.....	19
2.6 Lösungen zur Protein-Aufbereitung und Analyse.....	20
2.7. Plasmide.....	21
2.8 Oligonukleotide.....	21
2.9 Antikörper.....	21
2.9.1 Primäantikörper.....	21
2.9.2 Sekundäre Antikörper /Konjugate.....	22
2.10 Reagenzien für die Immunfluoreszenz.....	22
2.10.1 Fixierungspuffer und Farbstoffe.....	22
2.11 Reagenzien für die Durchflusszytometrie.....	23
3. Methoden	24
3.1 Nukleinsäureanalytik.....	24
3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien.....	24
3.1.2 DNA Präparation.....	25
3.1.2.1 Analytische Plasmidpräparation (Minipräparation).....	25
3.1.2.2 Präparative Plasmidisolierung (Midipräparation).....	25
3.1.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	26
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.....	27
3.1.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	27

3.1.3.2 Auffüllung überhängender Enden.....	28
3.1.3.3 Dephosphorylierung/Phosphorylierung von DNA Fragmenten.....	28
3.1.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	28
3.1.4 Polymerase chain reaction (PCR).....	29
3.2 Methoden der Zellkultur.....	31
3.2.1 Kultur von Säugerzellen.....	31
3.2.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen.....	31
3.2.3 Stabile Transfektion von Säugerzellen.....	31
3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie von Säugerzellen.....	32
3.3 Methoden der Proteinanalytik.....	34
3.3.1 Herstellung von Zellextrakten.....	34
3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
3.3.3 Western Blot.....	35
3.3.4 Immunpräzipitation.....	36
3.3.5 Kinase Assay.....	36
3.3.6 SDS Page.....	37
3.4 Durchflusszytometrie.....	38
4. Ergebnisse	42
4.1 Interaktion mit mitotischen Strukturen.....	42
4.1.1 Überexpression der ZIP Kinase bewirkt eine Störung der Cytokinese.....	42
4.1.2 Etablierung stabiler MCF 7 Zelllinien, die GFP-Konstrukte konstitutiv exprimieren.....	45
4.1.3 Die C-terminale Region der ZIP Kinase interagiert mit dem Centrosom.....	46
4.1.4 Die Mutante $\Delta N1$ interagiert nicht mit dem Centromer.....	48
4.1.5 Die ZIP Kinase interagiert über die C-terminale Region mit dem kontraktilen Ring.....	49
4.1.6 Die Expression des Bereiches 337-448 interferiert mit der ZIP Kinase.....	50

4.2 Die Expression von Δ C2NLS ruft eine Reihe von Defekten hervor.....	52
4.2.1 Die Expression des Konstruktes Δ C2NLS hat keinen Einfluss auf die Expression der endogenen ZIP Kinase.....	52
4.2.2 Die Zelllinie MCF7 Δ C2NLS hat veränderte Wachstumseigenschaften.....	53
4.2.3 Die Expression von Δ C2NLS bringt anormale und mehrkernige Zellen hervor.....	55
4.2.4 Bei den Zellen, die große gelappte Kerne aufweisen handelt es sich um mehrkernige Zellen.....	56
4.2.5 Die hi Population geht aus der lo Population hervor.....	57
4.2.6 Bei der hi Population treten vermehrt polyploide Zellen auf.....	59
4.2.7 Die Expression der Mutante Δ C2NLS beschleunigt den Aufbau der mitotischen Spindel.....	62
4.2.8 Die Expression von Δ C2NLS hat keinen Einfluss auf die H3 Phosphorylierung.....	64
4.2.9 Die Expression der Mutante Δ C2NLS hat keinen Einfluss auf die Lokalisation der “chromosomal passenger” Proteine.....	65
4.2.10 Die Mutante Δ C2NLS kopräzipitiert nicht mit dem Protein MYPT-1.....	67
4.2.11 Die Expression der Mutante Δ C2NLS beeinflusst die Verteilung von Ser19 phosphorylierter MLC sowie das Aktinzytoskelllet.....	68
5. Diskussion	71
5.1 Kartierung der Interaktionsdomänen der ZIP Kinase mit mitotischen Strukturen...71	
5.1.1 Die Überexpression der ZIP Kinase verhindert den Eintritt der Zellen in die Mitose.....	71
5.1.2 Etablierung stabiler Zelllinien.....	72
5.1.3 Die ZIP Kinase interagiert über die C-terminale Region mit dem Centrosom und dem kontraktilen Ring.....	73
5.1.4 Die Interaktion der ZIP Kinase mit dem Centromer wird wahrscheinlich über die Kinasedomäne vermittelt.....	74
5.2 Die starke Expression der Mutante Δ C2NLS korreliert mit dem Auftreten von Defekten.....	75
5.2.1 Die Zelllinie Δ C2NLS besteht aus zwei Populationen die auseinander hervorgehen.....	75

5.2.2. Die Zelllinie $\Delta C2NLS$ benötigt eine höhere Zelldichte um in die exponentielle Wachstumsphase einzutreten.....	75.
5.2.3 Die Expression der endogenen ZIP Kinase wird nicht durch die Mutante $\Delta C2NLS$ beeinflusst.....	76
5.2.4 Bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ treten Mitose und Cytokinesedefekte auf.....	77
5.2.5 Die großen, runden Zellkerne haben einen DNA Gehalt von mehr als 4N.....	80
5.2.6 Die Mutante $\Delta C2NLS$ interferiert nicht mit der H3 Phosphorylierung.....	80
5.2.7 $\Delta C2NLS$ beschleunigt den Aufbau der mitotischen Spindel.....	81
5.2.8 Die Lokalisierung der Chromosomal passenger ist nicht durch die Mutante $\Delta C2NLS$ beeinflusst.....	83
5.3 Die Rolle der ZIP Kinase in der Mitose.....	84
5.4. Ausblick.....	86
6. Zusammenfassung	88
7. Literaturverzeichnis	90
8. Anhang	96
Poster, Veröffentlichungen.....	96
Danksagung.....	97
Erklärung.....	98
Lebenslauf.....	99

II. Abkürzungsverzeichnis

AATF	<i>Apoptosis-antagonizing transcription factor</i>	MLC	<i>myosin light chain</i>
Abb.	Abbildung	mod.	modifiziert
APS	Ammoniumpersulfat	MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
	AS Aminosäure	mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>	N-	amino-
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	NEM	N-Ethylmaleinimid
bidest	bidestilliert	NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
bp	Basenpaare	Noc	Nocodazol
BSA	Bovines Serum-Albumin	NP-40	Nonidet P-40
bzw.	beziehungsweise	OD	Optische Dichte
C-	carboxy-	PAA	Polyacrylamid
CDC5	<i>Cell division cycle 5</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
cDNA	<i>copy DNA</i> , komplementäre DNA	Par-4	<i>Prostate apoptosis response 4 gene-4</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> , alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm	PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
DAP	<i>Death associated protein</i>	PEG	Polyethylenglykol
DAPK	<i>Death associated protein kinase</i>	Pen/Strep	Penicillin /Streptomycin
Dik	<i>DAP-like kinase</i>	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentration
DRAK	<i>DAP kinase related apoptosis-inducing potein</i>	PLP	Phosphat-Lysispuffer
DRP	<i>DAP kinase related protein</i>	PML	<i>promyelocytic leukemia</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	Rb	Retinoblastomprotein
ddH2O	zweifach destilliertes Wasser	RNA	Ribonukleinsäure
dGTP	Desoxyguanintriphosphat	RT	Raumtemperatur
DMSO	Dimethylsulfoxid	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Ser	Serin
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	SV40	<i>simian virus 40</i>
DTT	Dithiothreitol	Thr	Threonin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	TAE	Tris-Acetat-EDTA
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	TE	Tris-EDTA
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylen diamin
EGTA	Ethylenglykoll-bis (β-Aminoethyläther) N,N,N',N'-Tetraessigsäure	Tm	mittlere Schmelztemperatur
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
FCS	fötale Kälberserum	U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>	ün	über Nacht
kb	Kilobasenpaare	Upm	Umdrehungen pro Minute
kDa	Kilodalton	UV	Ultraviolett
LB	<i>Luria-Bertani</i>	v/v	Volumen pro Volumen
LT	Large T-Antigen, großes T-Antigen von <i>SV40</i>	vgl.	vergleiche
LZ	Leuzin-Zipper	Wdh.	Wiederholung(en)
mind.	mindestens	w/v	Masse pro Volumen
		wt	Wildtyp
		ZIP	<i>Zipper interacting Protein</i>

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 und Proteinphosphorylierung

Die vollständige Entschlüsselung des humanen Genoms erlaubte vor 6 Jahren die Identifizierung von 518 Proteinkinasen, die somit über 1,7% aller humanen Gene repräsentieren (Manning *et al.*, 2002). Somit gehören die Proteinkinasen nach den Transkriptionsfaktoren zu den grössten Genfamilien in Eukaryonten.

Proteinkinasen kontrollieren durch spezifisches Anhängen eines oder mehrerer Phosphatreste an ihre Substrate viele zelluläre Prozesse, wie die Signaltransduktion, den Verlauf des Zellzyklus, die Differenzierung, die Organisation des Zytoskellets, die Zelladhäsion, den Metabolismus, die Transkription und die Apoptose.

Es wird zwischen Proteinkinasen, die in der Plasmamembran verankert sind wie etwa die Rezeptortyrosinkinasen, Proteinkinasen die mehrheitlich im Cytoplasma lokalisiert sind und solchen, die hauptsächlich im Kern lokalisiert sind, unterschieden. Bei Eukaryonten erfolgt die Einteilung der Kinasen nach ihrer Akzeptoraminosäure in die Serin/Threonin- und Tyrosin Kinasen.

Eine Gruppe von Kinasen bildet die Familie der DAP Kinasen.

1.2 Die DAP Kinase Familie

Die 5 Mitglieder der DAP-Kinase Familie, die namensgebende 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 DIK/ZIP Kinase (**D**AP like kinase/**Z**ipper-**I**nteracting **P**rotein kinase), sowie die DRAK1 und DRAK2 (**D**AP kinase-related apoptosis-inducing protein kinase 1 und 2) werden ubiquitär in zahlreichen Geweben exprimiert. Diese Kinasen sind nach Überexpression in kultivierten Zellen imstande Apoptose auszulösen. Die apoptotische Wirkung dieser Kinasen hängt von ihrer enzymatischen Aktivität ab (Übersicht bei Shohat *et al.*, 2002 ;Kögel *et al.*, 2001).

Die 5 Kinasen der die DAP Kinase Familie zeigen eine hohe Sequenzhomologie in den N-terminal gelegenen Kinasedomänen. Die Kinasedomänen der DIK/ZIP Kinase und der DRP-1/DAPK2 zeigen dabei mit 83,3 % bzw. 79,8 % eine sehr hohe Sequenzhomologie

gegenüber der DAPK. Die Kinasen DRAK1 und DRAK2 sind im Gegensatz dazu 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 haben neben regulatorischen Funktionen ebenfalls die Aufgabe verschiedene Interaktionen jeder einzelnen Kinase zu vermitteln (Abb. 1.1).

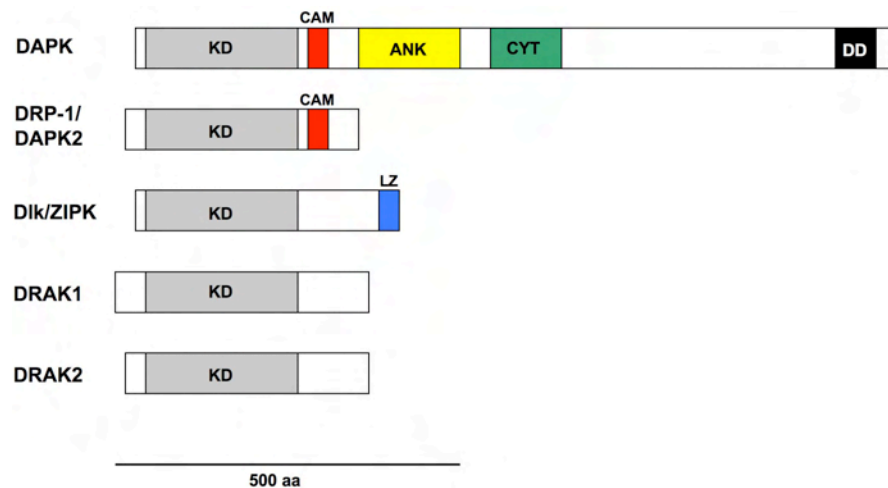


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der 5 Mitglieder der DAP Kinase Familie. KD bezeichnet die hochkonservierte Kinasedomäne. CAM bezeichnet die bei der namensgebenden DAPK und der DRP-1/DAPK2 vorhandene Ca^{2+} /Calmodulin Binderegion. Die DAPK besitzt zusätzlich sogenannte "ankyrin repeats" (ANK), eine Cytoskelett bindende Region (CYT) und eine Todesdomäne (DD). Der C-terminale Leuzinzipper der Dlk/ZIP Kinase wird als LZ bezeichnet (Nach Kögel *et al.*, 2001).

Die DAP-Kinase Familienmitglieder zeigen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen. Die Dlk/ZIP Kinase ist mehrheitlich im Kern zu finden, wo sie teilweise mit sogenannten PML-Bodies kolokalisiert (Kögel *et al.*, 1998). DRAK1 und DRAK2 sind Kernproteine mit diffuser Verteilung (Sanjo *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu ist die DAPK stark assoziiert mit den Aktin Filamenten des Cytoskeletts, während DRP-1/DAPK2 ein lösliches, cytoplasmatisches Protein ist (Sanjo *et al.*, 1998, Kawai *et al.*, 1999a).

1.3. Die Death associated protein kinase (DAPK)

Die DAPK besitzt eine molekulare Masse von 160 kD und besteht aus der N-terminalen Kinase Domäne sowie dem C-terminalen Bereich mit verschiedenen Regionen. Neben einer Ca^{2+} /Calmodulin Binderegion, befinden sich hier die sogenannten "ankyrin repeats" (Ankyrin Region bestehend aus 8 Wiederholungen), eine für die Interaktion mit den Aktin-Filamenten

des Cytoskeletts verantwortliche Region und die sogenannte "death domain" (Cohen *et al.*, 1997). Der N-terminale Bereich enthält ebenfalls einen Serin-reichen Bereich, der autoinhibitorische Funktionen ausübt. Die Autophosphorylierung der DAPK an Ser308 innerhalb der Ca²⁺/Calmodulin Bindungsregion vermindert die Affinität zu Ca²⁺/Calmodulin (Raveh *et al.*, 2000). Ebenso korreliert die Autophosphorylierung umgekehrt mit der Substrat-Phosphorylierung. Es wird angenommen, dass die DAPK auf den Wechsel der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration reagiert, der im Zuge der Apoptose erfolgt (Pinton *et al.*, 2000).

Die DAPK wird teilweise auf transkriptioneller Ebene reguliert. Die Transkription der DAPK steigt während der Induktion der Apoptose mit IFN- γ an (Deiss *et al.*, 1995). Onkogene wie überexprimiertes c-Myc und E2F-1 regulieren den DAPK Proteinpegel in murinen embryonalen Fibroblasten hoch (Raveh *et al.*, 2000). In einigen Tumorzelllinien ist die Expression der DAPK unterdrückt (Kissil *et al.*, 1997), was möglicherweise durch eine anomale DNA Methylierung im Promotorbereich bewirkt wird (Cohen *et al.*, 2001).

1.4. Die Dlk/ZIP Kinase

Die Dlk/ZIP Kinase wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen entdeckt. In der Arbeitsgruppe von K.H. Scheidtmann versuchte man Kinasen zu finden, die bei der SV40 "large" T vermittelten Transformation eine Rolle spielen, um so, neue an der Wachstumskontrolle beteiligten Proteinkinasen zu identifizieren. Durch das "large" T Antigen kommt es zur Induktion bzw. Aktivierung von Proteinkinasen die den Phosphorylierungszustand des wichtigsten negativen Regulators des Restriktionspunktes des Zellzyklus Rb, oder des Proteins p53, einem Induktor der Apoptose, kontrollieren (Scheidtmann und Haber 1990; Wang *et al.*, 1991; Müller *et al.*, 1993).

Mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden, die aus konservierten, für Serin/Threonin Kinasen spezifischen Subdomänen abgeleitet wurden, wurde unter Verwendung der RT PCR eine Ratten cDNA-Bank durchgemustert und die cDNA der Dlk von 1514 bp und einem offenen Leseraster von 448 AS isoliert (Kögel *et al.*, 1998).

Das murine Homolog, der Dlk, die ZIP-Kinase wurde zeitgleich mit dem "Yeast-Two-Hybrid"-System als Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors ATF4 identifiziert. (Kawai *et al.*, 1998). Im Folgenden wird die Bezeichnung ZIP Kinase verwendet.

Die molekulare Masse der ZIP Kinase beträgt 52kDa. Das Protein besteht aus einer N-terminalen Kinasedomäne die eine putative NLS (NLS1) enthält und eine Arginin-reiche (22%) C-terminale Domäne, die sowohl drei NLS Sequenzen, sowie einen Leuzinzipper enthält. (Abb.1.2). Bisher wurde angenommen dass die NLS4 notwendig und ausreichend für die Lokalisation der Kinase ist, neueren Befunden zufolge spielt jedoch auch die NLS2 bei der Regulation der subzellulären Lokalisation eine Rolle (Diplomarbeit Achmet Imam-Chasan). Die ZIP-Kinase wird bei der Ratte ubiquitär im Gehirn, im Herzen, im Skelettmuskel, im Hoden, sowie in der Leber, in der Niere oder in der Milz exprimiert (Kögel *et al.*, 1998). Zusätzlich ist die ZIP Kinase aus der Ratte hochkonserviert zu den murinen (99,7%) und humanen (86%) Orthologen.



Abb.1.2 Die (Dlk) ZIP Kinase. Das Protein besteht aus der N-terminalen Kinasedomäne (AS 1-275), sowie der Argininreichen C-terminalen Domäne (AS 276-448) und einem C-terminalen Leuzinzipper (LZ). Die ZIP Kinase besitzt vier putative NLS (NLS1-4) .

Als GFP-Fusionsprotein zeigte die ZIP Kinase eine punktförmige Anordnung im Zellkern (Kögel *et al.*, 1998) (sogenannte "speckles"). Studien mit Deletions- und Kinase-inaktiven Mutanten ergaben, dass sowohl Kinaseaktivität und Leuzinzipper der ZIP Kinase für deren Anordnung in "speckles" notwendig sind (Kögel *et al.*, 1999).

1.4.1 Substrate und Interaktionspartner der ZIP Kinase

a) Substrate und Substratspezifität

Neben der Myosin Leichten Kette (MLC) (Murata-Hori *et al.*, 1999), dem Histon H3 (Kögel *et al.*, 1998; Preuss *et al.*, 2003a) und dem pro-apoptotischen Protein Par-4 (Page *et al.*, 1999a) wurden das Myosin-Bindeprotein MYPT1 (MacDonald *et al.*, 2001; Übersicht bei Haystead 2005), der Myosin Phosphataseinhibitor CPI-17 (MacDonald *et al.*, 2001) und der Transkriptionsfaktor STAT3 (Sato *et al.*, 2005) als *in vitro* Substrate identifiziert, die wahrscheinlich auch *in vivo* Substrate sind. Zusätzlich dazu sind Tubulin- α und β (Preuss *et al.*, 2003b), der CDK Inhibitor p21^{waf1}, der p53 Regulator Mdm2 (Burch *et al.*, 2001), das Histon

H4, der Spleißfaktor SF2/ASF, sowie das “myelin basic protein” (Engemann *et al.*, 2002) als *in vitro* Substrate der ZIP Kinase beschrieben.

Substrate		Interaktionspartner
MLC	MYPT-1	CDC5
H3	p21 ^{waf1}	Daxx
H4/H2A	Par-4	ATF4
α/β-Tubulin	STAT3	AATF
γ-Tubulin		
MBP		
SF2/ASF		

Abb. 1.3. Substrate und Interaktionspartner der ZIP Kinase. Die linke Spalte listet die *in vitro* Substrate der ZIP Kinase auf, die rechte Spalte zeigt die Interaktionspartner der ZIP Kinase, von denen einige zugleich Substrate der ZIP Kinase sind und in der mittleren Spalte aufgeführt sind

in vivo Substrate sind. Zusätzlich dazu sind Tubulin- α und β (Preuss *et al.*, 2003b), der CDK Inhibitor p21^{waf1}, der, das Histon H4, der Spleißfaktor SF2/ASF, sowie das “myelin basic protein” (MBP) (Engemann *et al.*, 2002) als *in vitro* Substrate der ZIP Kinase beschrieben.

Das p21^{waf1} wurde mit Hilfe eines “phage-peptid-displays” als Substrat der ZIP Kinase identifiziert. Das Genprodukt p21^{waf1} ist ein genereller CDK Inhibitor, welcher unter anderem durch p53 induziert wird und einen Wachstumsarrest bewirkt. Die ZIP Kinase phosphoryliert p21^{waf1} am Threonin 145 Rest *in vitro* was mit einer Stabilisierung von p21^{waf1} einhergeht (Burch *et al.*, 2001).

Anhand von Sequenzvergleichen der unmittelbaren Umgebung der jeweiligen Phosphorylierungsstelle von bekannten Substraten konnte ermittelt werden, dass die ZIP Kinase basische Aminosäuren N-terminal von der Phosphorylierungsstelle bevorzugt. Die Konsensussequenz die für die ZIP Kinase erstellt wurde lautet: **Rxx(S/T)y** (x= beliebige Aminosäure, y= nicht Prolin)(Karl Heinz Scheidtmann unveröffentlicht). Bestimmte Aminosäurereste, die diese Phosphoakzeptorstelle umgeben, können allerdings die Spezifität der ZIP Kinase beeinflussen, was am Beispiel von Mdm2 deutlich wird: Verschiedene Peptide die die ZIP Kinase Konsensussequenz beinhalten, konnten zwar *in vitro* phosphoryliert werden, jedoch gelang dies nicht am Gesamtprotein (Burch *et al.*, 2001).

b) Interaktionspartner

Mit Hilfe des "Yeast-Two-Hybrid" Systems konnten Par-4 (Page *et al.*, 1999a), die Transkriptionsfaktoren ATF4 (Kawai *et al.*, 1998 ; Page *et al.*, 1999a), AATF (Page *et al.*, 1999b) und CDC5 (Engemann *et al.*, 2002) als Interaktionspartner der ZIP-Kinase identifiziert werden. Weitere Interaktionspartner der ZIP Kinase sind p21^{waf1} (Burch *et al.*, 2001), Daxx (Kawai *et al.*, 2003) und STAT3 (Sato *et al.*, 2005). Die DAPK und die Kinase ROCK1, interagieren ebenfalls mit der ZIP Kinase, jedoch sind diese Proteine eher an ihrer Modulation/Regulation beteiligt (Shani *et al.*, 2004; Hagerty *et al.*, 2006) als dass sie "downstream" Substrate der ZIP Kinase sind.

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die Proteine AATF, Par-4 und CDC5 gegeben, die Bedeutung der übrigen Interaktionen wird weiter unten besprochen.

AATF ist ein nukleäres Phosphoprotein von 523 Aminosäuren und wird ubiquitär exprimiert. Bisher konnte keine Phosphorylierung durch die ZIP Kinase gezeigt werden (Page *et al.*, 1999b). Interessanterweise konnte AATF jedoch die apoptotischen Effekte von ZIP Δ C2 (Dlk Δ C2), sowie der Koexpression von ZIP Kinase und Par4 inhibieren (Page *et al.*, 1999b). AATF kann mit Par-4 direkt interagieren (Guo und Xie 2004).

Das humane Ortholog von AATF, (Che-1) ist an der transkriptionellen Regulation von E2F Zielgenen und der Zellproliferation beteiligt (Übersicht bei Floridi und Fanciulli 2007, Passananti und Fanciulli 2007). Weiterhin ist AATF an der Androgen Rezeptor vermittelten Transkriptionsteuerung beteiligt (Leister *et al.*, 2003, Burgdorf *et al.*, 2004).

Par-4 wurde ursprünglich als ein nach der Apoptose induziertes, "response" Gen in Prostatakarzinomzellen identifiziert (Sells *et al.*, 1994). Es umfasst 332 aa, was ein Molekulargewicht von 38 kDa ergibt. Par-4 besitzt zwei NLS, zeigt jedoch in den meisten Geweben eine zytoplasmatische Verteilung (Boghaert *et al.*, 1997; Sells *et al.*, 1997b; Guo *et al.*, 1998). Die ZIP Kinase interagiert durch ihre Arginin-reiche Region zwischen den aa 337 und 417 mit dem Leuzinzipper von Par-4, welches durch die ZIP Kinase phosphoryliert wird (Page *et al.*, 1999a). Die Interaktion von ZIP und Par-4 wird mit Apoptose in Verbindung gebracht (siehe unten)

CDC5: Das Phosphoprotein CDC5 besteht in den Mammalia (CDC5like) aus 802 aa und enthält mehrere putative Phosphorylierungsstellen für die Kinasen CKII, MAPK sowie PKA

und PKC (Bernstein *et al.*, 1997). Das Protein enthält mehrere “myo repeats”, einen “myo-like” repeat (Nelson 1995), vier putative NLS (Boulikas 1993), eine prolinreiche hydrophile Region, die Ähnlichkeit zu bekannten Transaktivierungsdomänen aufweist (Mitchell und Tijan 1989, Tijan und Maniatis 1994). Im C-terminalen Bereich befindet sich zusätzlich noch eine regulatorische Domäne (Bernstein und Coughlin 1997; Ohi *et al.*, 1994). Erstmals wurde CDC5 in *S.pombe*, als ein Gen welches am G₂/M Übergang involviert ist beschrieben (Nasmyth und Nurse 1981). Das Homolog von CDC5 In *S.cerevisiae*, *Cef1p*, wurde als Polo-ähnliche Kinase beschrieben, die in diversen mitotischen Prozessen, wie der Reifung des Centrosoms, der Formierung der mitotischen Spindel und dem Metaphase/Anaphase Übergang eine Funktion ausübt (Kitada *et al.*, 1993; Ohkura *et al.*, 1995). In REF52.2 Zellen kolokalisieren die ZIP Kinase und das CDC5 im Kern in “speckle” ähnlichen Strukturen, die teilweise mit PML Bodies kolokalisieren. Interessanterweise wird der Spleiß Faktor SC35 durch Koexpression von ZIP Kinase und CDC5 aus dem Kern ins Cytoplasma relokalisiert (Engemann *et al.*, 2002).

1.5. Die Regulation der ZIP Kinase

Die ZIP Kinase wird in vergleichbarem Maße während des gesamten Zellzyklus exprimiert (Scheidtmann und Landsberg, unveröffentlicht).

Als GST-Fusionsprotein ist sie aktiv, wenn sie in *E.coli* Zellen exprimiert wird (Kögel *et al.*, 1998), was darauf hindeutet, dass die ZIP Kinase eine Autoaktivierung durchläuft. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind 6 Autophosphorylierungsstellen beschrieben, von denen drei (Ser180, Thr 225 und Thr 265) in der katalytischen- und drei (Thr299, Thr 306 und Ser 311) in der extrakatalytischen Domäne zu finden sind (Graves *et al.*, 2005). Mittels Punktmutanten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsstellen in der katalytischen Domäne sowohl in Verbindung mit der Autoaktivierung, als auch mit der Substratphosphorylierung stehen. Eine Mutation des extrakatalytischen Thr299 ging mit der Relokalisation der Kinase aus dem Cytoplasma in den Nukleus einher (Graves *et al.*, 2005). Demzufolge scheinen die extrakatalytischen Sites die Lokalisation und möglicherweise die Interaktion mit verschiedenen Strukturen und Proteinen zu beeinflussen.

Vor kurzem wurde beschrieben, dass die beiden Aminosäuren Thr 265 und Thr 299 durch die Kinase ROCK1 phosphoryliert werden. Die Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass Threonin 265 notwendig für die Aktivierung der ZIP Kinase ist (Hagerty *et al.*, 2006). Diese Befunde bringen die ZIP Kinase in Verbindung mit dem Rho/Rock Signalweg, der ebenfalls

an der Regulation von kontraktile Prozessen, sowie an der Zellteilung beteiligt ist. Während der Mitose ist der Rho/Rock Signalweg an der Modulierung des Zellkortex beteiligt, so dass dieser, den sich aufteilenden Chromosomen weichen kann (Hickson *et al.*, 2006). Während der Cytokinese ist der Rho/Rock Signalweg maßgeblich an der Positionierung des kontraktilel Rings und der Regulation dessen motorischer Aktivität beteiligt (Bement *et al.*, 2005; Nishimura und Yonemura 2006).

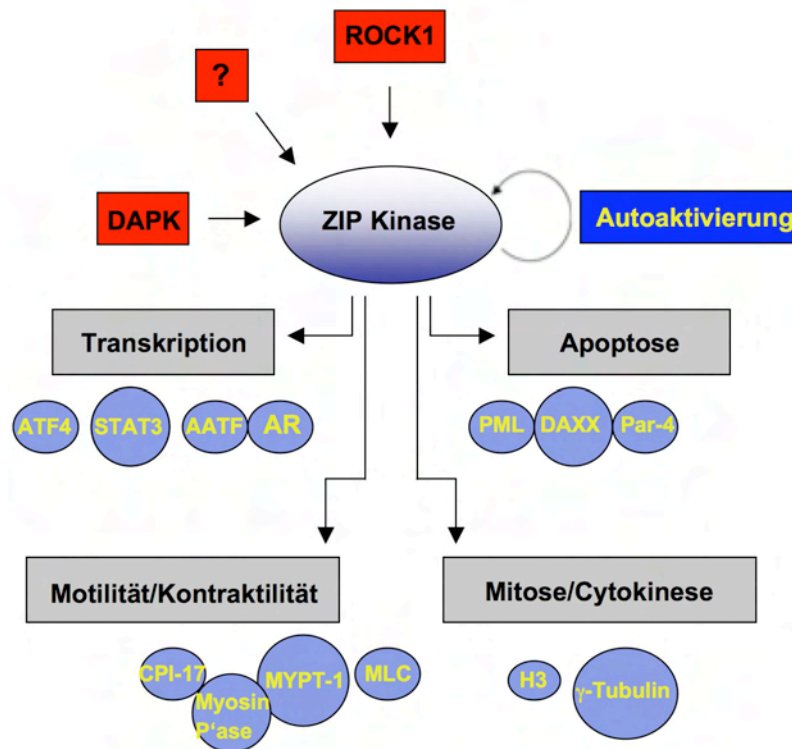


Abbildung 1.5. Die ZIP Kinase ist in mehrere Signalwege eingebunden und wird möglicherweise durch eine Reihe von "upstream" Kinasen beeinflusst. Die ZIP Kinase besitzt 6 Autophosphorylierungssites. Die DAPK phosphoryliert die ZIP Kinase an 6 extrakatalytischen Aminosäureresten, von denen 2 ebenfalls zu diesen Autophosphorylierungssites gehören. Die Kinase ROCK1 phosphoryliert die ZIP Kinase ebenfalls zwei extrakatalytischen Threoninresten die als Autophosphorylierungssites beschrieben wurden. Die Konsensussequenz um das Threonin 180 lässt vermuten dass die ZIP Kinase hier durch eine Kinase phosphoryliert wird, die an der Position +1 relativ zu der Phosphorylierungsstelle ein Prolin bevorzugt. Die Abbildung zeigt ebenfalls die Substrate und Interaktionspartner der ZIP Kinase, die sie mit Apoptose, Transkription, Motilität und Mitose in Verbindung bringt (Nach K.H. Scheidtmann 2007).

