

Identifizierung von Cyclin L2 und des Spleißfaktors SF3B1 als Substrate der Proteinkinase DYRK1A

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin Katrin de Graaf
aus Krefeld

Berichter:

apl. Professor Dr. rer. nat. W. Becker
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. F. Kreuzaler

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Proteinkinasen	1
1.2 Die DYRK-Familie	2
1.3 DYRK1A	3
1.4 Interaktionspartner der Proteinkinase DYRK1A	4
1.5 Zielsequenz der DYRK1A-Phosphorylierung	6
1.6 Zielsetzung	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.1.1 Chemikalien	9
2.1.2 Medien und Lösungen	9
2.1.3 Antikörper	11
2.1.4 Plasmide	11
2.1.5 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Wirtsstämme	12
2.1.6 cDNA-Bibliotheken, <i>Northern-Blots</i>	12
2.2 Molekularbiologische Grundtechniken	12
2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren	13
2.2.1.1 DNA Präparation aus <i>E. coli</i>	13
2.2.1.2 RNA Präparation aus Säugerzellen	13
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	13
2.2.3 <i>Blot</i> - und Hybridisierungstechniken	14
2.2.3.1 <i>Northern-Blot</i>	14
2.2.3.2 <i>Southern-Blot</i>	14
2.2.3.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	14
2.2.3.4 <i>Southern</i> - und <i>Northern-Blot</i> -Hybridisierung	14
2.2.4 Erststrang cDNA-Synthese	15
2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
2.2.6 DNA-Sequenzierung	18
2.2.7 Mutagenese	19
2.2.8 Konstrukte und Sonden	19
2.2.8.1 Bakterielle Expressionskonstrukte	19
2.2.8.2 Säuger-Expressionskonstrukte	23
2.3 Mikrobiologische Methoden	27
2.3.1 Kultivierung von Bakterienzellen	27
2.3.2 Transformation von <i>E. coli</i>	27
2.3.2.1 Transformation chemisch kompetenter DH5 α -Zellen	27

2.3.2.2 Elektrotransformation von DH5 α -Zellen	27
2.4 Zellkultur.....	28
2.4.1 Zellen	28
2.4.2 Subkultivierung der Zelllinien	28
2.4.3 Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen.....	28
2.4.3.1 Calciumphosphat-Präzipitation	28
2.4.3.2 Transfektion mit FuGENE TM 6	29
2.4.4 Lokalisationsanalysen	29
2.4.5 Detektion der <i>in vivo</i> -Phosphorylierung	29
2.5 Proteinchemische Methoden.....	30
2.5.1 Expression und Aufreinigung von Proteinen in Bakterien	30
2.5.1.1 GST-Fusionsproteine	30
2.5.1.2 His-Fusionsproteine.....	30
2.5.1.3 Aufreinigung von <i>Inclusion Bodies</i>	31
2.5.1.4 Gelfiltration	32
2.5.1.5 <i>Pulldown</i> -Experimente.....	32
2.5.2 Präparation von Proteinen aus Säugerzellen.....	32
2.5.2.1 Präparation von Kernproteinen aus Maushoden	32
2.5.2.2 Präparation von Gesamtzelllysaten	33
2.5.2.3 Immunpräzipitation	33
2.5.3 <i>Western-Blot</i> -Analyse	34
2.5.3.1 <i>Western-Blot</i>	34
2.5.3.2 Immunchemische Detektion von <i>Western-Blots</i>	34
2.5.3.3 Entfernen von spezifisch gebundenem Antikörper	35
2.6 Phosphorylierungsreaktionen	35
2.6.1 Definition der katalytischen Einheit für DYRK1A.....	35
2.6.2 Festphasen-Phosphorylierung	35
2.6.3 <i>In vitro</i> -Kinase-Assay	36
2.6.4 K _m -Wert-Bestimmung.....	36
2.6.5 Vergleichende K _m -Wert-Abschätzung (DYRK1A und CDK2).....	37
2.6.6 Immunkomplex-Kinase-Assay	37
2.6.7 SAPtide-Assay.....	38
2.7 Massenspektrometrische Analyse von Phosphorylierungsstellen	38
2.8 Peptide Mapping	39
2.9 RNA- <i>Interference</i>	40
2.10 Verwendete Computerprogramme für die Datenbank-Recherchen	40

3. Ergebnisse	41
3.1 Festphasen-Phosphorylierung einer cDNA Expressionsbibliothek	41
3.2 DYRK1A phosphoryliert <i>in vitro</i> verschiedene Proteine mit RS-Domänen	46
3.3 Cyclin L2	47
3.3.1 Sequenzanalyse	47
3.3.2 Genomische Organisation	52
3.3.3 Alternative gespleißte Transkripte von <i>CCNL2</i> und <i>CCNL1</i>	53
3.3.3.1 <i>Northern-Blot</i> -Analysen	53
3.3.3.2 RT-PCR-Analysen	56
3.3.4 Regulation der Genexpression von <i>CCNL1</i> und <i>CCNL2</i>	58
3.3.5 Herstellung eines Cyclin L2-spezifischen Antiserums und Nachweis des Proteins <i>in vivo</i>	59
3.3.6 Subzelluläre Lokalisation von Cyclin L2, Cyclin L1 und Kolo- kalisierung mit Spleißfaktoren	60
3.3.7 Identifizierung der Cyclin L2 bindenden Domäne von DYRK1A	62
3.3.8 Phosphorylierung von Cyclin L2	63
3.3.8.1 Identifizierung der <i>in vitro</i> -Phosphorylierungsstellen	63
3.3.8.2 <i>In vivo</i> -Phosphorylierung von Cyclin L2	64
3.4 SF3B1	66
3.4.1 DYRK1A phosphoryliert SF3B1 mit hoher Affinität	66
3.4.1.1 K_m -Wert-Bestimmung der Phosphorylierung von His ₆ -SF3B1 Δ durch DYRK1A	66
3.4.1.2 Vergleichende Phosphorylierung der Konstrukte His ₆ -SF3B1 Δ und SF3B1NT-His ₆ durch DYRK1A	67
3.4.2 Vergleichende Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A und CDK2	68
3.4.2.1 SF3B1 als <i>in vitro</i> -Substrat von CDK2/Cyclin E	68
3.4.2.2 Vergleich der Affinitäten von DYRK1A und CDK2 zu SF3B1	69
3.4.2.3 Vergleich der Phosphorylierungsmuster von SF3B1 nach DYRK1A- und CDK2-Phosphorylierung mit dem <i>in vivo</i> -Phosphorylierungsmuster	70
3.4.3 Identifizierung von Aminosäuren in SF3B1, die durch DYRK1A <i>in vitro</i> phosphoryliert werden	73
3.4.3.1 Massenspektrometrische Analyse von SF3B1 nach Phosphorylierung durch DYRK1A	73
3.4.3.2 Untersuchungen von Punktmutanten durch Kinase-Assays	73
3.4.3.3 Untersuchung der Punktmutanten mit Hilfe des <i>Peptide Mappings</i>	75
3.4.3.4 Identifizierung einer neuartigen Zielsequenz, die durch DYRK1A phosphoryliert wird	77
3.4.4 Identifizierung einer <i>in vivo</i> -Phosphorylierungsstelle in SF3B1	78

3.4.5 <i>In vivo</i> -Phosphorylierung von SF3B1 in COS-7 Zellen	79
3.4.5.1 Charakterisierung eines phosphospezifischen Antikörpers, der die Phosphorylierung in SF3B1 durch DYRK1A detektiert	79
3.4.5.2 Dosis-abhängige Phosphorylierung durch DYRK1A	81
3.4.5.3 Phosphorylierung von SF3B1 durch die Aktivitäts-reduzierte Punktmutante DYRK1AK188R und die verwandte Kinase CLK3	83
3.4.5.4 Phosphorylierung von SF3B1 durch Mitglieder der DYRK-Familie	84
3.4.5.5 Überexprimierte DYRK1A phosphoryliert endogene Phosphorylierungsstellen von SF3B1	85
3.4.6 Verminderung der DYRK1A-Expression durch RNA- <i>Interference</i> und Auswirkung auf die Phosphorylierung von SF3B1	87
4. Diskussion	89
4.1 Cyclin L2	89
4.1.1 Cyclin L2, ein neues Cyclin aus der Gruppe der Transkriptions- regulatorischen Cycline	89
4.1.2 Die RS-Domäne von Cyclin L2 vermittelt die Interaktion mit Spleißfaktoren und eine Kolokalisation mit diesen Proteinen in <i>Nuclear Speckles</i>	90
4.1.3 Vergleichende Charakterisierung von Cyclin L2 und Cyclin L1	92
4.1.4 Interaktion der Proteinkinase DYRK1A mit Cyclin L2	94
4.2 SF3B1	95
4.2.1 Phosphorylierung durch die Proteinkinase CDK2	95
4.2.2 <i>In vivo</i> -Phosphorylierung	96
4.2.3 Identifizierung einer neuartigen Phosphorylierungs-Zielsequenz von DYRK1A	97
4.3 Über welche Effektoren wird die Funktion von DYRK1A vermittelt?	99
4.4 Eine neue Methode zur Identifizierung von Substraten	100
5. Zusammenfassung	103
6. Anhang	105
6.1 Verzeichnis der Abkürzungen	105
6.2 Verzeichnis der Abbildungen	107
6.3 Verzeichnis der Tabellen	108
7. Literatur	109

1. Einleitung

1.1 Proteinkinasen

Ein bedeutender Mechanismus der Regulation von Proteinfunktionen in Eukaryonten ist die reversible Phosphorylierung durch Proteinkinasen. Dabei wird die endständige Phosphatgruppe des ATP (Adenosin-Tri-Phosphat) meist auf Serine, Threonine und Tyrosine übertragen. Die enorme Zahl an Proteinkinasen spiegelt die Vielfalt der möglichen regulatorischen Funktionen wider. Im Menschen umfasst die Superfamilie der Proteinkinasen 518 Mitglieder und damit etwa 1.7% aller menschlichen Gene (Manning *et al.*, 2002). Die Superfamilie wird anhand der Strukturähnlichkeiten ihrer Mitglieder in verschiedene Gruppen aufgeteilt. Die DYRK-Familie, mit der sich diese Arbeit befasst, gehört der CMGC-Gruppe an (Hanks und Hunter, 1995; Manning *et al.*, 2002, Abb. 1.1). In dieser Gruppe sind unter anderem die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), die MAP-Kinasen, die GSK3/CK2-Familie und die CLK-Familie zusammengefasst (Hanks und Hunter, 1995). Diese Kinasen sind an der Regulation wichtiger Zellprozesse, wie zum Beispiel Zellzyklus (einige CDK-Mitglieder) oder Spleißen (CLK-Familie) beteiligt.

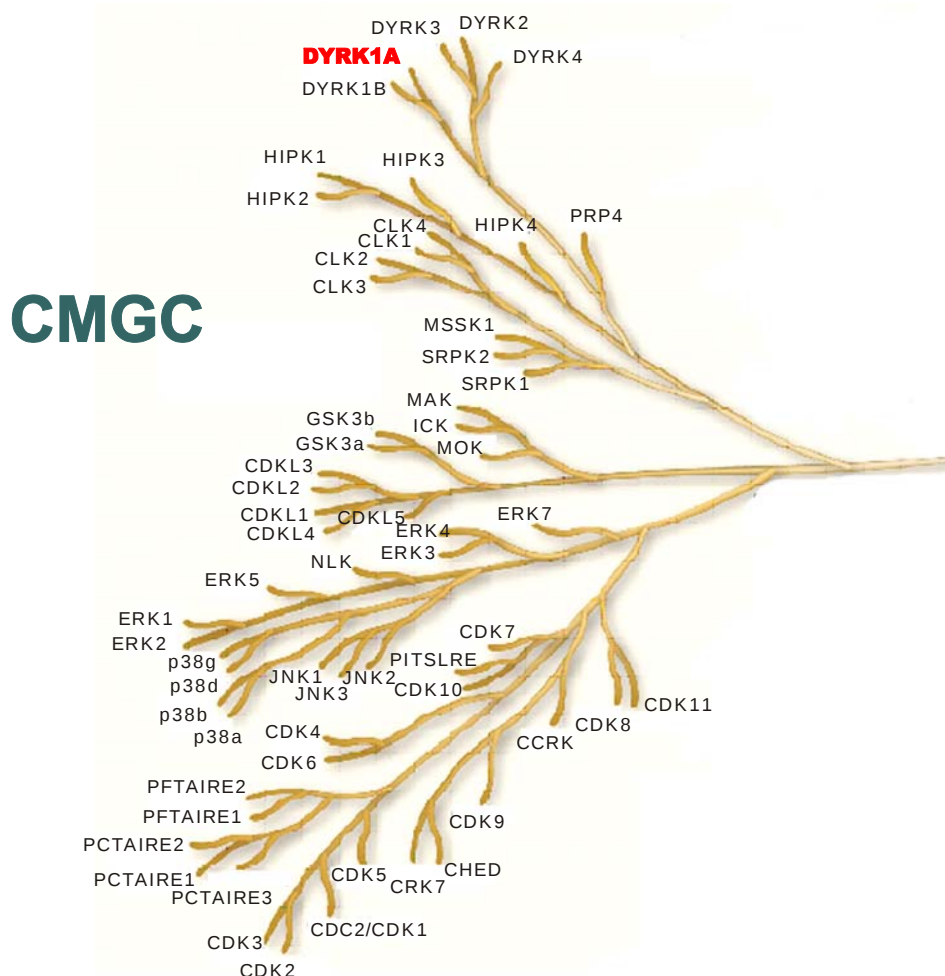


Abb. 1.1: Die CMGC-Gruppe der Proteinkinasen

Modifiziert nach Manning *et al.*, (2002)

Obwohl durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms inzwischen alle Proteinkinasen bekannt sind, bestehen hinsichtlich der Aufklärung ihrer Funktion noch enorme Lücken. Dabei ist dieser Aspekt von großer Bedeutung, da Inhibitoren der Proteinkinasen wichtige, therapeutisch anwendbare Pharmaka darstellen können (Cohen, 2002). Für die CDK-Familie sind bereits zahlreiche Inhibitoren identifiziert worden, von denen einige bereits klinisch erprobt werden (Knockaert *et al.*, 2002). Um die Folgen einer therapeutisch durchgeführten Hemmung von Proteinkinasen beurteilen zu können, ist es von besonderer Bedeutung, die physiologischen Substrate der Kinasen zu identifizieren.

1.2 Die DYRK-Familie

Diese Arbeit befasst sich mit der Identifizierung von Substraten der Proteinkinase DYRK1A, einem Mitglied der DYRK-Familie. Weitere Vertreter dieser Familie sind DYRK1B, DYRK2, DYRK3 und DYRK4 (Becker und Joost, 1999; Wiechmann *et al.*, 2003). Neben der *DYRK-Homology-(DH-)Box*, einer Ansammlung saurer Reste (DDDNxDY; Becker und Joost, 1999), beschränken sich strukturelle Gemeinsamkeiten hauptsächlich auf die katalytische Domäne (Becker *et al.*, 1998). Das gemeinsame Sequenzmotiv „Tyr x Tyr“ zwischen den Subdomänen VII und VIII der katalytischen Domäne ist von besonderer Bedeutung, da die Phosphorylierung des zweiten Tyrosins Voraussetzung für die katalytische Aktivität von DYRK1A und DYRK3 ist (Kentrup *et al.*, 1996; Himpel *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002). Diese Aktivierungsschleife ähnelt dem Thr-x-Tyr-Motiv der MAPK-Familie und nimmt in einem Strukturmodell von DYRK1A eine analoge Position ein (Himpel *et al.*, 2001; Wiechmann *et al.*, 2003). Der Aktivierungsmechanismus der DYRK-Familie durch Tyrosin-Autophosphorylierung unterscheidet sich allerdings von dem der MAP-Kinasen, die durch duale Phosphorylierung des Tyrosin- und des Threonin-Restes durch spezielle *Upstream*-Kinasen aktiviert werden (Marshall, 1995). Aufgrund der Autophosphorylierung eines Tyrosin-Restes und der Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten in exogenen Substraten werden die Mitglieder der DYRK-Familie als dualspezifische Kinasen bezeichnet. Die duale Spezifität und die Regulation der Kinaseaktivität über die Tyrosin-Phosphorylierung in einer Aktivierungsschleife gaben der Familie ihren Namen, wobei das Akronym DYRK für „Dual-Specificity Tyrosine (Y) Phosphorylation-Regulated Kinase“ steht.

Obwohl die Kinasen strukturell eng verwandt sind und über den gleichen Mechanismus aktiviert werden, unterscheiden sie sich in vielen anderen Aspekten. Mit Ausnahme von DYRK1A, die ubiquitär exprimiert wird, sind alle Mitglieder hauptsächlich im Hoden nachweisbar (Becker *et al.*, 1998). Auch die subzelluläre Lokalisation der Mitglieder ist verschieden, was auf unterschiedliche Funktionen der Kinasen schließen lässt.

DYRK1A und DYRK1B sind hauptsächlich im Kern lokalisiert (Becker *et al.*, 1998; Leder *et al.*, 1999), wohingegen DYRK2 ein zytoplasmatischer Vertreter der DYRK-Familie ist (Song *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 1998). Ein weiterer Unterschied der Kinasen besteht hinsichtlich ihrer Spezifität für bestimmte Substrate (Becker *et al.*, 1998).

1.3 DYRK1A

Die Proteinkinase DYRK1A war das erste Mitglied der DYRK-Familie, das kloniert und charakterisiert wurde. Neben der Kinasedomäne und der *DH-Box*, die in allen Mitgliedern der DYRK-Familie hoch konserviert sind, weist die Kinase weitere charakteristische Sequenzmotive auf. Im N-Terminus befindet sich ein zweiteiliges Kern-Lokalisationssignal (Kentrup *et al.*, 1996), und Analysen mit GFP-Fusionskonstrukten des N-Terminus belegen die nukleäre Lokalisation (Becker *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde ein weiteres Sequenzmotiv mit einer Reihe von 13 Histidin-Resten im C-Terminus der Kinase identifiziert, das zu einer Anreicherung im Kern in so genannten *Nuclear Speckles* führt (Álvarez *et al.*, 2003). Der C-Terminus enthält eine „PEST-Region“, die als Signal für einen schnellen Abbau in der Zelle gilt (Rogers *et al.*, 1986).

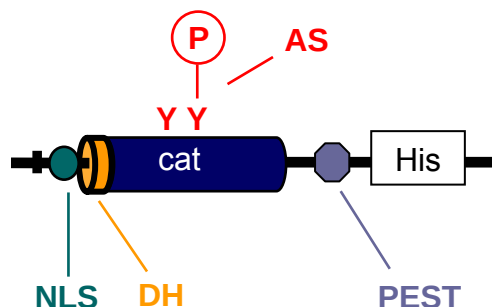


Abb. 1.2: Der strukturelle Aufbau der Proteinkinase DYRK1A

In der schematischen Darstellung sind das Kernlokalisierungssignal (NLS), die *DH-Box* (DH), die katalytische Domäne (cat), die Aktivierungsschleife mit zwei konservierten Tyrosin-Resten (AS), die PEST-Region (PEST) und das Motiv aus 13 Histidin-Resten (His) eingezeichnet.

DYRK1A wird sowohl auf der Ebene der Genexpression als auch direkt, durch Beeinflussung der katalytischen Aktivität, reguliert. In aktivierten T-Lymphozyten (Teague *et al.*, 1999), in Melanom-Zelllinien (de Wit *et al.*, 2002) und in menschlichen neutrophilen Granulozyten, die Bakterien ausgesetzt wurden (Subrahmanyam *et al.*, 2001), wird DYRK1A differentiell exprimiert. In der hippocampalen Vorläuferzelllinie H19-7 wird die katalytische Aktivität von DYRK1A durch den *Fibroblast Growth Factor* induziert (Yang *et al.*, 2001). Das oder die Proteine, die diese Aktivitätssteigerung am Ende der Signalkette vermitteln, sind noch nicht bekannt. Eine direkte

Aktivitätssteigerung gegenüber dem Substrat Histon H3 kann *in vitro* durch das Adenovirus E1A Oncoprotein erzielt werden (Zhang *et al.*, 2001).

Das menschliche Gen von DYRK1A ist auf Chromosom 21 in der Down-Syndrom-kritischen Region lokalisiert (DSCR; Guimerá *et al.*, 1996; Ohira *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997). Das Down-Syndrom ist eine der häufigsten, mit einer geistigen Retardierung einhergehenden, genetischen Erkrankungen des Menschen. Die Down-Syndrom-kritische Region umfasst 20 Gene und wurde definiert durch die Genanalyse von Patienten mit partieller Trisomie 21 (Delabar *et al.*, 1993). Transgene Mäuse, die ein 1.8 Mb großes Fragment aus der menschlichen DSCR zusätzlich exprimieren, zeigen verschiedene abnorme Verhaltensweisen und Lerndefizite (Smith *et al.*, 1997). Die alleinige Überexpression von DYRK1A in transgenen Mäusen führt schon zu Lerndefiziten und neuroentwicklungs-spezifischen Veränderungen (Altafaj *et al.*, 2001). Darüber hinaus besitzen heterozygote *Knockout*-Mäuse (DYRK1A +/-) eine abnormale Morphologie des Gehirns. Der homozygote *Knockout* des DYRK1A-Gens führt zu embryonaler Letalität der Mäuse (Fotaki *et al.*, 2002). In *Drosophila melanogaster* führt eine reduzierte Expression des DYRK1A-Orthologs MNB (*minibrain*) zu einer signifikanten Reduktion von Neuronen in bestimmten Bereichen des Gehirns. Diese Reduktion geht mit Verhaltensstörungen der Fliegen einher (Tejedor *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse belegen eine wichtige Beteiligung von DYRK1A an der Entwicklung des zentralen Nervensystems.

1.4 Interaktionspartner der Proteinkinase DYRK1A

Bislang ist nicht bekannt, wie die Funktion von DYRK1A auf molekularer Ebene vermittelt wird. In den letzten Jahren wurden jedoch einige Interaktionspartner der Proteinkinase identifiziert. Dabei handelt es sich um bindende Proteine und Substrate der Kinase, die in Tab. 1.1 zusammengefasst sind. Vier der identifizierten Proteine sind Transkriptionsfaktoren (FKHR, STAT3, GLI1, CREB), die Schlüsselfunktionen in der Zellentwicklung ausüben. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren kann durch DYRK1A auf unterschiedliche Weise gesteigert werden.

FKHR (*forkhead in rhabdomyosarcoma*) ist ein Transkriptionsfaktor, der durch vielfältige Phosphorylierung reguliert wird (Woods und Rena, 2002). DYRK1A phosphoryliert FKHR *in vitro* an Serin 329, einer *in vivo*-Phosphorylierungsstelle, die in verwandten Proteinen (FKHR-L1 und AFX) konserviert ist (Woods *et al.*, 2001a). Von Groote-Bidlingmaier und Kollegen (2003) konnten zeigen, dass DYRK1A einen positiven Effekt auf die FKHR-abhängige Promoteraktivität hat, der allerdings unabhängig von der katalytischen Aktivität der Kinase ist.

STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) ist Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch Cytokine des IL-6-Typs reguliert werden (Heinrich *et al.*, 2003). Die frühe Letalität von STAT3-Knockout-Mäusen lässt auf eine wichtige Funktion in der Embryogenese schließen (Levey und Lee, 2002). DYRK1A phosphoryliert STAT3 an Serin-727 (Matsuo *et al.*, 2001; Wiechmann *et al.*, 2003). Es gibt Hinweise für eine transaktivierende Funktion der Serin-727-Phosphorylierung (Schuringa *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003), auch wenn ein direkter Nachweis anhand von Promoterstudien in diesen Untersuchungen fehlt. Ob DYRK1A tatsächlich *in vivo* diesen Rest phosphoryliert, oder ob andere Kinasen diese Funktion ausfüllen, wird sich durch weitere Untersuchungen zeigen.

Tab. 1.1: Substrate und Bindungspartner der Proteinkinase DYRK1A

Substrat/ Bindungspartner	Phospho- rylierung	Inter- aktion ¹	Effekt	Referenz
FKHR	<i>in vitro</i>	Ko-IP	Stimulation des Kern-Exports ² , Stimulation der Transkription ³	Woods <i>et al.</i> , 2001a von Groote-Bidlingmaier <i>et al.</i> , 2003
STAT3	<i>in vivo</i> ⁴	-	-	Matsuo <i>et al.</i> , 2001 Wiechmann <i>et al.</i> , 2003
CREB1	<i>in vivo</i> ⁴	Y2H, Ko-IP	Stimulation der Transkription ³	Yang <i>et al.</i> , 2001
GLI1	<i>in vitro</i>	-	Stimulation der Transkription ³	Mao <i>et al.</i> , 2002
E1A	-	<i>Pulldown-Assay</i>	E1A stimuliert die Aktivität von DYRK1A	Zhang <i>et al.</i> , 2001
eIF2Bε	<i>in vitro</i>	-	<i>Priming</i> -Phosphorylierung für GSK3	Woods <i>et al.</i> , 2001b
Tau	<i>in vitro</i>	-	<i>Priming</i> -Phosphorylierung für GSK3	Woods <i>et al.</i> , 2001b
Dynamin	<i>in vitro</i>	<i>Pulldown-assay</i>	Regulation von Protein/Protein-Interaktion	Cheng-Hwang <i>et al.</i> , 2002

¹ Ko-IP, Ko-Immunpräzipitation; Y2H, *Yeast-Two-Hybrid*

² Verstärkte Kernlokalisation einer Punktmutante des *in vitro* durch DYRK1A phosphorylierten Serins

³ Kotransfektion von DYRK1A verursacht erhöhte Aktivität in Reporter-Gen-Assays

⁴ Kotransfektion von DYRK1A verursacht verstärkte Phosphorylierung

CREB1 (*cAMP responsive element binding protein*) ist ein Transkriptionsfaktor, der bei der neuronalen Entwicklung und Differenzierung eine wichtige Rolle spielt (Lonze und Ginty, 2002). Durch Aktivierung von DYRK1A in H19-7 Zellen wird CREB phosphoryliert und die CREB-abhängige Promoteraktivität gesteigert. Die DYRK1A Aktivierung führt darüber hinaus zu einer Differenzierung dieser Hippocampus-Vorläufer-Zellen (Yang *et al.*, 2001).

Der Transkriptionsfaktor GLI1 (*glioma associated oncogene*) wird über den *Hedgehog*-Signalweg reguliert, der die gewebsspezifische Zellteilung während der Embryogenese kontrolliert (Villavicencio *et al.*, 2000). Durch Überexpression von katalytisch aktiver DYRK1A kommt es zu einer Anreicherung des Transkriptionsfaktors im Kern und dadurch zu einer erhöhten GLI1-abhängigen Promoteraktivität. Zusätzlich kann DYRK1A die Promoteraktivität auf direktem Wege steigern (Mao *et al.*, 2002).

Neben den genannten im Kern lokalisierten Transkriptionsfaktoren sind kürzlich auch einige zytoplasmatische Proteine als *in vitro*-Substrate von DYRK1A identifiziert worden (eIF2B ϵ , Tau, Woods *et al.*, 2001b; Dynamin, Chen-Hwang *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von eIF2B ϵ und Tau erfolgt *in vitro* auch durch zytoplasmatisch lokalisierte Vertreter der DYRK-Familie (DYRK2, DYRK3, Woods *et al.*, 2001b), die als verantwortliche Kinasen in Frage kommen.

Trotz der identifizierten Interaktionspartner ist die molekulare Funktion von DYRK1A noch lange nicht hinreichend bekannt. Eine intensive Suche nach weiteren Substraten wird dabei helfen, die Rolle von DYRK1A in Zellprozessen näher aufzuklären.

1.5 Zielsequenz der DYRK1A-Phosphorylierung

DYRK1A gehört zu den dual-spezifischen Kinasen, die sowohl phenolische (Tyr) als auch alkoholische Hydroxylgruppen (Ser und Thr) von Aminosäuren phosphorylieren können. DYRK1A phosphoryliert Tyrosin allerdings nur im eigenen Protein, wohingegen in Substrat-Proteinen und -Peptiden Serine und Threonine phosphoryliert werden. Durch Phosphorylierung einer Peptid-Bibliothek (Himpel *et al.*, 2000) konnte eine Konsensussequenz für eine DYRK1A-Phosphorylierung abgeleitet werden (DYRKtide, Tab. 1.2). DYRK1A wird den *Proline directed Kinases* zugeordnet, da der C-terminal der Phosphorylierungsstelle gelegene Prolin-Rest (Position P+1) ein notwendiges Kriterium für eine Phosphorylierung durch DYRK1A ist. Ein Arginin-Rest an Position P-2 oder P-3 war in den untersuchten Peptiden für eine erfolgreiche Phosphorylierung ebenso wichtig. Die Bedeutung des Arginin-Restes wurde auch durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen unterstrichen (Woods *et al.*, 2001b; Campbell und Proud, 2002). Viele Proteinkinasen, z.B. die Proteinkinase A, benötigen eine basische Aminosäure wie

Arginin oder Lysin N-terminal der Phosphorylierungsstelle (Pinna und Ruzzene, 1996). Erstaunlicherweise verhinderte der Austausch des Arginins gegen Lysin in den untersuchten Peptiden die Phosphorylierung durch DYRK1A.

Bemerkenswert ist, dass die theoretische Konsensussequenz eines Computerprogramms von Brinkworth und Kollegen (2003) auch einen Arginin-Rest N-terminal der Phosphorylierungsstelle voraussagt (Tab. 1.2). Dieses Programm stützt sich dabei auf ein Strukturmodell der Kinase, das aus der Aminosäuresequenz abgeleitet wird. Mit Hilfe des Strukturmodells analysiert das Programm, welche Aminosäuren in direkter Nachbarschaft der Phosphorylierungsstelle eine Wechselwirkung mit dem katalytischen Zentrum der Kinase eingehen können.

Viele der bisher bekannten Substrate enthalten einen Arginin-Rest N-terminal der Phosphorylierungsstelle (Tab. 1.2). Den Substraten STAT3 und c-JUN allerdings fehlt dieser Arginin-Rest. Auch wenn die Substrate nicht durch kinetische Untersuchungen verglichen wurden, kann man doch annehmen, dass es Zielsequenzen für die DYRK1A-Phosphorylierung gibt, die anderen Kriterien als denen der bislang bekannten Konsensussequenz folgen.

Tab. 1.2: Bekannte Zielsequenzen der DYRK1A-Phosphorylierung

Substrat	Sequenz	Referenz
FKHR (Ser-329)	S G <u>R</u> L pS P I M	Woods <i>et al.</i> , 2001a
STAT3 (Ser-727)	D L P M pS P R T	Matsuo <i>et al.</i> , 2001 Wiechmann <i>et al.</i> , 2003
CREB1 (Ser-133)	S R <u>R</u> P pS V R K	Yang <i>et al.</i> , 2001
c-JUN (Ser-243)	T P P L pS P I D	Morton und Cohen unveröffentlichte Daten ¹
eIF2B ϵ (Ser-539)	S <u>R</u> A G pS P Q L	Woods <i>et al.</i> , 2001b
Tau (Thr-212)	S <u>R</u> S R pT P S L	Woods <i>et al.</i> , 2001b
Histon H3 (Thr-45)	Y <u>R</u> P G pT V A L	Himpel <i>et al.</i> , 2000
DYRKtide ² (Konsensussequenz)	F <u>R</u> P A pS P L R	Himpel <i>et al.</i> , 2000
theoretische Konsensussequenz ³	x <u>R</u> x x pS P x x	Brinkworth <i>et al.</i> , 2003

¹ als unveröffentlichte Daten in Morton *et al.* (2003) zitiert

² synthetisch hergestelltes Peptid

³ Computerprogramm, das auf Basis des Strukturmodells einer Kinase eine Konsensussequenz ableitet

1.6 Zielsetzung

Die Proteinkinase DYRK1A scheint in höheren Eukaryonten eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems auszuüben. Wie diese Funktion auf molekularer Ebene vermittelt wird, ist noch nicht hinreichend verstanden, obwohl in den letzten Jahren einige Substrate und Bindungspartner der Proteinkinase identifiziert werden konnten. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung weiterer Substrate von DYRK1A, um Erkenntnisse über die zellulären Funktionen der Kinase zu gewinnen. Obwohl eine Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch DYRK1A bekannt ist, zeigen die Substrate STAT3 und c-JUN (Tab. 1.2), dass die bisherigen Kenntnisse der Zielsequenz nicht ausreichen, um Substrate über eine Datenbanksuche zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde für die Substrat-Identifizierung ein experimenteller Ansatz entwickelt:

- Durch Phosphorylierung einer cDNA-Expressionsbibliothek sollten zunächst *in vitro*-Substrate der Kinase identifiziert werden.
- Um die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung ausgewählter Substrate durch DYRK1A näher zu charakterisieren, sollten die Phosphorylierungsreaktionen in kinetischen Analysen untersucht werden und die Phosphorylierungsstellen bestimmt werden.
- Schließlich sollte die Frage beantwortet werden, ob die Phosphorylierung der Substrate in lebenden Zellen durch DYRK1A vermittelt wird.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht zusätzlich aufgeführt, wurden die Chemikalien von Merck Eurolab GmbH (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) und ICN Biochemicals GmbH (Eschwege) bezogen.

2.1.2 Medien und Lösungen

1x MOPS: 40 mM MOPS, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA (pH 7.2)

2x HBS-Puffer (pH 7.0): 280 mM NaCl, 40 mM HEPES, 1.4 mM Na₂HPO₄, 12 mM Glucose, 10 mM KCl

20x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Tri-Na-Citrat

2x Laemmli-Probenpuffer: 500 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50% (w/v) Glyzerin, 16% (w/v) *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), 20 mM EDTA, 0.2% (w/v) Bromphenolblau, 8 mM Dithiothreitol (DTT)

2x Laemmli-Probenpuffer/EDTA: 2x Laemmli-Probenpuffer mit 80 mM EDTA

5x OLB: 0.5 M Tris-HCl (pH 6.9), 0.1 M MgSO₄, 1 mM DTT, je 0.6 mM dATP, dGTP, dTTP

Laufmittel für die Dünnschicht-Chromatographie: Isobuttersäure, Pyridin, Eisessig, n-Butanol, H₂O im Verhältnis 65:5:3:2:29

Coomassie-Färbelösung: 0.3 g Coomassie-*Brilliantblue* R250 in 1.5 ml Methanol und 30 ml Trichloressigsäure (TCA, 50% w/v) lösen, filtrieren, auf 200 ml mit TCA (50% w/v) auffüllen.

DEPC-Wasser: 0.1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) in deionisiertem Wasser verrühren, anschließend autoklavieren.

Detektionslösung für die ECL: Komponente 1: 6.5 µl H₂O₂ in 10 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5); Komponente 2: 100 µl Luminol (250 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO)), 44 µl Cumarinsäure (90 mM in DMSO) in 10 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5); Komponenten 1 und 2 kurz vor dem Gebrauch zusammengeben.

Solubilisierungs-Puffer: 300 mM Saccharose, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 6.8), 3 mM MgCl₂

Extraktionspuffer: 50 mM Ammoniumbicarbonat, 0.1% SDS, 1% β-Mercaptoethanol

GEB-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM reduziertes Glutathion

Hybridisierungspuffer: 50% (v/v) Formamid, 600 mM NaCl, 40 mM NaH₂PO₄, 4 mM EDTA, 0.1% (w/v) BSA, 0.1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP), 0.1% (w/v) Ficoll 400, 0.5% (w/v) SDS, 0.1 mg/ml Heringssperma-DNA

IB-Puffer zur Resuspension von *Inclusion Bodies*: 50 mM Natriumphosphat (pH 7.8; 7.98 g/l Na₂HPO₄, 0.716 g/l NaH₂PO₄), 300mM NaCl

Immunpräzipitationspuffer1: 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.4 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), 1% Triton X-100

Immunpräzipitationspuffer2: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.2 mM PMSF

Inhibitor-Mix: 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 mM Na₃VO₄, 2 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin

Kinasepuffer: 25 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 0.5 mM DTT

LB-Medium: 10 g/l Peptone, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt

Lysis-Puffer für die Kernisolierung: 300 mM Saccharose, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 6.8), 3 mM MgCl₂

Nativer Lysispuffer: 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM NaF, 2 mM Na₄P₂O₇, 1% Nonidet-P40

Ni-Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 6.0), 300 mM NaCl, 10% Glycerin

Orange-G-Puffer: 60% (v/v) Glycerin (wasserfrei), 0.25% (w/v) Orange G, 200 mM Tris-Acetat (pH 8.0), 5 mM EDTA

Paraformaldehyd-Lösung: 3% Paraformaldehyd in PBS (frisch angesetzt)

PBS-Puffer (pH 7.4): 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄

pH1.9-Puffer: 2.2% Ameisensäure, 7.75% Eisessig

Ponceau S-Lösung: 250 mg Ponceau S, 40% (v/v) Methanol, 15% (v/v) Essigsäure

Pulldown-Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.2 mM PMSF, 0.5% BRIJ97 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

RNA-Probenpuffer: 0.5% (v/v) Formamid, 0.08% (v/v) 10x MOPS, 0.14% Formaldehyd (pH 4.0), 0.1% (v/v) Glycerin, 0.02% (w/v) Bromphenolblau in DEPC-Wasser

Saccharosekissen: 1.8 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF

SDS-Lysispuffer: 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1% SDS

SOC-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose

Standard-Kinasepuffer: 100 µM ATP, 200 µM DYRKtide in Kinasepuffer

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat (pH 8.0), 1 mM EDTA

TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl

TBSTT: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.1% (v/v) Tween-20

TBS-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl

TBST-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 150 mM NaCl; 0.1% (v/v) Tween-20

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0.1% (w/v) SDS

Waschpuffer: 50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA

2.1.3 Antikörper

anti CyclL2: Durch die Immunisierung von Kaninchen mit dem Peptid PYKGSEIRGSRK, welches den Aminosäuren 437 bis 448 im C-Terminus von Cyclin L2 entspricht (Abb. 3.5), wurde ein Antiserum hergestellt, das spezifisch die lange Form von Cyclin L2 detektiert. Diese Aminosäurenabfolge zeigt weder eine signifikante Sequenzähnlichkeit mit Cyclin L1 noch mit RS-Domänen anderer Proteine. Der Antikörper wurde durch Adsorption an das immunogene Peptid Affinitäts-gereinigt (Bioscience, Göttingen).

anti GFP: gegen das *Green Fluorescent Protein* (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* gerichtete Antikörper. Eingesetzt wurden ein monoklonaler Antikörper (IgG) der Firma MBL (Nagoya, Japan) und ein polyklonales Antiserum der Firma Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

anti SC35: monoklonaler Antikörper (IgG), gerichtet gegen den menschlichen Spleißfaktor SC35 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen).

anti pTP: monoklonaler Antikörper (IgM), gerichtet gegen phosphoryliertes Threonin, das C-terminal von einem Prolin flankiert ist (P-Thr-Pro-101, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA).

anti DYRK1A: monoklonaler Antikörper (IgG), gerichtet gegen die Aminosäuren 588 - 746 von DYRK1A (Transduction Laboratories, Lexington, USA).

sekundäre Antikörper: Peroxidase (POD)-gekoppelte sekundäre Antikörper stammen von den Firmen Pierce (Perbio Science, Bonn; anti Kaninchen-IgG und anti Maus-IgM/IgG) und Amersham Bioscience (Freiburg, anti Maus-IgG). Der *Alexa-Red* konjugierte sekundäre Antikörper für die Immunfärbung ist gegen Maus-IgG (Molecular Probes) gerichtet.

2.1.4 Plasmide

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

pQE-30NST: Bakterielle Expression von Proteinen mit N-terminalem His₆-Tag GenBankTM Zugangsnummer: AF074376. In diesem Vektorsystem befand sich die menschliche Expressionsbibliothek. Ressourcen Zentrum/Primäre Datenbanken (RZPD).

pGEX-2TK: Bakterielle Expression von Proteinen mit N-terminaler Fusion von Glutathion-S-Transferase (GST). GenBankTM Zugangsnummer: U13851. Amersham Bioscience.

pET-28a: Bakterielle Expression von Proteinen mit N- oder C-terminalem His₆-Tag in BL21-DE3-Zellen, die die T7-RNA-Polymerase exprimieren. Novagen, Madison, WI, USA.

pEGFP-C1: Expression von Proteinen mit N-terminalem GFP-Tag in Säugerzellen. GenBankTM Zugangsnummer: U55763. Clontech, Heidelberg.

2.1.5 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Wirtsstämme

Zur Expression rekombinanter Fusionsproteine und zur Präparation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Amersham Bioscience) eingesetzt. Dieser Wirtsstamm ist *recA*-negativ, was eine Rekombination verhindert, und *endA1*-negativ, so dass keine Endonuklease A gebildet wird. Eine Ausnahme bildeten Fusionsproteine, die im Vektorsystem pET-28a produziert wurden. Hier wurde der Stamm BL21-DE3 eingesetzt, da er in Form eines Prophagen das Gen für die T7-RNA-Polymerase besitzt (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Bei den Wirtszellen der cDNA-Expressionsbibliothek handelte es sich um den *E. coli*-Stamm SCS1. Auch dieser Stamm ist *recA1*- und *endA1*-negativ (Stratagene).

2.1.6 cDNA-Bibliotheken, *Northern-Blots*

a) Exprimierende cDNA-Bibliothek:

Die cDNA der Bibliothek stammt aus menschlichem, fötalem Gehirn und wird durch das Vektorsystem pQE-30NST im *E. coli* Stamm SCS1 exprimiert. Dieser Stamm enthält zusätzlich das Plasmid pSE111, dass einen *lacI*^Q-Repressor und das *argU*-Gen für seltene tRNAs exprimiert. Die exprimierende cDNA-Bibliothek besteht aus 37 830 *E. coli*-Kolonien, die doppelt auf eine Membran aufgebracht wurden. Auf dieser Membran wurde die Produktion der Proteine mit IPTG induziert, die durch die cDNA-Bibliothek kodiert werden. In dieser Form wurde der Bibliotheksfilter freundlicherweise von Konrad Büssow zur Verfügung gestellt (Büssow *et al.*, 1998).

b) cDNA-Bibliothek aus menschlichem Hoden:

Diese cDNA-Bibliothek diente der Amplifikation von cDNAs zu Klonierungszwecken und wurde von der Firma Clontech (Katalog Nummer HL1161x) bezogen.

c) cDNA-*Panel* aus Mensch:

Die cDNAs der Firma Clontech (Human MTCTM Panel I) wurden für eine RT-PCR-Analyse von *CCNL2* verwendet.

d) Die *Northern-Blots* menschlicher PolyA-RNA verschiedener Gewebe wurden von der Firma Clontech bezogen.

2.2 Molekularbiologische Grundtechniken

Molekularbiologische Standardmethoden (Ethanol-fällung, Restriktionsverdau, Auffüllen überhängender Enden, Ligation, Phosphatasereaktion) wurden nach Sambrook und Kollegen (1989) durchgeführt. Nukleinsäuren wurden mit Restriktionsenzymen der Firma MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verdaut.

2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.1.1 DNA Präparation aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA (5 - 10 µg) aus *endA*⁻-Wirtsstämmen, wie DH5α, erfolgte nach der *Rapid Boiling*-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) oder mit Hilfe des Mini-Präparationskits von Qiagen (Hilden). Bei dem Verdau von Plasmid-DNA, die nach der *Rapid Boiling*-Methode isolierte wurde, wurden dem Restriktionsansatz 133 ng/µl RNase A zugesetzt. Für Experimente, bei denen größere Mengen Plasmid-DNA (20 - 500 µg) oder besonders reine DNA benötigt wurden, erfolgte die Präparation mittels eines Midi- oder Maxi-Präparationskits (Qiagen). Nach *Rapid Boiling*-Präparationen und nach Ethanolfällungen wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.2 RNA Präparation aus Säugerzellen

Die RNA aus Phoenix-Zellen, die für die *Northern-Blot*-Analyse von *CCNL2* verwendet wurde, wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) isoliert. Maus-Gesamt-RNA wurde aus Geweben des Stammes C57B/6 mit der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) extrahiert und für die RT-PCR-Analyse von *CCNL2* verwendet. RNA von RT112-Zellen, stimuliert mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) oder Cycloheximid (CHX), wurde freundlicherweise von Gregor Bahrenberg aus meinem Institut zur Verfügung gestellt (Bahrenberg *et al.*, 2001). PolyA-RNA von 3T3-L1-Adipozyten und Fibroblasten wurde mit Hilfe von oligo(dT)-gekoppelten *Paramagnetic Beads* (Chemagen, Baesweiler) von Susanne Leder aus meiner Arbeitsgruppe isoliert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Differenzierung der Fibroblasten zu Adipozyten ist in Leder *et al.* (2003) beschrieben. Die RNA aus menschlichem Urothel zur Amplifikation von SF3B1NT wurde mir freundlicherweise von Gregor Bahrenberg zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von PCR-Produkten und durch Restriktion entstandenen DNA-Fragmenten erfolgte in Gelen mit 0.75 - 2.0% (w/v) Agarose in TAE-Puffer, denen 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Proben wurden mit dem 0.25fachen Volumen Orange-G-Puffer versetzt und bei 8 Volt/cm aufgetrennt. Als Größenstandards dienten die Fragmente der 1 kb-Leiter bzw. der 100 bp-Leiter (MBI Fermentas GmbH). Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Gel erfolgte mit dem *Gel Extraktion Kit* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.3 Blot- und Hybridisierungstechniken

2.2.3.1 Northern-Blot

10 - 15 µg RNA wurden mit dem 2.5fachen Volumen Ethanol (97%) und dem 0.1fachen Volumen 3 M Na-Acetat bei pH 5.2 gefällt und in 15 µl RNA-Probenpuffer denaturiert (60 °C, 15 min). Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel mit 1x MOPS als Laufpuffer. Für 250 ml Gel wurden 2.5 g Agarose in 218 ml DEPC-Wasser aufgekocht, unter Rühren auf 60 °C abgekühlt und vor dem Gießen mit 25 ml 10x MOPS und 7.5 ml Formaldehyd (pH 4.0) versetzt. Die Trennung erfolgte für ca. 2 h bei 10 Volt/cm. Nach der Elektrophorese erfolgte der Transfer der RNA auf *Nylon Hybond N⁺-Filter* (Amersham Bioscience) durch Kapillar-*Blot*-Technik (Sambrook *et al.*, 1989) in 10 x SSC über Nacht. Nach irreversibler Fixierung der Nukleinsäuren durch UV-Licht (0.4 J/cm², Wellenlänge 312 nm) wurden die durch Ethidiumbromid gefärbten 18S rRNA und 28S rRNA (Mensch: 1874 bp und 4718 bp) als Größenmarker gekennzeichnet.