Die Konsensussequenz, welche den Thr 180 Rest umgibt, lässt vermuten dass die ZIP Kinase hier durch eine Kinase, wie etwa die MAP Kinase oder die Zyklinabhängigen Kinasen phosphoryliert wird, die an der Position +1 der Phosphorylierungsstelle ein Prolin bevorzugen (Karl Heinz Scheidtmann; unveröffentlicht).

Shani et al konnten zeigen, dass die ZIP Kinase durch die DAPK an 6 extrakatalytischen Aminosäureresten (Thr 299 und die Serine 309,311,312,318 und 326) phosphoryliert wird, von denen 2 als Autophosphorylierungsstellen beschrieben sind (Thr 299 und Ser 311). Ein Austausch dieser 6 Aminosäuren durch Aspartat, um eine konstitutive Phosphorylierung zu imitieren, resultierte in der cytoplasmatischen Lokalisation, sowie einer Trimerisierung der ZIP Kinase einhergehend mit einer Verstärkung der DAP Kinase induzierten Apoptose (Shani *et al.*, 2001).

Bisher ungeklärt ist, inwiefern die Phosphorylierung durch "upstream" Kinasen und die Autophosphorylierung für eine vollständige Aktivierung der ZIP Kinase notwendig sind oder ob sie eher eine modulatorische Funktion, etwa die Regulation der Lokalisation und des Oligomerisierungsstatus, wie im Falle der DAPK haben.

1.6. Funktionen der ZIP Kinase

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann eine Beteiligung der ZIP Kinase an der Apoptose, sowie an Vorgängen die mit Zell-Polarität und Motilität in Verbindung stehen, gezeigt werden. Weiterhin ist die ZIP-Kinase an der Regulation der Mitose (insbesondere der Cytokinese) und der Transkription beteiligt.

1.6.1 ZIP Kinase und Apoptose

Nach transienter Überexpression von muriner FLAG-ZIP Kinase, beobachteten Kawai *et al.*, die Induktion von Apoptose (Kawai *et al.*, 1998). Dagegen löste die Überexpression der ZIP Kinase als GFP Fusionsprotein weder in REF52.2 Zellen noch in NIH 3T3 Zellen die Symptome der Apoptose aus (Kögel *et al.*, 1999). Die Ursachen für diese gegensätzlichen Beobachtungen konnten bis heute nicht geklärt werden.

Die ZIP Kinase kann unter drei Bedingungen Apoptose auslösen, die voraussetzen dass sich die Kinase im Cytoplasma befindet:

1. Die Deletion der C-terminalen 110 AS (ZIP Δ C2/DIK Δ C2), welche NLS4 und Leuzinzipper beinhalten, bewirkt eine Relokalisation der ZIP Kinase in das Cytoplasma, wo sie mit Aktinfilamenten assoziiert und Apoptose auslöst (Kögel *et al.*, 1999). Durch Anfügen der heterologen NLS des SV40 T Antigens und der damit verbundenen nukleären Lokalisation, konnte diese apoptotische Aktivität unterbunden werden (Kögel *et al.*, 1999).

2. Bei Koexpression des Pro-apoptotischen Proteins Par-4 und der ZIP Kinase kommt es ebenfalls zu einer cytoplasmatischen Lokalisation der ZIP Kinase. Par-4 und die ZIP Kinase kolokalisieren anschließend an den Spannungsfasern des Zytoskeletts, es kommt zu einer dramatischen Reorganisation des Cytoskellets und den morphologischen Symptomen der Apoptose (Page *et al.*, 1999b). Der Transkriptionsfaktor AATF kann als Antagonist der Par-4/ZIP Kinase induzierten Apoptose wirken (Page *et al.*, 1999a).

3. Die Koexpression der DAPK und der ZIP Kinase bewirkt, dass die ZIP Kinase durch die DAPK an 6 verschiedenen Aminosäureresten phosphoryliert wird. Neben der Retention der ZIP Kinase im Cytoplasma, geht diese Hyperphosphorylierung sowohl mit einer Trimerisierung der ZIP Kinase, als auch mit der Induktion der Apoptose einher (Shani *et al.*, 2004)

Die ZIP Kinase kolokalisiert teilweise als GFP Fusionsprotein mit sogenannten PML-"bodies". Neueren Untersuchungen zufolge, interagiert die ZIP Kinase mit dem proapoptotischen Protein Daxx in den PML-"bodies" unter dem Einfluss von apoptotischen Stimuli wie AS_2O_3 und IFN- γ . Par-4 verstärkt die Assoziation von Daxx und der ZIP Kinase (Kawai *et al.*, 2003). Eine durch die siRNA verminderte Expression eines der Proteine ZIP Kinase, Daxx oder Par-4, führt zu einer verminderten Aktivierung der Caspasen und der Apoptose (Kawai *et al.*, 2003). Diesen Befunden zufolge, ist die ZIP Kinase mit ihren Interaktionspartnern Daxx und Par-4 an einen neuen nukleären Signalweg der Apoptose beteiligt.

1.6.2. ZIP Kinase und Transkriptionsregulierung

Die ZIP Kinase ist ebenfalls an der Regulation der Transkription beteiligt. Die punktförmigen Strukturen, mit denen die ZIP Kinase im Kern kolokalisiert, sogenannte "speckles", ähneln dem Verteilungsmuster von Replikations-, Transkriptions oder Spleiß- Zentren (Kögel *et al.* 1998). Zusätzlich zeigte sich eine partielle Kolokalisation mit PML-"bodies" (Kögel *et al.*, 1999). PML-"bodies" sind neben der Beteiligung an der Regulation der Apoptose, auch an der Transkriptionssteuerung, beteiligt (LaMorte *et al.*, 1998, Quignon *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

Weiterhin interagiert die ZIP Kinase mit den Transkriptionsfaktoren ATF4 (Kawai *et al.*, 1998), AATF (Page *et al.*, 1998) und STAT3 (Sato *et al.*, 2005), sowie mit dem Androgenrezeptor (AR) (Leister *et al.*,; in Vorbereitung). Einen direkten Einfluss auf die Transkription konnte bisher für STAT3 und den AR gezeigt werden. Die ZIP Kinase ist zusammen mit AATF an

aktiven Promotoren nachweisbar und sie hat sich als essentieller Koaktivator in der Androgenrezeptor vermittelten Transkriptionssteuerung erwiesen (Leister *et al.*, in Vorbereitung). STAT3, wird durch Cytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und besitzt eine wichtige Funktion während des Zellwachstums, der Apoptose und der Zelltransformation. Das STAT3 ist in verschiedenen Tumorzellen konstitutiv aktiv und es wird angenommen dass die Phosphorylierung von STAT3 (an Serin727) durch die ZIP Kinase die Transkriptionsaktivität von STAT3 moduliert (Sato *et al.*, 2005).

1.6.3 ZIP Kinase und Zell- Polarität und Motilität

Die ZIP Kinase beeinflusst die Zellpolarität und ist an verschiedenen motilen Prozessen beteiligt.

Die ZIP Kinase kann *in vitro* eine Ca^{2+} unabhängige Kontraktion von glatten Muskelzellen bewirken (Niirou und Ikebe 2001). Weiterhin induziert die Überexpression der ZIP Kinase die Bildung von Aktinfaserbündeln, welche meistens mit di-phosphorylierter MLC assoziiert sind (Murata-Hori *et al.*, 2001). Komatsu und Ikebe konnten zeigen, dass die MLC Phosphorylierung im Zuge von Migrationsereignissen in unterschiedlichen Säugerfibroblasten überwiegend durch die ZIP Kinase bewerkstelligt wird. Ein *knock-down* der endogenen ZIP Kinase mittels der siRNA Technik bewirkte in diesen Zellen sowohl Cytoskelettdefekte, als auch einen Defekt der Zellpolarität einhergehend mit dem Verlust der Migrationsaktivität. Die Autoren nehmen an, dass die Phosphorylierung der MLC durch die ZIP Kinase zur Bildung von stabilen Myosin Filamenten in den sogenannten "stress fibers" führt (Komatsu und Ikebe 2004). Neben einer direkten Beeinflussung der MLC Phosphorylierung in ihrer Funktion als MLC Kinase, konnte durch Haystead *et al.*, gezeigt werden, dass die ZIP Kinase in glatten Muskelzellen ebenfalls die Myosin Phosphatase hemmen kann und so die Dephosphorylierung der MLC verhindern kann. Die ZIP Kinase assoziiert mit der Myosin Bindeeinheit der PP1 δ und inhibiert die Myosin Phosphatase durch Phosphorylierung von MYPT-1, was in einer Verminderung der Myosinaffinität resultiert. Ausserdem aktiviert die ZIP Kinase, den Myosin Phosphataseinhibitor CPI-17 was ebenfalls eine Verminderung der MLC Dephosphorylierung zur Folge hat. Über diese Mechanismen kann die ZIP Kinase die Ca^{2+} Sensitivität und Kontraktilität von glatten Muskelzellen beeinflussen (MacDonald *et al.*, 2001a und 2001b ; Endo *et al.*, 2004; Übersicht bei Haystead 2005).

1.6.4 ZIP Kinase und Mitose

Durch die Erzeugung einer Zelllinie, die GFP ZIP Kinase konstitutiv exprimiert konnte gezeigt werden, dass die ZIP Kinase während der Mitose eine distinkte Lokalisation aufzeigt. (Preuss *et al.*, 2003a und 2003b). Im Gegensatz zu der Interphase, wo die ZIP Kinase mehrheitlich eine diffuse oder punktuelle Verteilung im Zellkern zeigt, assoziiert die ZIP Kinase während der Mitose mit den Centrosomen, den Centromeren und dem kontraktilen Ring (Im Folgenden wird des Öfteren die Bezeichnung mitotische Strukturen als Sammelbegriff benutzt) (Preuss *et al.*, 2003b).

a) Centrosom

Die Centrosomen dienen sowohl während der Interphase als auch während der Mitose als sogenannte "microtubule organizing centres" (MOC) und bilden in der Mitose Ausgangs- und Ankerpunkte der mitotischen Spindel. Das Centrosom verdoppelt sich einmal pro Zellzyklus und trennt sich zu Beginn der Prophase, um zu den gegenüberliegenden Polen zu wandern. Mit der Trennung der Centrosomen geht die Ausbildung des Spindelapparates einher.

Die Assoziation der ZIP Kinase mit den Centrosomen besteht während des gesamten Zellzyklusses, wird aber während der Mitose bedeutend verstärkt. Das GFP Signal der ZIP-Kinase am Centrosom korreliert mit dem γ -Tubulin Signal. Die Ko-Immunopräzipitation der ZIP Kinase mit dem γ -Tubulin deutet auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine, bzw. auf eine gemeinsame Zugehörigkeit der beiden Proteine zu einem Proteinkomplex hin. Möglicherweise wird die ZIP Kinase zusammen mit dem γ -Tubulin zum Centrosom rekrutiert. Allerdings konnte bisher keine *in vitro* Phosphorylierung des γ -Tubulins durch die ZIP Kinase gezeigt werden (Preuss *et al.*, 2003 b).

b) Mitotische Spindel

Der Spindelapparat dient der Segregation und Gleichverteilung der Chromosomen auf die entstehenden Tochterzellen. Die Mikrotubuli der Spindelfasern bestehen in der Hauptsache aus α - und β -Tubulin, welche ebenfalls *in vitro* von der ZIP Kinase phosphoryliert werden, so wie assoziierten Motorproteinen, wie etwa dem Centromer assoziierten CENP-E.

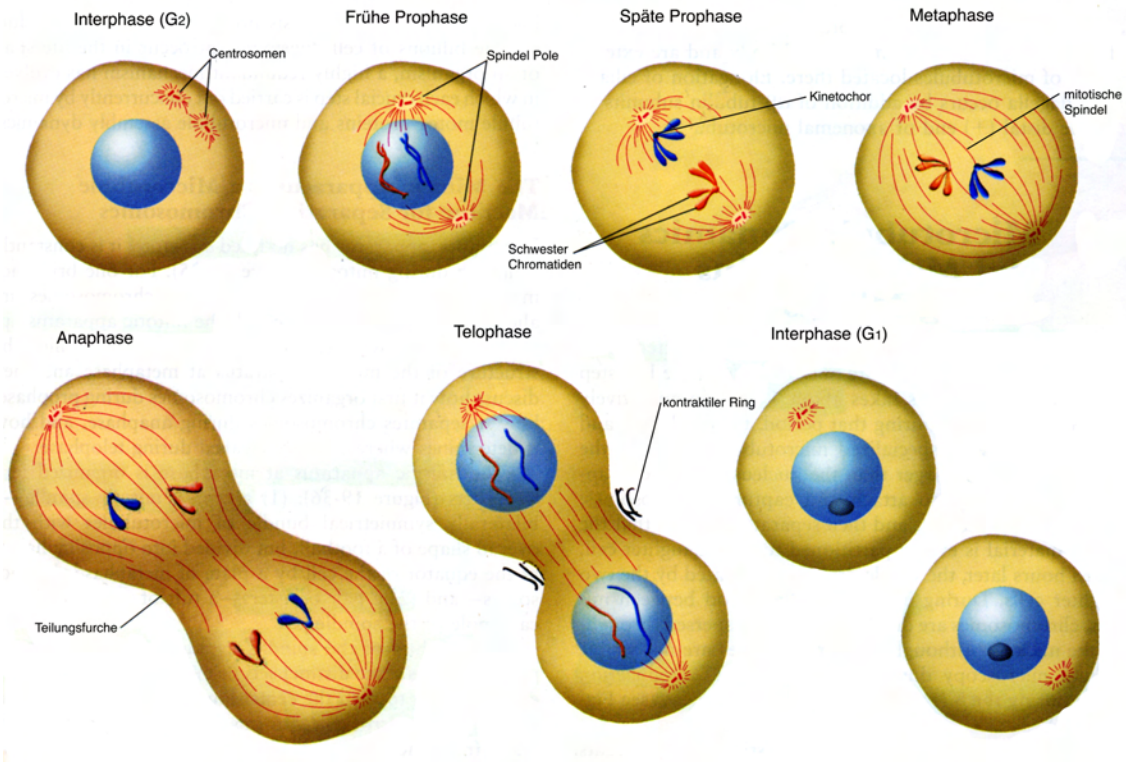


Abbildung 1.4 Mitose und mitotische Strukturen. Das Centrosom verdoppelt sich in der G₂ Phase des Zellzyklus und wandert dann zu den entgegengesetzten Polen der Zelle, was mit dem Beginn der Metaphase vollendet ist. Mit den Centrosomen als Ankerpunkte bildet sich die mitotische Spindel, die über den Centromer/Kinetochor-Komplex mit den Chromosomen verbunden ist und die Chromosomen in Metaphase in der Äquatorial-Ebene aufreihet. Gleichzeitig mit der Auftrennung der Chromosomen in der Anaphase bildet sich die Teilungsfurche in der sich der kontraktile Ring bildet. Aufgrund dessen motorischer Aktivität schnürt sich die Zelle in der Telophase ein um so zwei unabhängige Tochterzellen zu erhalten. (Nach Lodish, Molecular Cell Biology 4.Ausgabe 2000)

Es konnte zwar bisher keine Kolo-kalisation der ZIP Kinase mit der Mitotischen Spindel beobachtet werden, jedoch gibt es einige Befunde die auf eine Beteiligung der ZIP Kinase bei der Regulation des Spindelaufbaus hindeuten. Weiterhin spielt das STAT3, welches von der ZIP Kinase phosphoryliert und aktiviert wird, ebenfalls eine Rolle bei der Regulierung der Mictrotubuli Dynamik (Ng *et al.*, 2006).

c) Centromer

Die Centromere dienen als Plattform für den Aufbau der Kinetochore und stellen mit diesen eine funktionelle Einheit dar. Diese Multiproteinkomplexe dienen der Kohäsion der

Chromatiden bis zu deren Trennung in der Anaphase, deren Anheftung an die Spindelfasern, sowie deren Transport zu den gegenüberliegenden Polen. Sie enthalten außerdem eine Reihe von regulatorischen Proteinen, die den Metaphase-/Anaphaseübergang regulieren und/oder am sogenannten Spindelcheckpoint beteiligt sind (Übersicht bei Musacchio und Salmon 2007, Morris und Moazed 2007). Die Proteine INCENP, Aurorakinase B und Survivin werden als „chromosomal passengers“ bezeichnet, da sie nur vorübergehend mit den Centromeren assoziiert sind. In der späten Anaphase findet man sie in der Zentralspindel und später am kontraktilen Ring. Daher wird ihnen, vor allem INCENP und Aurora B eine Rolle beim „assembly“ des kontraktilen Rings, sowie an der Koordination von Karyo- und Cytokinese zugesprochen. (Übersicht bei Yanagida 2005; Vagnarelli und Earnshaw 2004; Adams *et al.*, 2001).

Die Kolokalisation der ZIP Kinase mit den Centromeren beschränkt sich auf den Zeitraum von der Prophase bis zur frühen Anaphase und korreliert mit einer spezifischen Phosphorylierung des Histons H3 am Threonin11 (Preuss *et al.*, 2003a). Bisher war nur die Phosphorylierung des Histons H3 an Position Serin 10 beschrieben, die für den Ablauf der Mitose eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Phosphorylierung des Serin 10 wird in der pericentromeren Region initiiert und breitet sich über die gesamten Chromosomenarme aus (Hendzel *et al.*, 1997). Die Centromerregion scheint jedoch frei von S10 phosphoryliertem Histon H3 zu sein, da dieses dort durch das verwandte CENP-A ersetzt wird, was zeitgleich zu der Assoziation der ZIP Kinase mit den Centromeren stattfindet. (Sullivan *et al.*, 1994; Van Hooser *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung des CENP-A wird vermutlich durch die Aurorakinasen A und B bewerkstelligt und stellt möglicherweise ein Signal für den anschließenden Aufbau des Kinetochorkomplexes dar. Analog dazu könnte die H3 T11 Phosphorylierung durch die ZIP Kinase ebenfalls eine Möglichkeit darstellen centromeres Chromatin für anschließende mitotische Abläufe zu markieren (Preuss *et al.*, 2003a).

d) Kontraktiler Ring

Der kontraktile Ring besteht überwiegend aus Aktin und Myosin-II, sowie assoziierten Proteinen wie die regulatorische Untereinheit von Myosin II, der Myosin Leichten Kette (MLC). In der Mitose durchläuft die Phosphorylierung der MLC einen Wechsel von Serin 1 nach Serin 19 (Yamakita *et al.*, 1994; Matsamura *et al.*, 1998). Der kontraktile Ring bildet sich in der

Anaphase und bewirkt in der Telophase, durch Einschnürung, die Trennung der Tochterzellen.

Die ZIP Kinase kolokalisiert ab der Telophase bis zum Ende der Cytokinese mit Ser19 phosphorylierter MLC in der Teilungsfurche (Preuss *et al.*, 2003b). Da die ZIP Kinase bereits bei Vorgängen der Zellmotilität als MLC Kinase an der Regulation der MLC Phosphorylierung beteiligt ist, ist es wahrscheinlich, dass die MLC während der Cytokinese auch ein Substrat der ZIP Kinase ist.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der ZIP Kinase während der Mitose genauer zu untersuchen. Eine Kolokalisation der ZIP Kinase mit den Centrosomen, dem Centromer und dem kontraktilen Ring war zwar beschrieben, sowie auch das Auftreten einer neuartigen, mitosespezifischen Phosphorylierung des Histons H3, jedoch ließen diese Untersuchungen keine Rückschlüsse bezüglich des Interaktionsbereiches der ZIP Kinase an diesen Strukturen zu. Des weiteren war es auch nicht möglich Erkenntnisse bezüglich der Funktion der ZIP Kinase an den jeweiligen Strukturen zu gewinnen.

Mit Hilfe von Deletionsmutanten sollten die Interaktionsbereiche der ZIP Kinase mit dem Centrosom, dem Centromer und dem kontraktilen Ring ermittelt werden. Anhand der Kenntnis der Interaktionsdomänen sollten interferierende Peptide hergestellt werden, die es erlauben, die Funktion, bzw. die Lokalisation der ZIP Kinase an genannten mitotischen Strukturen selektiv auszuschalten.

2. Material

2.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (München), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) und AppliChem (Darmstadt), radioaktives ^{32}P - γ -ATP von GE Healthcare (Freiburg) bezogen.

Enzyme stammten von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt), Roche (Mannheim) oder Promega (Mannheim).

Verbrauchsmaterialien wurden von den Herstellern Eppendorf, Sarstedt, BD Falcon, und Roth bezogen.

2.2. Kits

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

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
JETSTAR PLASMID Purification Kit	Isolierung von Plasmid DNA	Genomed
JETSTAR Gel Extraction Kit	Gelextraktion von linearer DNA	Genomed
JETSTAR PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR Ansätzen	Genomed
QIAquick Gel Extraction Kit	Gelextraktion von linearer DNA	Qiagen

2.3 Allgemeine Stammlösungen und Puffer

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

PBS⁺ (pH 7,2)

137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 8,1 mM Na₂HPO₄
 1,5 mM KH₂PO₄
 0,7 mM CaCl₂
 0,5 mM MgCl₂

SDS-Stammlösung (10 %) 1 g Natriumdodecylsulfat in 10ml A.bidest

2.4. Kultur von Säugerzellen 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
HeLa	Epithelzellen	Mensch	ECACC 93021013
MCF7	Brustkarzinomzellen	Mensch	DSM ACC 115
REF52.2	Embryofibroblasten	Ratte	
PC3	Prostatakarzinomzellen	Mensch	

2.4.1.2. Medien für die Kultur von Säugerzellen

Die Medien für Säugerzellen wurden von Sigma bezogen, das FCS von Seromed. Die Medien DMEM 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 Bakterienstämmen

2.4.2.1. Bakterienstämme

E. Coli-Stamm Dh5 α Genotyp F-, supE44, Δ lacU169, Φ 80d, lacZ Δ M15, Hanahan et al, 1983 hsdR17(rk-mk-), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 XL1 blue-MRF Δ (mcr)183, Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, Jerpseth et al, 1992 endA1,supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F', proAB, lacIq, Z Δ M15,Tn10 (Tett)]

2.4.2.2. 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:

Antibiotikum	Stammlösung	Gebrauchskonzentration
Ampicilin	50 mg/ml	100 μ g/ml
Kanamycin	10 mg/ml	70 μ g/ml

2.4.2.3. Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien

Folgende Lösungen wurden zur Herstellung von kompetenten 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).

Lösung 1	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A pH 8,0
Lösung 2	1 %	SDS
	200 mM	NaOH
Lösung 3	3 M	K-Acetat pH 5,5

Weitere 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

Ethidiumbromid-Stammlsg. (10 mg/ml) 1 % Ethidiumbromid
Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

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
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)	140 mM	NaCl
	20 mM	Na ₃ PO ₄ pH 8,0
	3 mM	MgCl ₂
	0,5 %	NP-40
	1 mM	DTT
Proteaseinhibitor-Tablette/50 ml (Complete©, Roche)		
TBS	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	50 mM	NaCl
Folgende Lösungen wurden für die SDS-PAGE verwendet.		
SDS-Probenpuffer (1x)	0,25mM	Tris-HCl pH 6,8
	40 mM	DTT
	6,6 %	SDS
NEM	25 mg	NEM
	0,66 ml	H ₂ O
	0,33 ml	Glycerin, gesättigt mit Bromphenolblau
Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCL pH 6,8
	0,4 %	SDS
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
	0,4 %	SDS
Elektrophoresepuffer	0,19 M	Glycin
	25 mM	Tris-HCl
	0,5 mM	SDS

2.7 Plasmide

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
pCMV-Tag2	(Stratagene)	Expressionsvektor mit N-terminalem FLAG-Signal

Bereits existierende Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Bezeichnung		Anwendung
pGFP- Dlk ΔC1	(Kögel et al 1999)	Expressionsvektor von GFP- Dlk ΔC1
pGFP-Dlk ΔC2NLS	(Kögel et al 1999)	Expressionsvektor von GFP- Dlk ΔC2NLS
pGFP Dlk ΔC3NLS	(Kögel et al 1999)	Expressionsvektor von GFP- Dlk ΔC3NLS
pGFP Dlk ΔN1	(Kögel et al 1999)	Expressionsvektor von GFP- Dlk ΔN1
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

2.8. Oligonukleotide

Die in der PCR eingesetzten Primermoleküle wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert. Die Formulierung yx bezeichnet das Nukleotid x (bzw. die Komplementäre Base bei den antisense Primern) an der Position y der cDNA.

Primer für die katalytische Domäne/des N-Terminus der Dlk

KDBgIII sense 5'-gaagatctcc₁atgtccacgttcaggcaggagg-3'

EcoRI antisense 5'-ggaattc₈₁₈gaatgctccaggctctgtgcatgg-3'

Primer für den C-Terminus der Dlk (333-417 bzw. 333-448)

DCTEcoRI S 5'-ccggaattc₉₉₈gctgctgagctgcagcggg-3'

DlkDC-LeuBamHIAS (ΔLZ) 5'-cgggatcccgtca₁₂₄₈gtcgtagcggttctcaagg-3'

BamHI antisense plus (+LZ) 5'-ggatcc₁₃₄₃cgcacgccgcactcggcctgcagc-3'

2.9 Antikörper

2.9.1 Primärantikörper

α-Flag: Anti-FLAG® M2 monoklonaler Antikörper aus der Maus, spezifisch gegen das Flag-Epitop (Sigma-Aldrich, München)

α-GFP (mono): Monoklonal Maus IgG1κ (Roche). Erkennt rekombinantes GFP

α-GFP (poly): Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (BD Bioscience, Heidelberg)

α - α -Tubulin: Monoklonal anti- α -Tubulin Maus IgG1 (Sigma-Aldrich, München)
 α - γ -Tubulin: Monoklonal anti- γ -Tubulin aus Kaninchen (Sigma-Aldrich, München)
 CREST: Humanes Autoimmunserum. Erkennt Centromerproteine(DPC Bierbaum)
 α -p21: Polyklonaler Ziegenantikörper. Erkennt p21 CIP1 (Santa Cruz, Palo Alto)
 α -MYPT1: Monoklonal Maus IgG1 Erkennt MYPT1 (Santa Cruz, Palo Alto)
 α -H3 (Serin 10): Monoklonaler Maus Antikörper. Erkennt Serin 10 phosphoryliertes Histon H3 (Upstate, Billerica)
 α -H3 (Threonin11): Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen. Erkennt Threonin 11 Phosphoryliertes Histon H3 (Pineda, Berlin; Auftragsarbeit)
 α -ZIP Kinase: Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, Erkennt endogene ZIP Kinase (Calbiochem, San Diego)
 α -MLC S19 : Monoklonaler Antikörper aus der Maus. Erkennt an Serin 19 phosphorylierte MLC (Cell Signaling)
 α -Lamin B: Monoklonaler Antikörper aus der Maus. Erkennt die Proteine der Kernlamina (Biomol, Butler Pike)
 α -INCENP: Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen. Erkennt die N-terminalen AS zwischen 884 und 901 (Sigma-Aldrich, München)

2.9.2 Sekundäre Antikörper/Konjugate

α -mousePO Ziege-Anti-Maus, Peroxidase gekoppelt (Nordic Immunology, Tilburg NL)
 α -rabbitPO Ziege-Anti-Kaninchen, Peroxidase gekoppelt (Nordic Immunology, Tilburg NL)
 α -mouse Cy3 Ziege-Anti-Maus, konjugiert mit CyTM3 (Dianova, Hamburg)
 α -rabbit Cy3 Ziege-Anti-Kaninchen, konjugiert mit CyTM3 (Dianova, Hamburg)
 α -human Cy3 Ziege-Anti-Mensch, konjugiert mit CyTM3 (Dianova, Hamburg)

2.10 Reagenzien für die Immunfluoreszenz

2.10.1 Fixierungspuffer und Farbstoffe

PFA-Puffer (Paraformaldehyd Puffer):	3 %	PFA in PBS+
	0,1 %	Triton X-100
Fixierungspuffer nach Honda (Honda et al. 2003)	20 mM	PIPES (pH 6,8)
	1 mM	MgCl ₂
	10 mM	EGTA
	4 %	Formaldehyd
	0,2 %	Triton X-100

DAPI 4', 6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid, eingesetzt zur spezifischen Färbung der Zellkerne (Sigma-Aldrich).

TRITC-Phalloidin Gift aus dem Knollenblätterpilz, das spezifisch F-Aktin, jedoch nicht G-Aktin bindet. Gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC).

Einbettmedium: Permafluor, Aqueous Mounting Medium (Immunotech, Marseille)

2.11. Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Färbung von DNA

0,1 % Triton X-100
50 µg/ml Propidiumiodid
100 U/ml Rnase A
in PBS⁺ gelöst

3.Methoden

3.1 Nukleinsäureanalytik

3.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Zur Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation wurde das Protokoll von Hanahan und Mitarbeitern verwendet (Hanahan *et al.*, 1983). Dieses Protokoll ermöglicht Transformationsraten von $\geq 5 \times 10^8$ transformierter Kolonien pro μg Plasmid-DNA. 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 bei 5000 Upm 4°C für 5min zentrifugiert. 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 -80°C mehrere Monate lagerbar.

Um die Kompetenz der Bakterien zu ermitteln, werden die Bakterien mit dem pBluescript SK+ (Promega) transformiert und anschließend wird die Lebendkeimzahl bestimmt. Für eine normale Klonierung reicht eine Lebendkeimzahl von 10^6 - 10^7 , für schwierige Klonierungen sollten hochkompetente Bakterien mit einer Lebendkeimzahl von 10^8 - 10^9 verwendet werden.

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 er-

möglichen. 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)

Die allgemein als Mini-Präparation bekannte analytische Plasmidpräparation wird genutzt, um die Plasmid-DNA mehrerer Bakterienklone zu analysieren. Die DNA-Isolierung erfolgt (nach Birnboim und Doly, 1979, mod.) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse.

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 × g, RT) geerntet. Nach gründlichem Entfernen des Mediums, wurde das Zellpellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 100 µl Lösung 2 lysiert. Die Fällung der Proteine und der mit Proteinen besetzten genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 100 µl eiskalter Lösung 3, sofortiges vorsichtiges Mischen und anschließender Zentrifugation (5 min, 16000 × g, 4 °C). Der Überstand wurde zur Fällung der Plasmid-DNA mit 0,7 fachem Volumen Isoopropanol (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 (Midipräparation)

Die allgemein auch als DNA-Midi-Präparation bezeichnete Plasmidisolierung ermöglicht es, sehr saubere Plasmid-DNA in einer hohen Menge (100-200 µg) zu erhalten. Für die präparative Plasmidisolierung stand das Plasmid-Midi-Kit50 Jetstar von Genomed zur Verfügung. Hierbei wird die oben beschriebene alkalische Lysemethode angewandt und mit einem Reinigungsschritt über eine Ionenaustauschersäule verbunden. Es wurde die Säule zur Isolierung von 100-200µg Plasmid-DNA aus einer 25-30ml Bakteriensuspension verwendet. Die Lösungen wurden dem Kit entnommen und die anschließende Durchführung erfolgte 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 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Aufreinigung der DNA aus einem Agarosegel stand das Jet-sorb-Kit „DNA-Extraktion“ von Genomed zur Verfügung, aus dem die verwendeten Lösungen stammen. Es ermöglicht eine Aufreinigung von DNA-Fragmenten zwischen 500bp-10kb. Hierbei wird die DNA mit sehr feinen Glasperlen, die DNA binden, isoliert. Der Reagentiensatz wurde laut Angaben des Herstellers benutzt.

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

Anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich die Konzentration von Nukleinsäuren durch Messen der Absorption von UV-Licht 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) erstellt 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

Es wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II für den Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA verwendet, die bestimmte kurze, palindrome Sequenzmotive erkennen. Innerhalb ihrer Erkennungssequenz katalysieren sie die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung auf jedem Strang. Dabei entstehen DNA-Fragmente mit glatten Enden, oder mit komplementären 5'- oder 3'-Enden Überhängen (Sambrook et al., 1989). Der Restriktionsverdau erfolgt in der Regel mit 0,3-2U/µg DNA bei 37°C für mind. 1 Std.

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

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

Die Inkubationsbedingungen wurden gemäß den Herstellerangaben gewählt. Bei Doppelrestriktionen wurde das 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 aufgefüllt werden. Zu 20 µl hitzeinaktiviertem Restriktionsansatz (0,1 – 4 µg DNA) wurden jeweils 10 µl Ansatz 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 Religation 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.

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 : 3- 1:6, Vektor 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. Glatte DNA-Fragmenten wurden in bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Bei überhängenden DNA-Fragmenten wurde mindestens 1 h 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 die Pwo Polymerase (MWG) 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 in 50 μ l Ansätzen unter angegebenen Bedingungen durchgeführt:

100ng Matrizen-DNA
1,5mM MgCl₂
0,2mM pro dNTP
0,5 μ M pro Primer-Oligonukleotid
25U/ml DNA-Polymerase
1x Reaktionspuffer
(der jeweils verwendeten Polymerase)

Die Spezifität und Effizienz einer PCR ist von vielen verschiedenen Parametern abhängig, die bei jeder PCR mit neuen Startermolekülen neu optimiert werden müssen (gem. H.J. Müller 2001):

- **Denaturierung:** Eine vollständige Denaturierung ist extrem wichtig für das Gelingen der PCR. Wird doppelsträngige DNA nicht komplett denaturiert, so wirkt sich dies in einer deutlichen Herabsetzung der „Annealing“-Effizienz des Oligonukleotids aus.
- **Oligonukleotid-Annealing:** Die optimale „Annealing“-Temperatur muss für jedes Oligonukleotid-Paar bestimmt werden. Bei zu hohen Temperaturen erfolgt kein „Annealing“ und damit keine PCR-Produkte, bei zu niedrigen Temperaturen kommt es zu Fehlpaarungen und damit zu unspezifischen Produkten.

- **Elongation:** Die Elongationszeit (Oligonukleotidverlängerung) wird von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Matrize, sowie durch die Prozessivität der Polymerase, bestimmt. Die Faustregel besagt: 60sek für 1000bp. Ausnahmen sind die „Proofreading“-Enzyme, die für ihre 3'→ 5' Exonukleaseaktivität für ein 1000bp Fragment etwa 2min benötigen.
- **Zykluszahl:** In der Regel gilt eine Zykluszahl von 25-40, mehr Zyklen steigern das Risiko fehlerhafte Nukleotide einzubauen, oder unspezifische Fragmente zu amplifizieren.
- **Magnesiumkonzentration:** Mg²⁺-Ionen beeinflussen die Enzymaktivität, erhöhen die Schmelztemperatur der doppelsträngigen DNA und bilden einen löslichen Komplex mit Nukleotiden, wodurch das Substrat gebildet wird, welches die Polymerase erkennt. Die Mg²⁺-Konzentration kann die Spezifität und Ausbeute der PCR erheblich beeinflussen. In der Regel werden Konzentrationen von 1,0 bis 2,5 mM verwendet. Die optimale Konzentration ist jedoch von PCR zu PCR unterschiedlich. Niedrigere Konzentrationen führen zu einer geringeren und hohe Konzentrationen zu einer erhöhten Ausbeute. Allerdings ist bei einem Überschuss freier Mg²⁺-Ionen mit der Synthese unspezifischer Produkte zu rechnen.

Als Richtwerte gelten:	1	94°C	2'	Denaturierung
	2	92°C	45"	Denaturierung
	3	40-58°C	1'	„Annealing“/Primeranlagerung
	4	72°C	90sek/1kb	Elongation
	5	72°C	5'	
	6	4°C	inf.	

Die Schritte 2 bis 4 werden je 40 mal wiederholt. Die „Annealing“-Temperatur richtet sich nach der Länge und Zusammensetzung der Primer und bestimmt dadurch die Spezifität der PCR.

3.2. Methoden der Zellkultur

3.2.1. 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.

3.2.2. Transiente Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion von Säugerzellen wurde mittels JetPEI-Transfektionsreagenz der Firma Qbiogene durchgeführt. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden $1,7 \times 10^4$ Zellen auf runden Deck-Gläschen in Kulturgefäßen mit passenden Vertiefungen (1,5 cm Ø) (sogenannte well Plates) 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 - 2h 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 auf den Zellen verbleiben.

3.2.3. Stabile Transfektion von Säugerzellen

Um stabile Zelllinien zu etablieren, welche die verschiedene Mutanten konstitutiv exprimieren, wurden die Zellen zunächst in einer 10cm Zellkulturschale, wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben, transient transfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen auf die Vertiefungen einer sogenannten "24 well" Zellkulturschale verteilt und es wurde dem Medium 1,2µg/ml des Antibiotikums Genitecin zugesetzt, um Zellen zu selektieren, die die Konstrukte stabil in ihr Genom integriert hatten. Das Medium mit dem Selektionsantibiotikum wurde alle 1-2 Tage gewechselt, um zu verhindern, dass sich tote Zellen, welche sich ablösten und im Medium schwammen, ansammelten. Die überlebenden Klone wurden anschließend wachsen gelassen bis sie eine Grösse erreicht hatten die das Ernten der Klone ermöglicht. Dies war meist nach zwei bis drei Wochen der Fall. Die einzelnen Klone waren dann mit bloßem Auge sichtbar. Die Zellen wurden geerntet, in dem ein Metallring um die Klone gelegt wurde,

um es zu ermöglichen, die einzelnen Kolonien selektiv zu trypsinieren und in neue Vertiefungen einer 24 well Platte zu überführen. Dort wurden die selektierten Klone, nachdem mikroskopisch überprüft wurde ob sie das gewünschte Peptid exprimieren weiterkultiviert bis sie die erforderliche Dichte hatten, um auf eine 6cm Kulturschale und anschliessend auf eine 10 cm Kulturschale, überführt zu werden.

3.2.4. Fluoreszenzmikroskopie von Säugerzellen

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen auf runden Deckgläschen, in sogenannten 24-well Kulturschalen, mit passenden Vertiefungen (1,5 cm Ø) ausplattiert. Es wurden je nach Zelllinie $1,5 - 2,5 \times 10^4$ Zellen je Vertiefung ausplattiert. Die Fixierung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte 24 bis 48 h nach der Transfektion, die Durchführung wich je nach verwendetem Fixativ leicht ab:

- 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.

Für eine Fixierung mit dem Puffer nach Honda et al. und "Fixperm" wurden die Zellen ebenfalls mit PBS⁺ gewaschen und für 10 Minuten in dem Fixierungspuffer inkubiert, welcher ebenfalls durch Waschen mit PBS⁺ entfernt wurde.

- Für die Fixierung mit Methanol wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺ gewaschen und anschließend wurde eiskaltes Methanol zu den Zellen gegeben und diese 5 Minuten bei -20 °C inkubiert. Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurde das Methanol anschließend mit PBS⁺ in mehreren Waschschritten bei RT herausverdünnt.

Der Fixierungspuffer nach Honda et al. und dessen Variante "Fixperm" enthielten bereits 0.05 % Triton-X-100, so dass die Zellen gleichzeitig fixiert und permeabilisiert wurden. Bei den übrigen Fixierungsmethoden wurden die Zellen nach der Fixierung 5 Minuten mit 0,05% Triton X-100 (in PBS⁺ gelöst) bei RT permeabilisiert.

Nach der Fixierung/Permeabilisierung 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 blockiert. Je nach Strukturen die untersucht werden sollten kamen hier verschiedene Methoden zum Einsatz:

- Die Zellen wurden in 5% Magermilchpulver in PBS+ mit 1% Ziegen Serum 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% Ziegen Serum und 0,1% Triton X-100 inkubiert.
- Die Zellen wurden in 3% BSA für 1h bei RT inkubiert. Alternativ konnte der Erstantikörper zusammen mit der Blockierungslösung zugegeben werden.
- Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ziegen Serum inkubiert (1-10%). Der Erstantikörper konnte ebenfalls der Blockierungslösung zugesetzt werden, um die Spezifität zu erhöhen.

Es folgten drei 10minütige Waschschrte in PBS+. Der Erstantikörper wurde durch fluoreszenzmarkierte Zweit-Antikörper (Dianova) nachgewiesen. Die Zweitantikörperinkubation erfolgte für 30 min in einer Verdünnung von 1 : 2000 in PBS+ mit 1% Ziegen Serum und 0,1% Triton X-100. Alternativ wurde der Zweitantikörper in PBS+ oder 3% BSA zugegeben.

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 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

3.3. Methoden der Protein-Analytik

3.3.1 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung eines Zellextraktes wird Phosphatlysispuffer verwendet. Dieser Puffer besitzt eine hohe Konzentration an Phosphationen, die während der Zellyse die Phosphatasen hemmen, so dass die aufgereinigten Proteine ihren Phosphorylierungszustand behalten (Scheidtmann et al., 1982).

Von einer großen Zellkulturschale (Durchmesser: 10cm) werden die Zellen nach der Transfektion auf Eis geerntet: Das Medium wird abgenommen und die Zellen dreimal in PBS⁺ gewaschen. Nach dem letzten Waschen wird die LP schräggestellt, und ca 500 ml PBS⁺ dazugegeben. Anschließend werden die Zellen abgeschabt und zusammen mit dem PBS⁺ in eine Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend bei 1500 UpM und 4°C während 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das PBS⁺ abgenommen und das Zellpellet in 200-1000 µl (je nach gewünschter Proteinkonzentration), resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zellyse werden die Zellkerne und die festen Zellbestandteile 3min bei 1500UpM (Minifuge) sedimentiert. Der Überstand enthält alle löslichen Proteine des Cytoplasmas und des Nukleoplasmas. Er wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und direkt für eine Immunpräzipitation, oder einen Western Blot verwendet oder bei -70°C aufbewahrt. Das Pellet, das die Zellkerne und unlöslichen Zellbestandteile enthält, kann nachextrahiert werden. Dazu wird es in 100-200µl/LP Phosphatlysispuffer gut resuspendiert, mit Benzonaase versetzt (5U/LP) und 15min auf Eis inkubiert. Benzonaase ist eine unspezifische Nuklease, die bei 4°C noch sehr effizient arbeitet und unter den gewählten Bedingungen eine Zerkleinerung des Chromatins und eine Freisetzung von 0,5-2kb Fragmenten bewirkt (Protokoll ausgearbeitet von G. Landsberg; modifiziert nach Ando et al., 2002). Anschließend wurde der Ansatz für 5min bei 1500UpM zentrifugiert. Der Überstand enthält das Chromatin (Fragmente von 0,5-2 kb), im Pellet befinden sich die Restkerne (nicht lösliche, größere Chromatinfragmente). Das Pellet kann mit 0,5M (oder höherer Konzentration) NaCl nachextrahiert werden. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und noch mal bei 14000UpM für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird direkt für eine Immunpräzipitation, oder einen Western Blot verwendet, oder ebenfalls 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 OD₅₉₅ nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde anhand einer zuvor erstellten Eichreihe mit verschiedenen BSA- Konzentrationen (0 - 20 µg/ml) ermittelt.

3.3.2 Western Blot

Die Technik des „Western Blotting“ umfasst den Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Membran und den anschließenden spezifischen Nachweis einzelner Proteine durch Antikörper.

Der Transfer der Proteine („Blotting“) auf eine Membran erfolgt üblicherweise durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Auf einem solchen „Blot“ können nun Proteine, mittels spezifischer Antikörper, nachgewiesen werden. Meist werden ein für das nachzuweisende Protein spezifischer Erstantikörper und ein enzymgekoppelter Zweitantikörper, der gegen die eingesetzten Erstantikörper gerichtet ist, eingesetzt. Das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym wird dazu benutzt, ein farb- oder lichtgebendes Substrat umzusetzen um so die Anwesenheit des gesuchten Proteins anzuzeigen.

Die Detektion durch verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence, kurz ECL™) beruht auf der Oxidation von Luminol durch Peroxidase in der Gegenwart von H₂O₂ und chemischen Verstärkern, vor allem Phenolen. Diese Verstärker erhöhen die Lichtausbeute um den Faktor 1000 und verlängern die Dauer der Lichtabgabe. Das Emissionsmaximum liegt bei 428 nm und kann durch blaulichtempfindliche Filme nachgewiesen werden.

3.3.3. Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation nutzt man die Eigenschaft von Antikörpern aus, spezifisch an ihr Antigen zu binden, um ein bestimmtes Protein aufzureinigen. Dabei werden die Antikörper über ihre Fc-Region an das Protein A oder G von *Staphylococcus aureus* gebunden, um die Aufreinigung des Antigens zu ermöglichen. Das im Zellextrakt enthaltene Antigen kann so als matrixgebundener Antigen-Antikörper-Komplex präzipitiert werden. Als Matrix wird Sepharose oder Agarose benutzt, an die das Protein A oder G kovalent gekoppelt ist. Je

nach Antikörper wird Protein A oder G verwendet, z.B. haben Mausantikörper eine höhere Spezifität für Protein G und Kaninchenantikörper eine höhere Spezifität für Protein A.

Zu den Zellextrakten, die unter Punkt 3.3.1 hergestellt wurden, wurde 1 µl Antikörper gegeben und das Gemisch wurde 1h auf Eis inkubiert. Währenddessen werden 20-25 µl des Protein-G-Sepharose / Protein A Agarose Gemisches zweimal mit PBS⁺ gewaschen und nach Ablauf der Stunde wird die Protein-G Sepharose /Protein-A Agarose zu dem Antikörper-Zellextrakt-Gemisch gegeben und wieder für 1h-ÜN, auf einem Rotor bei 4°C, inkubiert. Danach wurde die Sepharose/Agarose abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit einem Gemisch aus Puffer-J/PLP im Verhältnis 1:5 gewaschen (je nach erforderlicher Stringenz auch nur mit Puffer J oder mit unterschiedlichen Verhältnissen Konzentration an PLP/Puffer J). Es folgt ein weiterer Waschschrift mit 10mM Tris. Danach kann das Präzipitat für verschiedene Untersuchungen, wie z.B. *in vitro* Bindungsstudien oder einen *in vitro* Kinase-Test verwendet werden. Für den *in vitro* Kinasetest wird ein weiterer Waschschrift mit Kinasepuffer durchgeführt und das Pellet anschließend in 20-30 µl Kinasepuffer aufgenommen. Davon werden 10 µl für den Kinasetest eingesetzt. Um die Proben für die Analyse auf einem SDS-Gel vorzubereiten, wird das gleiche Volumen an 2x-Probenpuffer zugegeben und 3min bei 100°C gekocht. Hierbei werden die Proteine durch das im Probenpuffer enthaltene SDS und die Hitze denaturiert. Durch DTT werden Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen reduziert. Diesem Ansatz werden nach dem Kochen 1/3 des Probenvolumens an NEM zugeetzt und ca. 10-15 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe des NEM wird verhindert, dass die Proteine erneut oxidieren, da die Sulfhydrylgruppen alkyliert werden. Die Proben können dann zur Auftrennung der Proteine auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden, oder bei -20°C einige Zeit gelagert werden.

3.3.4 Kinase Assay

In einem *in vitro* Kinasetest wird die Kinaseaktivität der zu untersuchenden Kinase überprüft, indem der Kinase in einer Reaktion Testsubstrate und P³²-markiertes ATP angeboten werden. Nach Ablauf der Reaktion wird der Reaktionsansatz durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel anschließend getrocknet. Anhand einer Autoradiographie kann die Phosphorylierung der Testsubstrate durch die Kinase nachgewiesen werden.

Für den Kinasetest werden die Proteinextrakte verwendet, die die zu untersuchende Kinase enthalten, wie z.B. Zellextrakte von Säugerzellen, welche die Kinase exprimieren.

In dieser Arbeit wurden Zellextrakte von MCF-7 Zellen verwendet, die mit den entsprechenden Dlk-Mutanten im GFP-Vektor transfiziert wurden und aus denen die Dlk durch Immunpräzipitation isoliert wurde. Zu 10µl des Präzipitats (siehe 3.3.3) werden 10 bis 20µl Kinasepuffer sowie ein Substratgemisch zugegeben. Im Isotopenlabor werden 10µl Kinasepuffer und 2µCi γ -ATP³² auf Eis zum Reaktionsansatz gegeben und der Ansatz 30min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend, wie unter Abschnitt 3.3.4 beschrieben, für die SDS-PAGE vorbereitet.

3.3.4 SDS Page

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine denaturierende Gelelektrophorese, in der Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Denaturierung erfolgt durch SDS (Natriumlaurylsulfat), das sich an die Proteine anlagert und so deren Eigenladung überlagert. Entsprechend ihrer Größe bewegen sich die Proteine im Gel zur Anode. In einem bestimmten Größenbereich der Proteine ist die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Es handelt sich hier um eine diskontinuierliche SDS-PAGE, bei der die Proteine erst in einem Sammelgel mit pH-Wert 6,8 konzentriert werden. Die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgt dann durch ein engmaschiges Trenngel mit pH 8,8.

Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten gegossen, an denen unten und an den beiden Seiten mit Klammern Abstandshalter befestigt wurden. Die beiden Glasplatten werden von außen mit flüssiger Agarose abgedichtet.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Vernetzungsgrade von 8,5%, 10%, 13,5 % und 15% setzt sich die Trenngel-Lösung wie folgt zusammen:

Acrylamidanteil→	8,5%	10%	13,5%	15%
H ₂ O bidest	6,8 ml	5,7 ml	4,5 ml	3,4 ml
Trenngel Puffer	3,4 ml			
Acrylamid	3,4 ml	4,5 ml	5,7 ml	6,8 ml
APS	68 µl			
Temed	3,4 µl			
Sammelgel				
Acrylamid	0,5 ml			

Acrylamidanteil→	8,5%	10%	13,5%	15%
H ₂ O bidest	2 ml			
Sammelgel Puffer	0,82 ml			
APS	10 µl			
Temed	3,5 µl			

Durch Bisacrylamid werden die Acrylamidketten quervernetzt. Mit APS und TEMED wird, durch die Bindung der freien Radikale, die Polymerisation des Gels induziert. Daher wird APS und TEMED erst kurz vor dem Gießen des Gels zugegeben. Davor wird der gelöste Sauerstoff, der bei der Polymerisation stören würde, aus der Gellösung durch Entgasen mittels Unterdruck entfernt.

Die Polymerisation des Gels findet nur unter Sauerstoff-Ausschluß statt. Daher wird das Gel mit SDS-Lösung überschichtet und nach einer Stunde Polymerisation vorsichtig wieder abgesaugt.

Nach der Polymerisation des Trenngels wird der untere Abstandshalter vorsichtig entfernt, die Ecken mit Agarose abgedichtet und das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt.

Analog zum Trenngel wird das Sammelgel zusammengegeben und auf das Trenngel bis zum oberen Rand pipetiert. Unmittelbar nach dem Gießen wird der Gelkamm vorsichtig luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation werden die Geltaschen dreimal mit Elektrophoresepuffer ausgespült, um die APS- und Acrylamid-Reste zu entfernen. Anschließend können die vorbereiteten Proteinproben aufgetragen werden. Die Elektrophorese der Proteine durch das Sammelgel findet bei 17mA statt, im Trenngel bei 34mA. Kurz bevor das Bromphenolblau aus dem Gel austritt, wird die Elektrophorese beendet. Bei radioaktiven Kinasetest-Proben läuft das überschüssige ATP³² kurz über der Bromphenolbande und muss vom Gel abgetrennt und gesondert entsorgt werden.

Das Gel wird anschließend entweder gefärbt, oder im Falle eines Kinasetests für eine Autoradiographie benutzt. Hierzu wird das getrocknete Gel in einer Filmkassette auf einen Röntgenfilm gelegt (z.B. X-OMAT AR der Firma Kodak) und bei RT gelagert. Das Gel kann ebenfalls zwischen einem Film und einem sogenannten "screen" (Verstärkerfolie) zum Verstärken der Signale in die Kassette gelegt werden, die dann bei -70°C gelagert wird.

3.4 Durchflusszytometrie

Die Bezeichnung "Flow Cytometry" (Durchflusszytometrie) kommt daher, dass bei dieser Technik verschiedene Eigenschaften von Zellen oder anderen Teilchen untersucht werden,

während diese Zellen hintereinander durch eine dünne Messkammer, die sogenannte Flusszelle ("Flow Cell") fließen. Eine Zellsuspension wird in dem Messgerät durch eine Kapillare gesaugt und dabei derart beschleunigt, dass ein dünner Flüssigkeitsfaden entsteht. Hierdurch ist es möglich dass einzelne Zellen hintereinander an dem Detektor vorbeikommen, die dann mit einem Laserstrahl bestrahlt werden. Eine Eigenschaft einer Zelle, die in der Durchflusszytometrie gemessen wird, ist das Streulicht. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto größer ist das entstehende Streulicht. Somit erhält man durch Messung des Streulichts auf einfache Weise wichtige Informationen über die Zelle.

Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen. Je nachdem in welchem Winkel man das Streulicht misst, erhält man unterschiedliche Informationen. Gemessen wird das Streulicht meist an 2 Stellen:

1) Das Vorwärtsstreulicht, In Richtung des ursprünglichen Strahls, parallel zur Lichtquelle: ("*forward scatter*" FSC) hängt vor allem von der Größe/Volumen einer Zelle ab. Das heißt, kleine Zellen mit wenig Volumen, verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes.

2) Das Seitwärtsstreulicht, etwa im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl ("*sideward scatter*" SSC)

Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch sehr stark vom Inhalt einer Zelle ab. Finden sich in der Zelle sehr viele Vesikel, wie etwa Lysosomen und Proteine, dann hat sie ein großes Seitwärtsstreulicht, finden sich nur wenige, dann ist ihr Seitwärtsstreulicht gering. Das Seitwärtsstreulicht hat gewöhnlich eine niedrigere Frequenz als die Lichtquelle. Vesikel treten im Lichtmikroskop gewöhnlich als Granularität auf, so dass eine Zelle, je granulärer sie im Lichtmikroskop erscheint, ein desto höheres Seitwärtsstreulicht erzeugt. Im Allgemeinen spricht man davon dass das Seitwärtsstreulicht von der Granularität abhängt.

Um die Streulicht-Messergebnisse anschaulich darzustellen werden die Zellen in einer Graphik, einem sogenannten Dot-Plot, dargestellt. Dabei wird meist auf der x-Achse das Vorwärts- und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht aufgetragen.

Durch die Fähigkeit des Durchflusszytometers Fluoreszenz messen zu können ist es möglich eine Vielzahl von Merkmalen einzelner Zellpopulationen oder sogar einzelner Zellen zu un-

tersuchen. Durch die Markierung von Oberflächenmolekülen, oder diverser intrazellulärer Strukturen und Proteinen mit Fluoreszenz markierten Antikörpern bzw. Fluoreszenzfarbstoffen können diverse Merkmale der Zellen untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA verschiedener Zelllinien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid markiert. Dadurch kann der DNA Gehalt der Zellen quantitativ erfasst werden. Die Software des Durchflusszytometers, beziehungsweise die Auswertungssoftware FloJo (Treestar. Inc.) erlaubt es DNA Histogramme zu erstellen, die es erlauben den DNA Gehalt der einzelnen Zellen mit der GFP Fluoreszenz zu vergleichen.

Eine der wichtigsten Auswertetechniken der Durchflusszytometrie stellt das sogenannte "Gaten" ("Schleusen") dar. Ziel des "Gaten" ist, im Dot Plot nur die Zellen darzustellen die das untersuchende Merkmal haben. In der Praxis erlaubt einem das Bedienungsprogramm des Durchflusszytomters (und die Auswertungssoftware) einen Bereich im Streulichtdiagramm zu markieren, der die gewünschte Zellpopulation enthält und nur diese in einem neuen Streulichtdiagramm darzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurde das "Gaten" eingesetzt um lediglich die GFP positiven Zellen in die Untersuchung mit einzubeziehen und um zwischen der "high expression" (hi) und "lo-expression" (lo) (siehe unten) Population zu unterscheiden.

Aufgrund der Möglichkeit, zwischen Zellen mit unterschiedlicher Fluoreszenzstärke zu unterscheiden, ist es ebenfalls möglich sogenannte " Fluorescence activated cell sorting" Experimente (FACS : "Zellsortierungsexperimente") zu unternehmen. In der vorliegenden Arbeit ermöglichte die Durchflusszytometrie eine Zellpopulation die verschieden starke GFP Signale hatte voneinander zu trennen. Der sogenannte "cell sorter" ermöglicht es, neben dem Erfassen des Fluoreszenzsignals, die Zellen in verschiedene Röhrchen, die mit Zellkulturmedium gefüllt sind, auszugeben.

Zur Erstellung von DNA Histogrammen:

Die Zellen werden von den Zellkulturschalen abtrypsiniert und 3 mal mit PBS+ mit 0,5% BSA gewaschen und anschließend mit 1,5 % PFA 10-15 % auf Eis fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift wird das Zellpellet in ca. 1ml PBS+ 0,5% BSA und 50µg/ml Propidiumiodid resuspendiert und 15 Minuten lang bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach diesem Inkubations-schritt können die Zellen in ein Messröhrchen überführt und anschließend vermessen werden. Die Messergebnisse wurden anschließend mit der Auswertungssoftware FloJo von Treestar inc. ausgewertet. Diese Software ermöglicht es, sowohl DNA Histogramme wie

auch die Zellzyklusverteilung der einzelnen Zellpopulation, mit dem sogenannten "Dean-Jett-Fox" Algorithmus zu erstellen

Für die Zellsortierungsexperimente:

Für die Zellsortierungsexperimente wurden die Zellen trypsinisiert und 3 mal mit PBS⁺ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem Volumen von 500µl- 1ml resuspendiert und mit Hilfe des Cell sorters (FACS Diva) getrennt. Die getrennten Zellen werden in verschiedene Röhrchen, in denen bereits Medium vorgegeben ist, ausgegeben. Von dort können sie wieder in Zellkulturschalen überführt und weiterkultiviert werden.

4. Ergebnisse

4.1 Interaktion mit mitotischen Strukturen

4.1.1 Überexpression der ZIP-Kinase bewirkt eine Störung der Cytokinese.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es wenige Befunde, die auf eine Funktion der ZIP-Kinase während der Mitose hinwiesen. Preuss et al. beschrieben eine Kolokalisation der ZIP Kinase mit dem Centrosom, dem Centromer und dem kontraktilen Ring (Preuss et al. 2003 b), sowie eine neuartige, mitosepezifische Phosphorylierung des Histons H3 an Threonin11 (Preuss et al. 2003a). Diese Untersuchungen zeigten zwar eine Kolokalisation der ZIP Kinase mit mitotischen Strukturen (vgl.1.4.5),ließen jedoch keine Schlussfolgerungen bezüglich des Interaktionsbereiches der ZIP Kinase oder ihrer Funktion an den jeweiligen Strukturen zu.

Zunächst wurde der Versuch unternommen die einzelnen Interaktionsbereiche der ZIP-Kinase mit dem Centrosom, dem Centromer und dem kontraktilen Ring zu ermitteln. Das Ziel war, interferierende Peptide herzustellen, mit Hilfe derer sich die Funktion bzw. Lokalisation der ZIP-Kinase an genannten mitotischen Strukturen selektiv ausschalten lässt.

Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche, bereits vorhandene und beschriebene ZIP-Kinase Deletionskonstrukte (Kögel et al. 1999) transient in MCF7 Zellen transfiziert um sie bezüglich ihrer Lokalisation und Interaktion mikroskopisch zu untersuchen.

Zum Einsatz kamen, neben dem Fusionsprotein aus GFP und dem kodierenden Bereich der ZIP-Kinase (ZIP-wt), GFP Konstrukte die für Fusionsproteine aus GFP und verschiedenen ZIP Deletionsmutanten kodierten (Abb.4.1). Bei dem Konstrukt $\Delta C1$ war der C-terminale Leuzinzipper deletiert (Abb.4.1), bei $\Delta C2NLS$ die C-terminalen Aminosäuren von 337-448 inklusive Leuzinzipper und NLS 4 deletiert, die durch eine Kernlokalisationssequenz des large" T - Antigens des SV40 Virus ersetzt wurde (Abb.4.1), da ein Fehlen der NLS mit einer Retention des Proteins im Cytoplasma und Apoptose einhergeht. Bei dem Konstrukt $\Delta C3NLS$ wurde der gesamte C-terminale Bereich (AS 276-448) deletiert und es wurde ebenfalls eine "large" -T NLS angefügt (Abb 4.1). Bei $\Delta N1$ war die gesamte N-terminale Kinasedomäne (As1-276) deletiert (Abb.4.1). Bei dem Konstrukt K42A handelt es sich um eine Kinase-inaktive Mutante, bei der in der ATP-Bindungsstelle an Position 42 ein Lysin gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (Abb.4.1) Dieses Konstrukt kam zum Einsatz um Rückschlüsse über die Kinaseaktivität ziehen zu können.

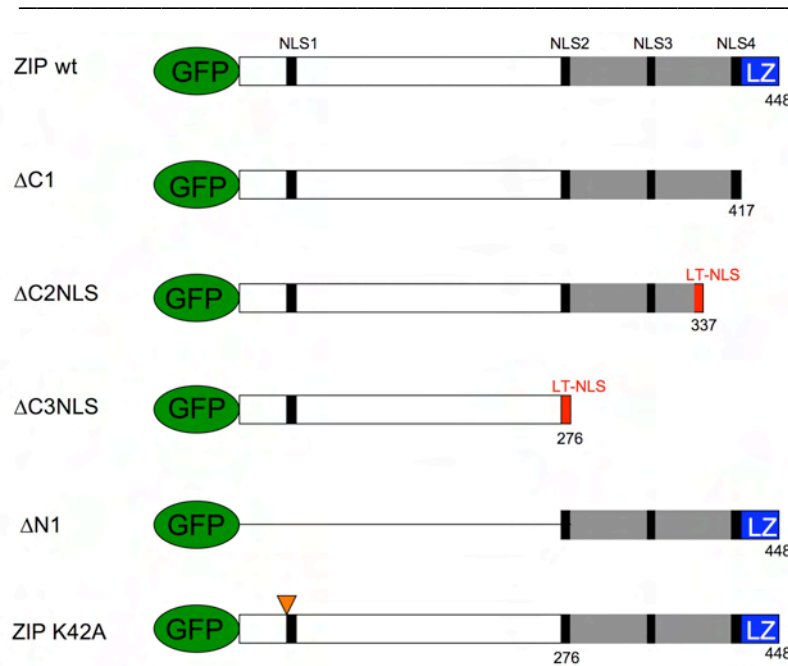


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Die einzelnen Konstrukte zeigten das bekannte Verteilungsmuster der ZIP Kinase, welche mehrheitlich im Zellkern zu finden war und bei der Wildtyp ZIP Kinase mit sogenannten "speckles" assoziierte. Die übrigen Konstrukte zeigten keine Assoziation mit "speckles", was auf das Fehlen der Kinasedomäne und/oder des Leuzinzippers zurückzuführen ist (Kögel *et al.*, 1999). Abbildung 4.2 zeigt einige repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der intrazellulären Verteilung der einzelnen ZIP Kinase Konstrukte:

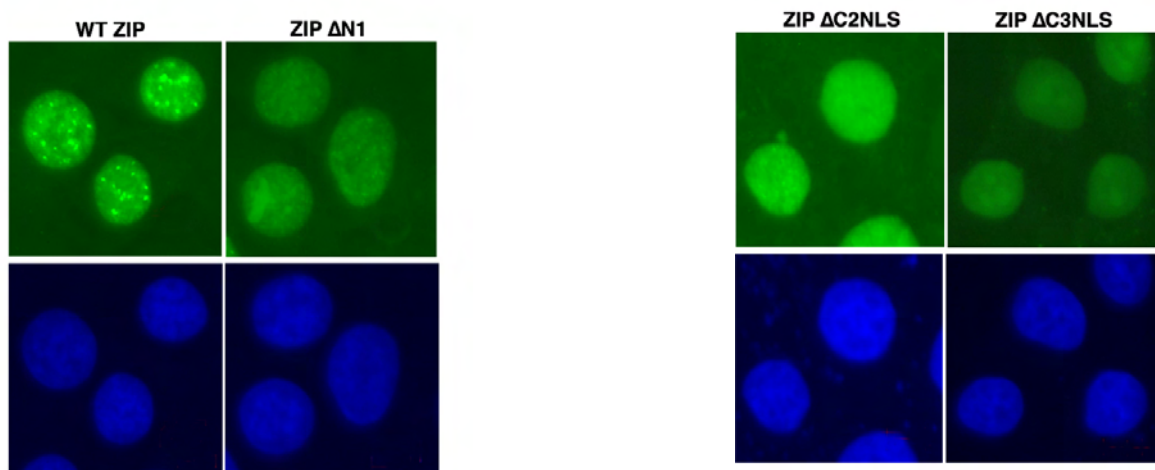


Abbildung 4.2 Verteilungsmuster der einzelnen ZIP-Kinase Konstrukte nach transienter Expression. Die Zellen wurden transient in MCF7 Zellen transfiziert und nach 24 Stunden fixiert und mikroskopisch untersucht. Die Aufnahmen in der oberen Reihe zeigen die GFP-Fusionskonstrukte, in der unter Reihe sind die DAPI Färbungen der Zellkerne zu sehen (Messbalken: 10µm)

Die transiente Expression der beiden Konstrukte $\Delta N1$ und $\Delta C2NLS$ brachte nach 48 Stunden mehrkernige Zellen hervor (10 %, bzw. 15%), was auf eine Interferenz der Konstrukte mit der Cytokinese hindeutete. Durch die Expression von $\Delta C2NLS$ traten zudem übergrosse, einkernige Zellen mit einer Häufigkeit von 15%, nach 48h Expression auf. Aufgrund ihres mikroskopischen Erscheinungsbildes kam die Vermutung auf, dass es sich hierbei um polyploide Zellen handeln könnte.