2.2.3.2 Southern-Blot

Die bei der RT-PCR entstandenen Produkte (Kap. 3.3.3.2) wurden in einem 2.5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf *Nylon Hybond N⁺-Filter* (Amersham Bioscience) durch Kapillar-*Blot*-Technik übertragen. Nach erfolgtem Transfer über Nacht in 0.4 N NaOH wurden die Nukleinsäuren mit UV-Licht (0.4 J/cm², Wellenlänge 312 nm) kovalent an die Membran gebunden.

2.2.3.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die Markierung von cDNA-Fragmenten mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP erfolgte nach dem Verfahren des *Random Primed Labeling* (Feinberg und Vogelstein, 1983). 100 ng DNA wurden mit 0.1 - 2.0 µg Hexanukleotid-*Primer* (Amersham Bioscience) je nach Fragmentgröße vermischt und denaturiert (10 min, 100 °C). Nach Zugabe von 40 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (5000 Ci/mmol, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig), 2.5 U Klenow-Fragment (MBI Fermentas GmbH) und 1x OLB, erfolgte die Synthese eines neuen Stranges für 1 h bei 37 °C (Hodgson und Fisk, 1987). Anschließend wurde die markierte DNA mit Hilfe des *Nucleotide Removal Kits* (Qiagen) aufgereinigt. Die eluierte DNA wurde denaturiert (100 °C, 10 min) und die eingebaute Radioaktivität in einem Scintillationszähler (Beckmann Instruments GmbH, München) gemessen.

2.2.3.4 Southern- und Northern-Blot-Hybridisierung

Die Prähybridisierung zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte in Hybridisierungsröhren in einem Drehofen (Biometra, Göttingen) für mindestens 1 h bei

42 °C in Hybridisierungspuffer. Die Hybridisierung der Membrane erfolgte über Nacht in 5 - 12 ml Hybridisierungspuffer mit der entsprechenden Sonde ($1 - 5 \times 10^6$ cpm/ml) bei 42 °C. Die Anzahl und Stringenz der Waschschriffe ($0.8 \times$ SSC/ 0.1% SDS bis $0.2 \times$ SSC/ 0.1% SDS) bei 55 °C richtete sich nach der Stärke des Signals. Die radioaktiven Signale wurden mit Hilfe von Röntgenfilmen (*HyperfilmTM MP*, Amersham Bioscience) oder Phosphor Screens (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) detektiert. Die Hybridisierungen von *Northern-Blots* der Firma Clontech erfolgten nach Herstellerangaben.

2.2.4 Erststrang cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem *First Strand cDNA Synthesis KitTM* (Amersham Bioscience) nach den Angaben des Herstellers. Je nach Verwendung der cDNA wurde der *Random-Hexanukleotid-Primer* pd(N)₆ bzw. der *oligo(dT)-Primer* des Kits eingesetzt.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Je nach Ansatz wurden mindestens 10 - 20 ng cDNA oder Plasmid-DNA sowie 50 pmol jedes spezifischen *Primers* eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 0.5 - 1.0 U Taq-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) oder, bei schwer amplifizierbaren Transkripten, mit 1 U *JumpStart REDAccuTaqTM* Polymerase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 0.2 mM jedes Nukleotids (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Wenn nicht gesondert angegeben, wurden die PCRs mit folgenden Standard-Bedingungen durchgeführt: Nach Denaturierung der DNA von 5 min bei 95 °C erfolgten 35 Zyklen von Denaturierung, *Annealing* und Synthese für jeweils 30 Sekunden. Anschließend wurde ein letzter Syntheseschritt von 5 min durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur wurde anhand der T_m -Werte der *Primer* errechnet (3°C unter T_m) oder gegebenenfalls für ein *Primer*-Paar experimentell ermittelt. Die verwendeten *Primer* sind in Tab. 2.1 aufgelistet.

Tab. 2.1: *Primer*-Liste

<i>Primer</i> ^a	Sequenz 5'→ 3'	Verwendung Konstruktname ^a
<u><i>Primer für die Klonierung bakterieller Konstrukte^b:</i></u>		
SF3B1-pETfor (DS13RSfor)	<u>ACATGTC</u> GGAAGATCGCCAAG <i>Afl</i> III	pET-SF3B1NT (pET-DS13RS)
SF3B1-pETrev (DS13RSrev)	<u>AACTCGAG</u> CATTGGTGGTGT TCCATTC <i>Xho</i> I	pET-SF3B1NT, pET-SF3B1/401- 511 (pET-DS13RS, pET-DS13RS-401- 511)

Primer ^a	Sequenz 5'→ 3'	Verwendung Konstruktname ^a
SF3B1/401-511for (DS13-401-511for)	TAATTCATGA CTGATGAGGA ATTAGATGC <i>Bsp</i> HI	pET-SF3B1/401-511 (pET-DS13RS-401-511)
<u>Primer für die Klonierung von Säugerkonstrukten^b:</u>		
CCNL2-GFP _{rev} (KdGGFP-A6for)	TTAATCCGGA ATGGCGGCG GCGGCGGCGGCGGCTGGT <i>Bsp</i> EI	pEGFP-CCNL2 (pEGFP-ania6b)
CCNL2ΔN-GFP _{for} (GFPPH9FOR)	ATTCGGGA TACATGAACGAC AGCCTTCG <i>Bsp</i> EI	pEGFP-CCNL2ΔN (pEGFP-PH9)
CCNL2ΔN-GFP _{rev} (GFPPH9REV)	ACGAATTC TCAAAGGGCAGC CATCAGG <i>Eco</i> RI	pEGFP-CCNL2, pEGFP- CCNL2ΔN (pEGFP-PH9, pEGFP-ania6b)
SF3B1-GFP _{for} (DS13FOR)	GATCCGGA GACAAAATGGC GAAGATCGC <i>Bsp</i> EI	pEGFP-SF3B1NT (pEGFP-DS13)
SF3B1-GFP _{rev} (DS13REV)	CCATCGAT TTGCTCTTCTGG ACTAAGTG <i>Cl</i> al	pEGFP-SF3B1NT (pEGFP-DS13)
<u>Primer für die Amplifizierung von Sonden für die Northern-Blot-Analyse:</u>		
L2-E6a-5'for (KdGSoPH9E6for)	GGTAGCCTCTGAGGGTAAG	Sonde L2-E6a-5' (Sonde PH9-E6)
L2-E6a-3'for (KdGSoPH9E6-7H2for)	CTCTGATGAGCCCGAGAAG	Sonde L2-E6a-3' (Sonde PH9-E6-7H2)
L2-E6a-3'rev (KdGSoPH9E6-7H2rev)	TGGAAGCCAAACACAGGAAG	Sonde L2-E6a-3' (Sonde PH9-E6-7H2)
L2-E6a-5'rev (E6IIrev)	AGTCTAGAGCCAGCCTTCG	Sonde L2-E6a-5' (Sonde PH9-E6), Triple-PCR
L2-E11for (SO ANIA6BFOR)	AGAGATCAGCGACGAGAGC	Sonde L2-E11 (Sonde ania6b) erkennt 3'UTR
L2-E11rev (SO ANIA6BREV)	CAACGTGGAGAGAGAATAAG G	Sonde L2-E11 (Sonde ania6b) erkennt 3'UTR
L1-E7+8for (SOCyclL-E7/8forKdG)	TGGTCCATATCCATCTGG	Sonde L1-E7+8 (Sonde CyclL1-E7-8)
L1-E7+8rev (SOCyclL-E7/8revKdG)	AAATGAAGTGCTTCTTGC	Sonde L1-E7+8 (Sonde CyclL1-E7-8)

Primer ^a	Sequenz 5'→3'	Verwendung Konstruktname ^a
<u>Primer für die Amplifizierung von CCNL2-Spleißvarianten und zur Produktion von Southern-Blot-Sonden^b:</u>		
L2-E2for (PH9CYCFOR)	ATTCCGGA ATGGCTACCGG GCAGGTGTTG <i>BspEI</i>	Sonde L2-E2/5 (PH9-N) mit L2-E5rev (KdGCyclin-a6bE5rev), Triple-PCR mit L2-E6a-5'rev (E6llrev) und L2-E6brev (E7brev)
L2-E6a-5'rev (E6llrev)	s.o.	Sonde L2-E6a-5' (Sonde PH9-E6), Triple-PCR
L2-E6brev (E7Brev)	AAGACGTCGGTGCGAAGG	Triple-PCR
L2-E5rev (KdGCyclin-a6bE5rev)	TCTGGACCAGGTGTTGGTTA CG	Sonde L2-E2/5 (PH9-N)
<u>Primer für die Mutagenese^c:</u>		
T273Afor (DS13T273AFOR)	CGAGGTGAT GC ACCAGG GC ATGCGACAC <i>SphI</i>	Mutante pET-SF3B1-T273A (DS13RS-T273A)
T273Arev (DS13T273AREV)	GTGT CGCATGCC CTGG TGCA TCACCTCG <i>SphI</i>	Mutante pET-SF3B1-T273A (DS13RS-T273A)
T303Afor (DS13T303AFOR)	GAGAGAGAT GCT CCTGGGC ATGGAT TCCGGAT GGGCTG <i>BspEI</i>	Mutante pET-SF3B1-T303A (DS13RS-T303A)
T303Arev (DS13T303AREV)	CAGCCCAT TCCGGAT CCATGC CCAGG AGC ATCTCTCTC <i>BspEI</i>	Mutante pET-SF3B1-T303A (DS13RS-T303A)
T426Afor (DS13T160Afor)	GTTATGTTCTTATTCGAG GCT CCAGCTCGAAAGC	Mutante pET-SF3B1-T426A (160 alias DS13RS-T426A)
T426Arev (DS13T160Arev)	GCTTTCGAGCTGG AGCT CGA ATAGGAACATAAC	Mutante pET-SF3B1-T426A (160 alias DS13RS-T426A)
T434Afor (DS13-T434Afor)	CGAA AGCTT ACAGCT GCTCC AACACCTTTGG <i>HindIII</i>	Mutante pET-SF3B1-T434A (DS13RS-T434A)
T434Arev (DS13-T434Arev)	CCAAAGGTGTTGG AGC AGCT GT AAGCTTT CG <i>HindIII</i>	Mutante pET-SF3B1-T434A (DS13RS-T434A)
T436Afor (DS13-T436Afor)	CGAA AGCTT ACAGCTACTCC AGC ACCTTTGG <i>HindIII</i>	Mutante pET-SF3B1-T436A (DS13RS-T436A)

Primer ^a	Sequenz 5'→3'	Verwendung Konstruktnamen ^a
T436Arev (DS13-T436Arev)	CCAAAGG TGCT GAGTAGCT GT <u>AAGCTT</u> TCG <i>HindIII</i>	Mutante pET-SF3B1-T436A (DS13RS-T436A)
T434/436Afor (DS13-T434/436Afor)	CGAAAGCTTACAG GCT GCTCC AGCACCTT TGG <i>HindIII</i>	Mutante pET-SF3B1-T434/436A (DS13RS-T434/436A)
T434/436Arev (DS13-T434/436Arev)	CCAAAGG TGCT GAG AGC AGC TGT <u>AAGCTT</u> TCG <i>HindIII</i>	Mutante pET-SF3B1-T434/436A (DS13RS-T434/436A)
<u>Primer für die Sequenzierung:</u>		
KdGpET28a-for	ATTGTGAGCGGATAACAATT CC	Sequenzierung pET28a
KdGpET28a-rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGGT GG	Sequenzierung pET28a
ABIM13for	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung M13 (pUC18)
ABIM13rev	GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierung M13 (pUC18)
pEGFP-C1for	CATGGTCCTGCTGGAGTTCG	Sequenzierung pEGFP-C1
pEGFP-C1rev	GTGGTATGGCTGATTATGAT CAG	Sequenzierung pEGFP-C1
pQE-30NSTfor	TGAGCGGATAACAATTTAC A CAG	Sequenzierung pQE-30NST
pQE-30NSTrev	GTTCTGAGGTCATTACTGGA TC	Sequenzierung pEGFP-C1

^a Um die Darstellung dieser Arbeit zu vereinfachen, wurden den *Primern* und Konstrukten funktionelle Namen gegeben. In Klammern sind die Labor-internen Bezeichnungen angegeben.

^b Fett gedruckte Buchstaben markieren Basen, die in der endogenen Sequenz nicht enthalten sind, sondern aus Klonierungs-technischen Gründen eingefügt wurden. Unterstreichungen markieren Erkennungs-Sequenzen für die angegebenen Restriktionsenzyme.

^c Mutierte Basen sind fett gedruckt. Die durch stille Mutation eingeführten Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Das Basen-Triplett, das durch Mutation ein Alanin kodiert, ist grau hinterlegt.

2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierreaktionen wurden unter Verwendung des *Thermosequenase Cycle Sequencing Kits* (Amersham Bioscience) oder des *Sequencing Analysis Kits* (Applied Biosystems, CA, USA) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Sequenzierprodukte wurden mit Hilfe des Gel-Sequenzierers *dnasequencer 4000*

(LI-COR, Lincoln, USA) oder des Kapillar-Sequenzierers *ABI Prism 110* der Firma Applied Biosystems analysiert.

2.2.7 Mutagenese

Die Herstellung von Alaninmutanten der Threonin-Reste 273, 303, 426, 434 und 436 von SF3B1 erfolgte mit dem *QuickChangeTM Site-directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene nach Herstellerangaben. Hierbei wurden 30 ng pET-SF3B1NT als *Template* für die Amplifikation mit Hilfe der in Tab. 2.1 angegebenen *Mutagenese-Primer* eingesetzt. Wenn möglich, wurden die *Mutagenese-Primer* so entworfen, dass durch stille Mutationen (kein AS-Austausch) neue Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden. Durch den Verdau der Amplifikate mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurden erfolgreich mutierte Klone identifiziert. Die cDNA-*Inserts* wurden anschließend sequenziert, um PCR-Fehler auszuschließen.

2.2.8 Konstrukte und Sonden

2.2.8.1 Bakterielle Expressionskonstrukte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine werden durch das Vektorsystem pGEX-2TK (Amersham Bioscience) exprimiert. Die Konstrukte für die bakterielle Expression von GST-DYRK1A Δ C (Himpel *et al.*, 2000), GST-DYRK1A Δ C-K188R, GST-DYRK1A Δ C Δ N (Himpel *et al.*, 2001) und GST-DYRK2 (Becker *et al.*, 1998) sind in der angegebenen Literatur beschrieben. Das Konstrukt GST-DYRK1ANT exprimiert in Fusion an GST die Aminosäuren 1 bis 177 des N-Terminus von DYRK1A, DYRK1Acat exprimiert die Aminosäuren 133 bis 499 von DYRK1A. Die genannten Konstrukte standen unserer Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung.

Die Plasmide der menschlichen fötalen Expressionsbibliothek, welche für His₆-Fusionsproteine kodieren (Vektorsystem pQE-30NST, GenBankTM Zugangsnummer: AF074376), wurden über das Ressourcen Zentrum/Primäre Datenbanken (RZPD, Berlin) bezogen (für Klonierungs- und Vektorinformationen siehe <http://www.rzpd.de>, Bibliotheks-Nummer: 800). Sonstige His₆-Fusionsproteine wurden im Vektorsystem pET-28a der Firma Novagen exprimiert.

Die Expressionsplasmide für GST-SF2/ASF und GST-hTRA2 β 1 wurden mir freundlicherweise von Stefan Stamm (Erlangen; Ge *et al.*, 1991; Beil *et al.*, 1997) zur Verfügung gestellt. Die Proteine CDK2 und Cyclin E (hergestellt mit Baculoviren) und GST-RB (Protein Datenbanknummer: P06400, AS 779 - 928, bakteriell exprimiert) wurden mir freundlicherweise von Richard Lilischkis (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt. Die Konstrukte, die im Verlauf dieser Arbeit kloniert wurden, sind im Folgenden im Detail dargestellt.

pQE-SF3B1Δ (pQE-DS13)

Dieser Klon stammt aus der menschlichen, fötalen Expressionsbibliothek, wurde über das Ressourcen Zentrum/Primäre Datenbanken (RZPD, Berlin; Klon-Nr.: MPMGp800J16582Q102) bezogen und im Zuge dieser Arbeit sequenziert. Das Konstrukt exprimiert N-terminal einen Vektor-kodierten His₆-Tag, gefolgt von der cDNA des Spleißfaktors SF3B1 (GenBank™ Zugangsnummer: AF054284). Die cDNA beginnt mit den bp 637 bis 666, gefolgt von den bp 910 bis 1479. Anscheinend hat bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek eine Exzision der bp 667 bis 909 stattgefunden. An der Verbindungsstelle beider cDNAs befindet sich die Nukleotidsequenz AGAG. Bei dieser Sequenz kann es sich sowohl um die bp 663 - 666 des ersten cDNA-Stückes als auch um die bp 910 - 913 des zweiten cDNA-Stückes handeln. Das erste cDNA-Stück ist im Leseraster verschoben, wohingegen das zweite cDNA-Stück die AS 304 bis 493 von SF3B1 korrekt exprimiert. Dass das zweite cDNA-Stück am 3' Ende nicht bis zur Polyadenylierungs-Stelle von SF3B1 kodiert, liegt an einem internen Adenin-reichen Sequenzabschnitt (ab bp1475), an den der oligo(dT)-*Primer* bei der cDNA-Synthese gebunden hat.

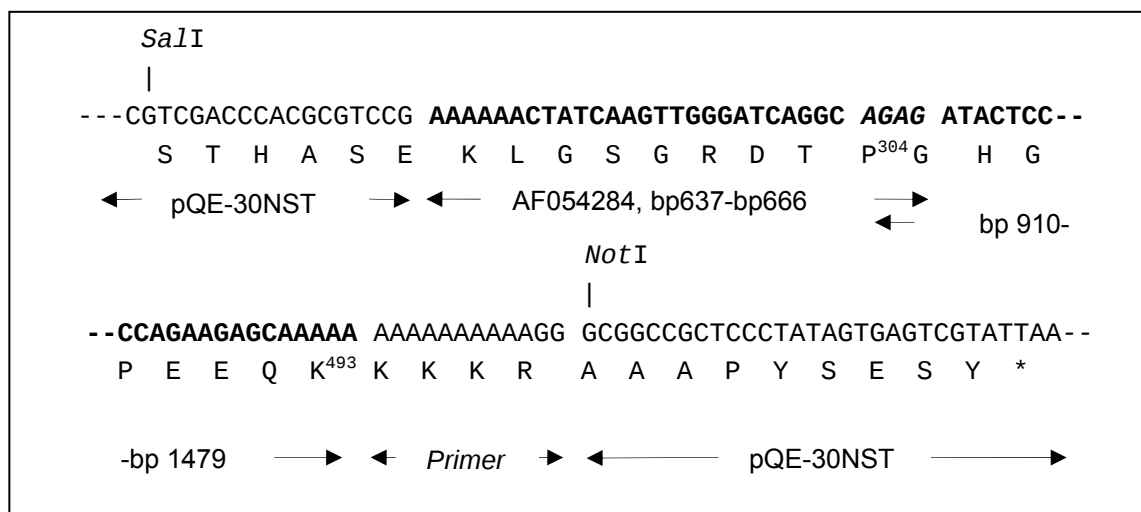


Abb. 2.1: Konstruktion von pQE-SF3B1Δ

pET-SF3B1NT (pET-DS13RS)

Das Konstrukt pET-SF3B1NT exprimiert in *E. coli* die komplette N-terminale Domäne von SF3B1 (AS1 bis AS 511). In diesem Fall konnte mit der menschlichen Hoden-cDNA-Bibliothek als *Template* keine cDNA von SF3B1 amplifiziert werden. Höchstwahrscheinlich ist eine solche cDNA in dieser Bibliothek nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden. Aus diesem Grund wurde mit mRNA aus menschlichem Urothel eine Erst-Strang-cDNA-Synthese durchgeführt. Da keine *Full-Length*-cDNA gebraucht wurde, wurde statt eines oligo(dT)-*Primers* der *Random*-Hexanukleotid-*Primer* pd(N)₆ verwendet, um die Amplifizierung des N-Terminus zu erleichtern.

Anschließend wurden die hergestellten cDNA-Einzelstränge als *Templates* verwendet, um die cDNA (bp 1 - 1533) von SF3B1 mit Hilfe des *Primer*-Paares SF3B1-pETfor und SF3B1-pETrev zu amplifizieren. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe des *Sure Clone Ligation Kits* (Pharmacia) über glatte Enden in den Vektor pUC18 kloniert. Das Konstrukt wurde abschließend noch einmal komplett sequenziert, um eine korrekte Expression zu gewährleisten. Der Vorwärts-*Primer* enthielt eine *AflIII* Schnittstelle, der Rückwärts-*Primer* eine *XhoI* Schnittstelle. Diese wurden verwendet, um das Konstrukt über die Vektor-Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* in die *Multiple-Cloning-Site* von pET-28a (Novagen) N-terminal von einem His₆-*Tag* einzuklonieren. Aus Klonierungs-technischen Gründen wurde der Vorwärts-*Primer* so gewählt, dass als zweite Aminosäure ein Serin anstatt eines Alanins exprimiert wird. Das von der SF3B1-cDNA kodierte Start-Kodon fungiert auch in diesem Klon als Start-Kodon.