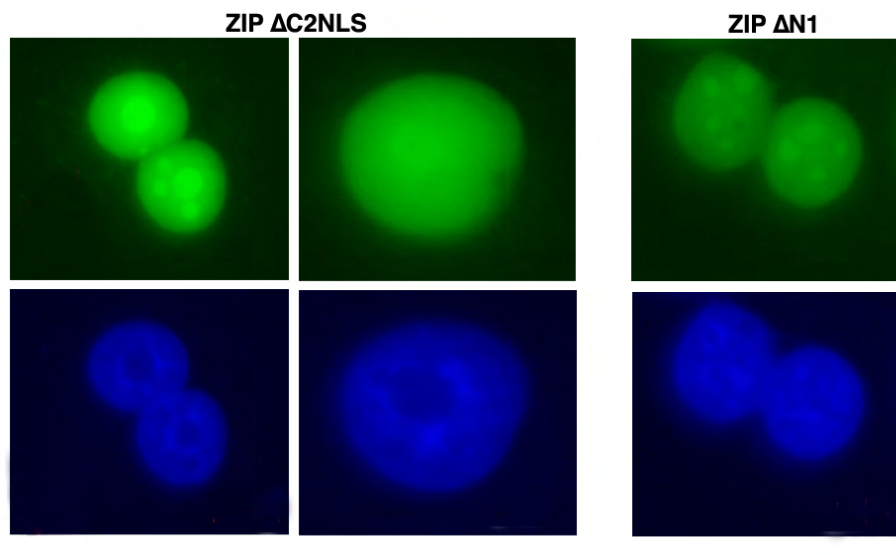


Abbildung 4.3: Die transiente Überexpression der Konstrukte $\Delta C2NLS$ und $\Delta N1$ bringt mehrkernige Zellen hervor. 48h nach Transfektion wurden bei $\Delta C2NLS$ 15%, bei $\Delta N1$ 10% mehrkernige Zellen, die hauptsächlich binukleär waren, beobachtet. Zusätzlich entstanden nach Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ mit einer Häufigkeit von ungefähr 15%, vermehrt übergrosse, einkernige Zellen. Die obere Reihe zeigt die GFP ZIP Fusionsproteine, die untere Reihe die DAPI Färbungen der Zellkerne (Messbalken: 10 μ m).

Obwohl das Auftreten mehrkerniger Zellen nach transienter Überexpression der Mutanten $\Delta C2NLS$ und $\Delta N1$ weitere Befunde für eine Beteiligung der ZIP Kinase an der Mitose, insbesondere der Cytokinese lieferten, ermöglichten die transienten Untersuchungen es nicht die Interaktionen der einzelnen Konstrukte mit mitotischen Strukturen zu beobachten. Es war kaum möglich Zellen zu beobachten, die sich sowohl in der Mitose befanden, als auch eine ausreichende Expression an GFP-ZIP Konstrukten zeigten.

Daher wurde im Folgenden der Versuch unternommen Zellen stabil mit den einzelnen GFP Konstrukten zu transfizieren, um eine konstitutive Expression zu erhalten.

4.1.2 Etablierung stabiler MCF 7 Zelllinien, die GFP-Konstrukte konstitutiv exprimieren.

Zunächst wurden MCF-7 Zellen mit unterschiedlichen GFP-ZIP-Konstrukten transfiziert. Nach zwei Tagen wurde dem Medium 1,2 µg/ml Genitecin (G418) zugesetzt um solche zu selektieren, die die Konstrukte stabil in ihr Genom integriert hatten (vgl 3.2.3). Nach Erreichen der erforderlichen Größe wurden die einzelnen Klone „geerntet“ und in sogenannte „24-Well“ Zellkulturschalen überführt, um sie weiter kultivieren und analysieren zu können.

Die ersten Versuche, Zelllinien zu etablieren, welche die verschiedenen GFP ZIP Kinase Konstrukte konstitutiv exprimieren, schlugen fehl, da die Mehrheit der Zellen die nach Selektion mit G418 eine hohe Expression der Konstrukte aufzeigten, nicht überlebten. Die verbliebenen Zellen wuchsen zwar einige Tage weiter, jedoch gingen auch diese dann verloren.

Es war aber sehr wohl gelungen, eine MCF-7 Zelllinie zu selektieren, welche GFP-wt ZIP auf relativ niedrigem Niveau stabil exprimierte (Preuss et al. 2003a). Daher war die Annahme, dass gegen stark exprimierende Klone eine Gegenselektion stattfindet, es aber möglich sein müsse aus einer großen Anzahl primärer Klone solche zu selektieren, welche die ZIP-Mutanten auf tolerierbarem Niveau exprimieren.

Nach der Analyse aller zunächst in Frage kommenden GFP-positiven Kolonien (mehr als 60) erhielten wir zwei lebensfähige Klone welche das Konstrukt ZIP- Δ N1 und ZIP Δ C2NLS (vgl.Abb.4.1) konstitutiv exprimieren. Die daraus entstandenen Zelllinien werden als MCF-7 ZIP- Δ N1 und MCF-7 ZIP- Δ C2NLS bezeichnet. (Der Einfachheit halber, werden sie im Folgenden als Δ N1 und Δ C2NLS bezeichnet).

Die neu hergestellten Zelllinien wurden mit Hilfe von Western Blot-Analysen auf ihr Expressionsniveau untersucht. Die GFP-Konstrukte wurden mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert. Als negativ-Kontrolle wurden untransfizierte MCF-7 Zellen eingesetzt. Zusätzlich wurden die eingebrachten Konstrukte hinsichtlich ihrer Kinaseaktivität untersucht. Hierzu wurden Zellextrakte hergestellt und die exprimierten Fusionsproteine wurden mit einem Anti- GFP Antikörper immunpräzipitiert und anschließend einem *in-vitro* Kinasetest unterzogen (vgl 3.3.4).

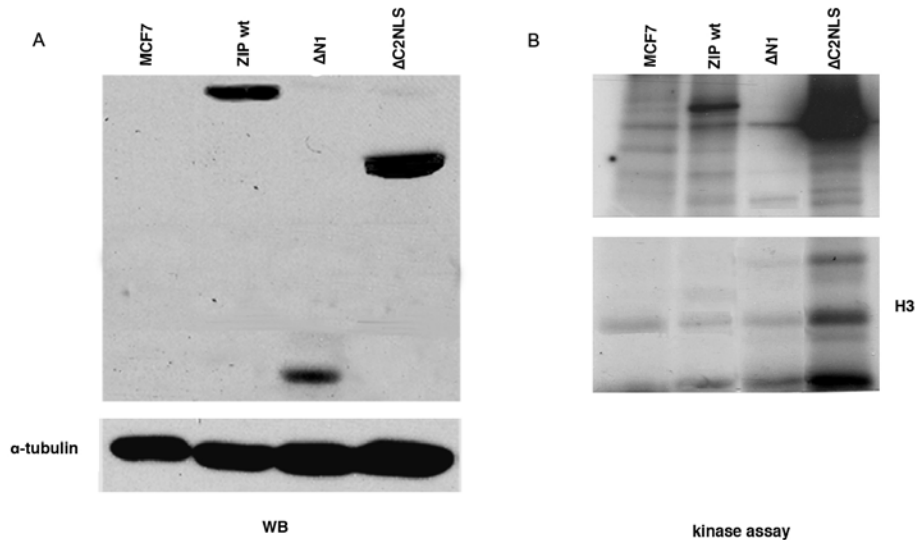


Abbildung 4.4: (A): Western Blot, Es wurden Extrakte von den stabilen Zelllinien hergestellt und nach SDS- Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die GFP Fusionsproteine wurden anschließend mit Hilfe eines Anti-GFP Antikörpers detektiert. Zum Abgleich wurde α -Tubulin mit einem entsprechenden Antikörper gefärbt. (B) Kinase Assay, nach Herstellung von Zellextrakten wurden die GFP Fusionsproteine mit einem Anti-GFP Antikörper präzipitiert und es wurde Histon H3 als Substrat zugesetzt und ein *in-vitro* Kinase Test durchgeführt.

Die Western Blot Analysen zeigten dass die Mutanten entsprechend ihrer erwarteten Grössen im Gel wanderten. Die Mutante Δ C2NLS wurde jedoch im Vergleich zum Wildtyp und der Mutante Δ N1 verstärkt exprimiert (vgl Abb 4.4. A). Weiterhin zeigte der *in vitro* Kinasetest, dass das Konstrukt Δ C2NLS eine stärkere Autophosphorylierung zeigt (vgl Abb.4.4. B). Die Substratphosphorylierung blieb davon jedoch unbeeinflusst, alle der Kinase angebotenen Substrate wurden in gleichem Maße phosphoryliert (Abb. 4.4 B). Die Banden, die den Substraten entsprechen sind bei dem Konstrukt Δ C2NLS zwar insgesamt etwas stärker, jedoch ist dies auf die erhöhte Expression der Kinase, bzw auf eine höhere Proteinmenge zurückzuführen und nicht auf eine bevorzugte Phosphorylierung eines der Substrate. Die Mutante Δ N1, wurde vergleichbar mit der Wildtyp Kinase exprimiert, zeigte jedoch eine wesentlich schwächere Histon H3 Phosphorylierung, als die Wildtyp Kinase oder die Mutante Δ C2NLS, was auf das Fehlen der Kinasedomäne zurückzuführen ist.

4.1.3. Die C-terminale Region der ZIP-Kinase interagiert mit dem Centrosom

Um weiterhin die Interaktionsdomäne(n) der ZIP Kinase mit den mitotischen Strukturen zu bestimmen, wurden die neu hergestellten Zelllinien bezüglich der Lokalisation der eingebrachten Konstrukte untersucht. Hierzu wurden die Zellen wie unter 3.2.4 beschrieben, fixiert und eine γ -Tubulin Färbung durchgeführt. Bei γ -Tubulin handelt es sich um eines der Hauptbestandteile des Centrosoms (zur Übersicht siehe Lüders and Stearns 2007) weshalb diese Färbung sich besonders gut eignet um das Centrosom darzustellen.

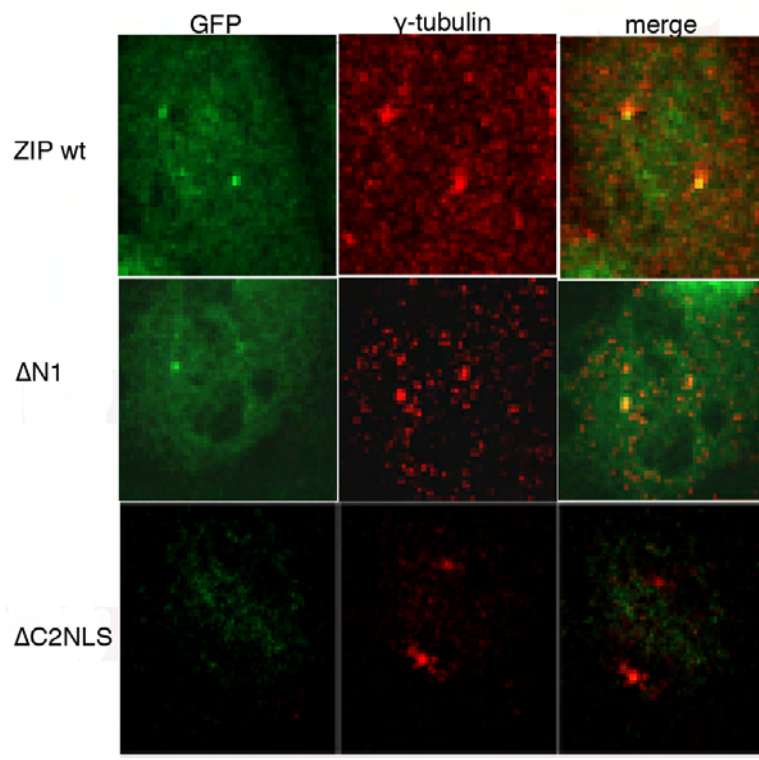


Abbildung 4.5: Die C-Terminale Region der ZIP Kinase assoziiert mit dem Centrosom. Die Zellen wurden fixiert und das Centrosom wurde mit Hilfe eines γ -Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht. Gezeigt sind Zellen in der Metaphase der Mitose (wt ZIP, ZIP Δ N1) und in der frühen Anaphase der Mitose (Δ C2NLS) (Messbalken 5 μ m).

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten für die Wildtyp ZIP-Kinase und für die N-terminal deletierte Mutante Δ N1 eine klare Kolokalisation mit dem Centrosom, welches durch eine γ -Tubulin Färbung sichtbar gemacht wurde. Bei dem Konstrukt Δ C2NLS konnte jedoch keine Kolokalisation beobachtet werden.

Diesen Beobachtungen zur Folge, befindet sich die Interaktionsdomäne der ZIP Kinase mit den Centrosomen in dem C-terminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 337-448,

welcher der Mutante $\Delta C2NLS$ fehlt, jedoch bei $\Delta N1$ vorhanden ist. Weiterhin kann aus diesen Beobachtungen gefolgert werden, dass diese Interaktion keine Kinaseaktivität benötigt da $\Delta N1$ kinaseinaktiv ist.

4.1.4 Die Mutante $\Delta N1$ interagiert nicht mit dem Centromer

Um zu überprüfen ob eine der Mutanten mit dem Centromer interagiert, wurden weitere mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Der Centromerkomplex besteht aus mehreren Proteinen, die mittels CREST Autoimmunserum sichtbar gemacht werden können. Das CREST Serum enthält eine Reihe von Antikörpern die gegen konstitutive Proteine des Centromers gerichtet sind.

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass neben der Wildtyp Kinase lediglich $\Delta C2NLS$ mit den Centromeren assoziierte. Bei dem Konstrukt $\Delta N1$ konnte keine Kolo-kalisation beobachtet werden, es wurden allenfalls vereinzelt leichte Überlappungen des GFP und des CREST Signals beobachtet, jedoch war dies nicht vergleichbar mit den beiden übrigen Mutanten. Das Konstrukt $\Delta N1$ assoziiert demzufolge nicht mit den Centromer. Die Interaktionsdomäne der ZIP Kinase mit dem Centromer könnte demzufolge entweder die Kinasedomäne sein, welche bei der Mutante $\Delta N1$ fehlt, oder die Domäne könnte in dem gemeinsamen Bereich von $\Delta N1$ und $\Delta C2NLS$, also zwischen den Aminosäuren 275 und 337 liegen, jedoch benötigen.

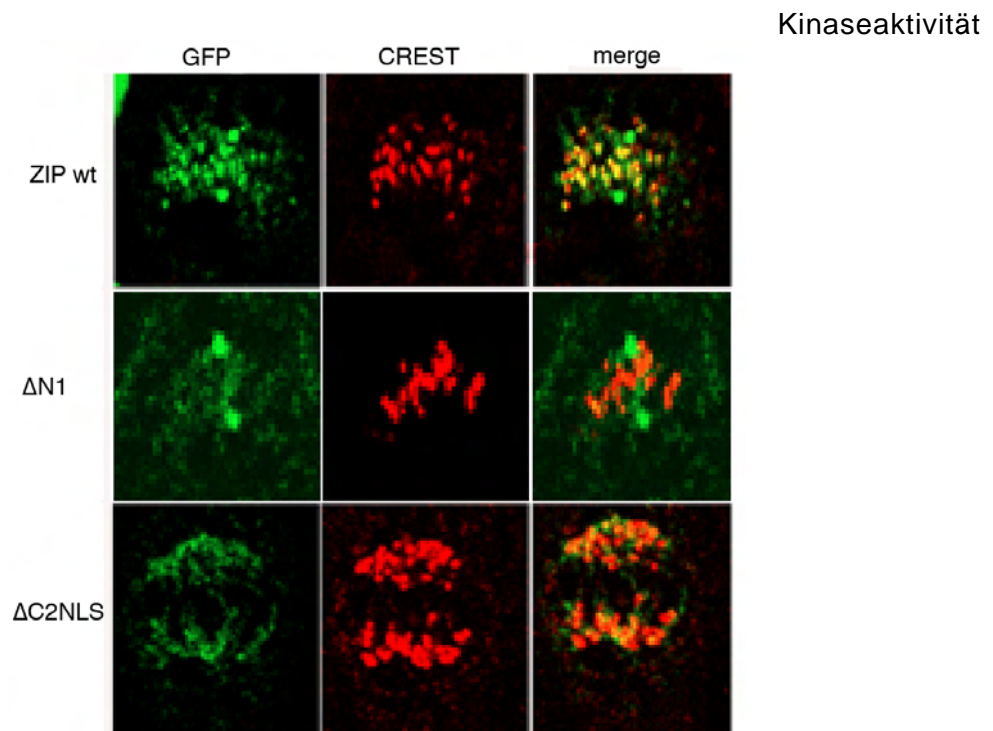


Abbildung 4.6: Die Wildtyp Kinase und das Konstrukt $\Delta C2NLS$ assoziieren mit dem Centromer. Die Zellen wurden fixiert, die Centromerregion wurde anschließend mit CREST Autoimmenserum sichtbar gemacht und die Zellen wurden mikroskopisch untersucht. Gezeigt sind eine Zelle in der Metaphase der Mitose (wt ZIP und $\Delta N1$), sowie eine Zelle in der frühen Anaphase ($\Delta C2NLS$). (Messbalken 5 μm)

4.1.5 Die ZIP Kinase interagiert über die C-terminale Region mit dem kontraktilem Ring

Die Cytokinese wird hauptsächlich über den Phosphorylierungszustand der regulatorischen Untereinheit von Myosin II (MLC) gesteuert (vgl. 1.4.5). Während Pro- und Anaphase ist die MLC an Ser1 phosphoryliert. Während der Cytokinese wird die MLC am Serin 19 phosphoryliert. Im Folgenden wurde die Kolokalisation der ZIP Kinasekonstrukte mit Ser19 phosphorylierter MLC untersucht, hierzu wurden die Zellen fixiert und die MLC wurde, wie unter 3.2.4 beschrieben, mit Hilfe eines Antikörpers der spezifisch gegen Ser19 phosphorylierte MLC gerichtet ist sichtbar gemacht:

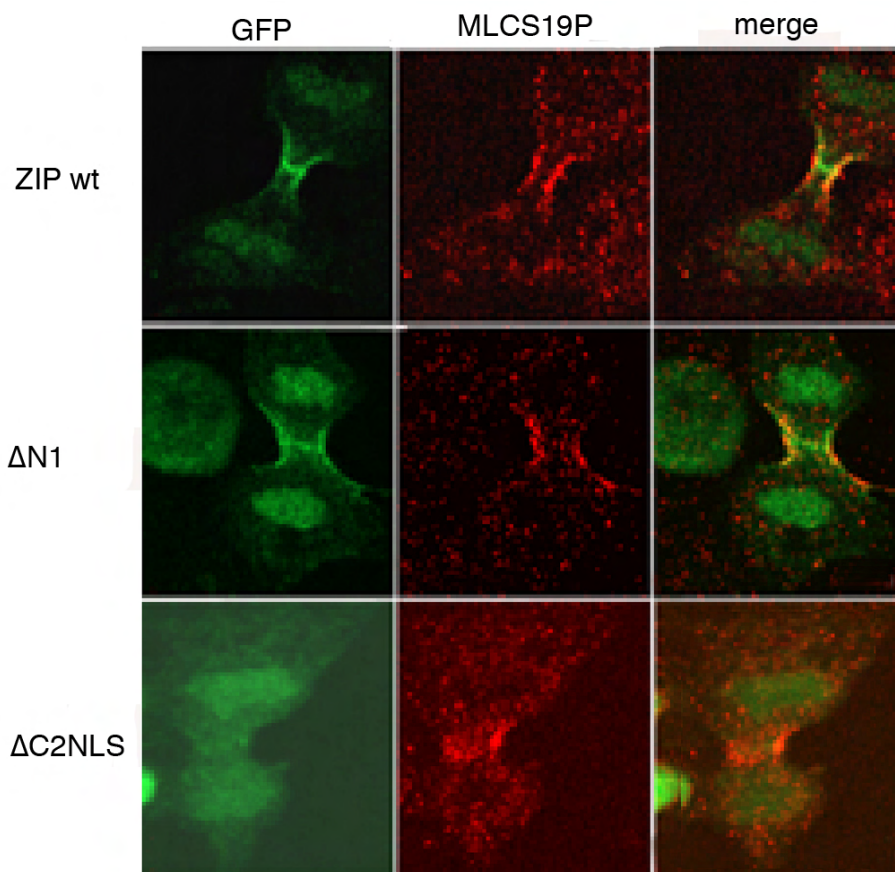


Abbildung 4.6: Die ZIP Kinase assoziiert über die C-terminale Region mit dem kontraktilem Ring. Die Zellen wurden fixiert und anschliessend wurde der kontraktile Ring mit Hilfe eines Antikörpers gegen Ser 19 phosphorylierte MLC sichtbar gemacht. Gezeigt sind Zellen in der Telophase (Messbalken 10 μm)

Analog zu der Koloalisation mit dem Centrosom ergaben die mikroskopischen Untersuchungen, dass neben der Wildtyp Kinase, lediglich die Mutante $\Delta N1$ mit dem kontraktilen Ring interagiert. Bei der Mutante $\Delta C2NLS$ konnte nur ein diffuses GFP Signal im Bereich der Teilungsfurche beobachtet werden. Demzufolge kann der C-terminale Bereich, analog zu den Centrosomen, als Interaktionsdomäne der ZIP Kinase mit dem kontraktilen Ring angesehen werden, da dieser Bereich bei dem Konstrukt $\Delta C2NLS$, welches nicht koloalisiert, fehlt.

Aus den obigen Untersuchungen konnte abgeleitet werden, dass die Interaktion der ZIP Kinase mit dem Centrosom und dem kontraktilen Ring über den C-terminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 337 bis 448 vermittelt wird. Bezüglich der Interaktion mit dem Centromer gestaltete sich die Interpretation etwas schwieriger.

Die Mutante $\Delta C2NLS$ interagiert mit dem Centromer, jedoch nicht die Mutante $\Delta N1$. Allerdings ließen diese Befunde keine eindeutige Schlussfolgerung zu. Bei dem zu ermittelnden Interaktionsbereich kann es sich sowohl um die Kinasedomäne handeln, die bei $\Delta N1$ fehlt, oder aber der Interaktionsbereich befindet sich in dem gemeinsamen Bereich von $\Delta N1$ und $\Delta C2NLS$ (AS 276-337), jedoch ist für eine Interaktion die Kinasedomäne bzw. Kinaseaktivität notwendig.

4.1.6. Die Expression des Bereiches 337-448 interferiert mit der ZIP Kinase

Mit dem Ziel die Interaktionsdomäne der ZIP Kinase mit dem Centrosom und dem kontraktilen Ring weiter eingrenzen zu können und eventuell interferierende Peptide herzustellen, die mit der ZIP Kinase am Centrosom und dem kontraktilen Ring interferieren, wurden weitere Deletionsmutanten wie unter Material und Methoden beschrieben, hergestellt. Diese Mutanten wurden in einen Tetrazyklin abhängigen Vektor kloniert um die Expression der Konstrukte gezielt steuern zu können. Da weitere Informationen über die Notwendigkeit des C-terminalen Leuzinzipers benötigt wurden, wurden Mutanten hergestellt, die den Bereich von 337 bis 448, bzw. von 337 bis 417 ohne Leuzinzipper umfassen (Abb. 4.7).

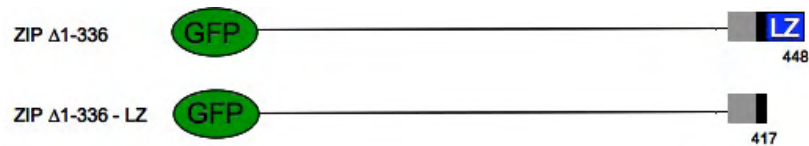


Abbildung 4.7. Schematische Darstellung von ZIP Kinase Deletionsmutanten. Die Mutante ZIP Δ 1-336 umfasst den Bereich der bei der Mutante Δ C2NLS fehlt (AS 337-448). Die Mutante ZIP Δ 1-336-LZ umfasst denselben Bereich allerdings ohne den C-terminalen Leuzinzipper.

Die neu hergestellten Mutanten wurden wiederum transient in MCF 7 Zellen exprimiert. Nach anschließender Induktion mit 1 μ g/ ml Doxyzyklin wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

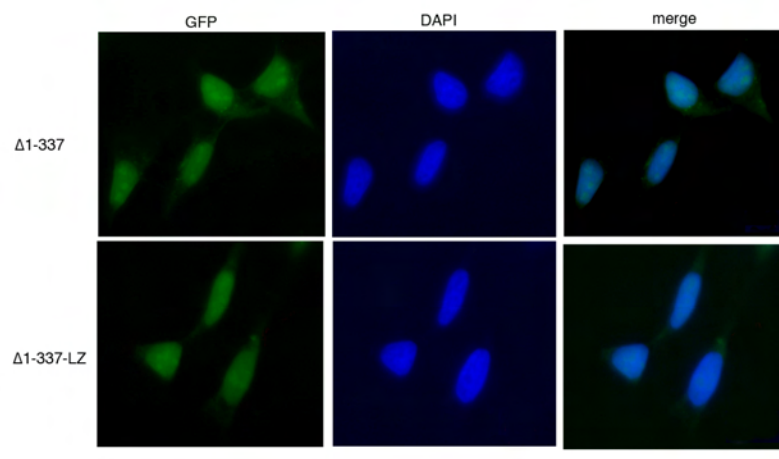


Abbildung 4.8 Die Konstrukte Δ 1-337 und Δ 1-337-LZ lösen nach Induktion mit Doxyzyklin Apoptose aus. Die Zellen wurden transient in MCF7 Zellen transfiziert und nach 24h induziert. (Messbalken 10 μ m)

24 Stunden nach der Induktion mit Doxyzyklin löste sich die Mehrzahl der GFP exprimierenden Zellen (ca 80%) vom Boden der Zellkulturschale. Das konnte als deutliches Zeichen der Apoptose gedeutet werden, die verbleibenden Zellen zeigten ebenfalls das morphologische Erscheinungsbild der Apoptose, da die Zellkerne dieser Zellen sehr stark deformiert oder verkleinert waren.

Es kann angenommen werden, dass diese Mutanten mit der Funktion der ZIP Kinase interferieren und sich wie dominant negative Mutanten verhalten, da es nach einem "knockdown" der ZIP Kinase durch siRNA ebenfalls zu Apoptose bei einer ähnlichen Anzahl von Zellen kam (Cathrin Keller Diplomarbeit).

4.2 Die Expression von $\Delta C2NLS$ ruft eine Reihe von Defekten hervor

Die Erkenntnis aus den obigen Untersuchungen ermöglichte es nicht Peptide abzuleiten, die mit einer spezifischen Funktion der ZIP Kinase interferieren und diese selektiv ausschalten. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die ZIP Kinase eine essentielle Rolle hat, jedoch nicht was ihre genaue Funktion an den einzelnen Strukturen ist. Dennoch brachte die Expression des Konstruktes $\Delta C2NLS$ eine Reihe von Defekten hervor, die ihrerseits Hinweise auf die Funktion der ZIP Kinase während der Mitose lieferten.

4.2.1 Die Expression des Konstruktes $\Delta C2NLS$ hat keinen Einfluss auf die Expression der endogenen ZIP Kinase

Um Informationen über das Verhältnis der endogenen ZIP-Kinase und dem Transgen $\Delta C2NLS$ zu erhalten, wurde diese Zelllinie mittels Western Blot auf das Expressionsniveau der endogenen ZIP-Kinase untersucht.

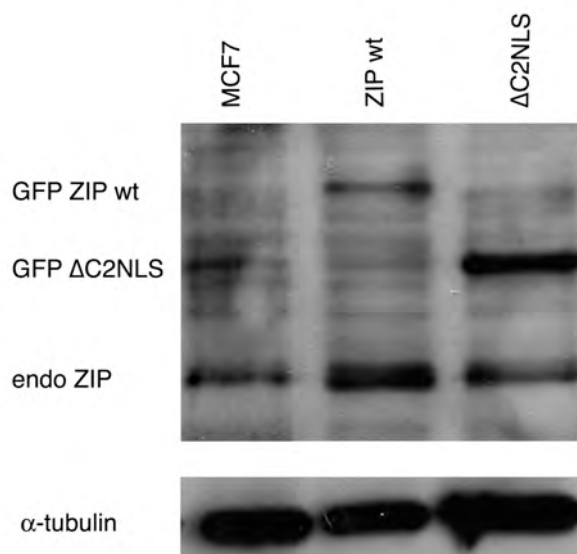


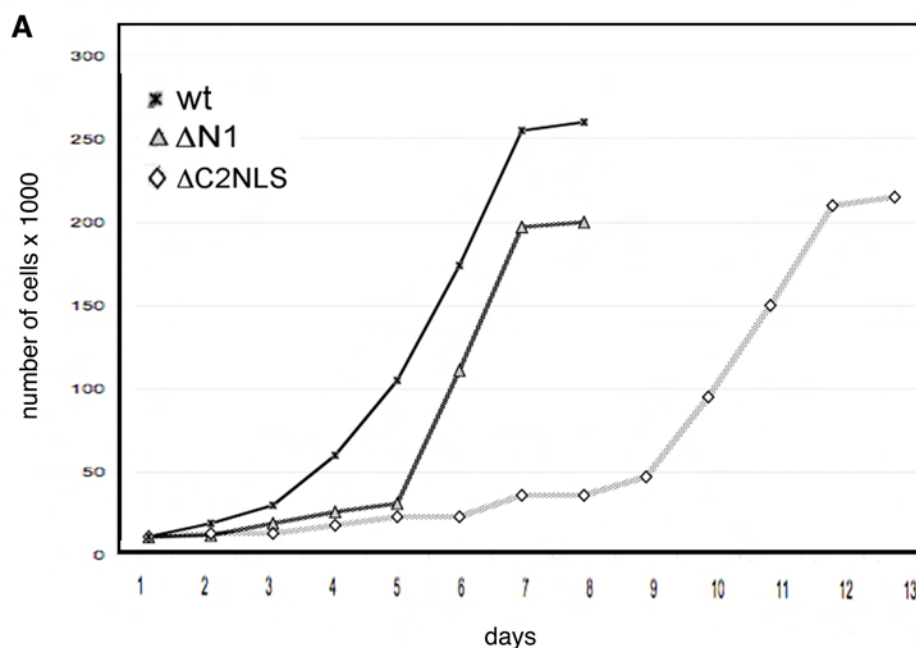
Abbildung 4.22. Western Blot. Verhältnis der endogenen ZIP Kinase zu dem eingebrachten Transgen. Es wurden Extrakte von den einzelnen Zelllinien hergestellt und nach SDS Gelelektrophorese wurde ein Western Blot durchgeführt. Die GFP Fusionsproteine wurden mit einem Anti-GFP Antikörper detektiert, die endogene ZIP Kinase wurde mit einem Anti ZIP Antikörper detektiert. Als Abgleich wurde α -Tubulin mit entsprechendem Antikörper dargestellt.