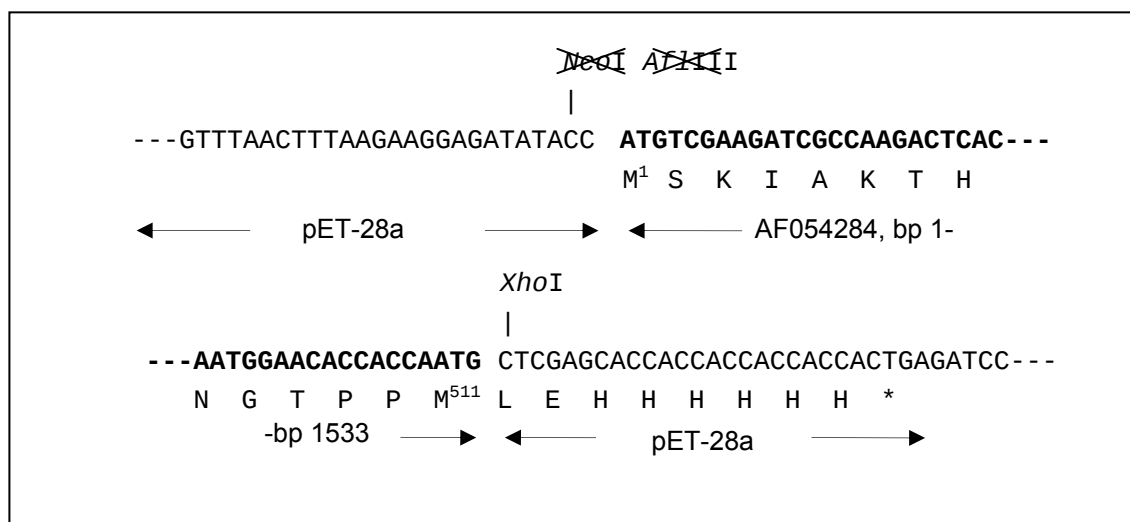


Abb. 2.2: Konstruktion von pET-SF3B1NT

pET-SF3B1/401-511 (pET-DS13/401-511 oder Dele)

Das Konstrukt exprimiert in *E. coli* die Aminosäuren 401 bis 511 von SF3B1 (GenBank™ Zugangsnummer: AF054284) mit einem C-terminalen His₆-*Tag*. Es wurde dazu verwendet, den Bereich für mögliche Phosphorylierungsstellen einzugrenzen. Die cDNA wurde mit Hilfe der *Primer* SF3B1/401-511for und SF3B1-pETrev amplifiziert. Als *Template* diente hierfür das Konstrukt pET-SF3B1NT. Dabei enthält der Vorwärts-*Primer* eine *BspHI*-Schnittstelle, die mit der *NcoI*-Schnittstelle des Vektors pET-28a fusioniert wurde. In das C-terminale Ende der cDNA wurde über den Rückwärts-*Primer* eine *XhoI*-Schnittstelle eingebaut, die mit der *XhoI*-Schnittstelle des Vektors ligiert wurde.

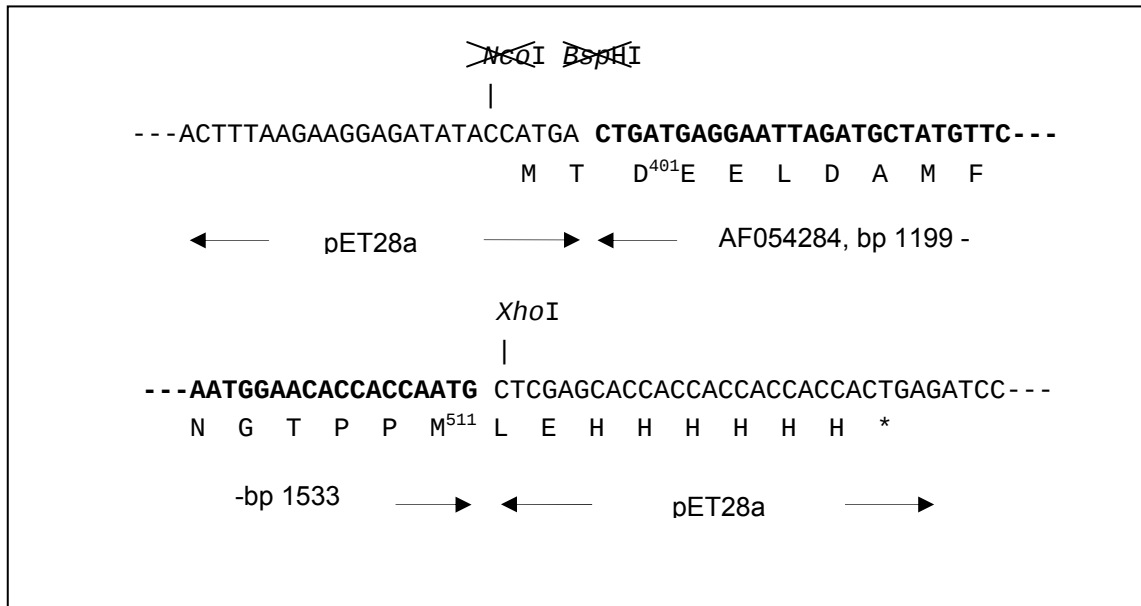


Abb. 2.3: Konstruktion von pET-SF3B1/401-511

SF3B1-Mutanten

Die Mutanten wurden wie in Kap. 2.2.7 dargestellt mit dem Konstrukt pET-SF3B1NT als *Template* und den in Tab. 2.1 angegebenen *Primern* hergestellt. Die cDNA-Inserts wurden anschließend vollständig sequenziert, um PCR-Fehler auszuschließen. Für die Expression der Mutanten in COS-7 Zellen wurden die in pET-SF3B1NT hergestellten Mutationen in das Konstrukt pEGFP-SF3B1NT umklontiert. Hierfür wurde die cDNA am 3'-Ende mit der Vektor-Schnittstelle *XhoI* geschnitten, und mit dem Klenow-Enzym wurden stumpfe Enden erzeugt. Anschließend wurde mit Hilfe der von der cDNA kodierten Schnittstelle *EcoRV* der mutierte Bereich ausgeschnitten und über die *EcoRV*-Schnittstelle der cDNA und die *SmaI*-Schnittstelle des pEGFP-Vektors eingebaut.

pQE-CCNL2ΔN (pQE-PH9)

Dieser Klon stammt aus der menschlichen fötalen Expressionsbibliothek und wurde über das Ressourcen Zentrum/Primäre Datenbanken (RZPD, Berlin; RZPD-Nr.: MPMGp800N16596Q104) bezogen. Das Konstrukt exprimiert in *E. coli* die AS 270 bis 520 von Cyclin L2 (GenBankTM Zugangsnummer: AY037150). Die cDNA umfasst neben dem kodierenden Bereich, der mit dem eigenen Stop-Kodon endet, noch den 3'UTR-Bereich der cDNA. Der kursiv dargestellte Sequenzabschnitt ist anscheinend durch Verdopplung eines Vektorabschnitts zustande gekommen.

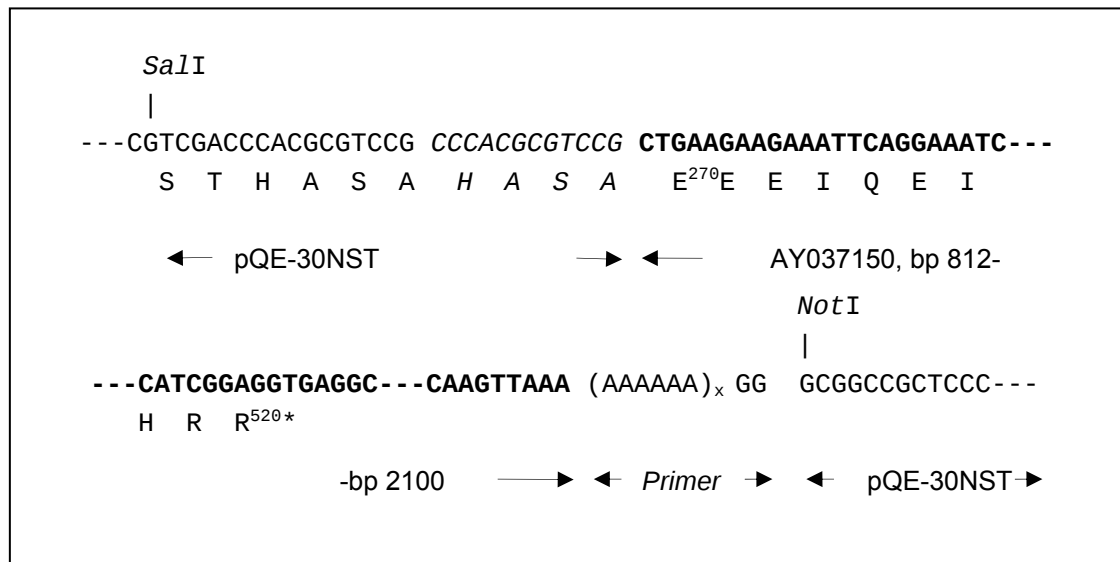


Abb. 2.4: Konstruktion von pQE-CCNL2ΔN

pGEX-CCNL2ΔN (pGEX-PH9)

Das bakterielle Expressionsplasmid, das für GST-CCNL2 kodiert, wurde mit Hilfe des Bibliotheksklons pQE-CCNL2ΔN kloniert. Hierbei wurde dessen cDNA, die für die AS 270 bis 520 von Cyclin L2 (GenBankTM Zugangsnummer: AY037150) kodiert, mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III/Klenow herausgeschnitten und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sma*I in pGEX-2TK einkloniert. Der Klon exprimiert als GST-Fusionsprotein demzufolge denselben Abschnitt von Cyclin L2 wie pQE-CCNL2ΔN.

2.2.8.2 Säuger-Expressionskonstrukte

Alle Säugerkonstrukte wurden durch das Vektor-System pEGFP-C1 (Clontech) N-terminal des *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) exprimiert. Die Expressionsklone GFP-DYRK1A (Becker *et al.*, 1998) und GFP-DYRK1A-K188R (Wiechmann *et al.*, 2003) sind unter der angegebenen Literatur beschrieben.

pEGFP-SF3B1NT (pEGFP-DS13)

Dieses Konstrukt diente der Expression von GFP-SF3B1NT (AS 1 - 492) in Säugerzellen. Die cDNA von SF3B1 (bp 1 - 1477) wurde mit den *Primern* SF3B1GFPfor und SF3B1-GFPprev amplifiziert. Der Vorwärts-*Primer* enthielt die Schnittstelle *Bsp*EI und der Rückwärts-*Primer* die Schnittstelle *Cl*aI. Diese Schnittstellen wurden dafür verwendet, die cDNA in die Schnittstellen *Bsp*EI und *Ac*cI der *Multiplex Cloning Site* des Vektors pEGFP-C1 einzubauen.



Abb. 2.5: Konstruktion von pEGFP-SF3B1NT

pEGFP-CCNL2ΔN (pEGFP-PH9)

Das Konstrukt exprimiert in Säugerzellen die AS 222 bis 520 von Cyclin L2 in Fusion mit GFP. Die cDNA (bp 670 – 1635) wurde mit den *Primern* CCNL2ΔN-GFPfor und CCNL2ΔN-GFPrev aus der menschlichen Hoden-cDNA-Bibliothek amplifiziert und mit Hilfe der darin eingebauten Schnittstellen *Bsp*EI und *Eco*RI gerichtet in den Vektor pEGFP-C1 kloniert.

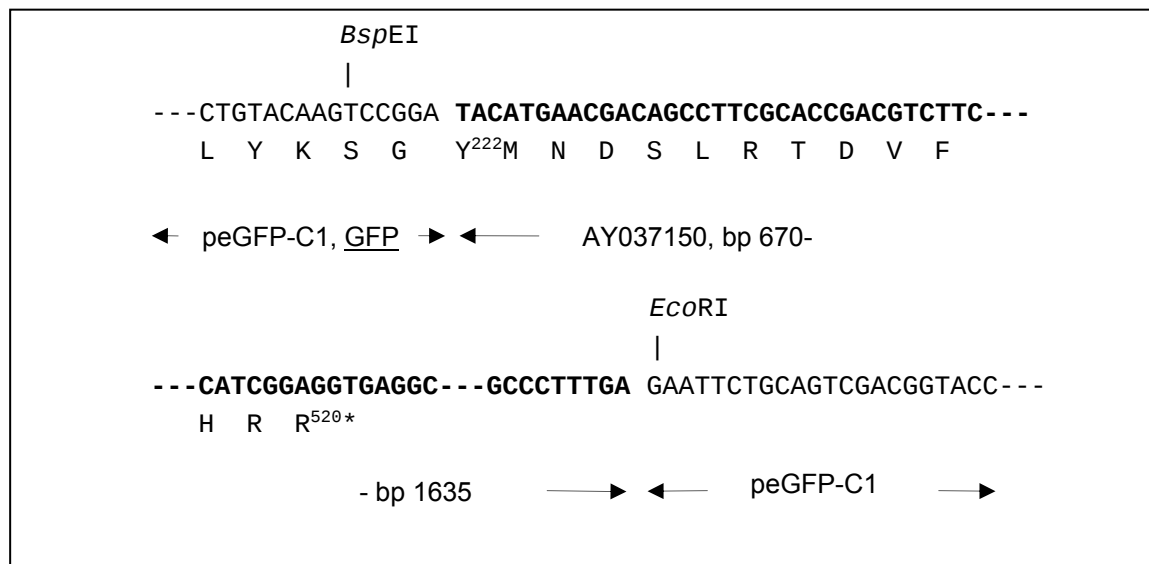


Abb. 2.6: Konstruktion von pEGFP-CCNL2ΔN

pEGFP-CCNL2 (pEGFP-ania6b)

Das Konstrukt exprimiert in Säugerzellen das komplette offene Leseraster (AS 1 bis 520) von Cyclin L2. Die cDNA (bp 7 – 1635) wurde mit den *Primern* CCNL2-GFPfor und CCNL2ΔN-GFPprev amplifiziert und mit Hilfe der darin eingebauten Schnittstellen *BspEI* und *EcoRI* gerichtet in den Vektor pEGFP-C1 kloniert.

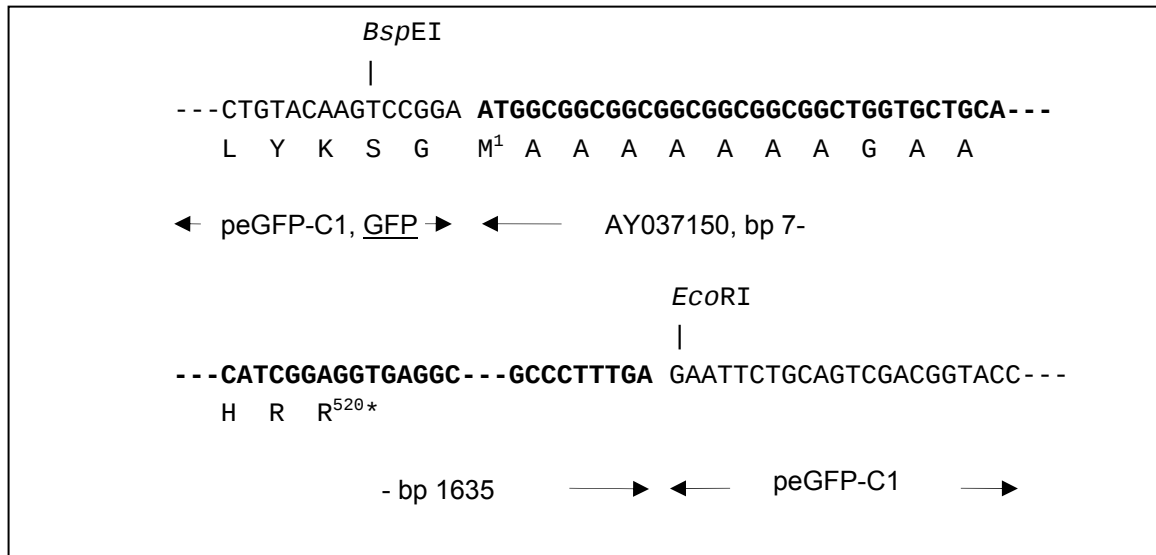


Abb. 2.7: Konstruktion von pEGFP-CCNL2

pΔGFP-CCNL2

Dieses Konstrukt wurde mir freundlicherweise von Oliver Spelten aus meiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Es exprimiert das komplette offene Leseraster von Cyclin L2 ohne einen fusionierten *Tag*. Es wurde aus dem oben beschriebenen Konstrukt pEGFP-CCNL2 kloniert, indem die cDNA, die für das GFP kodiert, durch die Restriktions-Endonukleasen *KpnI* und *BspEI* herausgeschnitten wurde. Durch das Klenow-Enzym wurden stumpfe Enden hergestellt und wieder ligiert. Als Startpunkt der Translation fungierte das endogene Start-Methionin von Cyclin L2.

pEGFP-CLK3

Die cDNA (bp 152 bis 1759) wurde aus pGEX-Clk3* (Becker *et al.*, 1996) mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *ApaI* ausgeschnitten und über die Schnittstellen *XhoI* und *ApaI* in pEGFP-C1 kloniert. Das Konstrukt exprimiert die AS 33 bis 490 von CLK3 in Fusion mit einem N-terminalen GFP-*Tag*.

Die Sonden für die *Northern*- und *Southern-Blot* Hybridisierungen wurden mit den in Tab. 2.1 angegebenen *Primern* aus der menschlichen Hoden-cDNA-Bibliothek amplifiziert und kloniert (*TOPO TA Cloning Kit*, Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Sonden wurden durch Sequenzierung überprüft und für die radioaktive Markierung eingesetzt. Die Sonde CyclinL1-E14 wurde aus dem Konstrukt pEGFP-CCNL1 mit den Enzymen *PvuI* und *PstI* herausgeschnitten und anschließend radioaktiv markiert. Die genaue Lokalisation der Sonden ist im Folgenden anhand von Datenbankeinträgen angegeben; die Benennung erfolgte anhand der Exons, mit denen die Sonden jeweils hybridisieren:

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Bakterienzellen

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln. Bei Arbeiten mit Zellen, die ein Plasmid mit Resistenzgen enthielten, wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (100 µg/ml Ampicillin; 30 µg/ml Kanamycin). Für Agarplatten wurde das Medium durch Zugabe von 15 g/l Agar (GibcoBRL™, Eggenstein) verfestigt. *E. coli*-Zellen konnten als Glycerinkulturen (500 µl Flüssigkultur, 333 µl 50%iges Glycerin) langfristig gelagert werden.

2.3.2 Transformation von *E. coli*

2.3.2.1 Transformation chemisch kompetenter DH5α-Zellen

DH5α-Zellen erhielten nach der Methode von Hanahan (1983) ihre Kompetenz zur DNA-Aufnahme und wurden in Aliquots bei -80 °C gelagert. Nach langsamem Auftauen auf Eis wurden 100 µl der kompetenten Zellen mit der zu transformierenden DNA vermischt, 30 min auf Eis inkubiert und nach einem Hitzeschock (90 s, 42 °C) mit 250 µl LB-Medium versetzt. Diese Suspension wurde 40 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf LB/Amp- bzw. LB/Kan-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.3.2.2 Elektrotransformation von DH5α-Zellen

Diese Methode wurde teilweise bei Ligationen, bei denen eine geringe Anzahl positiver Ligationsergebnisse zu erwarten war, und nach Mutagenese mit dem *QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) eingesetzt, da die Transformationseffizienz der Elektrotransformation deutlich höher liegt als bei der oben beschriebenen Methode. Die verwendeten DNAs wurden durch Fällung und anschließendes Waschen mit Ethanol (70%) vom Salz befreit. Die DH5α-Zellen wurden nach Angaben des Instruktionshandbuches für den *Gene-Pulser™*-Elektroporator (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) jeweils vor Gebrauch kompetent gemacht, 1 min zusammen mit der DNA auf Eis inkubiert und im *Gene-Pulser™*-Elektroporator unter Verwendung einer 0.2 cm-Küvette (Eurogentec, Seraing, Belgien) bei 25 µF und 2.5 kV (*Puls Controller* 200 Ω, Bio-Rad Laboratories GmbH) transformiert. Die transformierten Zellen wurden mit 1 ml SOC-Medium (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose) versetzt, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend auf LB/Amp- bzw. LB/Kan-Platten ausplattiert.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Zellen

COS-7 Zellen (Kat. Nr.: CRL-1651) und 3T3-L1 Zellen (Kat. Nr.: CI-173) wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, USA) bezogen. Die Phoenixzellen sind modifizierte 293T-Zellen und wurden mir freundlicherweise von Andreas Barthel aus meinem Institut zur Verfügung gestellt. Informationen über diese Zelllinie sind unter http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html zu finden. Die genannten Zelllinien wurden in DMEM-High Glucose (PAA Laboratories, Linz, Österreich) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Phosphat-freies DMEM wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen (Katalog-Nr.: D3656) und mit 3.7 g/l NaHCO₃, 0.11 g/l Natriumpyruvat und 10% dialysiertem, Phosphat-freiem FCS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Katalog-Nr.: F0392) ergänzt.

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelltyp	Gewebe	Organismus
COS-7	Niere	Affe
3T3-L1	Embryo-Fibroblasten	Maus
Phoenix	293T (embryonale Niere)	Mensch

2.4.2 Subkultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden jeweils vor dem Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und mit 1 ml 0.05% Trypsin/EDTA (Seromed, Berlin) in PBS für ca. 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch die Zugabe von 9 ml Medium abgestoppt, und die Zellen wurden je nach Bedarf auf neue Kulturgefäße verteilt.

2.4.3 Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen

2.4.3.1 Calciumphosphat-Präzipitation

Verschiedene Konstrukte wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation (Graham und van der Eb, 1973) in COS-7 Zellen transfiziert. Einen Tag vor der Transfektion wurden 3.5×10^5 Zellen in Kulturschalen (Durchmesser 9.2 cm, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) ausgesät. Vier Stunden vor der Transfektion erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Pro Kulturschale wurden 10 µg aufgereinigte Plasmid-DNA in 1.5 ml CaCl₂-Lösung (250 mM) gegeben, diese nach und nach mit 1.5 ml 2x HBS-Puffer versetzt und 1 min mit Luft begast. Innerhalb von 10 - 20 min bildete sich ein feines Präzipitat, das tropfenweise den Zellen zugesetzt wurde. Nach Inkubation von 24 h

wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Zwei bis drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen lysiert.

2.4.3.2 Transfektion mit FuGENE™6

Das Transfektionsreagenz FuGENE™6 (Roche Diagnostics GmbH) wurde nach Angaben des Herstellers genutzt. Dabei wurde pro µg DNA 3 µl FuGENE-Reagenz eingesetzt. Die Zellen wurden nach den Herstellerempfehlungen ausplattiert (Kulturschalen Durchmesser: 6 cm, 50 000 Zellen pro ml) und mit entsprechenden DNA-Mengen transfiziert.

2.4.4 Lokalisationsanalysen

Die subzelluläre Verteilung von Cyclin L2 und Cyclin L1 wurde mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen untersucht. Die Lokalisation von endogenem SC35 wurde mit Hilfe von Antikörper-vermittelter indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. COS-7 Zellen wurden in 24-Well-Multischalen (Kulturoberfläche: 1.9 cm²/Well, Nunc GmbH & Co. KG) auf runden Plastik-Deckgläschen (*Tissue Culture Coverslips*, 13 mm, Sarstedt, Newton, USA) mit einer Zelldichte von 35 000 Zellen/ml ausgesät und 24 h später jeweils mit 0.3 µg Plasmid-DNA (pEGFP-CCNL2, pEGFP-CCNL2ΔN, pEGFP-CCNL1) mit FuGENE™6-Reagenz transient transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in PBS gewaschen und in 3% Paraformaldehyd-Lösung für 20 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden erneut 2x 5 min in PBS gewaschen und anschließend in 0.2% Triton X-100 in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Das Detergens wurde durch dreimaliges Waschen in PBS (jeweils 5 min) entfernt. Die Detektion von endogenem SC35 erfolgte nach Blocken der Zellen mit 3% (w/v) BSA in PBS (20 min) durch Inkubation mit dem primären Antikörper (anti SC35; 1:100 in 3% BSA in PBS) für 1 h bei RT. Der Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS (je 5 min) entfernt, die Zellen wurden erneut geblockt (s.o.) und mit dem sekundären Antikörper (Alexa-Red konjugierter anti Maus Antikörper; 1:100 in 3% BSA in PBS) 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Zellen mehrmals intensiv mit PBS gewaschen wurden, wurden sie in *Fluoromount-G* (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA) eingebettet und mit einem konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop* (Zeiss, Jena, Germany) analysiert.