Im Vergleich zu der Gesamtproteinmenge findet sich in der Wildtyp Zelllinie die höchste Expression an endogener ZIP Kinase. Die entsprechende Bande zeigt in dem Wildtyp Extrakt eine 2-3 mal stärkere Intensität als bei den beiden übrigen Zelllinien. Die Intensität der

endogenen ZIP Kinase Bande ist bei dem Extrakt aus $\Delta C2NLS$ vergleichbar mit der entsprechenden Bande aus den Kontroll MCF7 Zellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Expression der endogenen Kinase im Extrakt von $\Delta C2NLS$ vergleichbar mit der Expression der endogenen ZIP Kinase in den MCF7 Kontrollzellen ist. Demzufolge hat die Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ keinen Einfluss auf die Expression der endogenen Kinase. Die Wildtyp Kinase scheint jedoch einen positiven Effekt auf die Expression der endogenen ZIP Kinase zu haben.

4.2.2 Die Zelllinie MCF7 $\Delta C2NLS$ hat veränderte Wachstumseigenschaften

Nachdem die Zelllinien MCF 7 $\Delta N1$ und $\Delta C2NLS$ etabliert worden waren, wurden Wachstumskurven erstellt, um zu untersuchen ob sich diese Zelllinien untereinander in ihrem Wachstum unterscheiden. Hierzu wurde eine definierte Anzahl von Zellen ausplattiert, täglich trypsinisiert und unter in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt, anschließend wurden Wachstumskurven erstellt.:



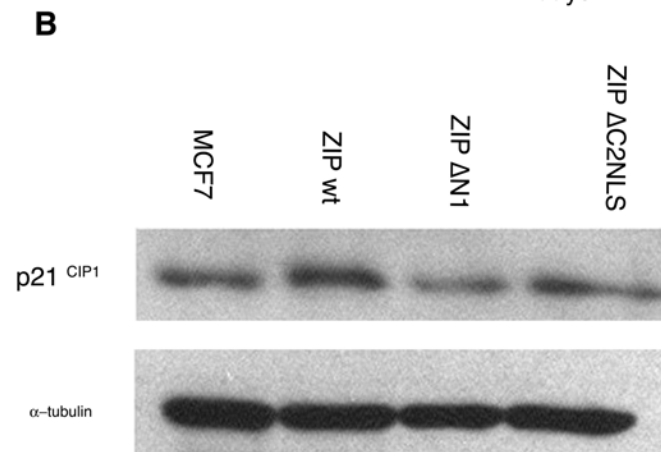


Abbildung 4.9: (A) Wachstumskinetik der Zelllinien, MCF7 wt ZIP, MCF7ΔN1 und MCF7 ΔC2NLS. Die gleiche Anzahl von Zellen wurde ausplattiert, die Zellen wurden täglich trypsiniert und in einer Neubauerkammer ausgezählt. **(B) Western Blot der verschiedenen Zelllinien:** Es wurden Extrakte von den einzelnen Zelllinien hergestellt und das Expressionsniveau von p21^{waf1} mit Hilfe eines p21 Antikörpers detektiert.

Die beiden Zelllinien wt ZIP und ZIP ΔN1 unterschieden sich kaum in ihren Wachstumseigenschaften. Beide Linien zeigten ein normales Wachstum und traten nach etwa 4 Tagen in die exponentielle Wachstumsphase. Die Generationszeit der beiden Zelllinien betrug 24 Stunden. Die Zelllinie ΔC2NLS hingegen, benötigte einen Zeitraum von 8-9 Tagen bevor es zum exponentiellen Wachstum kam. Die Zelllinie verdoppelt sich dann allerdings mit einer ähnlichen Generationszeit (24,5h) wie die beiden übrigen Zelllinien.

Burch et al. (Burch *et al.*, 2001) konnten zeigen, dass der generelle CDK Inhibitor p21^{waf1} (vgl. 1.4.1) ein *in vitro* Substrat der ZIP Kinase ist und eine Phosphorylierung von p21^{waf1} durch die ZIP Kinase am Threonin 145 Rest mit einer Stabilisierung von p21 einhergeht. Eine derartige Stabilisierung von p21^{waf1} könnte ein Grund für die veränderten Wachstumseigenschaften sein.

Mit Hilfe eines p21 spezifischen Antikörpers wurde ein Westernblot durchgeführt um das Expressionsniveau von p21 zu untersuchen. Das Expressionsniveau von p21 unterschied sich geringfügig in den einzelnen Zelllinien. Die Kontroll-Zellen und die wt ZIP Linie zeigten das höchste Expressionsniveau. Bei den beiden Zelllinien ΔN1 und ΔC2NLS wurde etwas weniger p21 exprimiert so dass davon ausgegangen werden kann dass die veränderten Wachstumseigenschaften der Zelllinie ΔC2NLS nicht auf ein erhöhtes Maß an p21 CIP1 zurückzuführen sind.

4.2.3. Die Expression von $\Delta C2NLS$ bringt anormale Zellkerne und mehrkernige Zellen hervor

Neben der höheren Dichte, welche die Zelllinie $\Delta C2NLS$ benötigte, zeigte sie eine heterogene Expression des eingebrachten Transgens. Etwa 70% der Zellen exprimierten das Konstrukt auf einem Niveau, welches vergleichbar mit der Expression von wt ZIP oder $\Delta N1$ war. Diese Population wird im folgenden als schwach exprimierende Population bezeichnet {im Folgenden wird die Abkürzung lo (low) verwendet}. Daneben gab es Zellen (30%) die das Transgen sehr stark exprimierten {im Folgenden wird die bezeichnung hi (high) verwendet}. Die starke Expression korrelierte mit dem Auftreten von Zellkernen die entweder sehr gross und rund waren, oder mit Zellkernen, die sehr stark deformiert waren und mit dem Auftreten mehrkerniger Zellen.

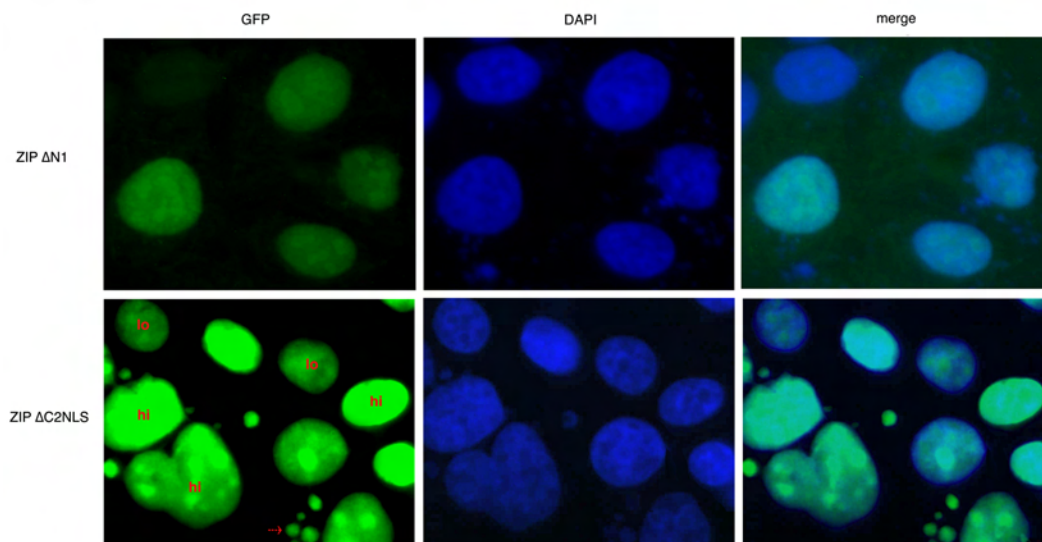


Abbildung 4.10: Die beiden Konstrukte $\Delta N1$ und $\Delta C2NLS$ lokalisieren analog zu transienter Expression im Zellkern und zeigen eine diffuse Fluoreszenz. Die Expression des Konstruktes $\Delta C2NLS$ ist heterogen (unten), die Mehrzahl der Zellen (70%) exprimiert das Konstrukt vergleichbar mit den wt ZIP Kinase oder $\Delta N1$ (lo Population)). Eine Subpopulation von 30% exprimiert das Konstrukt sehr stark (hi Population), diese starke Expression korreliert sehr stark mit dem Auftreten von großen runden, oder stark deformierten Zellkernen. Weiterhin korreliert die starke Expression mit dem Auftreten von mehrkernigen Zellen oder Mikrokernen (Pfeil), die auf Aneuploidie oder Apoptose hindeuten.

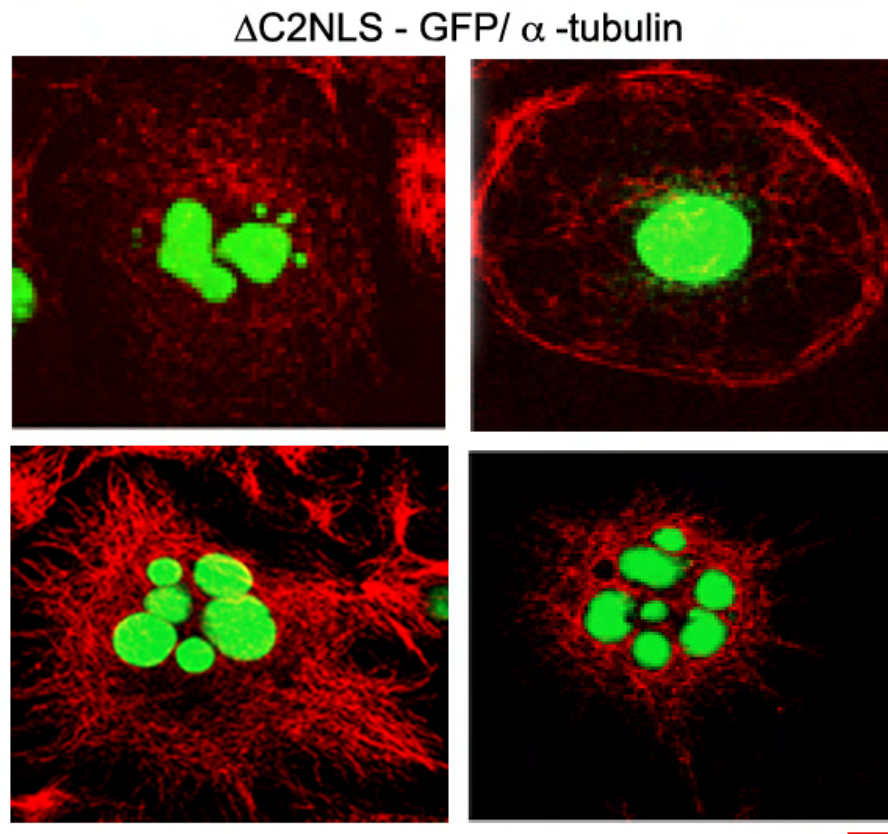


Abbildung 4.11 Die Expression des Konstruktes Δ C2NLS korreliert mit dem Auftreten von aberranten Kernen. Die Zellen wurden nach Fixierung mit anti α -Tubulin gefärbt um die Umrise der Zellen sichtbar zu machen. Die Abbildung zeigt das GFP Δ C2NLS und Tubulin. Messbalken 10 μ m.

Das Auftreten von großen runden Kernen, lies die Vermutung aufkommen, dass es sich hierbei um polyploide Kerne handelte, da deren Grösse durch einen unnormalen DNA Gehalt zustande kommen könnte. Dies würde auf eine Interferenz von Δ C2NLS mit der Chromosomenaufteilung hindeuten. Die mehrkernigen Zellen deuteten eindeutig auf eine Interferenz des Konstruktes Δ C2NLS während der Cytokinese hin. Da sich die beobachteten Defekte auf die hi Population beschränkten, kann angenommen werden dass die Defekte durch die Überexpression zustande kommen.

4.2.4 Bei den Zellen, die große gelappte Kerne aufweisen handelt es sich um mehrkernige Zellen

Eine weitere Frage die sich stellte war, ob es sich bei den gelappten Kernen (stark deformierte Kerne) ebenfalls um polyploide Kerne handelte, oder aber, ob es sich um einzelne zusammenhängende Kerne handelt, was auf einen Cytokinesedefekt hindeuten würde. Um

diese Frage zu klären wurde eine Lamin B Färbung der Zellkernmembran durchgeführt (vgl. Material und Methoden)

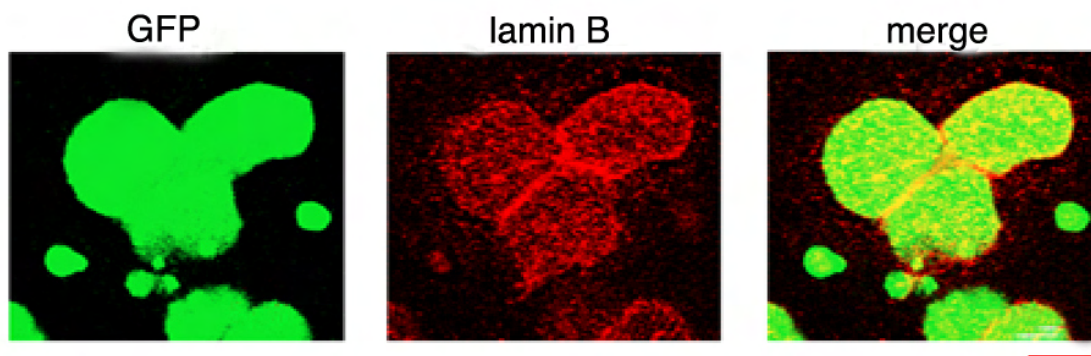


Abbildung 4.15. Eine Lamin B- Färbung der Kernmembran zeigt dass es sich bei den großen, gelappten Kernen um mehrere zusammenhängende Kerne handelt.

Die Lamin B Färbung zeigte, dass es sich bei den großen, gelappten Kernen um einzelne zusammenhängende Zellkerne handelt. Demzufolge handelt es sich bei Zellen die solche gelappten Kerne haben ebenfalls um mehrkernige Zellen.

4.2.5 Die hi Population geht aus der lo Population hervor

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden Zellsortierungsexperimente durchgeführt.

Die beiden Messgrößen SSC und FSC, geben in der Durchflusszytometrie Aufschluss über die Beschaffenheit einer Zellpopulation. Die Zellsuspension wird in dem Messgerät durch eine Kapillare gesaugt und dabei derart beschleunigt, dass sie zu einem dünnen Flüssigkeitsfaden wird. Einzelne Zellen werden dann mit einem Laserstrahl bestrahlt und streuen das einfallende Licht dann entweder parallel zur Lichtquelle (Forward Scatter; FSC), oder aber rechtwinklig zur Lichtquelle (Side Scatter SSC). Bestandteile der Zelle, wie etwa Proteine oder Vesikel, können durch den einfallenden Laserstrahl dazu angeregt werden Licht zu emittieren, welches eine niedrigere Frequenz als die Lichtquelle hat. Die Kombination aus parallel gestreutem Licht und rechtwinklig gestreutem Licht wird durch Detektoren erfasst. Durch die Analyse der Fluktuationen in der Helligkeit der Lichtstrahlen können Informationen über die physische und chemische Beschaffenheit jeder einzelnen Zelle extrapoliert werden: FSC korreliert mit dem Volumen der Zelle und der SSC korreliert mit der inneren Beschaffenheit der Zelle (Form des Nukleus, Granularität des Cytoplasmas, Beschaffenheit der Membran) (vg. 3.4) Diese Untersuchungen zeigten, dass es bei der Zelllinie MCF7 Δ C2NLS

eine signifikante Population gibt, die eine hohe GFP Fluoreszenz zeigt. Abbildung 4.13 zeigt ebenfalls die Bereiche die als GFP positiv und als stark exprimierend bezeichnet werden.

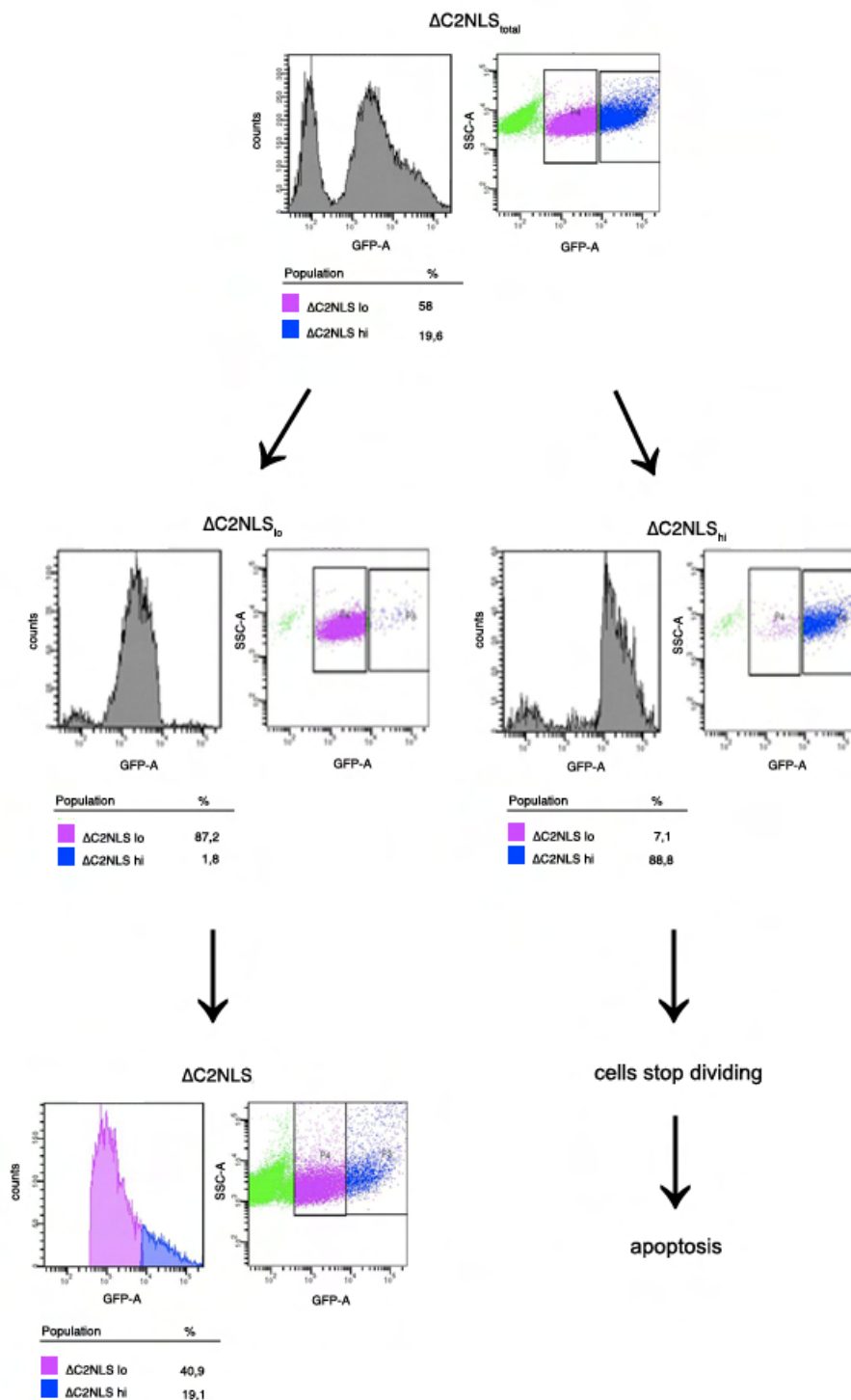


Abbildung 4.12 FACS® der Zelllinie MCF7 ZIP $\Delta C2NLS$. Die anfänglich heterogene Population wurde mit Hilfe eines Cell Sorters in die hi und die lo Population getrennt und separat weiterkultiviert. Die hi Population hört auf sich zu teilen und die Zellen sterben nach wenigen Tagen ab. Die lo Population hingegen erreicht nach ca einer Woche in Kultur, wiederum ein Maß an Heterogenität wie vor der Sortierung.

Da die beobachteten Defekte sich hauptsächlich auf die hi Population beschränkten, konnte davon ausgegangen werden, dass die Abnormalitäten als Folge der hohen Expression von $\Delta C2NLS$ auftraten. Im folgenden wurden fluoreszenzaktivierte Zellsortierungsexperimente (FACS[®]; **F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting) mit dieser Population durchgeführt (vgl. 3.4), um die beiden Zellpopulationen voneinander zu trennen und separat weiterzukultivieren, um sie so einzeln untersuchen zu können. Mit Hilfe der FACS[®]-Technik gelang es, die einzelnen Populationen voneinander zu trennen und separat zu kultivieren, jedoch teilten sich die Zellen der hi Population nicht mehr und begingen nach einigen Tagen Apoptose. Die lo Population ihrerseits wurde nach und nach wieder heterogen, (vgl. Abb. 4.12) und nach ca. einer Woche in Kultur erreichte diese Population wiederum ein Maß an Heterogenität wie vor der Sortierung.

Die obigen Experimente zeigen deutlich, dass die hi Population aus der lo Population hervorgeht. Demzufolge kann angenommen werden, dass die beobachteten Abnormalitäten dosisabhängig sind und immer dann auftreten, wenn sich ein gewisses Maß an GFP $\Delta C2NLS$ in der Zelle akkumuliert hat.

4.2.6. Bei der hi Population treten vermehrt polyploide Zellen auf

Bei der hi Population treten vermehrt Zellen auf, die einen grossen, jedoch normal runden, Zellkern besaßen. Das morphologische Erscheinungsbild dieser Zellen ließ die Vermutung aufkommen, dass es sich hierbei um polyploide Zellen, also mit einem DNA Gehalt $\geq 4N$ handelte. Um dieser Frage nachzugehen wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers, wie unter 3.4 beschrieben, DNA Histogramme erstellt, mit deren Hilfe die Zellzyklusverteilung und der DNA-Gehalt der einzelnen Zellpopulationen bestimmt werden konnte.

Es wurden nun sogenannte "Gates" angelegt (vgl. 3.4) die es erlauben eine bestimmte Population von Zellen zu beobachten. Bei den Kontroll MCF7 Zellen wurden alle Zellen untersucht. Bei den übrigen wurden lediglich die GFP positiven Zellen mit Hilfe eines Gates untersucht. Bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ wurde zudem zwischen der hi und der lo Population unterschieden. Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden DNA Profile erstellt und die Zellzyklusverteilung der Zellen wurde mittels der Auswertungssoftware FloJo[®] bestimmt (vgl. 3.4).

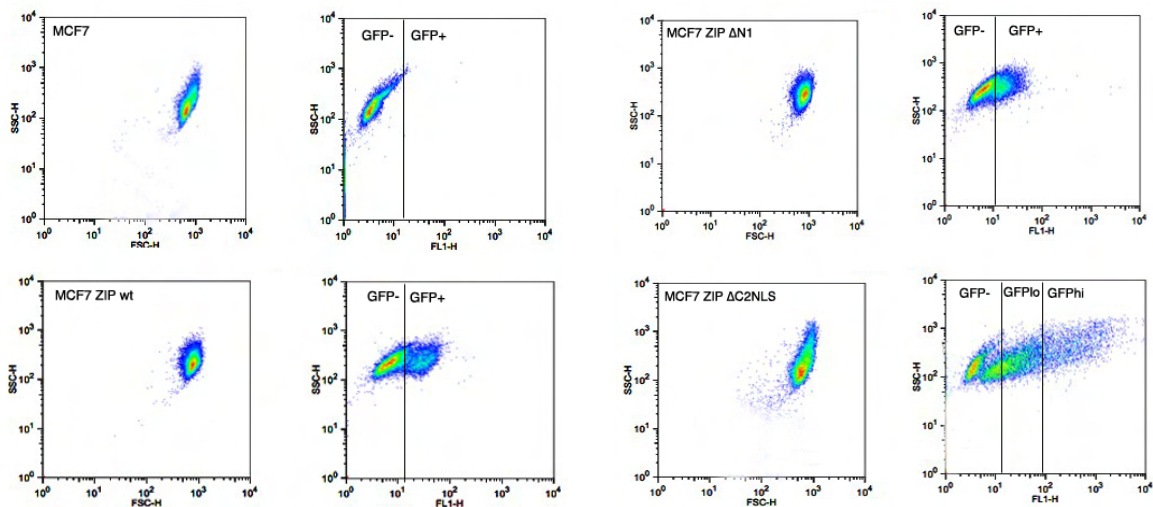


Abbildung 4.13: Dot Plots. Die beiden Messgrößen Forward Scatter (FSC, gerade Streuung) und Sideward Scatter (SSC, seitliche Streuung) zeigen deutlich, dass die Zelllinie $\Delta C2NLS$ aus einer heterogenen Population besteht, mit einer signifikanten Population die ein sehr starkes GFP Signal zeigt. Gezeigt sind ebenfalls die Bereiche die als GFP positiv, als schwach exprimierend und als stark exprimierend bezeichnet werden.

Die Zellzyklusverteilung der einzelnen Zellpopulationen zeigte dass es bei der MCF7 Zelllinie bereits eine Subpopulation von 10% gab, die einen DNA Gehalt von $\geq 4N$ hatte. Da es sich bei der Linie MCF7 um eine Tumorzelllinie handelt, kam es hier spontan zu einer bestimmten Anzahl von Zellen die polyploid waren. Weiterhin wiesen auch die beiden Zelllinien MCF7 wt ZIP und MCF7 ZIP $\Delta N1$ bereits eine Anzahl an Zellen auf, die einen DNA Gehalt von mehr als $4N$ hatten ($\approx 16\%$ bzw. $\approx 20\%$). Die Expression der GFP Konstrukte erhöhte also den Anteil an polyploiden Zellen. Bei der $\Delta C2NLS$ hi Population hingegen stieg die Anzahl der Zellen mit einem DNA Gehalt von $\geq 4N$ jedoch auf mehr als 50% (knapp 30% bei der lo Population) Hier kann also davon ausgegangen werden, dass diese bedeutende Zahl an polyploiden Zellen auf die Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ zurückzuführen ist.

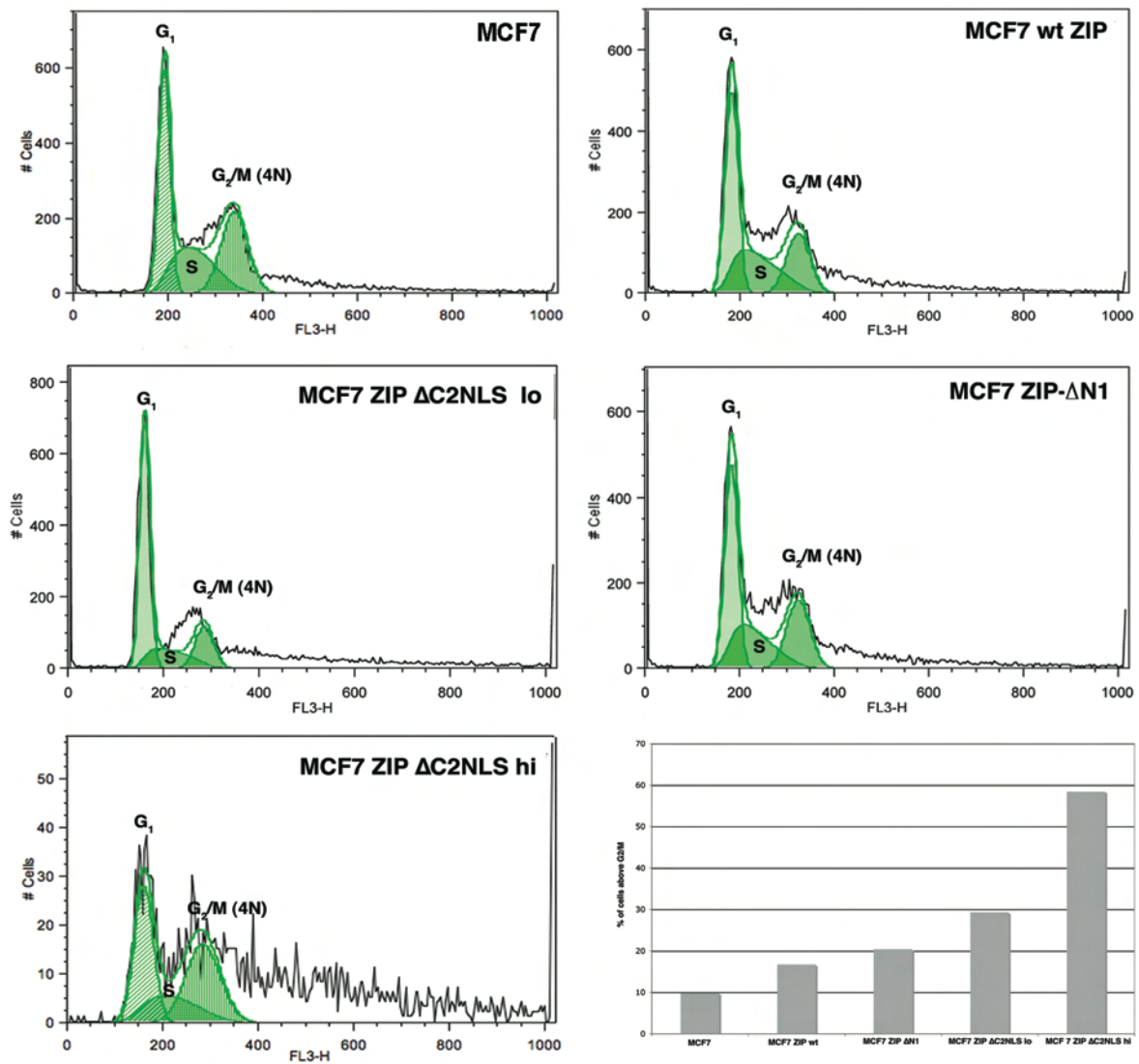


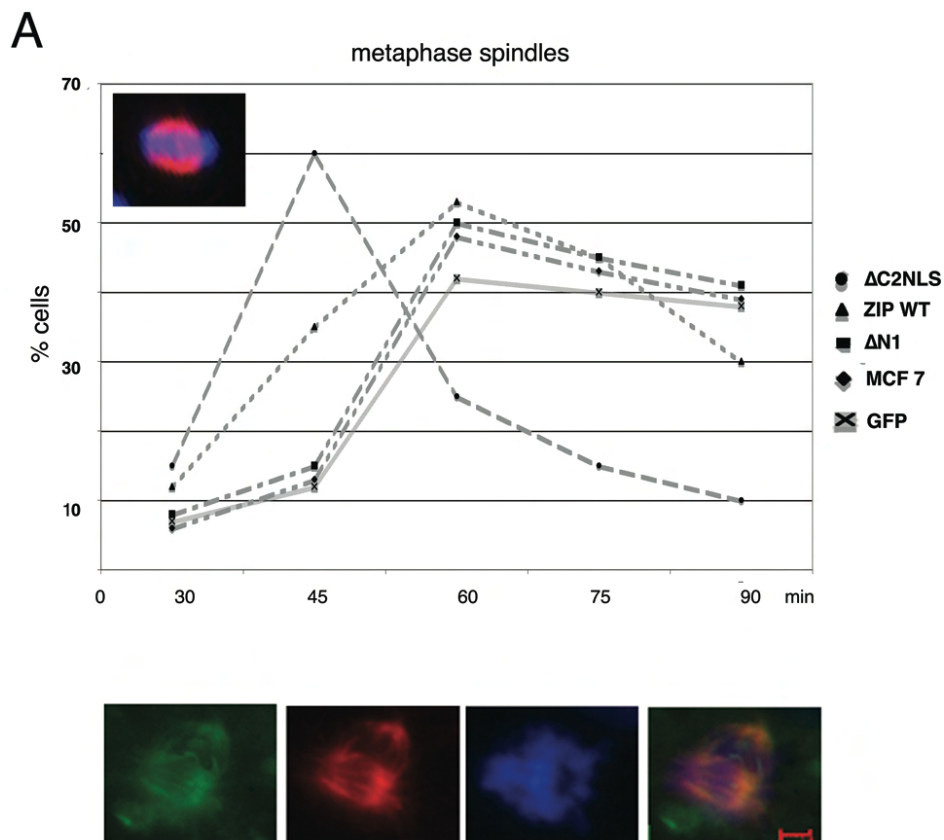
Abbildung 4.14 Aufgrund der DNA Profile wurde die relative Verteilung der Zellzyklusphasen und der prozentuale Anteil an Zellen, die einen DNA Gehalt von \geq 4N haben, ermittelt. Die Zellen wurden trypsinisiert und anschliessend resuspendiert. Nach Fixierung wurde die DNA mit Hilfe von Propidiumiodid gefärbt und die Extrakte wurden mittels eines Durchflusszytometers vermessen.

Da der Polyploidie oftmals ein Defekt während der Chromosomenaufteilung zugrunde liegt, ist es denkbar, dass die ZIP Kinase eine Rolle bei der Aufteilung der Chromosomen hat mit der die Mutante Δ C2NLS interferiert. Diese Interferenz muss also während den späten Stadien der Mitose, bei der Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen, stattfinden. Möglicherweise könnte die Funktion der ZIP Kinase an den Centromeren eine entscheidende

Rolle bei der Chromosomenaufteilung spielen, welche durch die Interferenz von $\Delta C2NLS$ mit der endogenen Kinase am Centromer gestört wird.

4.2.7 Die Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ beschleunigt den Aufbau der mitotischen Spindel

Da die Expression des Konstruktes $\Delta C2NLS$ sowohl Mitose als auch Cytokinesedefekte hervorruft, stellte sich die Frage, während welcher Phase der Mitose bzw. Cytokinese die Mutante $\Delta C2NLS$ den normalen Ablauf dieser beiden Prozesse beeinträchtigt. Um die Zellen während der Mitose und Cytokinese beobachten zu können, wurden sie in der Pro-Metaphase mit Nocodazol arretiert und anschließend wieder aus dem Arrest entlassen. Ziel dieses Versuches war es, die Zellen beim Durchlaufen der Mitose und der Cytokinese zu beobachten, um so möglicherweise Rückschlüsse über das Wirken der Mutante $\Delta C2NLS$ treffen zu können. Die Zellen wurden nach der Entlassung aus dem Arrest alle 15 Minuten fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Anschließend wurde die Anzahl der Metaphase-spindeln und späten Cytokinesestadien ausgezählt und in das Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt (vgl Abb. 4.15).



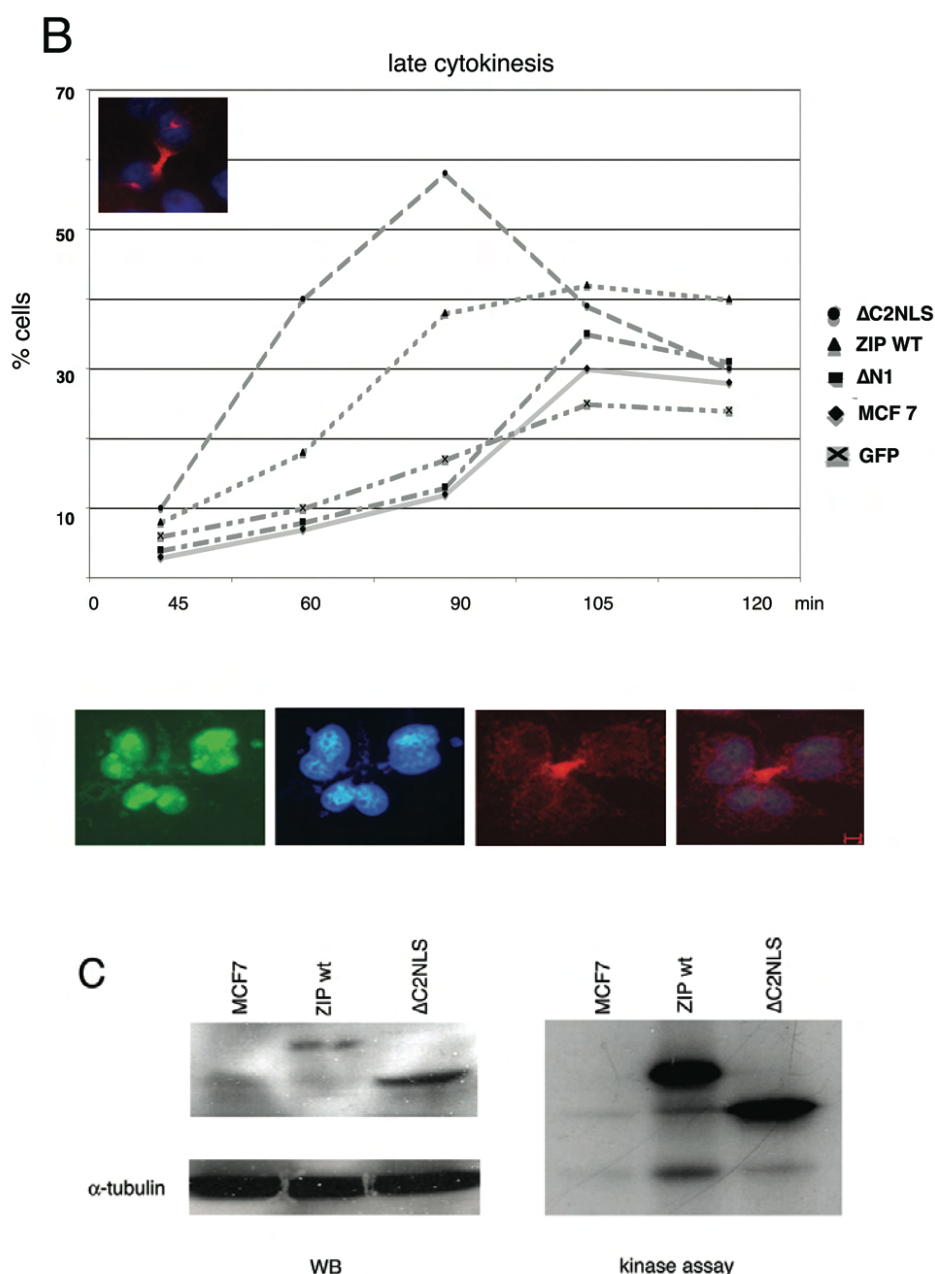


Abbildung 4.15 (A) Zellen welche wt ZIP und Δ C2NLS exprimieren sind nach einem Nocodazol Arrest bedeutend schneller im Aufbau der mitotischen Spindel als Kontroll MCF7 Zellen, oder Zellen die Δ N1 exprimieren. Die Zellen wurden mit Nocodazol in der Pro-Metaphase arretiert und anschließend wieder released, zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und die Anzahl der mitotischen Spindeln wurde ausgezählt. (B) Zellen welche wt ZIP und Δ C2NLS exprimieren treten nach einem Nocodazol Arrest schneller in die Cytokinese ein, als Kontroll MCF7 Zellen oder Zellen die Δ N1 exprimieren. (C). **Western Blot.** Es wurden Zellextrakte hergestellt, und diese wurden einem Western Blot unterzogen. Mit Hilfe eines Anti Tubulin Antikörpers wurde das Tubulin gefärbt und mit Hilfe eines GFP Antikörpers wurden die Mutanten sichtbar gemacht. **Kinase Assay,** die Fusionsproteine wurden mit einem Anti-GFP Antikörper aus Zellextrakten präzipitiert und es wurde Tubulin als Substrat dazugegeben und ein *in vitro* Kinasetest durchgeführt.

Die maximale Anzahl an mitotischen Spindeln war bei der Zelllinie Δ C2NLS bereits 30 Minuten nach dem Nocodazol Arrest zu sehen, bei allen übrigen Zelllinien erst nach 45 Minuten. Die wt-ZIP Linie war zwar anfänglich schneller als die Kontrollzellen oder die Δ N1 Zellen, sie

erreichte jedoch ihr Maximum an Mitosespindeln erst 15 Minuten später als die $\Delta C2NLS$ Zelllinie. Die Geschwindigkeit ging bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ allerdings zu Lasten der Genauigkeit, es waren vermehrt abnorme Spindeln zu sehen (25% mehr als bei den Kontrollzellen), die fast ausschließlich mehrpolig waren (vgl. Abb. 4.21 A). Ein ähnliches Phänomen konnte während der Cytokinese beobachtet werden, wo das Maximum an cytokinetischen Zellen bei der Linie $\Delta C2NLS$ ebenfalls 15 Minuten vor den übrigen Zelllinien erreicht wurde (90 Minuten nach dem release). Hier wurden ebenfalls vermehrt Zellen beobachtet, die abnorme Cytokinesen aufzeigten (Abb. 4.21 B unten).

Tubulin ist ein *in vitro* Substrat der ZIP Kinase (Preuss et al 2003 b). Unter der Annahme, dass eine verstärkte Tubulin Phosphorylierung durch die Mutante $\Delta C2NLS$ der Grund für ihren beschleunigten Spindelaufbau ist, wurde ein Kinase Test durchgeführt. Es wurden Zellextrakte hergestellt, aus welchen die GFP Fusionsproteine immunpräzipitiert wurden. Beim anschließenden Kinase Test wurde Tubulin als Substrat hinzugegeben. Das Ergebnis dieses Kinasetests zeigte allerdings eindeutig, dass die Mutante $\Delta C2NLS$ das Tubulin *in vitro* schwächer als der Wildtyp phosphoryliert (Abb. 4.21 C). Demzufolge steht der beschleunigte Tubulin Aufbau nicht in Verbindung mit einer erhöhten Tubulin Phosphorylierung.

4.2.8 Die Expression von $\Delta C2NLS$ hat keinen Einfluss auf die H3 Phosphorylierung

Da die Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ mitotische Defekte hervorruft, stellte sich die Frage nach dem durch dieses Konstrukt gestörten Mechanismus. Die Mutante interagiert mit dem Centromer und es kommt im Centromerbereich zu einer mitosespezifischen Phosphorylierung des Histon H3 (Preuss et al, 2003 a). Im Folgenden wurde überprüft, ob die Expression von $\Delta C2NLS$ und deren Interaktion mit dem Centromer, einen Einfluss auf die H3 Phosphorylierung hat. Die Zellen wurden mit Nocodazol in der Pro-Metaphase arretiert, um eine Anreicherung von mitotischen Zellen zu erhalten. Von diesen Zellen wurden Lysate hergestellt und anschließend mit Hilfe von Phosphospezifischen Antikörpern, mittels Western Blot, die H3 Phosphorylierung untersucht.

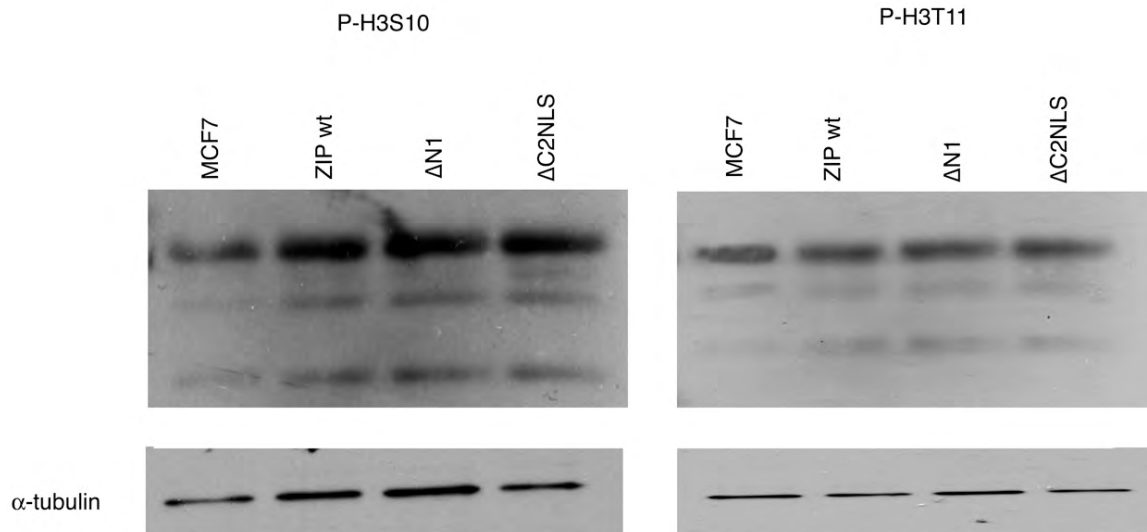


Abbildung 4.16. Western Blot, Mitotische Histon H3 Phosphorylierung. Die Expression der Mutante Δ C2NLS hat keinen Einfluss auf die Histon H3 Phosphorylierung an dem T11 oder dem S10 Rest. Die Zellen wurden mit Nocodazol in der Pro-Metaphase arretiert und es wurden Extrakte hergestellt, die dann mit einem Phospho-spezifischen T11 und S10 Antikörper untersucht wurden.

Die Western Blot Analysen (Abb. 4.1.6) zeigten, dass weder die Phosphorylierung des Histon H3 am Threonin 11, noch am Serin 10, beeinflusst ist. Demzufolge rühren die mitotischen Defekte, welche bei dieser Linie beobachtet wurden, nicht von einer anormalen H3 Phosphorylierung her.

4.2.9 Die Expression der Mutante Δ C2NLS hat keinen Einfluss auf die Lokalisation der "chromosomal passenger" Proteine

Die "chromosomal passenger" Proteine AuroraB, Survivin und INCENP sind beteiligt am sogenannten "spindle checkpoint", sowie in der Cytokinese (zur Übersicht siehe, Vagnarelli und Earnshaw 2004, Adams et al. 2001). Defekte, wie sie nach Expression der Δ C2NLS Zelllinie beobachtet wurden, gehen oftmals mit einer Delokalisation der sogenannten "chromosomal passenger" Proteine einher. Weiterhin ist bekannt, dass durch Delokalisation eines der Proteine es zu einer Beeinträchtigung des quartären Komplexes aus Aurora B, Survivin und INCENP kommt (Honda et al 2001).

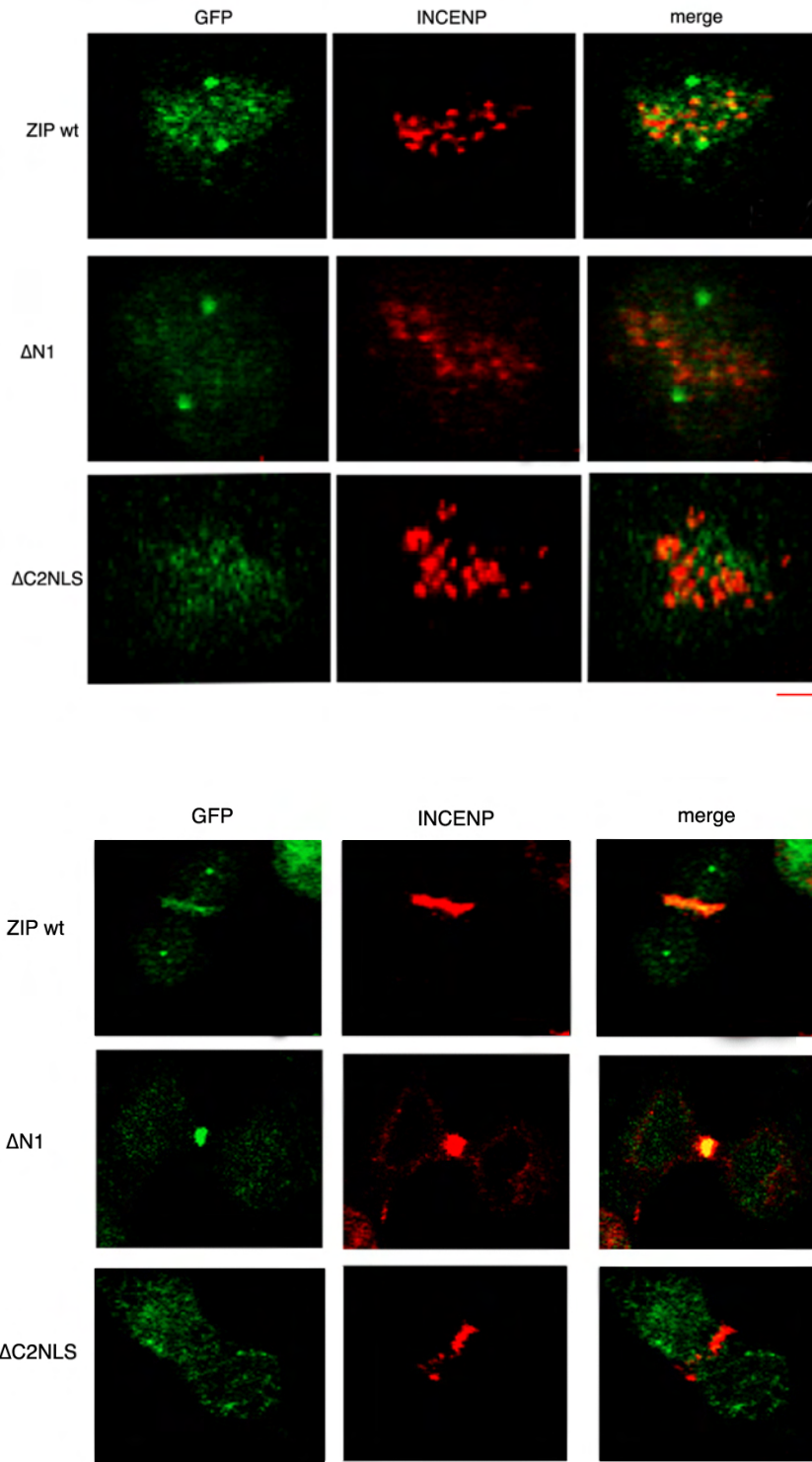


Abbildung 4.17. Lokalisation von INCENP während der Mitose. Die Expression von $\Delta C2NLS$ hat keinen Einfluss auf die Lokalisation der “chromosomal passenger” Proteine. Die Zellen wurden fixiert und anschließend wurde das Protein INCENP mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht.. Die oberen Aufnahmen zeigen Zellen in der Metaphase. Die unteren Zellen zeigen Zellen in der frühen Telophase (wt ZIP und ZIP $\Delta C2NLS$) bzw. in der späten Telophase (ZIP $\Delta N1$). Messbalken 10 μ m.

Im Folgenden wurde die Lokalisation der "chromosomal passenger" Proteine, am Beispiel von INCENP als Stellvertreter der "chromosomal passenger", überprüft.

Während der Metaphase ist INCENP im Bereich der Centromere zu finden und kolokalisiert teilweise mit wt ZIP und dem Konstrukt $\Delta C2NLS$. Bei dem Konstrukt $\Delta N1$ ist jedoch keine Kolokalisation zu beobachten. Während der Cytokinese lokalisiert INCENP erwartungsgemäss am kontraktilen Ring in der Teilungsfurche. Hier kolokalisieren sowohl wt ZIP und $\Delta N1$ mit INCENP, jedoch nicht die Mutante $\Delta C2NLS$.

4.2.10. Die Mutante $\Delta C2NLS$ co-präzipitiert nicht mit dem Protein MYPT-1

Die Cytokinese wird massgeblich durch die Phosphorylierung von MLC an einem Serin 19 Rest reguliert (zur Übersicht siehe Matsumura 2005). Der Phosphorylierungszustand der MLC wird durch das Wechselspiel zwischen MLC Kinasen und der MLC Phosphatase (PP1) reguliert (Zur Übersicht siehe Matsumura 2005). Die Phosphorylierung der Myosin Bindeeinheit (MYPT-1), der Myosin Phosphatase bewirkt eine Affinitätsverminderung der MLC Phosphatase zu Myosin. Dies hat zur Folge, dass die Phosphatase nicht mehr an das Myosin binden und letzteres dephosphorylieren kann. Da Haystead und Mitarbeiter beschrieben haben, dass die ZIP Kinase in glatten Muskelzellen die Myosin Bindeeinheit der PP1 phosphoryliert, kam die Vermutung auf, dass die ZIP Kinase während der Cytokinese sowohl einen direkten Einfluss auf den Phosphorylierungszustand der MLC hat, da sie letzteres zumindest *in vitro* am Ser19 Rest phosphoryliert, sowie einen indirekten Einfluss, indem sie MYPT-1 phosphoryliert. Dadurch verhindert sie eine Bindung der Phosphatase an das Myosin, welches ebenfalls zu einer verstärkten Phosphorylierung beiträgt.

Obwohl die Mutante $\Delta C2NLS$ nicht am kontraktilen Ring zu finden ist, ist es denkbar, dass es zu einer verfrühten, aberranten Phosphorylierung der MLC und oder MYPT-1 kommt, was den Cytokinese Defekten, die bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ auftreten zugrunde liegen könnte. Aus diesem Grund wurde untersucht ob das Konstrukt $\Delta C2NLS$ mit dem Protein MYPT-1 interagiert und es abnorm phosphoryliert. Hierzu wurden wie unter 3.3.3 beschrieben eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Es erfolgte mit Hilfe eines Antiköpers gegen MYPT-1 eine Immunpräzipitation mit anschließendem Kinaseassay ohne weitere Substratzugabe.

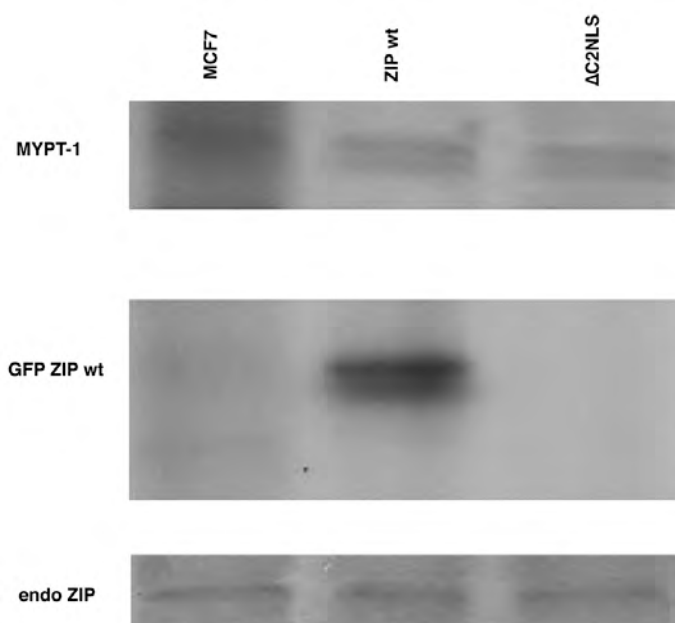


Abbildung 4.18 Immunpräzipitation und Kinase Test. Das Konstrukt $\Delta C2NLS$ lässt sich nicht mit dem Protein MYPT-1 präzipitieren. Es wurden Zellextrakte hergestellt, und anschliessend wurde, mit Hilfe eines MYPT-1 Antikörpers, das endogene MYPT-1 präzipitiert. Ohne weitere Zugabe von Substraten wurde ein *in vitro* Kinasetest durchgeführt. Lediglich die Wildtyp Kinase, sowie die endogene Kinase, lassen sich mit dem Protein MYPT-1 co-immunopräzipitieren.

Die Untersuchungen zeigten jedoch, dass lediglich das Wildtyp Konstrukt, sowie die endogene ZIP Kinase, coimmunopräzipitiert werden konnten. Bei der Mutante $\Delta C2NLS$ kommt es zu keiner Interaktion mit dem Protein MYPT-1. Demzufolge kann es durch $\Delta C2NLS$ auch nicht in seiner Phosphorylierung beeinflusst werden kann.

4.2.11 Die Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ beeinflusst die Verteilung von Ser19 phosphorylierter MLC sowie das Aktinzytoskelett

Die beobachteten Cytokinesedefekte könnten bei der $\Delta C2NLS$ exprimierenden Zelllinie durch eine aberrante Phosphorylierung der MLC zustande kommen. Im Folgenden wurde das Verteilungsmuster der phosphorylierten MLC untersucht. Da der Western Blot lediglich Auskunft über den Phosphorylierungszustand der MLC der Gesamtpopulation widerspiegelt, jedoch nicht über deren subzelluläre Verteilung, wurde dies mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht.

Diese Untersuchungen ergaben, dass bei der Zelllinie MCF7 ZIP $\Delta C2NLS$ das Verteilungsmuster von phosphorylierter MLC stark verändert, im Vergleich zu den Kontrollzellen, war. Entgegen den parentalen Kontroll MCF7 Zellen, oder den wt ZIP exprimierenden Zellen, wurden bei dieser Zelllinie dichte Stränge, die entlang dem Zellkortex liefen, beobachtet. Die

Zellen waren insgesamt grösser als die übrigen Zellen. Mit zunehmender Expression (und damit einhergehender Mehrkernigkeit) bildete sich ein dichter Kranz von P-MLC entlang dem Kortex, sowie ein feines Netzwerk, welches sich durch das Cytoplasma erstreckte. Es ist also anzunehmen dass die Mutante Δ C2NLS eine unkontrollierte Phosphorylierung der MLC vornimmt, was sich wiederum in der veränderten Lokalisation der MLC widerspiegelt.

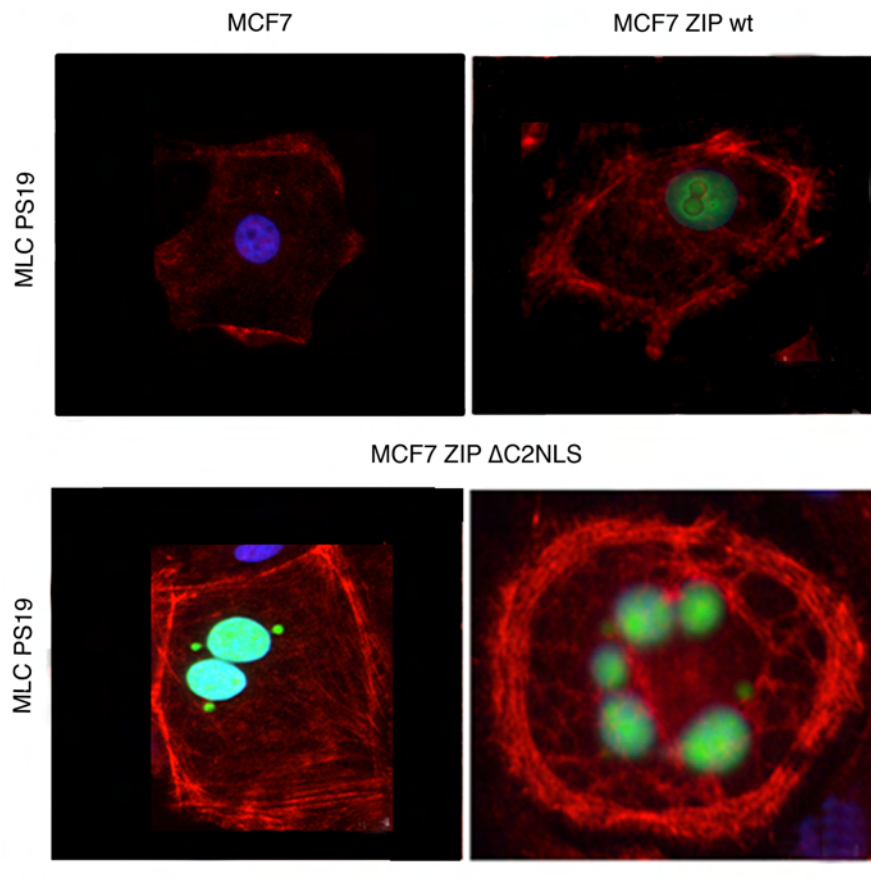


Abbildung 4.19. Die subzelluläre Verteilung von Ser19 phosphorylierter MLC ist bei der Zelllinie MCF7 ZIP Δ C2NLS stark beeinträchtigt. Die Zellen wurden nach Fixierung mit einem S19 spezifischen Antikörper gefärbt, um das Verteilungsmuster von S19 phosphorylierter MLC sichtbar zu machen. (Messbalken 10 μ m)

Weiterhin wurde untersucht ob das Aktin ebenfalls durch die abnorme MLC Verteilung beeinflusst ist. Im Folgenden wurde das Aktin Zytoskelett durch eine TRITC-Phalloidin Färbung sichtbar gemacht.

Analog zu dem Verteilungsmuster der MLC zeigte das Aktin Zytoskelett ebenfalls enorme Abnormalitäten auf: Es wurden mehrheitlich Zellen beobachtet, die ein sehr verdichtetes Aktinzytoskelett besitzen und zudem auch Filopodien ausbildeten, was für die MCF7 Zellen sehr untypisch ist. Zudem waren die Zellen ebenfalls viel grösser als die parentalen MCF7 Kon-

trollzellen oder die wt ZIP exprimierenden Zellen und die Grösse der Zellen korrelierte mit der starken Expression der Mutante. Mit zunehmender Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ wurden die Filopodien ebenfalls viel grösser und es wurden teilweise dichte Aktinstränge entlang des Zellkortex beobachtet.