2.4.5 Detektion der *in vivo*-Phosphorylierung

Um die Phosphorylierung von SF3B1 und Cyclin L2 *in vivo* zu untersuchen, wurden COS-7 Zellen in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesät (150 000 Zellen/Schale) und mit den entsprechenden GFP-Fusionskonstrukten transfiziert. 2 Tage nach Transfektion wurden die Zellen in Phosphat-freiem DMEM-Medium

gewaschen und in 4 ml dieses Mediums für 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Medium erneuert (2 ml/Platte) und mit radioaktiver $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (Hartmann Analytic GmbH) versetzt. Sollte anschließend ein *Peptide Mapping* erfolgen, wurden mindestens 300 μCi $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ pro ml Medium eingesetzt. Für die Detektion der Proteine auf einem *Western-Blot* reichten 15 μCi $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ pro ml Medium aus. Die Zellen wurden 2.5 h inkubiert, anschließend in Phosphat-freiem Puffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl) gewaschen und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Die Proteine wurden anschließend immungefällt und entweder für die Herstellung eines *Western-Blots* oder einer Phosphopeptid-Karte verwendet.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Expression und Aufreinigung von Proteinen in Bakterien

2.5.1.1 GST-Fusionsproteine

200 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden mit 5 ml einer *E. coli*-DH5 α -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0.5 - 0.6 im Inkubationsschüttler bei 37 °C angezogen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG; Endkonzentration: 0.1 mM), und die Expression des GST-Fusionsproteins wurde über einen Zeitraum von 2 h induziert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 2 500 g), und das erhaltene Pellet wurde in 9 ml kaltem PBS mit 1.2 mg Lysozym und 1.6 mg PMSF resuspendiert (5 min bei RT). Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Ultraschall (Sonifier 450, Branson Ultrasonics) für 30 s und darauf folgend eine Zugabe von 450 μl 20%igem Triton X-100 in PBS (Inkubation: 15 min auf Eis, alle 5 min homogenisiert). Die verbliebenen Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 15 000 g), und der Überstand wurde mit 200 μl Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Bioscience) vermischt. Das exprimierte Protein wurde während einer Inkubation von 2 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler an die Sepharose gebunden und mit der Sepharose bei 15 000 g (4 min, 4 °C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sepharose dreimal mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen. Das Protein wurde 2x mit je 150 μl GEB-Puffer (20 min auf Eis) von der Sepharose eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und bei -20 °C gelagert. Fusionsproteine von Kinasen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.5.1.2 His-Fusionsproteine

Die Herstellung der bakteriellen Lysate erfolgte nach der Methode, die oben für GST-Fusionsproteine beschrieben ist. Die Lysate wurden mit der vom Hersteller empfohlenen Menge Nickel-NTA-Agarose (Qiagen) 2 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Proteine durch Waschen der Agarose mit Ni-Waschpuffer entfernt (4x je 1ml). Die Elution erfolgte mit

steigenden Konzentrationen Imidazol in 1x Ni-Waschpuffer. Jeder Elutionsschritt wurde mit 500 µl für je 10 min bei RT durchgeführt, wobei 2x mit 2 mM, 1x mit 20 mM, 1x mit 50 mM und 1x mit 200 mM Imidazol eluiert wurde. Anschließend wurden Aliquots der Fraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch Coomassie-Färbung des Gels wurde die Fraktion bestimmt, die das exprimierte Protein enthielt. Bei niedrigen Imidazol-Konzentrationen wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die in dieser Arbeit verwendeten His-Fusionsproteine konnten mit 200 mM Imidazol eluiert werden. Da Imidazol die Kinaseaktivität von DYRK1A hemmt, wurden die Proteine, die für Phosphorylierungen eingesetzt wurden, entweder durch Ultrafiltration mit Centricon-Säulen (Amicon Inc., Beverly, MA, USA) oder durch Gelfiltration umgepuffert. Die Konzentrations-Bestimmung von aufgereinigten Proteinen erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Kit* der Firma Pierce.

2.5.1.3 Aufreinigung von *Inclusion Bodies*

Bei der bakteriellen Expression von pQE-CCNL2Δ konnte das Protein nicht nativ durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden, da es während der Expression als *Inclusion Body* ausfiel. *Inclusion Bodies* haben die Eigenschaft, bei der Lyse von Bakterien unter nativen Bedingungen nicht in Lösung zu gehen. Dadurch können sie von anderen Zellproteinen durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Proteinexpression von 100 ml *E. coli* Kultur wurde mit IPTG induziert, die Bakterien wurden abzentrifugiert, und das Pellet wurde in 3 ml IB-Puffer mit 25 µl PMSF (0.1 M) und 50 µl Lysozym (10 mg/ml) 5 min auf Eis resuspendiert. Nach einer Behandlung mit Ultraschall (4x 20 s) wurden 300 µl Triton (20% in PBS) hinzu gegeben und die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde die Suspension wiederholt durch Vortexen gemischt. Die *Inclusion Bodies* und andere unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (12 000g, 4 °C, 10 min), und das erhaltene Pellet wurde durch Ultraschall (2x 20 s) in 3 ml IB-Puffer wieder gelöst. Nach erneuter Zugabe von 300 µl Triton (20% in PBS) wurden die DNA und RNA mit 50 µg DNase und 50 µg RNase A 1 h lang bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden die *Inclusion Bodies* erneut abzentrifugiert (30 000g, 4 °C, 10 min). Durch dreimalige Resuspension in 3 ml IB-Puffer und 300 µl Triton (20% in PBS) mit anschließender Zentrifugation (30 000g, 4 °C, 10 min) wurden die *Inclusion Bodies* von anderen *E. coli* Proteinen gereinigt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die *Inclusion Bodies* in 500 µl Guanidiniumhydrochlorid (GHCl)-Lösung (7 M GHCl; 0.1 M DTT) für 30 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler gelöst. Die vollständige Solubilisierung wurde überprüft, indem die Lösung erneut zentrifugiert wurde (30 000g, 4 °C, 10 min) und kein Pellet mehr beobachtet werden konnte. Die Proteine wurden anschließend durch Gelfiltration vom GHCl befreit.

2.5.1.4 Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte mit fertig gepackten Säulen (NAPTM-5 gefüllt mit Sephadex[®]G-25) der Firma Amersham Bioscience. Die Säulen wurden mit 5 Säulen-Volumina (5x 2 ml) 10 mM Tris-HCl pH 7.5 und 100 mM NaCl äquilibriert und anschließend mit der Probe (500 µl) beladen. Nachdem die Probe vollständig in das Gelbett eingesunken war, wurden die Proteine mit 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl eluiert und in Fraktionen von 5x 200 µl aufgefangen. Durch gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende Coomassie-Färbung wurden die Fraktionen bestimmt, die das Protein enthielten.

2.5.1.5 *Pulldown*-Experimente

Der Interaktionsnachweis wurde mit GST-Fusionsproteinen durchgeführt, die an Glutathion-S-Sepharose gekoppelt waren. Die immobilisierten Proteine wurden unter Schütteln (3 h bei 4 °C) in *Pulldown*-Puffer mit Zelllysaten von COS-7 Zellen inkubiert, die zuvor mit GFP-CCNL2ΔN transient transfiziert worden waren. Die Sepharose wurde 5x in *Pulldown*-Puffer gewaschen und anschließend in Laemmli-Probenpuffer ausgekocht. Die Proteine wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Proteine wurden mit Ponceau S-Lösung angefärbt, um die Mengen der immobilisierten Proteine vergleichen zu können, die im *Pulldown* eingesetzt wurden. Anschließend wurde GFP-CCNL2-ΔN mit Hilfe eines GFP-Antikörpers (monoklonal) und Peroxidase-vermittelter Chemilumineszenz nachgewiesen.

2.5.2 Präparation von Proteinen aus Säugerzellen

2.5.2.1 Präparation von Kernproteinen aus Maushoden

Nach der Gewichtsbestimmung wurde ein eingefrorener Maushoden in Gegenwart von eiskaltem Lysis-Puffer (2 ml Puffer/g Gewebe) in einem 50 ml Potter (Thomas ScientificTM, Swedesboro, USA) durch 10 Hübe bei 2 000 rpm homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert (5 min bei 2 000 rpm und 4 °C; JS-13.1-Rotor, Beckmann) und das Pellet in 4 ml eiskaltem Lysis-Puffer aufgenommen. Das resuspendierte Pellet wurde in 6 Aliquots unterteilt. Die Kerne wurden schließlich durch Ultrazentrifugation der Aliquots für 30 min bei 23 000 rpm und 4 °C auf je 9 ml 1.8 M Saccharosekissen (SW-40TI-Rotor, Beckmann) pelletiert. Die Kernpellets wurden schließlich in je 50 µl Solubilisierungs-Puffer aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

2.5.2.2 Präparation von Gesamtzelllysaten

Native Lyse für die Immunpräzipitation

Transient transfizierte COS-7 Zellen in 6mm-Schalen wurden für eine Immunpräzipitation mit anschließendem Immunkomplex-Kinase-Assay wie folgt lysiert: Das Medium wurde dekantiert und die COS-7 Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Zur Lyse wurden die Platten auf Eis gestellt, mit 500 µl nativem Lysispuffer + Inhibitor-Mix überschichtet und für 15 min unter mehrmaligem Schwenken auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann im nativen Lysispuffer abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen für 30 s mit Ultraschall behandelt (Sonifier 450, Branson Ultrasonics) und gründlich gevortext. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 21 000 g), und der Überstand wurde anschließend direkt für eine Immunpräzipitation verwendet.

Denaturierende Lyse für die Immunpräzipitation

Für die Analyse von Phosphoproteinen wurde die Lyse unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, um einerseits die Dephosphorylierung durch Phosphatasen, andererseits eine nachträgliche Phosphorylierung durch Kontakt zu Kinasen im Lysat zu verhindern. Das Medium wurde dekantiert, die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 500 µl kochendem SDS-Lysispuffer überschichtet. Das Zelllysate wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 min im Wasserbad gekocht. Die Lysate wurden anschließend für 30 s mit Ultraschall behandelt (Sonifier 450, Branson Ultrasonics), die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und die Protein-Lösungen bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.5.2.3 Immunpräzipitation

Im Anschluss an eine native Lyse wurden Immunpräzipitationen mit dem kompletten Lysat einer Kulturschale (6 cm Durchmesser) durchgeführt. Dieses wurde mit 2 µl polyklonalem GFP-Antiserum (Molecular Probes) versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Immunkomplex mit 30 µl Protein-A-Sepharose CL-4B-Lösung (0.075 g/ml; Amersham Bioscience) über Nacht auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C gefällt. Nach einer einminütigen Zentrifugation in einer gekühlten Zentrifuge (21 000 g) wurde der Überstand verworfen und die Sepharose zweimal mit kaltem Waschpuffer mit 0.1% (w/v) Nonidet-P40 und zweimal mit Waschpuffer ohne Nonidet-P40 gewaschen (jeweils 1 ml). Danach wurde der Überstand möglichst vollständig abgehoben und die verbleibende Sepharose mit den gebundenen Proteinen in eine *in vitro*-Substratphosphorylierung eingesetzt.

Nach einer denaturierenden Zelllyse wurde das gesamte Lysat einer Kulturplatte (6 cm Durchmesser) zur Präzipitation eingesetzt. In einem 15 ml-Sarstedt-Röhrchen wurden 500 µl Lysat mit bidestilliertem Wasser auf 2 ml aufgefüllt und mit 2 ml Immunpräzipitationspuffer¹ und 2 µl polyklonalem GFP-Antiserum (Molecular Probes) versetzt.

Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden 30 µl Protein-A-Sepharose CL-4B (0.075 g/ml) zugesetzt und der Ansatz über Nacht bei 4 °C in einem Überkopfschüttler rotiert. Die Sepharose wurde am nächsten Tag abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Sepharose zweimal mit Immunpräzipitationspuffer2 mit 0.1% Triton X-100 und zweimal mit Immunpräzipitationspuffer2 ohne Triton X-100 gewaschen. Danach wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt, und die immungefällten Proteine wurden durch Inkubation bei 95 °C in Laemmli-Probenpuffer von der Sepharose eluiert.

2.5.3 Western-Blot-Analyse

2.5.3.1 Western-Blot

Der Transfer aufgetrennter Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF (Polyvinyliden Difluorid)-Membran (Immobilon™-P, Millipore Corporation, USA) oder Nitrozellulose (Protran, Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte im Tank-*Blot*-Verfahren (TE 22 Mighty Small™ Transphor, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) in Transferpuffer bei 200 mA für 2 h unter Wasserkühlung. Beide Membrantypen wurden vor Zusammenbau der Apparatur in Transferpuffer äquilibriert, wobei die PVDF-Membran zuvor mit Methanol angefeuchtet werden musste. Die auf den Membranen gebundenen Proteine wurden mit Ponceau S-Lösung angefärbt und anschließend für eine Antikörper-vermittelte Detektion, für eine Festphasen-Phosphorylierung oder die Herstellung eines Autoradiogramms verwendet.

2.5.3.2 Immunchemische Detektion von Western-Blots

Der Nachweis von Proteinen auf *Western-Blots* erfolgte mittels Chemilumineszenz. Die Membranen mit elektro-geblotteten Proteinen wurden in 3% BSA in TBST für eine Stunde bei RT blockiert und anschließend über Nacht mit dem primären Antikörper (anti Cycl2 1:500 bis 1:5000; anti GFP 1:5000; anti pTP 1:1000; anti DYRK1A 1:200; anti STAT3 1:1000) in 3% BSA, 0.02% Natrium-Azid in TBST bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 2x 10 min mit TBST und 2x 10 min mit 5% Milchpulver in TBST gewaschen, und anschließend wurden die Membranen mit dem passenden POD-gekoppelten sekundären Antikörper in 5% Milchpulver in TBST (1:5000) für 1 h inkubiert. Nach 4-maligem Waschen in TBST (jeweils 15 min) wurde die Chemilumineszenz-Reaktion durch 1minütige Inkubation in Detektionslösung durchgeführt. Auf den Membranen wurde direkt, je nach Signalintensität, ein Röntgenfilm wenige Sekunden bis zu 20 Minuten exponiert.

2.5.3.3 Entfernen von spezifisch gebundenem Antikörper

Im Anschluss an einen Immun-Assay der *Western-Blots* mit Peroxidase-vermittelter Chemilumineszenz konnte die Bindung zwischen Protein und Antikörper gelöst werden, indem die Membran unter leichtem Schütteln im Wasserbad (50 °C) für 30 min mit 100 mM β -Mercaptoethanol und 2% SDS in TBS-Puffer inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min mit TBST-Puffer bei RT gewaschen und in TBST-Puffer mit 3% BSA über Nacht geblockt.

2.6 Phosphorylierungsreaktionen

2.6.1 Definition der katalytischen Einheit für DYRK1A

Eine *Unit* der Proteinkinase-Aktivität wird hier definiert über die Phosphorylierung des synthetischen Standard-Peptid-Substrats DYRKtide (RRRFRPASPLRGPPK, Himpel *et al.*, 2000). Dabei entspricht eine *Unit* der Menge an Enzym, die die Phosphorylierung von 1 nmol DYRKtide in 1 min bei 30° C in Standard-Kinasepuffer katalysiert.

2.6.2 Festphasen-Phosphorylierung

Die cDNA-Expressionsbibliothek in Form eines Filter-Arrays (Büssow *et al.*, 1998) wurde für die Festphasen-Phosphorylierung verwendet. Auf dem Filter befanden sich *E. coli*-Kolonien, die durch Induktion mit Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG) eine cDNA-Bibliothek aus menschlichem, fötalem Gehirn im Vektorsystem pQE-30NST (GenBankTM Zugangsnummer: AF074376) exprimiert hatten. Die Bibliothek beinhaltete 37 830 Klone, die doppelt auf die Membran aufgebracht waren (Bibliotheksnummer: 800; RZPD Berlin). Die Kolonien wurden durch alkalische Behandlung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl, 10 min) lysiert, und der Filter wurde anschließend 2x 5 min neutralisiert (1 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl). Der Filter wurde getrocknet und in dieser Form freundlicherweise von Konrad Büssow zur Verfügung gestellt. Die bakteriellen Zelltrümmer wurden mit TBSTT-getränkten, fusselfreien Tüchern weggewischt, und der Filter wurde 2x 10 min in TBSTT und 1x 10 min in TBS bei Raumtemperatur gewaschen. Der Filter-Array bzw. PVDF-Membranen mit elektrogeblotteten Proteinen wurden in Kinasepuffer und 100 mM NaCl, 3% BSA und 3 μ M kaltem ATP für 1 h bei RT inkubiert, um Proteine mit Autophosphorylierungs-Aktivitäten und/oder ATP-Bindungs-Aktivitäten abzusättigen (Fukunaga und Hunter, 1997). Die Phosphorylierungsreaktion wurde mit 0.2 *Units*/ml GST-DYRK1A Δ C in Kinasepuffer mit 3 μ M [γ -³²P]ATP (5 μ Ci/ml) 45 min lang durchgeführt. Es wurde das Konstrukt GST-DYRK1A Δ C eingesetzt, da es die gleiche Substratspezifität, aber eine höhere Aktivität als die komplette Kinase aufweist, wenn es in *E. coli* produziert wird (Himpel *et al.*, 2000). Nach der Phosphorylierung wurden der Filter-Array bzw. die PVDF-Membranen 2x mit 30 mM Tris-HCl pH 7.4, 1x mit 30 mM Tris-HCl pH 7.4 und 0.05% NP40, 2x mit

30 mM Tris-HCl pH 7.4 ohne NP40, 1x mit 1 M HCl und abschließend 2x mit 30 mM Tris-HCl pH 7.4 für jeweils 10 min gewaschen. Die Membranen wurden luftgetrocknet und anschließend ein Röntgenfilm bzw. Phosphor Screen exponiert.

2.6.3 *In vitro*-Kinase-Assay

Alle Substrate wurden als Affinitäts-gereinigte GST-Fusionsproteine oder His-Fusionsproteine in Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt. His-Fusionsproteine wurden entweder durch Ultrafiltration mit Centricon-Säulen oder durch Gelfiltration vom Imidazol des Elutionspuffers befreit. Zusätzlich wurde als Substrat MBP (*myelin basic protein*) eingesetzt, das von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen wurde.

DYRK1A-Assays:

Wenn nicht gesondert angegeben, wurden die Kinase-Assays mit 0.5 *Units*/ml GST-DYRK1A Δ C in Kinasepuffer mit 100 μ M [γ -³²P]ATP (66.6 μ Ci/ml) für 15 min bei 30 °C durchgeführt. Die Reaktionen wurden anschließend durch Zugabe von 1/3 Vol Laemmli-Probenpuffer/EDTA gestoppt, 5 min bei 95 °C denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Das Gel wurde danach entweder direkt mit Coomassie gefärbt und für die Herstellung eines Autoradiogramms verwendet oder für *Western-Blot*-Analysen auf Nitrocellulose-Membran geblottet.

CDK2/CyclinE-Assays:

Die Phosphorylierungsreaktionen wurden in CDK2-Kinasepuffer (50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM Natrium-Vanadat, 10 mM NaF) für 15 - 30 min bei 30 °C durchgeführt. In der vergleichenden Phosphorylierung von RB und SF3B1 (Kap. 3.4.2.1) wurden 333 *Units*/ml kinase und 100 μ M [γ -³²P]ATP (66.6 μ Ci/ml) eingesetzt.

Eine *Unit* CDK2/Cyclin E ist definiert als die Menge an katalytisch aktivem Enzymkomplex, die 1 pmol Phosphat in 5 μ M Histon H1 in 30 Minuten bei 30 °C in CDK2-Kinasepuffer (25 μ M ATP) einbaut.

2.6.4 K_m-Wert-Bestimmung

His₆-SF3B1 Δ (pQE-SF3B1 Δ ; AS 304 bis 493) wurde bakteriell exprimiert und Affinitäts-gereinigt. Da das Protein fragmentierte, wurde es in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Bande des restlichen intakten Proteins ausgeschnitten. Durch Elektroelution (Bio-Rad Laboratories GmbH, Durchführung nach Hersteller-Angaben) wurde das Protein aus dem Gel gewonnen und anschließend der SDS-enthaltende Elutionspuffer durch Ultrafiltration mit Centricon-Säulen entfernt. Das Protein wurde zunächst für eine grobe Abschätzung des K_m-Wertes in einer Konzentration von 1 μ M [S1] und 10 μ M [S2] in Kinase-Assays mit 0.1 *Unit*/ml GST-DYRK1A Δ C eingesetzt. Der Phosphateinbau wurde nach 2, 4, 8, und 16 min bestimmt, indem drei Aliquots des Reaktionsansatzes auf das Ionenaustauscherpapier Whatman P-81 (Whatman,

Maidstone, UK) gedottet wurden. Das Papier wurde in 5%iger Phosphorsäure gewaschen und im Anschluss daran der Einbau von ^{32}P in flüssigem Scintillationscocktail gemessen (Himpel *et al.*, 2000). Die Reaktionsgeschwindigkeiten bei den beiden Substratkonzentrationen wurden ermittelt (v_1 und v_2) und für die Berechnung des K_m -Wertes mit folgender Gleichung verwendet (Suelter, 1990):

$$K_M = \frac{(v_2 - v_1)}{\left(\frac{v_1}{[S_1]} - \frac{v_2}{[S_2]} \right)}$$

Für eine exakte Bestimmung wurden Substratkonzentrationen gewählt, die sich um den im Vorversuch ermittelten K_m -Wert ($2.4 \mu\text{M}$) gruppieren: $0.3125 \mu\text{M}$, $0.625 \mu\text{M}$, $1.25 \mu\text{M}$, $2.5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$. Die Phosphorylierungsreaktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt und der Phosphateinbau in einer 3fach Bestimmung nach 4 min gemessen. Die Linearität der Reaktion wurde durch eine zusätzliche Messung nach 8 min überprüft. Die Hintergrund-Phosphorylierung, die durch DYRK1A-Autophosphorylierung zustande kam, wurde in einem separaten Ansatz ohne Substrat gemessen und von den anderen Messwerten abgezogen. Die so korrigierten Messwerte wurden mit Hilfe des Computerprogramms Graphpad Prism 1.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) in einer nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten analysiert:

$$Y = \frac{V_{\max} * X}{K_m + X} \quad Y = \text{Geschwindigkeit des Phosphateinbaus, } X = \text{Substratkonzentration}$$

2.6.5 Vergleichende K_m -Wert-Abschätzung (DYRK1A und CDK2)

Bakteriell exprimiertes SF3B1NT-His₆ wurde Affinitäts-gereinigt und das Imidazol des Elutionspuffers durch Gelfiltration entfernt. Das Protein wurde anschließend in einer Konzentration von $0.7 \mu\text{M}$ und $7 \mu\text{M}$ durch die Kinasen CDK2/Cyclin E bzw. GST-DYRK1A Δ C phosphoryliert. Beide Reaktionen wurden in ihrem optimalen Puffersystem mit $50 \mu\text{M}$ ($66.6 \mu\text{Ci/ml}$) ATP durchgeführt. Es wurden 400 Units/ml CDK2/CyclinE und 1 Unit/ml GST-DYRK1A Δ C eingesetzt. Der Phosphateinbau wurde wie unter Kapitel 2.6.4 beschrieben nach 2, 4, 8 und 16 min bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten bei den beiden Substratkonzentrationen wurden ermittelt und in die unter Kap. 2.6.4 angegebene Gleichung eingesetzt.

2.6.6 Immunkomplex-Kinase-Assay

Mit Hilfe des Immunkomplex-Kinase-Assays wurde die katalytische Aktivität des Konstruktes GFP-CLK3 nachgewiesen. In COS-7 Zellen exprimiertes GFP-CLK3 bzw. GFP (Kontrolle) wurden unter nativen Bedingungen immungefällt, um die katalytische Aktivität zu erhalten. Anschließend wurde mit diesem Immunkomplex ein Kinase-Assay

durchgeführt. Als Substrate in diesen Reaktionen dienten je 500 ng MBP. Der Immunkomplex wurde in Anwesenheit von 20 μM [γ - ^{32}P]ATP (33 $\mu\text{Ci/ml}$) in Kinasepuffer für 30 min bei 30 °C mit dem Substrat inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 1/3 Volumen 2x Laemmli-Probenpuffer gestoppt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, und ein Röntgenfilm wurde auf dem getrockneten Gel über Nacht exponiert.

2.6.7 SAPtide-Assay

Das Peptid SAPtide wurde von Marlies Fabry (Institut für Wollforschung, Aachen) synthetisiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Peptide-Assay wurde mit 10, 50, 100 bzw. 500 μM SAPtide und 0.4 *Units/ml* GST-DYRK1A ΔC in Kinasepuffer mit 200 μM [γ - ^{32}P]ATP (25 $\mu\text{Ci/ml}$) durchgeführt. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeiten bei den verschiedenen SAPtide-Konzentrationen wurde in einer 3fach Bestimmung nach 4 min gemessen. Mit einer zusätzlichen Messung nach 8 min wurde die Linearität der Reaktion kontrolliert. Die Autophosphorylierung von DYRK1A wurde in einem Ansatz ohne Substrat nach 4 min bestimmt und von den ermittelten 4min-Werten abgezogen. Die so errechneten Reaktionsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden für die Berechnung eines K_m -Wertes nach Michaelis-Menten verwendet (Kap. 2.6.4).

2.7 Massenspektrometrische Analyse von Phosphorylierungsstellen

Die Klone pQE-CCNL2 ΔN und pQE-SF3B1 Δ des Filter-Arrays wurden für eine präparative Proteinexpression verwendet. His $_6$ -SF3B1 Δ wurde Affinitäts-gereinigt und das Imidazol des Elutionspuffers durch Gelfiltration entfernt. His $_6$ -CCNL2 ΔN wurde in Form von *Inclusion Bodies* aufgereinigt und anschließend durch Gelfiltration renaturiert. Um eine möglichst vollständige Phosphorylierung der beiden Substrate zu erhalten, wurden sie in einem molaren Substrat-Kinase-Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die Reaktion wurde mit jeweils 1 nmol Substrat und 1 nmol GST-DYRK1Acat, 500 μM ATP in 150 μl Kinasepuffer für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Die Ansätze wurden mit 1/3 Vol Laemmli-Probenpuffer versetzt, zusammen mit unphosphoryliertem Substrat gelelektrophoretisch aufgetrennt, und das Gel wurde mit Coomassie-Färbelösung behandelt. Die jeweiligen Banden (CCNL2 drei Banden + unphosphoryliertes Protein; SF3B1 eine Bande + unphosphoryliertes Protein) wurden separat ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Die Gelstücke wurden an der Luft getrocknet und anschließend von Len Packman (Cambridge, UK) weiterbearbeitet. Nach tryptischem Verdau wurden die Peptide aus dem Gel extrahiert und in einer Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI) untersucht.

2.8 Peptide Mapping

Bakteriell exprimiertes SF3B1NT-His₆, Punkt-Mutanten dieses Proteins (Vektorsystem pET28a) und das Konstrukt SF3B1/401-511 wurden *in vitro* durch GST-DYRK1A Δ C radioaktiv phosphoryliert. Die Phosphorylierung von ca. 4 μ g Substrat wurde mit 10 μ M [γ -³²P]ATP (100 μ Ci/ml), 100 mM NaCl und 1.5 *Units*/ml GST-DYRK1A Δ C in einem Volumen von 30 μ l Kinasepuffer durchgeführt. Die Phosphorylierung von SF3B1 durch CDK2/Cyclin E wurde unter den gleichen Bedingungen in CDK2-Kinasepuffer mit 500 *Units*/ml CDK2/Cyclin E durchgeführt. Die Phosphorylierung von GFP-Konstrukten, die in COS-7 Zellen exprimiert wurden, wurde durch Inkubation der Zellen mit radioaktiver Phosphorsäure erreicht (Kap. 2.4.5).

Die *in vitro* phosphorylierten bakteriellen Proteine wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese von der Kinase getrennt. Die *in vivo* markierten GFP-Fusionsproteine wurden unter denaturierenden Bedingungen durch Immunpräzipitation und anschließende Gelelektrophorese isoliert. Die Gele wurden anschließend auf Whatman Papier 2668 (Schleicher & Schuell, Dassel) getrocknet und die Position der radioaktiv phosphorylierten Proteine wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes ermittelt. Nach Ausschneiden des Proteins aus dem Gel und Entfernung des Whatman Papiers 2668 wurde jedes Gelstück in 1 ml Extraktionspuffer homogenisiert. Das Gemisch wurde gevortext und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Nach einer Inkubation von 6 h bei 37 °C unter kräftigem Schütteln wurde die Probe bei 15 000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Extraktion der Proteine wurde in 600 - 800 μ l Extraktionspuffer für einige Stunden wiederholt, so dass beide Extrakte zusammen ein Volumen von 1.2 ml ergaben. Die Proteine in dem vereinigten Extrakt wurden anschließend durch Zugabe von 10 μ l RNaseA (1 mg/ml, Fällungshilfe) und 250 μ l Trichloressigsäure (TCA, 100% w/v in H₂O) 40 min lang auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (15 000 rpm, 4 °C, 15 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x in je 1 ml Ethanol/Ether (Volumen-Verhältnis 1:1) gewaschen. Hierzu wurde es jeweils gevortext und anschließend durch Zentrifugation (15 000 rpm, 4 °C, 10 min) wieder pelletiert. Nachdem das Ethanol/Ether-Gemisch verdampft war, wurde das trockene Pellet in 30 μ l Perameisensäure auf Eis für 90 min oxidiert. Die Perameisensäure wurde durch Inkubation von 100 μ l Ameisensäure mit 10 μ l 30%igem Wasserstoff-Peroxid für 1h bei RT hergestellt. Anschließend wurden die oxidierten Proteine mit 0.5 ml H₂O gemischt und lyophilisiert. Das Proteinpellet wurde dann in 20 μ l 50 mM Ammonium-Bicarbonat aufgenommen und durch Zugabe von 1 μ g Trypsin (*sequencing grade*, Roche Diagnostics GmbH) über Nacht bei 37 °C verdaut. Am nächsten Tag wurde 3x über den Tag verteilt nochmals je 0.5 μ g Trypsin hinzu gegeben, um einen vollständigen Verdau zu erreichen. Das Ammonium-Bicarbonat in der Peptidlösung wurde anschließend durch zweimaliges Mischen mit je 1 ml H₂O und anschließender Lyophilisation entfernt. Die lyophilisierten Proteine wurden in 5 μ l

pH1.9-Puffer aufgenommen und auf Cellulose-beschichtete Dünnschicht-Platten (Merck, Darmstadt) aufgedottet. Hierbei wurden radioaktive Mengen von 1 000 bis 10 000 cpm aufgetragen. Die Platten wurden mit pH1.9-Puffer äquilibriert, indem ein Whatman-Papier aufgelegt wurde, das mit pH1.9-Puffer getränkt war. Anschließend wurden zwei gegenüberliegende Seiten der feuchten Platten durch Whatman-Papiere (Brücken) mit Puffer-Reservoirien (pH1.9-Puffer) verbunden und die Peptide unter Kühlung elektrophoretisch aufgetrennt (20 min bei 1.8 kV). Nachdem die Platten mindestens 1 h getrocknet waren, wurden die Peptide in einer 2. Dimension durch Dünnschicht-Chromatographie in dem oben angegebenen Laufmittel für ca. 10 h aufgetrennt, bis die Laufront kurz unterhalb des Plattenendes angekommen war. Die Positionen der phosphorylierten Peptide wurden durch Exposition von Phosphor Screens detektiert.

2.9 RNA-Interference

Die RNAi-Konstrukte für den spezifischen *Knock-Down* von humaner DYRK1A standen unserer Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung. Das Konstrukt pSUPER-673 exprimiert einen doppelsträngigen RNA-Abschnitt, der homolog zu den Basen 671 bis 691 der DYRK1A-mRNA ist (GenBank™ Zugangsnummer: NM_001396 AAGCACAGATAGAAG TGCGAC). Die durch pSUPER-2060 kodierte RNA ist homolog zu den Basen 2060 bis 2078 (CGACTTCTTCCTCGACATC). COS-7 Zellen wurden mit 1.5 µg pEGFP-SF3B1NT transfiziert. Dazu wurden entweder 2.5 µg pSUPER-leer oder 1.25 µg pSUPER-673 und 1.25 µg pSUPER-2060 kotransfiziert. Die Zellen wurden mit radioaktivem Phosphat inkubiert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. 1/10 des Lysats wurde für eine *Western-Blot*-Analyse verwendet. Aus dem restlichen Lysat wurde SF3B1 immungefällt und für die Herstellung eines *Western-Blots* benutzt.

2.10 Verwendete Computerprogramme für die Datenbank-Recherchen

Die Datenbank-Recherchen wurden mit Hilfe der HUSAR-Software des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/>) durchgeführt. Dabei wurden folgende Programme verwendet: Prosite (Bairoch, 1992), BestFit (Needleman und Wunsch, 1970; Smith und Waterman, 1981), BlastP2 (Altschul *et al.*, 1997), ClustAl (Thompson *et al.*, 1994; Higgins *et al.*, 1992), Clustree (Saitou und Nei, 1987), Peptide Sort und Translate (DKFZ, Heidelberg).

3. Ergebnisse

3.1 Festphasen-Phosphorylierung einer cDNA Expressionsbibliothek

Um Substrate der Kinase DYRK1A zu identifizieren, wurde eine cDNA-Expressionsbibliothek aus menschlichem fötalen Gehirn (Büssow *et al.*, 1998) für eine Festphasen-Phosphorylierung durch DYRK1A verwendet. 37 830 cDNA-Klone dieser Bibliothek wurden nach einem festgelegten Koordinatengitter jeweils doppelt auf eine Membran aufgebracht (PVDF-Membran 22 x 22 cm). Durch IPTG-Induktion wurden die cDNAs in Fusion an einen N-terminalen His₆-Tag exprimiert. Die Membranen mit den lysierten Kolonien wurden getrocknet und in dieser Form freundlicherweise von Konrad Büssow zur Verfügung gestellt. Nach Entfernung der *E. coli*-Kolonien blieben die Fusionsproteine auf der Membran zurück. Die Membran wurde vor der Phosphorylierung in einem ATP-haltigen Puffer inkubiert, um Proteine mit Autophosphorylierungs-Aktivität und/oder ATP-Bindungs-Aktivität abzusättigen (Fukunaga und Hunter, 1997). Anschließend wurden die Proteine durch GST-DYRK1AΔC radioaktiv mit [γ -³²P]ATP phosphoryliert.

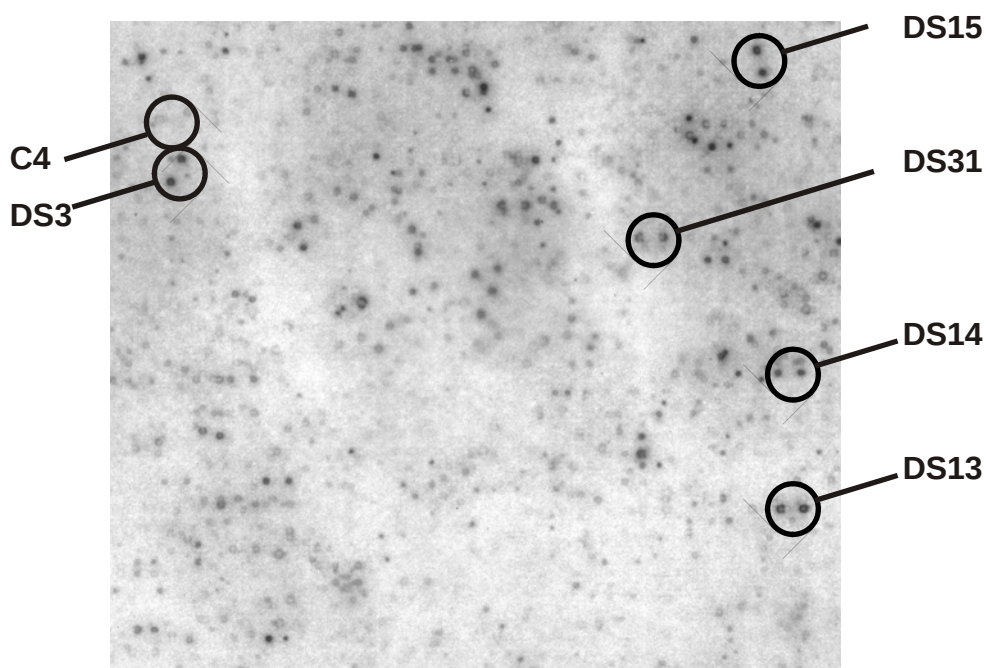


Abb. 3.1: Festphasen-Phosphorylierung der Expressionsbibliothek durch DYRK1A

Die His₆-Fusionsproteine der Bibliothek wurden durch IPTG-Induktion der *E. coli*-Zellen auf dem Filter produziert. Die Proteine wurden durch GST-DYRK1AΔC radioaktiv phosphoryliert und die Punktpaare durch Autoradiographie detektiert. In dem hier dargestellten Ausschnitt des Autoradiogramms (ca. 20% des Filter-Arrays) sind exemplarisch einige stark phosphorylierte Proteine (DS3, DS13, DS14, DS15, DS31) und ein unphosphoryliertes Protein (C4) markiert.

Es wurde das C-terminal deletierte Konstrukt der Kinase gewählt, da es dieselbe Substratspezifität, aber eine höhere Aktivität als das komplette Konstrukt aufweist, wenn es in *E. coli* produziert wird (Himpel *et al.*, 2000). Die phosphorylierten Proteine wurden als Punkte-Paare auf der getrockneten Membran durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Abb. 3.1 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt dieses Autoradiogramms. Neben Punktepaaren von phosphorylierten Proteinen (DS3, DS13, DS14, DS15, DS31) ist ein nicht phosphoryliertes Protein (C4) dargestellt, das in weiteren Versuchen als Negativkontrolle fungierte. Insgesamt wurden 72 Proteine mit starken Signalintensitäten detektiert, das bedeutet, 0.19% der auf dem Filter vorhandenen Proteine wurden stark phosphoryliert. Darüber hinaus wurden ca. 2.1% der Proteine schwach phosphoryliert. Von den 72 stark phosphorylierten Proteinen wurden die 31 Proteine, die die prominentesten Signale zeigten, und ein nicht phosphoryliertes Protein ausgewählt und deren Koordinaten bestimmt (DYRK1A-Substrate DS1 - DS32, negativ Kontrolle C4). Die zugehörigen Klone wurden beim RZPD als *E. coli*-Stichkulturen bestellt.

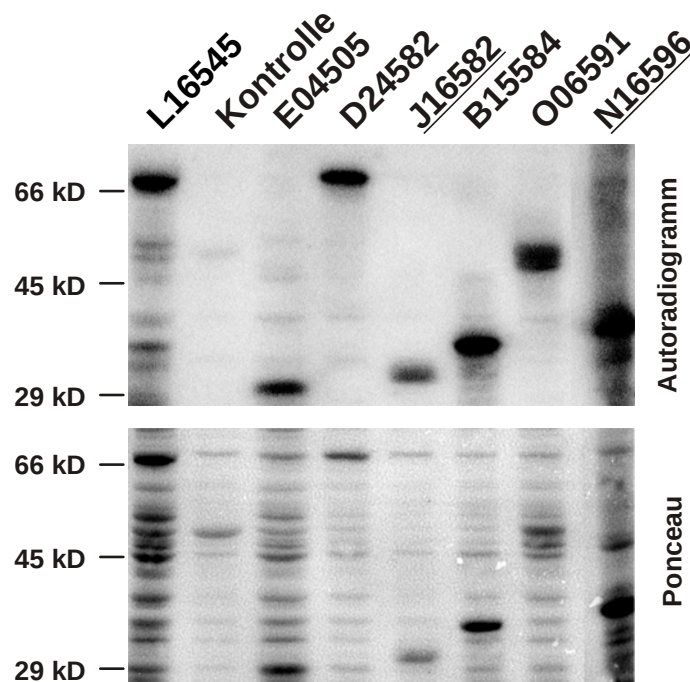


Abb. 3.2: Festphasen-Phosphorylierung ausgewählter Klone der Expressionsbibliothek

Die Expression der Fusionsproteine der ausgewählten Klone wurde in *E. coli* induziert. Gesamt-Zelllysate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf PVDF-Membranen transferiert. Die Proteine wurden mit Ponceau S-Lösung gefärbt (untere Abb.) und anschließend radioaktiv mit GST-DYRK1A Δ C phosphoryliert. Ein Autoradiogramm eines Teils der Bibliotheksklone ist exemplarisch dargestellt (obere Abb.). Die Klone sind mit Nummern bezeichnet, die im Anschluss an die Bibliotheksnummer (MPMGp800) die vollständigen RZPD-Nummern ergeben (z.B. MPMGp800L16545). Zwei Proteine, mit denen sich diese Arbeit hauptsächlich beschäftigt, sind unterstrichen (N16596-Cyclin L2; J16583-SF3B1). Kontrolle: ein Protein, das in dem Array-Experiment nicht phosphoryliert wurde (C4).

Um die Ergebnisse des Arrays zu verifizieren, wurden Gesamt-Zelllysate der 32 IPTG-induzierten *E. coli*-Klone in einer Festphasen-Phosphorylierung untersucht. Das Autoradiogramm in Abb. 3.2 zeigt exemplarisch einige der identifizierten Substrate und den Klon C4, der in dem Array-Versuch nicht phosphoryliert wurde und hier als Negativkontrolle fungiert. Alle 31 DS-Klone wurden in dieser Weise als Substrate bestätigt, die Negativkontrolle C4 wurde, wie erwartet, nicht phosphoryliert. Die Plasmid-DNA der einzelnen Klone wurde isoliert, mit den Enzymen *Sall* und *NotI* verdaut und damit die Größe der cDNA-Inserts im Agarosegel bestimmt. Die Inserts wurden mit Hilfe der Primer pQE-30NSTfor und pQE-30NSTrev aus Richtung des 5'- und des 3'-Endes sequenziert, und mit den erhaltenen Sequenzinformationen wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Mit den gefundenen Datenbankeinträgen wurden die eigenen Sequenzinformationen vervollständigt. Die von den Sequenzen kodierten Proteine wurden ermittelt (Programm Translate) und die resultierenden Molekulargewichte (Mr) und isoelektrischen Punkte (IEP) berechnet (Programm PeptideSort). Tab. 3.1 zeigt die gewonnenen Informationen. Die durchschnittliche Insert-Größe beträgt 1630 bp, das durchschnittliche Molekulargewicht 18.7 kD. Die meisten Fusionsproteine besitzen einen isoelektrischen Punkt im alkalischen Bereich (> pH 9.9). Ausnahmen bilden DS10, DS13 und DS31 mit einem IEP im neutralen (pH 6 - 8) und DS7 mit einem IEP im sauren Bereich (< pH 6). C4 wurde als Negativkontrolle verwendet und deshalb nicht in diese Gruppierung einbezogen.

Mit Hilfe von Protein-Datenbanken wurde untersucht, ob die entsprechenden cDNAs im richtigen Leseraster fusioniert sind. Ein großer Anteil der cDNA-Klone exprimiert Proteine, die *in vivo* nicht existieren. Teilweise werden die cDNAs bekannter Proteine im falschen Leseraster exprimiert (DS1, DS3, DS5, DS9, DS12, DS14, DS15, DS17, DS19, DS20, DS29). Einige cDNAs stammen nicht vom offenen Leseraster einer mRNA ab (DS6, DS23 und DS27 enthalten die *Spacer* ribosomaler RNA-Gene; DS25, DS10 und DS31 enthalten ein cDNA-Stück aus dem 5'UTR-Bereich einer mRNA; DS11 enthält einen Teil des *E. coli*-Chromosoms). Für andere Klone (DS21, DS22, DS24, DS26, DS28, DS30) existiert bislang kein *Unigene*-Eintrag (Oktober 2003). Es handelt sich also höchstwahrscheinlich nicht um cDNAs exprimierter Gene. Für den Klon DS32 kann nicht bestimmt werden, ob er im richtigen Leseraster exprimiert wird, obwohl er die cDNA eines bekannten Proteins exprimiert. Die aus Sequenzinformationen errechnete Proteingröße (10.7 kD) unterscheidet sich in erheblichen Maße von der experimentell ermittelten Größe (32 kD) und legt die Vermutung nahe, dass die cDNA unbekannte Insertionen enthält. Eine Sequenzierung des kompletten cDNA-Inserts wäre nötig, um diese Frage beantworten zu können.