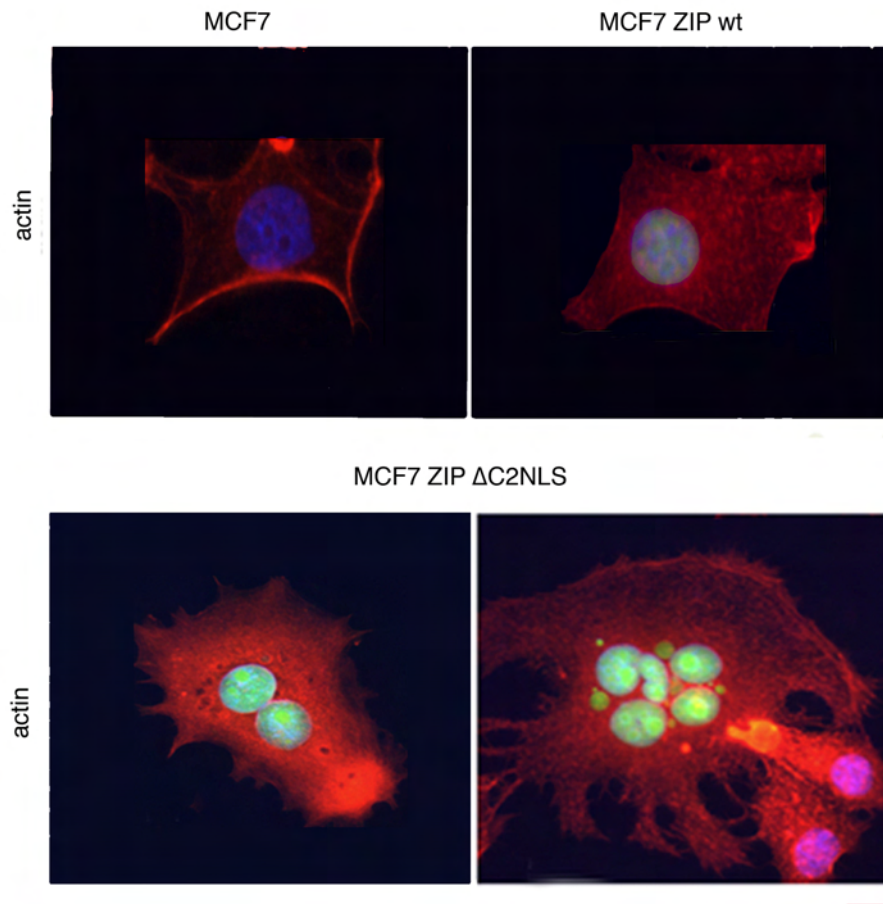


Abbildung 4.20. Bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ ist das Aktinzytoskelett ebenfalls verändert. Die Zellen wurden nach der Fixierung mit TRITC Phalloidin gefärbt um das Aktin Zytoskelett sichtbar zu machen. (Messbalken 10 μ m).

Analog zu dem Verteilungsmuster der MLC zeigte das Aktin Zytoskelett ebenfalls enorme Abnormalitäten auf: Es wurden mehrheitlich Zellen beobachtet, die ein sehr verdichtetes Aktinzytoskelett besitzen und zudem auch Filopodien ausbildeten, was für die MCF7 Zellen sehr untypisch ist. Zudem waren die Zellen ebenfalls viel grösser als die parentalen MCF7 Kontrollzellen oder die wt ZIP exprimierenden Zellen. Die Grösse der Zellen korrelierte mit der starken Expression der Mutante. Mit zunehmender Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ wurden die Filopodien ebenfalls viel grösser und es wurden teilweise dichte Aktinstränge entlang des Zellkortex beobachtet.

5. Diskussion

Es war bekannt, dass die ZIP Kinase mit dem Centrosom, dem Centromer und dem kontraktilen Ring kolokalisiert (Preuss *et al.*, 2003a). Es sollte nun der genaue Bereich ermittelt werden, über den die ZIP Kinase mit diesen Strukturen interagiert um dann anschließend von der Sequenz Peptide abzuleiten, mit Hilfe derer sich die Funktion der ZIP Kinase an den einzelnen Strukturen selektiv beeinflussen lässt. Nach transienter Expression verschiedener ZIP Kinase Deletionsmutanten konnten keine GFP- positiven Zellen beobachtet werden, die sich in der Mitose befanden, weshalb es nicht möglich war die Interaktionen der ZIP Kinase Mutanten mit mitotischen Strukturen auf diese Weise zu ermitteln. Im folgenden gelang es zwei Zelllinien zu etablieren, die die Mutanten $\Delta N1$ und $\Delta C2NLS$ stabil exprimierten. Mit Hilfe dieser Zelllinien gelang es, die Interaktionsdomäne der ZIP Kinase mit dem Centrosom und dem kontraktilen Ring auf die C-terminale Region einzugrenzen. Bezüglich des Centromers, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die ZIP Kinase wahrscheinlich über die Kinasedomäne mit dieser Struktur interagiert. Aufgrund der heterogenen Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ teilte sich die Zelllinie $\Delta C2NLS$ in zwei Populationen auf, eine schwach exprimierende "lo" Population und eine stark exprimierende "hi" Population. In der "hi" Population traten eine Reihe von Cytokinese- und Mitose Defekten auf: es traten sowohl vermehrt mehrkernige Zellen, als auch Zellen die einen DNA Gehalt von mehr als 4N besaßen, auf. Weiterhin beeinflusste die Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ das Wachstum der Zelllinie $\Delta C2NLS$. Sie beschleunigte den Aufbau der mitotischen Spindel und beeinflusste das Aktomyosinzytoskelett.

5.1 Kartierung der Interaktionsdomäne der ZIP Kinase mit mitotischen Strukturen

5.1.1 Die Überexpression der ZIP Kinase verhindert den Eintritt der Zellen in die Mitose

Der ursprüngliche Versuch, die Interaktion der ZIP Kinase mit mitotischen Strukturen nach transienter Expression der einzelnen Mutanten zu untersuchen, führte nicht zum Erfolg. Es war nicht möglich Zellen zu beobachten, die sowohl GFP positiv, als auch in der Mitose waren. Es ist vorstellbar, dass eine starke Expression der ZIP Kinase den Eintritt der Zellen in

die Mitose verhindert, oder dass die Zellen vor dem Eintritt in die Mitose durch Apoptose verloren gehen. Die ZIP Kinase interagiert mit dem Spleiss- und Transkriptionsfaktor CDC5, der am G₂/M Übergang beteiligt ist, (Nasmyth und Nurse 1981; Bernstein und Coughlin 1997; Engemann *et al.*, 2002) und mit dem generellen Zellzyklusinhibitor p21 (Burch *et al.*, 2003). Möglicherweise wird der verhinderte Eintritt der Zellen in die Mitose durch eine Interaktion der ZIP Kinase mit einem dieser Proteine bewirkt. Da jedoch nach transienter Expression der Konstrukte $\Delta N1$ und $\Delta C2NLS$ mehrkernige Zellen beobachtet wurden, ist anzunehmen, dass es sich bei diesem inhibitorischen Effekt der ZIP Kinase um einen dosisabhängigen Effekt handelt, da die binuklären Zellen, die nach Expression dieser Mutanten auftraten, mindestens eine Teilungsrunde absolviert haben müssen. Es ist möglich, dass die Mutante kurz nach der Transfektion, zu einem Zeitpunkt wo sie noch relativ schwach exprimiert wird, mit der Cytokinese interferiert. Zu einem späteren Zeitpunkt, wenn sie stärker exprimiert wird, interferiert sie mit anderen Funktionen der ZIP Kinase, was unter anderem den Eintritt in die Mitose verhindert.

Da es nicht möglich war die Interaktion der ZIP Kinase mit mitotischen Strukturen anhand von transienter Überexpression zu untersuchen, wurden Zelllinien etabliert, die die verschiedenen Deletionskonstrukte konstitutiv exprimieren.

5.1.2 Etablierung stabiler Zelllinien

Die Etablierung von Zelllinien, welche die verschiedenen ZIP Kinase Mutanten konstitutiv exprimieren, gestaltete sich ebenfalls schwierig. Die ersten Versuche schlugen fehl, da die Zellen nach Selektion auf GFP exprimierenden Zellen nur noch einige Teilungsrunden lebensfähig waren und vermutlich durch Apoptose zugrunde gingen. Dies deutet ebenfalls auf einen dosisabhängigen Effekt hin, da die Zellen erst nach andauernder Expression der Konstrukte verlorengingen. Da es jedoch früher bereits gelungen war eine Zelllinie zu etablieren, welche die Wildtyp ZIP Kinase exprimierte (Preuss. *et al.*, 2003a), wurde angenommen dass der Integrationsort des Transgens eine entscheidende Rolle bei der Überlebensfähigkeit der Zelle spielt. Es ist möglich dass der CMV Promotor aufgrund des Rekombinationsereignisses partiell zerstört wird und die Expression der Mutante nicht mehr durch diesen starken Promotor gesteuert wird, oder dass das Konstrukt in der Nähe von "silencing" Elementen integriert, was die Expressionsstärke ebenfalls negativ beeinflusst. Es wurden,

ausgehend von einer größeren Anzahl von Zellen, weitere Versuche unternommen um stabile Zelllinien zu etablieren. Von 60 selektierten Klonen überlebten 2, die die Mutanten $\Delta C2NLS$ und $\Delta N1$ exprimierten. Es gelang jedoch nicht Zelllinien zu etablieren, welche die übrigen ZIP Kinasekonstrukte exprimieren. Es ist möglich, dass die Mutanten, nach andauernder Expression, mit der Funktion der endogenen ZIP Kinase interferieren und dadurch ein Überleben der Zelle unmöglich machen, oder aber, dass aufgrund des Integrationsortes der Mutanten die Expression anderer, essentieller Gene gestört ist.

Die Zellen wurden mittels Western Blot untersucht um Aufschluss über die Stärke der Expression der einzelnen Mutanten zu erhalten. Hierbei wurde deutlich, dass die Mutante $\Delta N1$ vergleichbar mit dem Wildtyp exprimiert wird, das Konstrukt $\Delta C2NLS$ jedoch etwa um den Faktor 2 verstärkt exprimiert wird. Da bei der Zelllinie $\Delta N1$ keine Defekte zu beobachten waren, kann davon ausgegangen werden, dass die Mutante konstitutiv auf einem Niveau exprimiert wird, das mit dem Überleben der Zelle vereinbar ist. Die Zelllinie $\Delta C2NLS$ war entgegen der Erwartungen sehr heterogen bezüglich der Expression der Mutante $\Delta C2NLS$. Bei der sogenannten lo Population (70%) der Zellen traten mehrheitlich keine Defekte auf. Bei der sogenannten hi Population hingegen traten sehr oft Defekte auf, was mit der Expressionstärke der Mutante $\Delta C2NLS$ korrelierte (siehe unten). Es ist daher anzunehmen, dass die Mutante $\Delta C2NLS$ zwar ursprünglich auf einem relativ normalen Niveau exprimiert wird, sich jedoch nach andauernder Expression in der Zelle akkumuliert und dann die beobachteten Defekte hervorruft. Möglicherweise besitzt die Mutante $\Delta C2NLS$ eine längere Halbwertszeit als die Mutante $\Delta N1$, oder die GFP- Wildtyp Kinase, was zusätzlich zu der Akkumulation dieser Mutante beitragen könnte.

Mit Hilfe der hergestellten Zelllinien wurde die Interaktion der ZIP Kinase mit den mitotischen Strukturen untersucht.

5.1.3 Die ZIP Kinase interagiert über die C-terminale Region mit dem Centrosom und dem kontraktilen Ring

Mit Hilfe von immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte eindeutig geklärt werden, dass der C-terminale Bereich zwischen den Aminosäuren 337 und 448 die Interaktion mit dem Centrosom und dem kontraktilen Ring vermittelt. Sowohl die Wildtyp Kinase als auch die Mutante $\Delta N1$ kolokalisierten mit beiden Strukturen, jedoch nicht die Mutante $\Delta C2NLS$. Der C-terminale Bereich umfasst den Leuzinzipper, welcher an multiplen

Interaktionen mit verschiedenen Proteinen wie etwa ATF4 (Kawai et al. 1998), AATF (Page et al., 1999a) und CDC5, (Engemann et al., 2002), die alle in verschiedenen Signalwegen eingebettet sind, beteiligt ist. Weiterhin liegt N-terminal vom Leuzinzipper die sogenannte Arginin-reiche Region, welche ebenfalls als Interaktionsbereich in Frage kommt. Die ZIP Kinase interagiert über diese Region mit dem Protein Par-4 (Page et al., 1999a). Um zwischen diesen beiden Strukturmotiven unterscheiden zu können, wurden weitere Mutanten hergestellt, welche den Bereich von 337-448 (mit Leuzinzipper) und 337-417 (ohne Leuzinzipper) umfassten, hergestellt. Diese Mutanten wurden in einem mit Doxzyklin induzierbaren Vektor exprimiert, um ihre Expression gezielt steuern zu können. Nach der Induktion dieser Konstrukte löste sich jedoch die Mehrheit der Zellen innerhalb von 24h vom Boden der Zellkulturschale ab, was auf Apoptose hindeutet. Die verbliebenen Zellen zeigten ebenfalls eine deformierte Morphologie, wie sie beim apoptotischen Zelltod auftritt. Dieser Phänotyp tritt ebenfalls nach einem siRNA "knockdown" auf, der entweder Apoptose oder Mehrkernigkeit hervorruft (Cathrin Keller Diplomarbeit). Möglicherweise interferieren die Mutanten mit der Funktion der endogenen Kinase, was bedeuten würde, dass die ZIP Kinase eine essentielle Funktion in der Zelle hätte.

5.1.4. Die Interaktion der ZIP Kinase mit dem Centromer wird wahrscheinlich über die Kinasedomäne vermittelt

Bezüglich der Interaktion mit dem Centromer zeigte sich, dass neben dem Wildtyp lediglich die Mutante Δ C2NLS mit dem Centromer kolokalisierte, jedoch nicht die Mutante Δ N1. Dieser Befund lässt keine eindeutige Schlussfolgerung zu, bei dem gesuchten Interaktionsbereich könnte es sich sowohl um die Kinasedomäne handeln, die bei der Mutante Δ N1 fehlt, oder der gesuchte Bereich ist in dem gemeinsamen Bereich von Δ N1 und Δ C2NLS enthalten (AS 276-337). Es ist denkbar, dass dieser Bereich die Interaktion vermittelt, jedoch Kinaseaktivität benötigt. Es ist ebenfalls möglich, dass es durch die fehlende Kinasedomäne zu einer Konformationsänderung kommt, die bewirkt, dass der Bereich von 276-337 nicht zugänglich ist. Neueren Untersuchungen zufolge interagiert eine Mutante, bei der die Aminosäuren 305-333 deletiert wurden, mit dem Centromer (Achmet Imam Chasan, persönliche Mitteilung). Demzufolge ist der Bereich von 305-333 für die Interaktion mit dem Centromer nicht notwendig und die Interaktion wird mit großer Wahrscheinlichkeit von der Kinasedomäne vermittelt. Die ZIP Kinase interagiert mit einer Reihe von Proteinen, wie etwa dem Transkriptionsfaktor STAT3 (Sato et al., 2005), der DAPK (Shani et al., 2004) und

möglicherweise dem Protein MYPT-1 (Übersicht bei Haystead 2005) über die Kinasedomäne.

5.2. Die starke Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ korreliert mit dem Auftreten von Defekten

5.2.1 Die Zelllinie $\Delta C2NLS$ besteht aus zwei Populationen die auseinander hervorgehen

Die Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ ist heterogen. Bei der sogenannten lo Population (70%) der Zellen wird das Konstrukt relativ schwach exprimiert, bei der hi Population (30%) kommt es zu einer sehr starken Expression der Mutante, die vergleichbar mit transienter Überexpression ist. Unter der Vermutung, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Klone handelt, die ursprünglich nicht getrennt wurden, wurde versucht die beiden Populationen zu trennen, separat weiter zu kultivieren und zu untersuchen. Mit Hilfe des "cell sorters" gelang es auch beide Populationen voneinander zu trennen. Jedoch wurde die lo Population nach ca. einer Woche wieder heterogen, wie vor der Sortierung. Die Zellen der hi Population schienen sich nicht mehr zu teilen und gingen in dem gleichen Zeitraum verloren. Hieraus kann abgeleitet werden, dass die hi Population aus der lo Population hervorgeht. Die Zellen exprimieren das Konstrukt zunächst auf einem relativ normalen Niveau, jedoch akkumuliert sich die Mutante, möglicherweise aufgrund einer erhöhten Halbwertszeit, und ruft die beobachteten Defekte hervor. Nach einer Zeit sind die Defekte für die Zellen derart gravierend, dass sie und wahrscheinlich durch Apoptose zugrunde gehen.

5.2.2 Die Zelllinie $\Delta C2NLS$ benötigt eine höhere Zelldichte um in die exponentielle Wachstumsphase einzutreten.

Um die Wachstumseigenschaften der einzelnen Zelllinien miteinander vergleichen zu können wurden Wachstumsexperimente durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die Zelllinie $\Delta C2NLS$ im Gegensatz zu der wt Zelllinie, oder der $\Delta N1$ exprimierenden Zelllinie, eine wesentlich höhere Dichte benötigt, bevor sie in die exponentielle Wachstumsphase eintritt. Nach etwa 8-9 Tagen erreicht diese Linie erst die erforderliche Dichte, wohingegen die anderen Zelllinien diese bereits nach 3-4 Tagen erreichen. Wurden die Zellen jedoch mit

einer erhöhten Dichte ausplattiert, traten sie ebenfalls nach dem gleichen Zeitraum wie die Wildtyp Zelllinie oder die Linie $\Delta N1$ in die exponentielle Wachstumsphase ein. Die Frage die sich stellte, war welcher Mechanismus diesem veränderten Wachstumsverhalten zugrunde liegt. Möglicherweise interagiert die Mutante $\Delta C2NLS$ mit einem Protein das einen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum hat, oder die durch die Mutante hervorgerufenen Änderungen des Zytoskeletts (siehe unten) stehen in Verbindung mit den veränderten Wachstumseigenschaften.

Burch et al. beschrieben (Burch *et al.*, 2003), dass die ZIP Kinase den generellen Zellzyklusinhibitor $p21^{CIP1}$ phosphoryliert und dass $p21^{CIP1}$ durch die ZIP Kinase Phosphorylierung stabilisiert wird. Unter der Annahme dass die Mutante $\Delta C2NLS$ das $p21$ übermässig phosphoryliert und es dadurch zur Inhibition von CDK's kommen könnte, was sich negativ auf das Wachstum der Zellen auswirken würde, wurde mit Hilfe des Western Blots der Expressionslevel von $p21$ überprüft. In allen getesteten Zelllinien war das Expressionsniveau von $p21$ jedoch vergleichbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Expression von $p21$ nicht in Verbindung mit den veränderten Wachstumseigenschaften der Zelllinie $\Delta C2NLS$ steht. Im Zuge des Zellwachstums kommt es ebenfalls zu einer Umordnung des Zytoskeletts, welches bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ durch die Mutante beeinflusst ist und was sich ebenfalls negativ auf die Wachstumseigenschaften der Zelllinie auswirken könnte.

5.2.3 Die Expression der endogenen ZIP Kinase wird nicht durch die Mutante $\Delta C2NLS$ beeinflusst.

Um auszuschließen, dass die Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ einen Einfluss auf die Expression der endogenen ZIP Kinase hat, wurde das Expressionslevel der endogenen ZIP Kinase untersucht. Es ist denkbar, dass die Expression der ZIP Kinase einer Autoregulation unterliegt, und demzufolge ein hohes Expressionsmaß der Mutante ebenfalls die Expression der endogenen Kinase beeinflusst. Dieser Effekt würde einer Verminderung der Expression der endogenen Kinase durch siRNA gleichkommen.

Die Western Blot Untersuchung zeigte jedoch eindeutig, dass die Mutante $\Delta C2NLS$ keinen Einfluss auf die Expression der endogenen ZIP Kinase hat. Die Menge an endogener Kinase entsprach weitestgehend der Menge endogener Kinase in den Kontroll MCF7 Zellen oder der Wildtyp Zelllinie, so dass ausgeschlossen werden kann, dass die Mutante $\Delta C2NLS$ die Expression der endogenen Kinase beeinflusst.

5.2.4 Bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ treten Mitose und Cytokinesedefekte auf

Neben den veränderten Wachstumseigenschaften treten bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ Cytokinesedefekte auf, die sich im Auftreten von mehrkernigen Zellen äussern, sowie Mitosedefekte auf, die sich im Auftreten von Zellen mit anormal großen, runden Kernen äussern. Diese Defekte korrelieren mit der starken Expression der Mutante (hi Population), sie rühren jedoch nicht von einer Interferenz der Mutante $\Delta C2NLS$ mit der Expression der endogenen ZIP Kinase her, da die Mutante $\Delta C2NLS$ keinen Einfluss auf die Expression der endogenen Kinase hat. Es ist jedoch möglich, dass die Mutante auf post-translationalem Niveau mit der Funktion der endogenen Kinase interferiert.

Die hervorstechenden Cytokinesedefekte die bei der hi Population auftreten sind mehrkernige Zellen. Die mehrkernigen Zellen beinhalten sowohl normal runde, oder "stark deformierte" Kerne. Diese Kerne traten in allen möglichen Kombinationen in den mehrkernigen Zellen auf. Anhand einer Lamin -B Färbung konnte gezeigt werden, dass es sich bei den "stark deformierten" Kernen um einzelne, zusammenhängende Kerne handelt. Dies deutet darauf hin, dass die Kerne unter bestimmten Bedingungen, nach nicht erfolgter Cytokinese, wieder verschmelzen. Mit zunehmender Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ nimmt die Zahl der Kerne in einzelnen Zellen, und ebenfalls die Anzahl der stark deformierten Kerne, zu. Oftmals treten diese auch in Kombination mit normal runden Kernen in einer Zelle auf. Weiterhin wurde eine Reihe von Mikrokernen beobachtet die um die Zellkerne herum lagen. Diese Mikrokerne treten oftmals bei Apoptose auf und deuten darauf hin, dass die Zelle nach einer Zeit in die Apoptose eintritt. Diesen Beobachtungen zufolge interferiert die ZIP Kinase eindeutig mit der Cytokinese. Die Cytokinese wird maßgeblich durch den Phosphorylierungszustand der Myosin Leichten Kette gesteuert. Diese wechselt zwischen der Pro- und Anaphase ihren Phosphorylierungszustand von Serin1 nach Serin19, was mit einer Kontraktion des Aktomyosinapparates einhergeht (Yamakita *et al.*, 1994; Matsumura *et al.*, 1998). Die MLC wird von einer Reihe von Kinasen phosphoryliert wie etwa von der MLC Kinase, Aurora B, der Rho Kinase Rock, der Citron Kinase und der ZIP Kinase (Übersicht bei Matsumura 2005). Ausserdem wird die Rekrutierung der MLC in die Teilungsfurche ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert (Übersicht bei Matsumura 2005). Da die Mutante $\Delta C2NLS$ jedoch nicht mit Ser 19 phosphorylierter MLC in der Teilungsfurche kolokalisiert, kann es sein, dass die MLC zu einem früheren Zeitpunkt durch die ZIP Kinase beeinflusst wird, was eventuell eine Störung der Koordination der Cytokinese zur Folge hat, oder eventuell verfrüh-

te Kontraktion des kontraktiven Aktomyosin Ringes. Durch eine eine derartige, unkontrollierte, verfrühte MLC Phosphorylierung würde der Aufbau des Cytoskellets unabhängig von den Vorgängen in der Cytokinese beeinflusst. Aus diesem Grund wurde das Verteilungsmuster von Serin 19 phosphorylierter MLC während der Interphase mikroskopisch untersucht. Der Western Blot zeigt lediglich den Phosphorylierungszustand der Gesamtpopulation und lässt keine Unterscheidung zwischen der hi und lo Population zu, weshalb er sich für diesen Versuch nicht eignet.

Die hi Population der Zelllinie $\Delta C2NLS$, zeigte in der Tat starke Unterschiede in dem Verteilungsmuster der MLC. Entgegen der lo Population, den parentalen Kontrollzellen oder den wt exprimierenden Zellen, wurden bei dieser Zelllinie dichte Stränge von phosphorylierter MLC, die entlang dem Zellkortex liefen beobachtet. Mit zunehmender Expression des Konstruktes (und damit einhergehender Mehrkernigkeit), bildet sich ein dichter Kranz von P-MLC entlang dem Zellkortex sowie ein feines Netzwerk, welches sich durch das Cytoplasma erstreckte. Weiterhin nahmen die Zellen beträchtlich in der Größe zu. Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass die Mutante $\Delta C2NLS$ eine unkontrollierte Phosphorylierung der MLC vornimmt, was sich in der veränderten Lokalisation der MLC bemerkbar macht.

Neben der direkten MLC Phosphorylierung würde eine verfrühte und unkontrollierte Phosphorylierung des Proteins MYPT-1 sich ebenfalls in einer verfrühten und unkontrollierten MLC Phosphorylierung äussern. Die Myosin Bindeeinheit der Myosinphosphatase (PP1), das MYPT-1 vermittelt die Bindung des Holoenzym an das Myosin. Eine Phosphorylierung von MYPT-1 geht mit einer Konformationsänderung und einem Verlust der Bindungsfähigkeit des Holoenzym mit Myosin einher. Neben ROCK1 und anderen Enzymen phosphoryliert ebenfalls die ZIP Kinase das MYPT1 in glatten Muskelzellen (Übersicht bei Haystead T.A. 2005).

Aus diesem Grunde wurde versucht mit Hilfe der Immunpräzipitation und anschließendem Kinase Assay zu überprüfen, ob das Konstrukt $\Delta C2NLS$ mit dem Protein MYPT1 assoziiert, und ob dieses gegenüber dem Wildtyp oder den Kontroll MCF7 Zellen stärker phosphoryliert wird. Das Ergebnis des Versuches zeigte, dass die Wildtyp Kinase mit dem Protein MYPT-1 interagiert, jedoch nicht das Konstrukt $\Delta C2NLS$.

Laut diesen Beobachtungen kommt es also in der Zelllinie $\Delta C2NLS$ zu einer Beeinflussung des Zytoskellets, was hauptsächlich von einer direkten Phosphorylierung der MLC herrührt. Möglicherweise bewirkt diese unkontrollierte Phosphorylierung der MLC dass sich ein kon-

traktiler Ring bildet bevor sich die Chromosomen vollständig aufgeteilt haben was sich dann eventuell im Auftreten von Kernen mit einem anormalen DNA Gehalt äussern würde.

Da die MLC ebenfalls mit dem Aktin assoziiert, war es naheliegend, dass das Aktin Zytoskelet ebenfalls Abnormalitäten aufzeigen könnte. Die mikroskopische Untersuchung der Aktinverteilung bestätigte dies. Die Mehrheit der $\Delta C2NLS$ exprimierenden Zellen zeigten ein stark verdichtetes Aktinzytoskellet und bildeten zudem Filopodien aus, was für MCF-7 Zellen sehr untypisch ist. Die Zellen waren ebenfalls viel größer, als die parentalen MCF-7 Zellen oder die Wildtyp exprimierenden Zellen, dies korrelierte ebenfalls mit der starken Expression der Konstrukte. Mit zunehmender Expression der Mutante wurden die Filopodien ebenfalls viel größer und es bildeten sich dichte Aktinstränge entlang des Zellkortexes.

Die beobachteten Zytoskellet Anormalitäten könnten ebenfalls für die anormalen Cytokinesen verantwortlich sein, oder aber in Verbindung mit der Entstehung von polyploiden Zellen stehen, da während beiden Vorgängen dynamische und kontrollierte Umordnungen des Zytoskellets erfolgen müssen.

Weiterhin stellt sich die Frage, wieso die einzelnen Kerne, die nach einer fehlerhaften Cytokinese in der Zelle verbleiben, wieder zu einem einzelnen Kern verschmelzen ("stark deformierter" Kern). Nagata et al. beobachteten bei glatten Muskelzellen ebenfalls das Auftreten von grossen polyploiden, oder unregelmässig geformten, lobularen Kernen, sowie mehrkernigen Zellen. Die Autoren konnten zeigen, dass es bei diesen Zellen häufig zu einer nicht vollständigen Auftrennung der Chromosomen kam, jedoch bildete sich dennoch eine Kernhülle um die unvollständig aufgetrennten Chromosomen. Die Zellen traten anschließend in die Cytokinese ein, allerdings bildete sich der kontraktile Ring zurück und es entstand eine polyploide Zelle. Je nachdem wie "stark" die motorische Aktivität des kontraktilen Ringes war, bevor dieser sich zurückbildete, wurde die Kernhülle deformiert und es bildete sich ein unregelmässig geformter, lobularer Kern. Falls der entstandene kontraktile Ring jedoch nicht genügend motorische Aktivität ausüben konnte, um die Morphologie der Kernhülle zu beeinträchtigen, entstand ein großer, runder und polyploider Kern. Weiterhin beobachteten Nagata et al., dass sich nach erfolgter Auftrennung der Chromosomen und anschließender Bildung neuer Kernmembranen in der Telophase die Zellen in die Cytokinese eintraten, sich jedoch der kontraktile Ring zurückbildete und eine binukleäre Zelle entstand. (Nagata *et al.*, 2005). Möglicherweise kommt es bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ zu einem ähnlichen Phänomen und es ist denkbar dass die aberrante MLC Phosphorylierung diesen Defekten zugrunde

liegt. Es ist ebenfalls möglich, dass, je nach Stadium in dem die Zelle sich befindet, ein anderer Defekt zum Tragen kommt. Falls die Mutante sich in einer Zelle stark akkumuliert hat, die sich kurz vor dem Eintritt in die Mitose befindet, kommt es eventuell bereits zu Defekten bei der Chromosomenauftrennung. Falls die Mutante sich beim Eintritt in die Mitose weniger stark akkumuliert hat, kommt der Defekt möglicherweise erst in der Cytokinese zum Tragen.

5.2.5 Die großen, runden Zellkerne haben einen DNA Gehalt von mehr als 4N.

Da die normal runden, jedoch sehr großen Kerne möglicherweise aufgrund eines anormalen DNA Gehaltes ihre Grösse erhalten haben, stellte sich die Frage ob diese Zellen vielleicht eine DNA Gehalt von mehr als 4N haben. Aus diesem Grunde wurden die Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers hinsichtlich ihres DNA Gehaltes untersucht. Da es nicht möglich war die hi und die lo Population getrennt voneinander zu kultivieren (siehe 4.2.5), wurden sogenannte Gates angelegt um die beiden Populationen getrennt untersuchen zu können. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass die Kontroll MCF-7 Zellen bereits 10% an Zellen haben, die einen DNA Gehalt von mehr als 4N besitzen. Da es sich bei der MCF7 Zelllinie um eine Tumorzelllinie handelt kommt es bereits spontan zu fehlerhaften Mitosen. Die Zelllinie, welche die Wildtyp Kinase exprimiert zeigt eine leicht erhöhte Anzahl an polyploiden Zellen (15%) die möglicherweise durch die Expression des Konstruktes zustande kommen. Bei der Zelllinie $\Delta N1$ lässt sich weiterhin eine Steigerung von rund 5% beobachten. Hier sind ca. 20% polyploide Zellen zu erkennen. Die lo Population der Zelllinie $\Delta C2NLS$ (70% der Gesamtpopulation) zeigte einen Anteil von knapp 30% der Zellen die einen DNA Gehalt von mehr als 4N besaßen. Bei der hi Population (30% der Gesamtpopulation) stieg der Anteil an Zellen, die einen DNA Gehalt von mehr als 4N besaßen, auf weit mehr als 50%.

Möglicherweise rührt diese Tatsache von der Interferenz der Mutante $\Delta C2NLS$ mit dem Centromer her. Es wäre vorstellbar, dass das Wirken der ZIP Kinase am Centromer sich in einer fehlerhaften Aufteilung der Chromosomen äussert.

5.2.6. Die Mutante $\Delta C2NLS$ interferiert nicht mit der H3 Phosphorylierung

Da ein potentielles Substrat der ZIP Kinase am Centromer das Histon H3 ist (Preuss *et al.*, 2003 a), war es möglich dass $\Delta C2NLS$ die Phosphorylierung von Histon H3 beeinflusst. Die genaue Bedeutung der Phosphorylierung des Histons H3 am Threonin 11 ist zwar noch nicht bekannt, Preuss *et al.* vermuten jedoch, dass diese Phosphorylierung in Verbindung mit Chromatinumordnungen die während der Mitose stattfinden, steht. Um zu überprüfen ob

Δ C2NLS die Histon H3 Phosphorylierung beeinflusst, wurde der Phosphorylierungsstatus des Histon H3 am Threonin 11 und Serin 10 Rest in mitotischen Zellen mit Hilfe des Western Blots untersucht. Die Zellextrakte der Zelllinie Δ C2NLS zeigte jedoch, dass weder die Threonin11 Phosphorylierung noch die Serin10 Phosphorylierung stärker als bei den Kontroll MCF7 oder der Wildtyp exprimierenden Zelllinie war. Dennoch kann eine Interferenz der Mutante am Centromer nicht ausgeschlossen werden. Es wäre denkbar, dass zwar das Histon H3 am Threonin 11 normal phosphoryliert wird, jedoch ein weiterer bisher unbekannter Interaktionspartner der ZIP Kinase durch die Mutante Δ C2NLS beeinflusst wird.