Tab. 3.1: Charakterisierung von 32 ausgesuchten Klonen

Klone, deren cDNAs im richtigen Leseraster fusioniert waren, sind fett gedruckt

Labor- bezeichnung	RZPD-Nr. ¹	Insert-Größe der cDNA in bp ²	Mr in kD ³	IEP
DS1	J21577	631	8.9	11.96
DS2	L16545	2012	59.6	10.53
DS3	D10544	1985	10.3	12.98
C4	F10592	1289	42.4	5.24
DS5	E04505	1537	22.9	11.86
DS6 ^a	L01514	≈1200	10.0	9.95
DS7	D24582	1305	30.8	4.84
DS8	F01526	1118	24.7	12.42
DS9	E19524	1124	12.4	11.46
DS10 ^b	E18512	≈1200	3.6	7.76
DS11	P22543	≈3500	13.4	12.55
DS12	M15507	933	15.9	11.07
DS13	J16582	668	25.7	6.87
DS14	N16582	718	17.0	12.59
DS15	G17524	2616	12.0	12.08
DS16	B15584	2074	28.7	10.71
DS17 ^c	P11600	≈2100	12.9	11.66
DS18	O06591	2084	77.1	11.12
DS19 ^c	J02582	≈2000	10.8	11.76
DS20 ^c	D03578	≈2100	15.6	11.6
DS21 ^d	M24581	≈1600	9.9	12.22
DS22 ^d	C11553	≈1600	10.2	12.16
DS23 ^a	F07529	≈1400	10.0	11.05
DS24 ^e	L24544	≈2300	n.d.	n.d.
DS25	D20544	3104	12.9	12.41
DS26 ^e	E19544	≈2300	n.d.	n.d.
DS27 ^a	B06574	≈1500	10.0	9.95
DS28	F05592	≈1400	10.0	11.05
DS29	P01541	1224	10.6	11.71
DS30	A18530	≈1500	9.7	9.93
DS31 ^b	B20578	≈2000	3.6	7.76
DS32	I20512	≈2600	n.d.	n.d.

¹ Die vollständige RZPD-Nummer lautet: MPMGp800x (x= angegebene Nummer).² Die Insert-Größe wurde anhand der Sequenzinformationen errechnet und mit der im Gel ermittelten Größe verglichen. Bei Übereinstimmung wurde der errechnete Wert angegeben. Bei Nicht-Übereinstimmung bzw. wenn durch fehlende Sequenzinformation kein Wert errechnet werden konnte, wurde die im Gel abgeschätzte Größe angegeben (≈).³ Für einige Fusionsproteine konnte aufgrund von mangelnder Sequenzinformation kein Molekulargewicht und kein isoelektrischer Punkt errechnet werden (n.d.).^a DS6 und DS27 exprimieren identische Proteine, DS23 exprimiert drei zusätzliche Aminosäuren.^b DS10 und DS31 exprimieren identische Proteine.^c DS17, 19 und 20 exprimieren zum größten Teil denselben Aminosäureabschnitt.^d DS22 exprimiert 2 Aminosäuren mehr als DS21.^e DS24 exprimiert 1 Aminosäure mehr als DS26.

Tab. 3.2: cDNA-Klone bekannter oder hypothetischer Proteine

RZPD-Nr. ^a	HUGO Gen Symbol ^b	Protein	Exprimierte Aminosäuren (AS) ^c	Subzelluläre Lokalisation
L16545	Hs.177596 ^d	FLJ10350, hypothetisches Protein	AS 43 – AS 554 (NP_060537)	Putatives NLS
D24582	WDR22	WD repeat domain 22, hypothetisches Protein	AS 520 – AS 771 (XP_031102)	Putatives NLS
F01526	SFRS5	Spleißfaktor SRp40	AS 83 – AS 272 (Q13243)	Nukleus
J16582	SF3B1	Spleißfaktor 3b, Untereinheit 1	AS 304 – AS 493 (NP_036565)	Nukleus
B15584	MAFF	Transkriptionsfaktor MAFF	AS 1 – AS 164 (5'UTR ^e + AAH15037)	Nukleus
O06591	SWAP2	Suppressor of white apricot homologue 2	AS 26 – AS 677 (NP_008987)	Nukleus
N16596	CCNL2 ^f	Cyclin L2 ^f	AS 270 – AS 520	Nukleus
P23533			AS 269 – AS 520	
M24584	SFRS4	Spleißfaktor SRp75	AS 38 – AS 494 (Q08170)	Nukleus

^a Die vollständige RZPD-Nummer lautet: MPMGp800+angegebene Nummer.

^b HUGO: *Human Genome Organisation*

^c Die Nummerierungen der Aminosäuren beziehen sich auf Einträge der Proteindatenbanken Swissprot und PIR (*Protein Identification Ressource*).

^d Für den Klon L16545 existiert noch kein anerkanntes Gensymbol, so dass hier der *Unigene*-Eintrag angegeben wird.

^e Der Klon exprimiert vor dem offenen Leseraster (AAH15035, AS1 - AS164) noch ein Stück aus der 5'UTR.

^f Die Gen- und Protein-Bezeichnung erfolgte auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit.

Eine Zusammenstellung der cDNA-Klone, die Abschnitte von bekannten oder von hypothetisch existierenden Proteinen exprimieren, ist in Tab. 3.2 aufgelistet. Zwei dieser Klone (Cyclin L2 und SFRS4) sind in Tab. 3.1 nicht aufgeführt, da entsprechende Informationen über die Sequenzen und die resultierenden Proteine bereits im Zuge einer anderen Arbeit ermittelt wurden (Hekerman, 1999). Dort wurde ein identischer Filter-Array in einem Overlay-Assay mit DYRK1A eingesetzt, und Cyclin L2 und SFRS4 wurden als bindende Proteine der Kinase identifiziert. Da diese Klone auch in der hier durchgeführten Festphasen-Phosphorylierung anhand von starken Signalen detektiert werden konnten, wurden sie in die weiteren Untersuchungen miteinbezogen. Das Protein Cyclin L2 wurde interessanterweise anhand von zwei verschiedenen Klonen identifiziert, die sich nur geringfügig in den exprimierten Aminosäuren unterscheiden.

Die cDNA-Klone L16545 und D24582 exprimieren hypothetische Proteine, deren Funktion unbekannt ist. Es konnten keine Strukturmerkmale identifiziert werden, die einen Rückschluss auf die Funktion ermöglichen. Bei beiden Proteinen wurde allerdings mit Hilfe des Programms Prosite ein Kern-Lokalisations-Signal (NLS) identifiziert (Dingwall und Laskey, 1991). Alle übrigen Substrate wurden als Kernproteine identifiziert. Der Transkriptionsfaktor MAFF gehört zu der Familie Maf, deren Mitglieder eine DNA-Bindedomäne, aber keine Transaktivierungs-Domäne enthalten. Sie binden als Homo- oder Heterodimere an *Maf Recognition Elements (MARE)* und sind an der Kontrolle der Genexpression während der Zellentwicklung beteiligt (Motohashi *et al.*, 1997). Die Spleißfaktoren SFRS5 (Screaton *et al.*, 1995), SFRS4 (Zahler *et al.*, 1993) und SWAP2 (Denhez und Lafyatis, 1994) besitzen eine RS-Domäne und gehören zu den SR-Proteinen (SRp40, SRp75) bzw. zu den SR-Protein-verwandten Polypeptiden (SWAP2; Fu, 1995). SF3B1 ist ein Spleißfaktor ohne eine solche Domäne und ist Teil des Multi-Protein-Komplexes SF3B (Wang *et al.*, 1998a). Cyclin L2 ist ein bislang unbekanntes Protein mit einer RS-Domäne, das in dieser Arbeit charakterisiert wird.

3.2 DYRK1A phosphoryliert *in vitro* verschiedene Proteine mit RS-Domänen

Vier der sieben identifizierten Substrate besitzen als gemeinsames Strukturelement eine RS-Domäne: die Spleißfaktoren SFRS4, SFRS5, SWAP2 sowie das unbekannte Protein Cyclin L2. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Funktion von DYRK1A mit Spleißprozessen assoziiert ist, und dass die Kinase auch andere RS-Domänen-haltige Spleißfaktoren phosphorylieren kann. Aus diesem Grund wurde die Phosphorylierung der vier genannten Proteine und zwei weiterer bekannter Spleißfaktoren (menschliches TRA2 β 1 und SF2) in einem *in vitro*-Kinase-Assay verglichen (Abb. 3.3). Alle Spleißfaktoren wurden zwar durch DYRK1A phosphoryliert, allerdings mit unterschiedlicher Intensität. Die Proteine TRA2 β 1 und Cyclin L2 zeigten Signalintensitäten, die mit der Phosphorylierung von MBP vergleichbar waren. MBP ist ein sehr gut charakterisiertes *in vitro*-Substrat der Proteinkinase DYRK1A (Himpel *et al.*, 2000). Die Proteine hTRA2 β 1, SF2/ASF und Cyclin L2 wurden als GST-Fusionsproteine eingesetzt, so dass bei Beurteilung der Phosphorylierungs-Intensität die „Hintergrund-Phosphorylierung“ von GST berücksichtigt werden muss. Die unterschiedlich starke Phosphorylierung der Proteine lässt darauf schließen, dass DYRK1A nicht unspezifisch jedes Serin im Kontext von RS-Domänen phosphoryliert. Von den 8 Klonen der Expressionsbibliothek, die als Substrate identifiziert wurden, wurden zwei Proteine für weitergehende Untersuchungen ausgewählt.

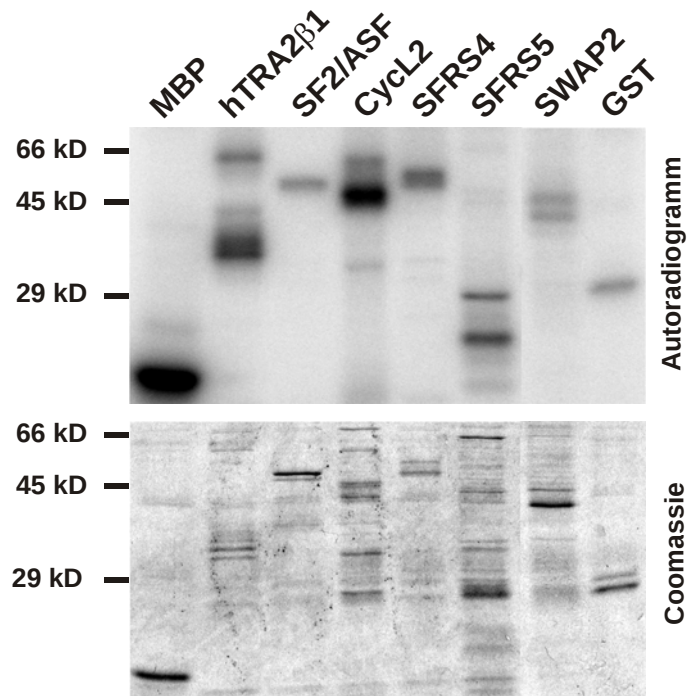


Abb. 3.3: Phosphorylierung Arginin-Serin-reicher Proteine durch DYRK1A *in vitro*

Die Mengen der Affinitäts-gereinigten GST-Fusionsproteine (hTRA2β1, SF2/ASF, Cycl2) bzw. His₆-Fusionsproteine (Klone der Expressionsbibliothek: SFRS4, SFRS5, SWAP2) wurden zuvor durch Vergleich der Färbungsintensität von Coomassie-gefärbten Gelen an 750 ng MBP angeglichen. Anschließend wurden die Affinitäts-gereinigten Proteine, MBP (Positiv-Kontrolle) und GST („Hintergrund-Phosphorylierung“) *in vitro* durch GST-DYRK1AΔC phosphoryliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt (untere Abb.). Der Phosphatereinbau wurde durch Autoradiographie des getrockneten Gels detektiert (obere Abb.).

Zum einen wurde Cyclin L2 ausgesucht, da es von den untersuchten Arginin-Serin-reichen Proteinen am stärksten durch DYRK1A phosphoryliert wurde und es sich zudem um ein unbekanntes Protein mit interessanter Domänen-Struktur handelt (Kap. 3.3.1). Zum anderen wurde SF3B1 ausgewählt, da es sich um einen Spleißfaktor handelt, der während des katalytischen Schrittes des Spleißprozesses phosphoryliert wird (Wang *et al.*, 1998a), und die dafür zuständige Kinase bislang noch unbekannt ist.

3.3 Cyclin L2

3.3.1 Sequenzanalyse

Sowohl in der Festphasen-Phosphorylierung (Kap. 3.1) als auch im Overlay-Assay (Hekerman, 1999) des Bibliothekfilters wurden die beiden Klone N16596 und P23533 detektiert. Beide kodieren einen cDNA-Abschnitt desselben Proteins und unterscheiden sich nur geringfügig in den exprimierten Aminosäuren.

A

```

1  MAAAAAAGAAGSAAPAAAAGAPSGGAPSGSQGVLIQDRLYSGVLITLE
51  NCLLPDDKLRFTPSMSSGLD TDTETDLRVVGCELIQAAGILLRLPQVAMA
101 TGQVLFQRFYTKSFVKHSMEHVSMACVHLASKIEEAPRRIRDVINVFHR
151 LRQLRDKKKPVPLLLDQDYVNLKNQIIKAERRVLKELGFCVHVKHPHKII
      VASEGK*
201 VMYLQVLECERNQHVLQTSWNYMNDLRTDVFVRFPESIAACACIYLAAR
251 TLEIPLPNRPHWFLFGATEEEIQEICKILQLYARKKVDLTHLEGEVEK
301 RKHAIEEAKAQARGLLPGGTQVLDGTSGFSPAPKLVESEKGGKSKPSPL
351 SVKNTKRRLEGAKKAKADSPVNGLPKGRESRSRSRSREQSYRSRPSRSAS
401 PKRRKSDSGSTSGGSKSQSRSRSDSPPRQAPRSAPYKGSEIRGSRKSK
451 DCKYPQKPHKSRSRSSSRSRSRERADNPGYKKKSHYYRDQRRERSRS
501 YERTGRRYERDHPGHSRHRH *

```

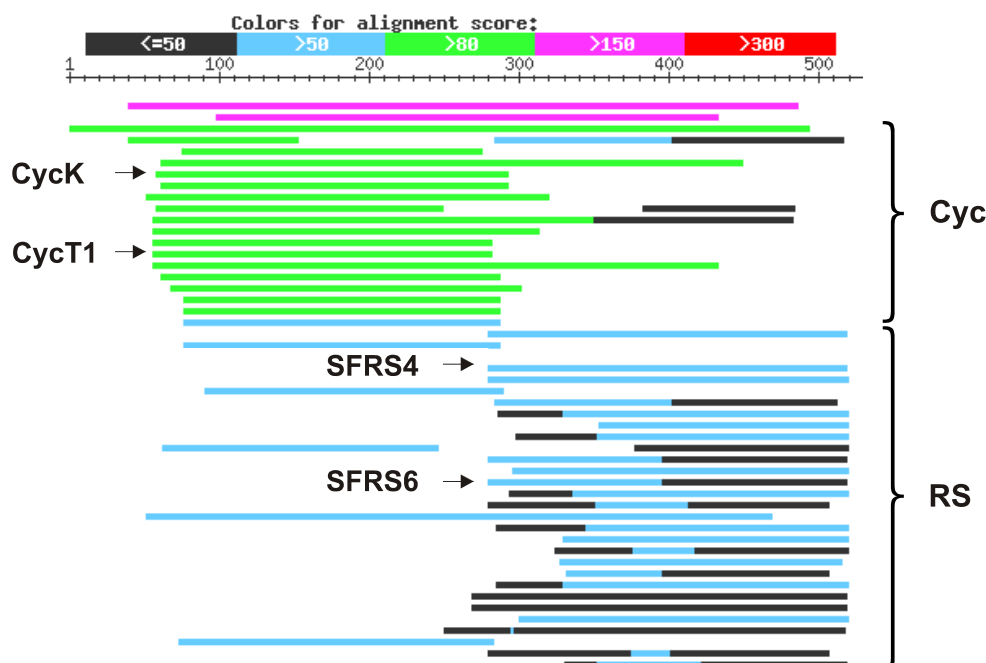
B

Abb. 3.4: Vergleich der Proteinsequenz von Cyclin L2 mit Protein-Datenbanken

A, Aminosäuresequenz von Cyclin L2. Die Sequenz von Cyclin L2 wurde aus einem Datenbankeintrag einer mRNA abgeleitet (GenBankTM Zugangsnummer: AY037150). Cyclin L2^s wurde durch Analyse von EST-Datenbanken als eine verkürzte Form von Cyclin L2 identifiziert (Kap. 3.3.2). Sie entsteht durch alternatives Spleißen und exprimiert die Aminosäuren 1 bis 222 von Cyclin L2 und 6 weitere Aminosäuren (kursiv dargestellt). Der Rahmen markiert die Cyclindomäne, die RS-Domäne ist unterstrichen (Kap. 3.3.1).

B, Sequenzähnlichkeit von Cyclin L2 zu Cyclinen und Arginin-Serin-reichen Spleißfaktoren. Die in A dargestellte Proteinsequenz von Cyclin L2 wurde mit den Datenbanken Swissprot und PIR (*Protein Identification Ressource*) verglichen (Programm BlastP2). Neben den orthologen Proteinen aus *C. elegans* und *A. thaliana* (rosa gefärbte Balken) wurden Proteine der Cyclin-Familie (Cyc) und der Arginin-Serin-reichen Spleißfaktoren (RS) gefunden. Exemplarisch sind einige menschliche Cycline und RS-Domänen enthaltende Proteine benannt.

Eine Datenbanksuche mit der Sequenz des hier gefundenen cDNA-Abschnitts ergab, dass es sich um ein unbekanntes Protein handelte. Allerdings konnte eine mRNA gefunden werden (GenBankTM Zugangsnummer: AY037150), die die bis dahin vorliegenden Sequenzinformationen zu einer kompletten cDNA vervollständigt. Aus dieser mRNA wurde die Sequenz für ein Protein abgeleitet (Proteinsequenz hier als Cyclin L2 bezeichnet; Abb. 3.4A) und mit Protein-Datenbanken verglichen (Abb. 3.4B). Der N-terminale Anteil des Proteins ist homolog zu Proteinen aus der Cyclin-Familie, der C-terminale Anteil ähnelte stark den RS-Domänen Arginin-Serin-reicher Spleißfaktoren. Zusätzlich konnten zwei orthologe Proteine aus *Caenorhabditis elegans* und *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Damit wurde das Protein als ein neues Cyclin identifiziert, dessen Cyclindomäne mit einer RS-Domäne (21 RS Dipeptide in 141 AS) kombiniert ist.

Bei der Analyse von menschlichen mRNA-Sequenzen wurde Cyclin L1 (Dickinson *et al.*, 2002) als das Protein mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung identifiziert. Auch Cyclin L1 besitzt neben der Cyclindomäne eine RS-Domäne (Berke *et al.*, 2001; Dickinson *et al.*, 2002). Die Proteinstruktur ist in Abb. 3.5B dargestellt. Die Cyclindomänen der beiden Proteine besitzen 84% identische Aminosäuren, die RS-Domänen stimmen hingegen nur in 45% der Aminosäuren überein. Diese relativ geringe Übereinstimmung wird auch im Vergleich mit anderen RS-reichen Spleißfaktoren gefunden. Die RS-Domäne von Cyclin L2 ist also mit der RS-Domäne von Cyclin L1 nicht näher verwandt als mit den RS-Domänen anderer Proteine. Diese Prozentzahlen sind darin begründet, dass es sich lediglich um die Anhäufung von Arginin-Serin-Dipeptiden und nicht um Sequenzverwandtschaft über längere Bereiche handelt. Aufgrund der hohen Homologie zu Cyclin L1 wurde das von AY037150 kodierte Protein als Cyclin L2 bezeichnet. Bei der *Human Genome Organisation* wurden die entsprechenden offiziellen Gensymbole vorgeschlagen (*CCNL1* bzw. *CCNL2*). Die Maus-Orthologe von Cyclin L1 und Cyclin L2 wurden als Cyclin Ania6a beziehungsweise Cyclin Ania6b bezeichnet (Berke *et al.*, 2001). Die Cyclindomäne von Cyclin L2 wurde durch Vergleich mit der Strukturanalyse von Cyclin H (Andersen *et al.*, 1997) auf die AS 69 bis 296 eingegrenzt. Dieser Protein-Abschnitt ist eng verwandt mit den Cyclindomänen anderer Proteine wie Cyclin K (33% identische AS) und Cyclin T1/T2 (30% bzw. 33% identische AS). Cyclin L1 weist nahezu dieselbe Anzahl von identischen Aminosäuren mit den genannten Cyclinen auf. Der Sequenzvergleich der Cyclindomänen verschiedener Cycline in Abb. 3.6 zeigt die konservierten Aminosäuren.