5.2.7 Δ C2NLS beschleunigt den Aufbau der mitotischen Spindel

Da die Mutante Δ C2NLS die Phosphorylierung des Histons H3 nicht beeinflusste stellte sich weiterhin die Frage nach dem Mechanismus, mit dem die Mutante Δ C2NLS mit der Mitose interferiert.

Da die Polyploidie, die vermehrt bei der Zelllinie Δ C2NLS auftritt, möglicherweise durch eine ungleiche Verteilung der Chromosomen zustande kommt, kam der Gedanke auf, dass bei dieser Zelllinie Defekte bei dem Aufbau der mitotischen Spindel vorliegen.

Möglicherweise kommt es hierbei auch öfters zu sogenannten "*missattachments*", also einem fehlerhaften Anheften der mitotischen Spindel, welches ursächlich für eine ungleiche Chromosomenverteilung sein könnte. Demzufolge könnte es sich bei den beobachteten Mikrokernen (siehe 5.2.4) um einzelne Chromosomen handeln, die durch ein fehlerhaftes Anheften der Spindel entstanden sind. Derartige Defekte wurden oftmals bei einer Störung der "*chromosomal passenger*" Proteine beobachtet die eine wichtige Rolle bei der Segregation der Chromosomen und dem sogenannten "*spindlecheckpoint*" besitzen (Übersicht bei Vader *et al.* 2006, Li und Li 2006)

Im Folgenden wurde der Aufbau der Spindel immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die verschiedenen Zellen wurden mittels Nocodazol in der Prometaphase arretiert und anschließend wieder aus ihrem Arrest entlassen. Die Anzahl der mitotischen Spindel wurde ausgezählt um anschließend eine Kinetik erstellen zu können. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Zelllinie ZIP wt und die Zelllinie Δ C2NLS schneller im Aufbau der Spindel waren als die Kontroll MCF7 Zellen. Allerdings erreichte die Zelllinie Δ C2NLS das Maximum an mitotischen Spindeln 15 Minuten schneller als die wt Zelllinie (45 min vs 60 min). Die Zelllinien

MCF und MCF7 Δ N1 erreichten auch nach 60 min ihr Maximum. Die Cytokinese schien bei der Zelllinie Δ C2NLS, in etwa die selbe Zeit in Anspruch zu nehmen wie bei den übrigen Zelllinien.

Die Zelllinie Δ C2NLS war zwar schneller im Aufbau der mitotischen Spindel, allerdings schienen sich bei dieser Linie auch die Fehler zu häufen. Es wurden sowohl in der Cytokinese, als auch in der Mitose, vermehrt Defekte beobachtet: Es traten mit einer Häufigkeit von rund 35% Zellen auf, die abnorme Spindeln hatten, die hauptsächlich mehrpolig waren. Möglicherweise kommt es ebenfalls zu einer fehlerhaften Anheftung der mitotischen Spindel.

Derartige Defekte treten ebenfalls auf wenn man Proteine des "*chromosomal passenger complex*", wie etwa das INCENP durch mutierte Versionen ersetzt (Vader *et. al*, 2007). Bei den beobachteten Mikrokernen könnte es sich um einzelne Chromosomen handeln, die durch ein solches "*missattachment*" entstanden sind. Weiterhin traten mit einer vergleichbaren Häufigkeit Zellen auf die fehlerhafte Cytokinesen zeigten. Es wurden Zellen beobachtet, die nach erfolgter Cytokinese weiterhin miteinander über cytoplasmatische Brücken verbunden blieben. Naim und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Mutation der Citron Kinase bewirkt, dass die Zellen zwar die Cytokinese durchlaufen, jedoch weiterhin über interzelluläre Brücken verbunden blieben und scheinbar nicht mehr aus der Cytokinese austreten konnten (Naim *et. al*, 2004). Da der Aufbau der mitotischen Spindel in der Hauptsache durch die Phosphorylierung von α - und β - tubulin reguliert wird (Zur Übersicht siehe Wiese und Zheng 2006), kam die Vermutung auf, dass die ZIP Kinase Mutante Δ C2NLS das Tubulin stärker phosphoryliert und demzufolge den Aufbau der mitotischen Spindel beschleunigt. Mit Hilfe eines GFP Antikörpers wurde die Mutante Δ C2NLS und die Wildtyp Kinase präzipitiert und anschließend wurde nach Zugabe eines Tubulin Gemisches ein Kinasetest durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass das Tubulin von der Mutante Δ C2NLS schwächer als vom Wildtyp phosphoryliert wird. Demzufolge scheint die direkte Tubulin Phosphorylierung durch die ZIP Kinase nicht in Verbindung mit dem beschleunigten Spindelaufbau zu stehen. Dem Ergebnis zufolge scheint die Tubulin Phosphorylierung entweder einen inhibitorischen Einfluss auf den Aufbau der Spindel zu haben, oder aber die ZIP Kinase wirkt nicht direkt über die Tubulinphosphorylierung auf den Spindelaufbau, sondern über ein bisher unbekanntes Protein.

5.2.8 Die Lokalisierung der Chromosomal passenger ist nicht durch die Mutante Δ C2NLS beeinflusst

Eine Beeinflussung der “*chromosomal passenger*” Proteine ruft oftmals ähnliche Defekte hervor wie die, die bei der Zelllinie Δ C2NLS beobachtet wurden. Defekte wie Polyploidie und Cytokinesestörungen gehen oft mit einer Delokalisation der Chromosomal passenger einher (Übersicht bei Vagnarelli und Earnshaw 2004). Weiterhin führt die Delokalisation eines der Proteine oftmals zu einer Delokalisation des gesamten “*chromosomal passenger*” Komplex (Honda et al. 2003).

Aus diesem Grunde wurde überprüft ob es bei der Zelllinie Δ C2NLS zu einer Beeinträchtigung der “*chromosomal passengers*” kommt. Es war denkbar, dass die Mutante Δ C2NLS durch eine direkte oder indirekte Beeinflussung der “*chromosomal passenger*” Proteine die Lokalisation des gesamten Komplexes beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein INCENP, während der Mitose im Bereich der Centromere und während der Cytokinese im Bereich der Teilungsfurche zu finden ist. Im Gegensatz zu Honda und Mitarbeitern (Honda et al., 2003), die feststellten, dass die falsche Lokalisation eines der “*chromosomal passenger*” Proteine zu einer Delokalisation des gesamten Komplexes führt, beobachteten Nagata et al., dass bei einer Population von Zellen, die Cytokinese und Mitosedefekte zeigten (vgl. 5.2.4), lediglich das Protein Survivin mislokalisierte, jedoch die übrigen Mitglieder des “*chromosomal passenger*” Komplexes richtig lokalisierten. Untersuchungen, die nach Beendigung der experimentellen Arbeiten, die dieser Dissertation zugrunde liegen, unternommen wurden, zeigten jedoch dass das Protein Survivin in der Zelllinie Δ C2NLS ebenfalls korrekt lokalisierte (Gerd Landsberg, persönliche Mitteilung).

Demzufolge ist es relativ unwahrscheinlich dass die beobachteten Defekte auf eine Beeinflussung der “*chromosomal passengers*” zurückzuführen sind, da diese selbst in der Zelllinie Δ C2NLS normal lokalisieren. Zusätzlich dazu konnte bisher keine funktionelle Beziehung zwischen der ZIP Kinase und den “*chromosomal passenger*” gezeigt werden (Anne Conradi, KH Scheidtmann, unveröffentlicht).

5.3 Die Rolle der ZIP Kinase in der Mitose

Bei einigen Vorgängen an denen die ZIP Kinase beteiligt ist, äussert sich ihr Handeln in einer Umordnung des Cytoskeletts, bzw in der Regulation der Kontraktilität des Aktomyosin Apparates. Im Zuge der Apoptose assoziiert die ZIP Kinase mit dem Cytoskelett und ihr Wirken äussert sich in einer Umordnung letzteren (Page *et al.*, 1999b). Im Zuge der Migration von Zellen ist die ZIP Kinase an Remodulierung des Cytoskelettes beteiligt (Komatsu und Ikebe 2004, Murata-Hori *et al.*, 2001), in glatten Muskelzellen ist sie an der Regulation der Kontraktion beteiligt (Übersicht bei Haystead 2005) und vieles deutet darauf hin dass die ZIP Kinase während der Mitose und der Cytokinese ebenfalls an der Modulation des Cytoskeletts beteiligt ist.

Während Mitose und Cytokinese, durchläuft das Cytoskelett eine Reihe von Veränderungen damit sich die Zelle den speziellen Anforderungen der Mitose anpassen kann. Eines der Hauptregulatorproteine für diese Vorgänge ist die GTPase Rho. Rho ist an den Polkappen der Zelle an der Remodulierung des Zellkortex beteiligt, damit dieser den sich auftretenden Chromosomen "weichen" kann (Hickson *et al.*, 2006). Die ZIP Kinase wird zusammen mit dem γ -Tubulin zum Centrosom rekrutiert und hat dort möglicherweise eine Effektorfunktionen im Zuge der Kortexremodellierungen, die durch Rho eingeleitet werden und/oder die ZIP Kinase ist am Aufbau der mitotischen Spindel beteiligt, jedoch nicht durch direkte Phosphorylierung des Tubulins. Weiterhin ist Rho an der Positionierung und Aufbau des kontraktilen Ringes beteiligt, indem ein Gradient von aktivem Rho in der späteren Teilungsfurche den Ort des Zusammenbaus des kontraktilen Ring festlegt und die Rekrutierung von Myosin II und Effektorkinasen in die Teilungsfurche steuert (Bement *et al.*, 2005., Nishimura und Yonemura 2005). Rho wird lokal, in dem Bereich in dem sich die Teilungsfurche bildet, aktiviert indem der sogenannte RhoGEF (Rho Guanine nucleotide Exchange Factor) GDP, das an Rho gebunden ist, durch GTP austauscht (Nishimura und Yonemura 2005). Rho GEF wird zumindest teilweise durch Zykline gesteuert. RhoGEF wandert vermutlich mit Hilfe von Motorproteinen entlang der Spindel bis in die Äquatorialebene, von wo aus er Rho an den Zellkortex im Bereich der Zentralspindel rekrutiert und aktiviert (Nishimura und Yonemura 2006). Es ist wichtig dass der Aktivator von Rho an der korrekten Stelle (Zentralspindel) lokalisiert. Dies ist eine notwendige Voraussetzung dafür, dass Rho lokal aktiviert wird, in dem Bereich wo sich später die Teilungsfurche und der kontraktile Ring bilden. Eine der Hauptkinasen die durch Rho aktiviert wird, ist die Kinase Rock I (Fukata *et al.*, 2001), welche

ebenfalls das MYPT-1 und die MLC phosphoryliert. Vor kurzem wurde gezeigt dass ROCK1 ebenfalls die ZIP Kinase phosphoryliert und aktiviert. Rock I übt zumindest teilweise ihr Wirken durch die ZIP Kinase aus (Hagerty *et al.*, 2006).

Möglicherweise hat die ZIP Kinase am Centromer, die Aufgabe bei der Positionierung und des RhoGEFs und der folgenden Aktivierung von Rho zu helfen. Eventuell stellt das phosphorylierte Histon H3 eine Markierung da, die zur genauen Positionierung des RhoGEFS im Bereich der Zentralspindel nötig ist. Die Kinase Aurora B ist notwendig damit sich die Zentralspindel und die Teilungsfurche bilden können (Yüce *et al.*, 2005) und Aurora B ist die Hauptkinase, die das Histon H3 an Serin 10 phosphoryliert (Übersicht bei Vagnarelli und Earnshaw 2004).

Serin 10 phosphoryliertes H3 ist an der Zentralspindel zu finden und bleibt auch später in der Teilungsfurche erhalten (Li *et al.*, 2005). Möglicherweise steht das Serin 10 phosphorylierte Histon H3 in Verbindung mit der Positionierung und dem Aufbau der Zentralspindel. Die Bedeutung von Threonin11 phosphoryliertem H3 konnte zwar noch nicht eindeutig geklärt werden, jedoch ist es nicht auszuschließen dass die Threonin 11 Phosphorylierung ebenfalls in Verbindung mit der Positionierung der Zentralspindel und der späteren Teilungsfurche steht. Möglicherweise übt die ZIP Kinase am Centromer noch weitere Funktionen aus, sie könnte bei dem "attachment" der Spindel notwendig sein und eventuell an weiteren, Rho induzierten Kortex- oder Zytoskellat Modifikation beteiligt sein, die notwendig sind um den anschließenden Prozessen der Chromosomenaufteilung und der Cytokinese gerecht zu werden.

Nach der Aktivierung von Rho durch Signale die vom RhoGEF von der Spindel ausgehen, wird Myosin II sowie weitere Effektor Kinasen in den Bereich der Furche, wo sich der aktive Rho Gradient gebildet hat, rekrutiert (Hickson *et al.*, 2006). Möglicherweise wird auch die ZIP Kinase durch den aktiven Rho Gradienten zu der Teilungsfurche gelotst und hat ebenfalls eine Funktion bei der Rekrutierung von Myosin in die Teilungsfurche.

Während der der anschließenden Cytokinese ist es denkbar, dass die ZIP Kinase an der Regulation der Kontraktion des Aktomyosinringes durch Phosphorylierung der MLC, und/oder an der Regulation der Myosinphosphatase Aktivität durch MYPT1 beteiligt ist, möglicherweise ist die ZIP Kinase darüber hinaus an den Modulationen des Zellkortex beteiligt die im Laufe der Cytokinese erfolgen. Die ERM Proteine Ezrin, Radixin und Moesin sind unter anderem an Verknüpfung der Plasmamembran mit dem Cytoskellat beteiligt (Yokoyama *et al.*, 2005; Übersicht bei Bretscher *et al.*, 2001). Es gibt Hinweise aus unserem Labor, dass

eines der ERM Proteine, Ezrin ebenfalls durch die ZIP Kinase phosphoryliert wird (Achmet Imam Chasan, Diplomarbeit). Diese Interaktion deutet möglicherweise darauf hin, dass die ZIP Kinase ebenfalls an der Modulierung von Zellkortex und Zytoskellet in der Cytokinese beteiligt ist.

5.4. Ausblick

Die vorliegende Arbeit lässt die Frage offen, welcher Mechanismus den beobachteten Defekten in Mitose und Cytokinese zugrunde liegt. Die bei der Zelllinie $\Delta C2NLS$ beobachteten Mitosedefekte sind möglicherweise auf ein "*misattachment*" der Chromosomen an die mitotische Spindel zurückzuführen. Weitere Versuche sollten unternommen werden um festzustellen was die Funktion der ZIP Kinase bei dem Aufbau der mitotischen Spindel ist und ob sie eventuell eine Rolle bei dem Anheften der Spindel an die Chromosomen hat. Es sollte untersucht werden durch welchen Mechanismus die ZIP Kinase an das Centrosom rekrutiert wird und die Identifizierung weiterer Interaktionspartner am Centrosom sollten Aufschluss darüber geben, ob die ZIP Kinase eventuell an Zytoskelettmordnungen beteiligt ist die für die folgende Auftrennung der Chromosomen Mitose notwendig sind, oder ob sie hier bereits eine Funktion beim Aufbau der Spindel hat. Da es durch die Mutante $\Delta C2NLS$ zu keiner erhöhten Tubulinphosphorylierung kommt, ist es denkbar dass die ZIP Kinase über ein weiteres, bisher unbekanntes Protein am Aufbau der Spindel beteiligt ist. Die Identifizierung der Interaktionspartner die möglicherweise unter Kontrolle der ZIP Kinase den Aufbau des Spindelapparates regulieren, würde weitere Einsichten in die Signalwege geben an denen die ZIP Kinase während der Mitose beteiligt ist und so zur Aufklärung ihrer biologischen Funktion beitragen. Weiterhin muss geklärt werden was die biologische Bedeutung der H3 T11 Phosphorylierung ist. Es ist denkbar dass die H3 Phosphorylierung ein Signal darstellt, welches bei der Positionierung des kontraktiven Ringes im Bereich der Zentralspindel notwendig ist, oder dass die H3 T11 Phosphorylierung eine Voraussetzung ist, um das korrekte Anheften der Spindel zu gewährleisten, etwa indem sie die Kinetochore für das anschließende Anheften der Spindel markiert. Mit Hilfe eines siRNA knockdowns der ZIP Kinase sollte sich untersuchen lassen, ob die lokale Aktivierung von Rho in der späteren Teilungsfurche nach Ausschalten der ZIP Kinase beeinflusst ist und/oder ob die mitotische Spindel weiterhin korrekt an den Chromosomen angeheftet wird. Die ZIP Kinase befindet sich ab der Anaphase am kontraktiven Ring und es erhebt sich die Frage, durch welches Signal sie dort hin rekrutiert wird. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen ob die ZIP Kinase ebenfalls durch den Rho/Rock Signalweg in die Teilungsfurche rekrutiert wird und was ihre genaue Funktion dort

ist. Es ist denkbar dass die ZIP Kinase eine Effektor kinase von Rock darstellt oder aber dass sie zum Teil redundante Funktionen ausführt, und hauptsächlich durch einen anderen Signalweg reguliert wird. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden ob die ZIP Kinase nach einem siRNA knockdown von Rock weiterhin in der Teilungsfurche, bzw an den anderen mitotischen Strukturen zu finden ist. Es ist ebenfalls möglich dass die ZIP Kinase, neben einer Effektorfunktion als MLC Kinase ebenfalls an der Modulation des Zytoskelettes beteiligt ist. Da die ZIP Kinase Ezrin phosphoryliert und die Gruppe der ERM Proteine an der Verankerung der Plasmamembran und des Cytoskelletes beteiligt sind, sollten weitere Untersuchungen gemacht werden, ob diese Interaktion im Verbindung mit cytokinetischen Cytoskelettmodifikationen steht. Eine Weitere wichtige Frage ist, ob die ZIP Kinase ihre Funktion in der Cytokinese hauptsächlich durch die direkte MLC Phosphorylierung oder durch die Phosphorylierung von MYPT-1 ausübt.

6. Zusammenfassung

Mit Hilfe von ZIP Kinase Deletionsmutanten konnte der Interaktionsbereich der ZIP Kinase mit dem Centrosom und dem kontraktilen Ring auf die C-terminale Domäne zwischen den AS 337 und 448 eingegrenzt werden. Die Interaktionsdomäne für das Centromer konnte nicht eindeutig geklärt werden, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass die Kinase über die Kinasedomäne mit dem Centromer interagiert.

Das ursprüngliche Ziel aus der Interaktionsdomäne Peptide abzuleiten, um mit der Funktion der endogenen ZIP Kinase zu interferieren, konnte nur bedingt erfüllt werden. Peptide die aus der C-terminalen Domäne abgeleitet wurden, lösten zu 80% Apoptose aus, der entstandene Phänotyp ähnelte zum Teil einem siRNA Phänotyp, bei dem entweder mehrkernige Zellen auftreten oder Apoptose ausgelöst wird, so dass davon ausgegangen werden kann dass die Mutanten mit der ZIP Kinase interferierten.

Die Expression der Mutante $\Delta C2NLS$ brachte Zellen hervor, die zuerst eine mit der wt Zelllinie, oder mit der Zelllinie $\Delta N1$ vergleichbare Expression, später eine starke Akkumulation der Mutante zeigten. Die starke Expression der Mutante korrelierte mit einer Reihe von Defekten. Die Zellen waren oftmals mehrkernig, wobei hier zwischen einzelnen Kernen die normal rund waren, oder Kernen die aus deformierten, zusammenhängenden Kernen bestanden oder einer Kombination aus beiden unterschieden werden konnte. Weiterhin korrelierte mit der starken Expression auch mit Defekten in den späten Mitosestadien, es traten in der hi Population 30% mehr Zellen auf, die einen DNA Gehalt von mehr als 4N hatten, als in den übrigen Zelllinien.

Um die Ursachen für die Defekte zu ermitteln, wurden unterschiedliche Sachverhalte untersucht: Die Mutante $\Delta C2NLS$ beeinflusste nicht die Expression der ZIP Kinase, die vergleichbar mit der der Kontroll MCF-7 Zellen war. Weiterhin korrelierte die starke Expression der Mutante mit Beeinflussung des Aktomyosin Zytoskellets und die Zellen waren schneller im Aufbau der mitotischen Spindel als die Kontroll MCF7 Zellen. Die Funktion der ZIP Kinase während der Mitose konnte zwar nicht eindeutig geklärt werden, jedoch deuten all diese Defekte auf eine Beteiligung der ZIP Kinase am Spindelaufbau, sowie an der Remodulierung des Cytoskellets und der Regulation der Kontraktion während der Cytokinese hin. Es ist jedoch unklar wie die ZIP Kinase sich am Spindelaufbau beteiligt und ob die Mitosedefekte eine direkte Konsequenz einer fehlerhaften Chromosomen

Auftrennung ist. Weiterhin bleibt zu klären welche die Funktion der ZIP Kinase während der Cytokinese ist, es ist nicht klar ob sie sich direkt an der MLC Phosphorylierung beteiligt und / oder an der Regulierung der Myosin-Phosphatase Aktivität.

7. Literaturverzeichnis

Ando, S., H. Yang, N. Nozaki, T. Okazaki, and K. Yoda. 2002. CENP-A, -B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells. *Mol. Cell Biol.* **22**:2229-2241

Adams, R. R., Carmena, M. and Earnshaw, W. C. (2001a). Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* **11**, 49-54.

Amano, M., Fukata, Y. and Kaibuchi, K. (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* **261**, 44-51.

Bement, W. M., Benink, H. A. and von Dassow, G. (2005). A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *J Cell Biol* **170**, 91-101.

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**, 5833-7.

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**, 881-90.

Boulikas, T. (1993) Nuclear localization signals (NLS). *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **3**, 193-227.

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**, 115-28.

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**, 17524-34.

Cheng, L. L., Stoev, S., Manning, M., Derick, S., Pena, A., Mimoun, M. B. and Guillon, G. (2004). Design of potent and selective agonists for the human vasopressin V1b receptor based on modifications of [deamino-cys1]arginine vasopressin at position 4. *J Med Chem* **47**, 2375-88.

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**, 141-8.

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.

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.

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**, 42055-61.

- 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**, 1408-17.
- Floridi, A. and Fanciulli, M.** (2007). Che-1: a new effector of checkpoints signaling. *Cell Cycle* **6**, 804-6.
- Graves, P.R., Winkfield, K.M. and Haystead, T.A.** (2005) Regulation of zipper-interacting protein kinase activity in vitro and in vivo by multisite phosphorylation. *J. Biol.Chem.* **280**: 9363-9374
- 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**, 957-62.
- 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**, 4596-603.
- Hagerty, L., Weitzel, D. H., Chambers, J., Fortner, C. N., Brush, M. H., Loiselle, D., Hosoia, H. and Haystead, T. A.** (2007). ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase. *J Biol Chem* **282**, 4884-93.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Haystead, T. A.** (2005). ZIP kinase, a key regulator of myosin protein phosphatase 1. *Cell Signal* **17**, 1313-22.
- Hendzel, M. J. and Bazett-Jones, D. P.** (1997). Fixation-dependent organization of core histones following DNA fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma* **106**, 114-23.
- Hickson, G. R., Echard, A. and O'Farrell, P. H.** (2006). Rho-kinase controls cell shape changes during cytokinesis. *Curr Biol* **16**, 359-70.
- Honda, R., Korner, R. and Nigg, E. A.** (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* **14**, 3325-41.
- Hughes, S. C. and Fehon, R. G.** (2007). Understanding ERM proteins--the awesome power of genetics finally brought to bear. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 51-6.
- Kawai, T., Akira, S. and Reed, J. C.** (2003). ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains. *Mol Cell Biol* **23**, 6174-86.
- 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**, 1642-51.
- 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.
- 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**, 403-7.

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.

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**, 7212-8.

Kögel, D., Plottner, 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**, 2645-54.

Kögel, D., Prehn, J. H. and Scheidtmann, K. H. (2001a). The DAP kinase family of proapoptotic proteins: novel players in the apoptotic game. *Bioessays* **23**, 352-8.

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**, 243-54.

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**, 4991-6.

Leister, P., Burgdorf S. and Scheidtmann K.H. (2003) Apoptosis antagonizing transcription factor AATF is a novel coactivator of nuclear hormone receptors. *Signal Transduction*, **1-2** 17-25.

Li, D. W., Yang, Q., Chen, J. T., Zhou, H., Liu, R. M. and Huang, X. T. (2005). Dynamic distribution of Ser-10 phosphorylated histone H3 in cytoplasm of MCF-7 and CHO cells during mitosis. *Cell Res* **15**, 120-6.

Luders, J. and Stearns, T. (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 161-7.

MacDonald, J. A., Borman, M. A., Muranyi, A., Somlyo, A. V., Hartshorne, D. J. and Haystead, T. A. (2001a). Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2419-24.

MacDonald, J. A., Eto, M., Borman, M. A., Brautigan, D. L. and Haystead, T. A. (2001b). Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett* **493**, 91-4.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-34.

Matsumura, F. (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol* **15**, 371-7.

Matsumura, F., Ono, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G. and Yamashiro, S. (1998). Specific localization of serine 19 phosphorylated myosin II during cell locomotion and mitosis of cultured cells. *J Cell Biol* **140**, 119-29.

Mitchell, P. J. and Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, **245**, 371-378.

- Müller, H.J.** 2001 Polymerase-Kettenreaktion (PCR), das Methodenbuch. (2001). *Spektrum akademischer Verlag*, Berlin, Heidelberg.
- Tjian,R. and Maniatis,T.** (1994) Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell*, **77**, 5-8.
- Morris, C. A. and Moazed, D.** (2007). Centromere assembly and propagation. *Cell* **128**, 647-50.
- 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**, 2193-205.
- 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**, 8175-83.
- 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**, 81-4.
- Musacchio, A. and Salmon, E. D.** (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-93.
- Nagata Y., Jones M.R., Nguyen H.G., McCrann D.J., St Hilaire C., Schreiber B.M., Hashimoto A., Inagaki M., Earnshaw W.C., Todokoro K. and Ravid K.**(2005). Vascular smooth muscle cell polyploidization involves changes in chromosomal passenger proteins and an endomitotic cell cycle. *Exp. Cell Res.* **305**(2):277-91
- 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**, 119-24.
- Nelson,H.C.** (1995) Structure and function of DNA-binding proteins. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **5**, 180- 189.
- Ng, Y. P., Cheung, Z. H. and Ip, N. Y.** (2006). STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling and functions. *J Biol Chem* **281**, 15636-44.
- Niuro, N. and Ikebe, M.** (2001). Zipper-interacting protein kinase induces Ca(2+)-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* **276**, 29567-74.
- Niuro, N., Koga, Y. and Ikebe, M.** (2003). Agonist-induced changes in the phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin light chain phosphatase and CPI17, two regulatory factors of myosin light chain phosphatase, in smooth muscle. *Biochem J* **369**, 117-28.
- Nishimura, Y. and Yonemura, S.** (2006). Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci* **119**, 104-14.
- 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**, 471-83.

- Ohkura, H., Hagan, I.M. and Glover, D.M.** (1995) The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase plo1, 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.
- Page, G., Kogel, D., Rangnekar, V. and Scheidtmann, K. H.** (1999a). Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis. *Oncogene* **18**, 7265-73.
- Page, G., Lodige, I., Kogel, D. and Scheidtmann, K. H.** (1999b). AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS Lett* **462**, 187-91.
- Passananti, C. and Fanciulli, M.** (2007). The anti-apoptotic factor Che-1/AATF links transcriptional regulation, cell cycle control, and DNA damage response. *Cell Div* **2**, 21.
- 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**, 857-62.
- Preuss, U., Bierbaum, H., Buchenau, P. and Scheidtmann, K. H.** (2003a). 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**, 447-59.
- Preuss, U., Landsberg, G. and Scheidtmann, K. H.** (2003b). Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res* **31**, 878-85.
- 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**, 259-65.
- Raveh, T. and Kimchi, A.** (2001). DAP kinase-a proapoptotic gene that functions as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* **264**, 185-92.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; and Maniatis, T.** (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, third edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Plainview, New York
- 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**, 29066-71.
- 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**, 1543-52.
- Satterwhite, L. L. and Pollard, T. D.** (1992). Cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 43-52.
- Scheidtmann, K.H.** (2007). Dlk/ZIP Kinase, a novel Ser/Thr-specific protein kinase with multiple functions. *Signal Transduction* **7**, 248-259.
- Scheidtmann, K. H., Echle, B. and Walter, G.** (1982). Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J Virol* **44**, 116-33.
- 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**, 672-9.

- 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**, 3823-32.
- 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**, 457-66.
- 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**, 8611-26.
- Shohat, G., Shani, G., Eisenstein, M. and Kimchi, A. (2002a). The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases. *Biochim Biophys Acta* **1600**, 45-50.
- Shohat, G., Spivak-Kroizman, T., Eisenstein, M. and Kimchi, A. (2002b). The regulation of death-associated protein (DAP) kinase in apoptosis. *Eur Cytokine Netw* **13**, 398-400.
- 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**, 581-92.
- Vagnarelli, P. and Earnshaw, W. C. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* **113**, 211-22.
- 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**, 4253-65.
- 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**, 266-72.
- Wiese, C. and Zheng, Y. (2006). Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci* **119**, 4143-53.
- Yamakita, Y., Yamashiro, S. and Matsumura, F. (1994). In vivo phosphorylation of regulatory light chain of myosin II during mitosis of cultured cells. *J Cell Biol* **124**, 129-37.
- Yamashiro, S., Totsukawa, G., Yamakita, Y., Sasaki, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Narumiya, S. and Matsumura, F. (2003). Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Mol Biol Cell* **14**, 1745-56.
- Yanagida, M. (2005). Basic mechanism of eukaryotic chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 609-21.
- Yokoyama, T., Goto, H., Izawa, I., Mizutani, H. and Inagaki, M. (2005). Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (ERM). *Genes Cells* **10**, 127-37.
- Yüce, Ö., Piekny, A. and Glotzer, M. (2005). An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol* **170**, 571-582.

8.Anhang

Posterpräsentationen

Steve Manderscheid, Gerd Landsberg and Karl Heinz Scheidtmann

Dlk/ZIP Kinase is involved in Mitosis and Cytokinesis. Meeting of the Signal Transduction Society, 25.01-28.01 2004 Luxembourg

Veröffentlichungen:

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.

Manuskripte in Vorbereitung:

Manderscheid S, Immam Chasan A, Keller C, Endl E, Landsberg G and Scheidtmann KH: Dlk/ZIP Kinase plays an essential role in mitosis and cytokinesis (in Vorbereitung)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für die Betreuung meiner Arbeit danken.

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

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Scheidtmann danke ich für die gute Zusammenarbeit. Ein ganz besonderer Dank geht an meinen beiden Freunde Gerd und Peter, die aufgrund ihrer Unterstützung innerhalb und ausserhalb des Labors zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Institutsmitgliedern danke ich sehr für ihre Hilfsbereitschaft.

Meiner Freundin Susan danke ich ganz besonders für das bereitwillige Korrekturlesen meiner Arbeit und auch sonst für ihre Geduld und stetige Unterstützung.

Ein herzlicher Dank geht an meine Familie, so wie an all meine Freunde für deren Unterstützung.

Last but not least bedanke ich mich bei einer bestimmten kalifornischen Firma, deren hervorragende Produktpalette es mir ermöglichte diese Dissertation absturzfrei zu verfassen.

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.

Bonn, den 28. August 2007

Steve Manderscheid