CyclL1	~~~~~	~~~LDLPS..	ETDLRILGCE	LIQAAGILLR	LPQVA	MATGQVLFHR
CyclL2	~~~~~	~~~LDTDT..	ETDLRVVGCE	LIQAAGILLR	LPQVA	MATGQVLFQR
CycT1	~~~~~	~~~VDPDK..	ELSYRQQAAN	LLQDMGQRLN	VSQLT	INTAIVYMHR
CycT2	~~~~~	~~~VEADK..	ELSCRQQAAN	LIQEMGQRLN	VSQLT	INTAIVYMHR
CycK	~~~~~	~~~LDPAT..	EARYRREGAR	FIFDVGTRLG	LHYDT	LATGIIYFHR
CycH	~~~~~	~~~LEPHE..	EMTLCKYYEK	RLLEFCSVFK	PA...MPRSV	VGACMYFKR
CycA1	~LLSQSEDIS	SLGTDVIN..	VTEYAEIYQ	YLREAEIRHR	PK...AHYMK	KQPDITEGMR
CycB1	CQAFSDVILA	VNDVDAEDGA	DPNLCSEYVK	DIYAYLRQLE	EEQAVRPKYL	LGREVTGNMR
CycD1	~~~~~LCCE	VETIRRAYPD	ANLLNDRVLR	AMLKAEETCA	PS...VSYFKC	VQKEVLPSMR
CycE1	~~~~~IA	PSRGSPLPVL	SWANREEVWK	IMLNKEKTYL	RD...QHFLE	QHPLLQPKMR
CyclL1	FFYSKSFVKH	SFEI..VAMAC	INLASKIEEA	PRRIR.....	...DVINVFH	HLRQLRGKRT
CyclL2	FFYTKSFVKH	SMEH..VSMAC	VHLASKIEEA	PRRIR.....	...DVINVFH	RLRQLRDKKK
CycT1	FYMIQSFTQF	PGNS..VAPAA	LFLAAKVEEQ	PKKLE.....	...HVIKVAH	TCLHPQ...E
CycT2	FYMHHSFTKF	NKNI..ISSTA	LFLAAKVEEQ	ARKLE.....	...HVIKVAH	ACLHPL...E
CycK	FYMFHSFKQF	PRYV..TGACC	LFLAGKVEET	PKKCK.....	...DIIKTAR	SLLNDV....
CycH	FYLNNSVMEY	HPRI..IMLTC	AFLACKVDEF	NVSSP.....	...QFVGNLR	ESPLGQ....
CycA1	TILVDWLVEV	GEEYKLRAT	LYLAVNFLDR	FLSCMS..VLR	GKLQLVGTAA	MLLASKYEEI
CycB1	AILIDWLQVQ	QMKFRLQET	MYMTVSIIDR	FMQNNC..VPK	KMLQLVGTA	MFIASKYEEM
CycD1	KIVATWMLV	CEEQKCEEEV	FPLAMNYLDR	FLSLEP..VKK	SRLQLLGATC	MFVASKMKET
CycE1	AILLDWLMEV	CEVYKLRHET	FYLAQDFDR	YMATQENVVK	TLLQLIGISS	LFIAAKLEEI
CyclL1	PSPLILDQNY	IN....TKNQ	VIKAEERRVLK	ELGFCVHVKH	PHK.....I	IVMYLQVLEC
CyclL2	PVPLLLDQDY	VN....LKNQ	IIKAERRVLK	ELGFCVHVKH	PHK.....I	IVMYLQVLEC
CycT1	SLPDTRSEAY	LQ....QVQD	LVILESIILQ	TLGFELTIDH	PHT.....H	VVKCTQLVRA
CycT2	PLLDTKCDAY	LQ....QTQE	LVILETIMLQ	TLGFEITIEH	PHT.....D	VVKCTQLVRA
CycK	...QF.GQFG	DD....PKEE	VMVLERILLQ	TIKFDLQVEH	PYQ.....F	LLKYAKQLKG
CycH		EK....ALEQ	ILEYELLILQ	QLNFHLIVHN	PYRPF...EGF	LIDLKTRYPI
CycA1	YPPEVDEFVY	ITDDTYTKRQ	LLKMEHLLLK	VLAFDLTVPT	TNQ.....F	LLQYLRQGV
CycB1	YPPEIGDLFAF	YTDNTYTKHQ	IRQMEMKILR	ALNFGGLRPL	PLH.....F	LRRASKIEV
CycD1	IPLTAELICI	YTDNSIRPEE	LLQMELLNVN	KLKWNLAAMT	PHD.....F	IEHFLSKMPE
CycE1	YPPKLHQFAY	VTDGACSGDE	ILTMELMIMK	ALKWRLSPLT	IVSWLNVYMQ	VAYLNDLHEV
CyclL1	ERN..QTLVQ	TAWNYMNDL	RTNVF..VRFQ	PETIACACIY	LAAR.....A	LQIPLPTR..
CyclL2	ERN..QHLVQ	TSWNYMNDL	RTDVF..VRFQ	PESIACACIY	LAAR.....T	LEIPLPNR..
CycT1	SKD....LAQ	TSYFMATNSL	HLTTFSLQYT	PPVACVCIH	LACKW...SN	WEIPVSTDG.
CycT2	SKD....LAQ	TSYFMATNSL	HLTTFCLQYK	PTVIACVCIH	LACKW...SN	WEIPVSTDG.
CycK	DKNKIQLVQ	MAWTFVNDSL	CTTSL..LQWE	PEIIAIVAMY	LAGRL...CK	FEIQEWTSKP
CycH	LENP..EILRK	TADDFLNRIA	LTDAY..LLYT	PSQIALTAIL	SSAS....R	AGITMESY..
CycA1	CVR...TENL	AKYVAELSLL	EADPF..LKYL	PSLIAAAAF	LANYT...VN	KHFWPETL..
CycB1	DVE....QH	TLAKYLMELT	MLDYDMVHEP	PSQIAAGAF	LALKI...LD	NGEWTPTL..
CycD1	AEEN..KQIR	KHAQTFVALC	ATDVKFISNP	PSMVAAGSVV	AAVQG...LN	LRSPNNFLSY
CycE1	LLPQYPQQIF	IQIAELDLDC	VLDVDCLEFP	YGILAASALY	HFSSSELMQK	VSGYQWCDE
CyclL1	..PHWFLFLG	..TTEEEIQE	ICIETLRLYT	RKKPNYEL		
CyclL2	..PHWFLFLG	..ATEEEIQE	ICLKILQLYA	RKKVDLTH		
CycT1	..KHWEYVD	ATVTLELLDE	LTHEFLQILE	KTPNRLKR		
CycT2	..KHWEYVD	PTVTLELLDE	LTHEFLQILE	KTPNRLKK		
CycK	MYRRWWEQFV	QDVPVDVLED	ICHQILDLYS	QGKQQMPH		
CycH	LS	ESLMLKENRT	CLSQLLDIMK	SMRNLVKK		
CycA1	...AAFTGYS	LSEIVPCLSE	LHKAYLDIPH	RPQQAIRE		
CycB1	...QHLYSYT	EESLLPVMQH	LAKNVVMVNO	GLTKHMTV		
CycD1	YRLTRFLSRV	IKCDPDCLRA	CQEIEALLE	SSLRQAQQ		
CycE1	NCVKWMVPFA	MVIRETGSSK	LKHFRGVADE	DAHNIQTH		

Abb. 3.6: Sequenzvergleich der Cyclindomänen von Cyclin L1 und Cyclin L2 mit den Cyclindomänen anderer Vertreter der Cyclin-Familie.

Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms ClustAl durchgeführt. Die Farbmarkierung gibt an, ob es sich um hoch konservierte Aminosäuren (blau, in allen Cyclinen identisch; türkis, in mehr als der Hälfte der Cycline identisch oder sehr ähnlich) oder um nicht so stark konservierte Aminosäuren handelt (grau, in mehr als der Hälfte der Cycline geringfügig ähnlich).

3.3.2 Genomische Organisation

Das menschliche *CCNL2*-Gen ist auf Chromosom 1 (1p36.33) lokalisiert. Abb. 3.7 zeigt eine maßstabsgetreue Darstellung.

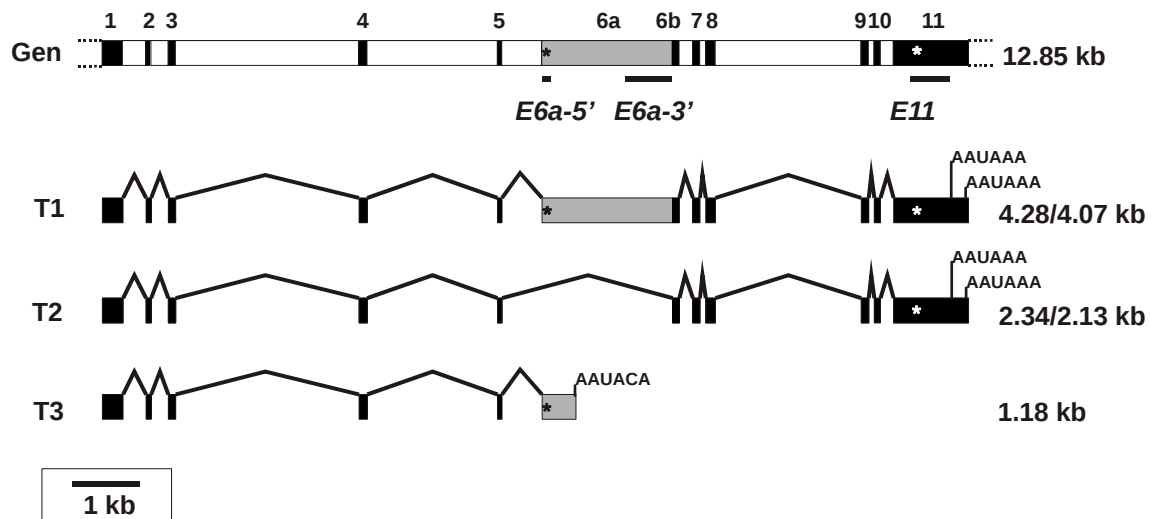


Abb. 3.7: Genomische Organisation von *CCNL2* und alternative Transkripte

Die Exons sind als schwarze Boxen dargestellt, das alternativ gespleißte Exon ist grau hinterlegt. Drei Spleißvarianten (T1, T2 und T3), die durch eigene Experimente und durch Analysen von *ESTs* öffentlicher Datenbanken identifiziert wurden, sind mit den jeweils errechneten Größen in kb angegeben. Stop-Kodons, die das offene Leseraster unterbrechen, sind durch einen Stern markiert. Alternative Polyadenylierungs-Signale von T1/T2 befinden sich an der Position 2073 und 2284 der Sequenz des Datenbankeintrags AY037150. Das alternative Polyadenylierungs-Signal von T3 ist in einem EST mit der GenBank™ Zugangsnummer: BC016333 an der Position 1173 zu finden. Die Bereiche, die den Sonden der *Northern-Blot*-Analysen entsprechen, sind unter dem Gen eingezeichnet (E6a-5', E6a-3' und E11).

Es hat eine Größe von ungefähr 13 kb und umfasst 11 Exons. Durch Vergleich der genomischen Sequenz mit *Expressed Sequence Tag (EST)*-Sequenzen wurden alternativ gespleißte mRNAs identifiziert, die einerseits durch alternatives Spleißen des Exon 6a und durch die Nutzung einer alternativen Polyadenylierungs-Stelle in Exon 6a zustande kommen. Insgesamt konnten 3 verschiedene Transkripte (T1 - T3) postuliert werden. Die Transkripte T1 und T3 beinhalten das Exon 6a, durch das ein Stop-Kodon in das Leseraster eingeführt wird. Die Translation von T1 und T3 führt demnach zu derselben verkürzten Form von Cyclin L2, die nur einen Teil der Cyclindomäne enthält und in der die RS-Domäne komplett fehlt. Dieses Protein wurde Cyclin L2^s (s=short) genannt (Abb. 3.4A). T1 und T3 unterscheiden sich lediglich durch die Länge der mRNA, da in T3 eine alternative Polyadenylierungs-Stelle genutzt wird. Dabei handelt es sich nicht um das klassische Polyadenylierungs-Signal (AAUAAA), sondern um die Variante AAUACA. Für Transkript T3 konnte eine Größe von 1.18 kb errechnet werden. Das Transkript T2 wird in einer Größe von 4.07 oder 4.28 kb exprimiert, da auch in Exon 11 eine alternative Polyadenylierung stattfindet (klassisches Polyadenylierungs-

Signal AAUAAA). Da in Transkript T2 (AY037150) das Exon 6a fehlt, kodiert es für das komplette Protein Cyclin L2. Aufgrund der oben erwähnten alternativen Polyadenylierungs-Signale in Exon 11 können mRNAs dieser Spleißvariante eine Länge von 2.13 und 2.34 kb haben. Die Proteinsequenzen, die von den Transkripten T1/T3 (Cyclin L2^s) und T2 (Cyclin L2) kodiert werden, sind in Abb. 3.4A dargestellt.

3.3.3 Alternative gespleißte Transkripte von *CCNL2* und *CCNL1*

3.3.3.1 Northern-Blot-Analysen

Um die postulierten Transkripte nachzuweisen, wurden *Northern-Blot*-Analysen durchgeführt. Die Transkripte konnten bestätigt und ihre Gewebsverteilung bestimmt werden (Abb. 3.8). Dies wurde durch Hybridisierung mit Exon-spezifischen Sonden erreicht, die in Abb. 3.7 dargestellt sind. Die Hybridisierung mit einer Sonde aus dem 3'UTR von Exon 11 (E11) detektierte zwei Transkripttypen von *CCNL2* mit einer Größe von 4.5 und 2.4 kb. Diese Größen korrespondieren mit den errechneten Größen von T1 (4.07 bzw. 4.28 kb) und T2 (2.13 bzw. 2.34 kb). Der Unterschied der beiden Polyadenylierungs-Varianten (211 bp) macht sich bei den kleineren Transkripten von T2 deutlicher bemerkbar, so dass das Signal dieser Spleißvariante als eine Doppelbande auf dem *Blot* erscheint. Transkript T1, welches das kurze Protein Cyclin L2^s kodiert, konnte in allen untersuchten Geweben detektiert werden. Besonders starke Signale wurden in Geweben aus Ovar, Hoden, Prostata, Pankreas, Skelettmuskel und Leber gefunden, wohingegen eine geringere Expression in Blut, Dickdarm, Lunge und Gehirn nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zu T1 konnte T2 nur in sehr wenigen Geweben (Skelettmuskel, Niere) durch schwache Signale detektiert werden. Die einzige Ausnahme bildete Hoden-RNA, die annähernd gleiche Mengen von T1- und T2-Transkripten enthielt. Um die Zuordnung der 4.5 kb-Bande zum Transkript T1 und der 2.4 kb-Bande zum Transkript T2 zu bestätigen, wurde eine Hybridisierung derselben *Blots* mit einer Sonde durchgeführt, die aus dem 5' Ende des Exon 6a hergestellt wurde. Wie erwartet, konnte mit dieser Sonde nur die 4.5 kb-Bande von Transkript T1 detektiert werden. Das Transkript T2 enthält also nicht das Exon 6a mit dem darin enthaltenen Stop-Kodon und kodiert für das komplette Protein Cyclin L2. Durch die Hybridisierung mit der Sonde E6a 5' wurde neben T1 aber noch ein weiteres Transkript detektiert. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um das Transkript T3, da die detektierte Bande von 1.2 kb sehr gut mit der errechneten Größe von T3 (1.18 kb) übereinstimmt. Die Exons 1 bis 5 ergeben eine Transkriptgröße von 677 bp. Um die detektierte Größe von 1.2 kb zu erreichen, muss dieses Transkript ca. 500 bp von Exon 6 enthalten. Tatsächlich konnte in Exon 6 an einer entsprechenden Stelle ein alternatives Polyadenylierungs-Signal (AAUACA, Beaudoin *et al.*, 2000) identifiziert werden.

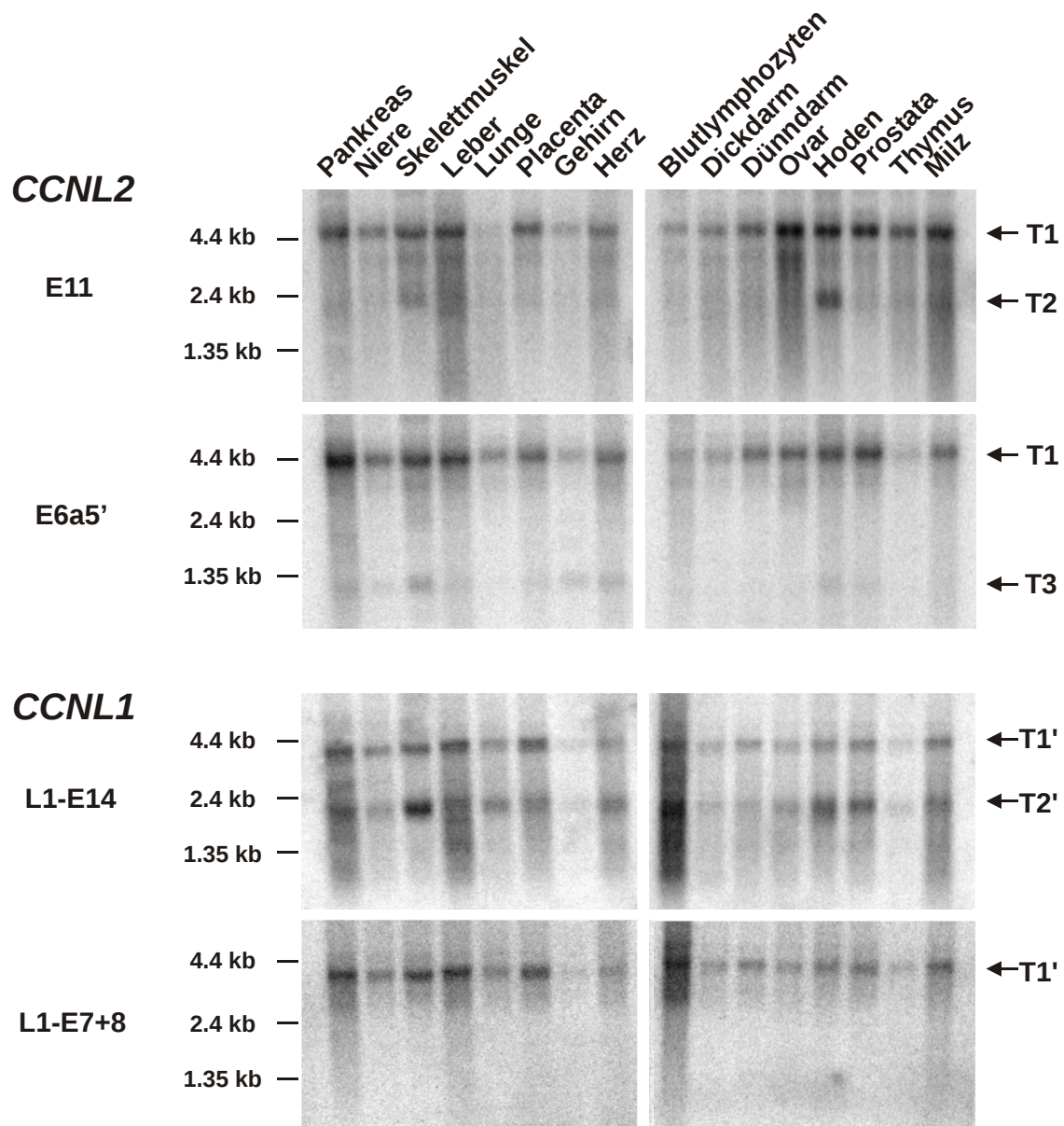


Abb. 3.8: Northern-Blot-Analyse der Spleißvarianten von Cyclin L2 und Cyclin L1

Die *Northern-Blots* enthalten Gesamt-RNA von menschlichen Geweben und wurden mit Exon-spezifischen Sonden hybridisiert. E11 hybridisiert mit der untranslatierten Region in Exon 11 von *CCNL2*. L1-E14 ist eine Sonde, die das entsprechende Exon von *CCNL1* detektiert. E6a-5' erkennt das 5'-Ende des alternativen Exon 6a von *CCNL2*, das durch ein Stop-Kodon zu einer verkürzten Form des Proteins führt. Die Sonde L1-E7+8 erkennt den korrespondierenden Bereich von *CCNL1*. Die genaue Lokalisation der Sonden kann Abb. 3.7 entnommen werden. Die Bezeichnungen der Transkripte T1-T3 im Autoradiogramm beziehen sich auf die Darstellung in Abb. 3.7, die Bezeichnungen T1'-T3' kennzeichnen die entsprechenden Transkripte von *CCNL1*.

Um die Exon-Zusammensetzung von T3 zu bestätigen, wurde Gesamt-RNA aus einer menschlichen Zelllinie isoliert und für die Herstellung eines *Northern-Blots* verwendet. Diese *Northern-Blots* wurden sowohl mit den bisher verwendeten Sonden E11 und E6a5' als auch mit einer weiteren Sonde hybridisiert. Die Sonde E6a3' hybridisiert mit

dem 3' Bereich von Exon 6a und sollte den Voraussagen nach nicht mit T3 interagieren. In Abb. 3.9 sind die Hybridisierungen mit den drei Exon-spezifischen Sonden dargestellt. Durch Hybridisierung mit der Sonde E11 wurden die beiden Transkripte T1 und T2 mit einer Größe von ungefähr 4.5 und 2.4 kb nachgewiesen. Die Sonde E6a5' detektierte das Transkript T1 (4.5 kb) und die 1.2 kb-Bande, die mutmaßlich das Transkript T3 repräsentiert. Das Signal dieser Bande konnte in der Hybridisierung mit der Sonde E6a3' nicht detektiert werden. Es handelt sich demnach um das Transkript T3, dessen Transkription durch ein alternatives Polyadenylierungs-Signal zu einem Abbruch im 3'-Bereich von Exon 6a führt. Zusätzlich zur experimentellen Bestätigung dieses Transkripts wurde eine *Full-Length*-mRNA in den Datenbanken identifiziert, die 18 Basenpaare nach dem alternativen Polyadenylierungs-Signal AAUACA (BC016333, bp1165) polyadenyliert ist und somit Transkript T3 repräsentiert. Die Struktur des *CCNL1*-Gens ähnelt der oben beschriebenen von *CCNL2*. Es existieren alternative Transkripte, die analog zu Cyclin L2 und Cyclin L2^s für eine lange und eine kurze Variante des Proteins kodieren (Berke *et al.*, 2001; Dickinson *et al.*, 2002). Um die Expressionsverhältnisse der langen und kurzen Proteinvarianten von *CCNL2* und *CCNL1* vergleichen zu können, wurde der für die *CCNL2*-Hybridisierung verwendete *Blot* menschlicher mRNAs einer Analyse mit *CCNL1*-Sonden unterzogen (Abb. 3.8). Hierfür wurden exon-spezifische Sonden analog zu der *CCNL2*-Hybridisierung hergestellt. Eine Sonde, spezifisch für das letzte Exon von *CCNL1* (L1-E14), detektierte zwei Transkripte (T1', T2'), die in ihrer Größe (4.3 und 2.3 kb) den Transkripten T1 und T2 von *CCNL2* ähneln. Dies spricht dafür, dass die detektierten Transkripte T1' und T2' analog zu *CCNL2* für die lange und die kurze Form des Proteins kodieren.

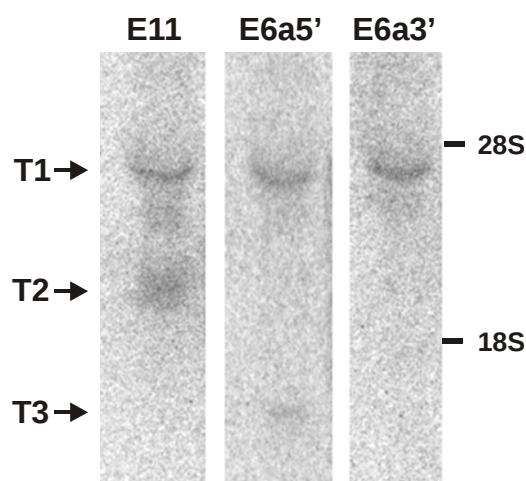


Abb. 3.9: Northern-Blot-Analyse der RNA aus Phoenix-Zellen mit Exon-spezifischen Sonden

Auf den *Northern-Blots* sind jeweils 15 µg derselben RNA-Präparation aus Phoenix-Zellen aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit den angegebenen Sonden. Die zugeordneten Transkripte sind angegeben. Als Größenmarker ist die Position der 18S und 28S rRNA angegeben.

Mit dieser Interpretation übereinstimmend, wurde durch eine Sonde, die mit dem 5'-Bereich des alternativen Exons von *CCNL1* hybridisiert (äquivalent zu E6a-5'), nur das größere der beiden Transkripte detektiert. Interessanterweise konnte kein Transkript von *CCNL1* detektiert werden, das dem Transkript T3 entspricht. Eine mRNA, die das entsprechende lange Protein von *CCNL1* kodiert, ist in den Datenbanken vorhanden (AF180920, 2 074 bp). Eine vollständige Sequenz, die für die kurze Variante kodierte, konnte nicht identifiziert werden, da alle ESTs im Bereich des alternativ gespleißten Exons abbrechen. Da das zu Exon 6a analoge Exon von *CCNL1* eine Größe von 1 550 bp hat und die restlichen Exons 2 074 bp ergeben (siehe Größe AF180920), errechnet sich für das Transkript T1' eine Größe von 3 624 bp. Die Größe von AF180920 und die errechnete Größe von 3 624 bp des T1'-Transkripts sind beide kleiner als die in der *Northern-Blot*-Analyse detektierten Größen. Demzufolge ist die 3'UTR oder 5'UTR länger als bisher bekannt. Diese Ergebnisse zeigen, dass das alternative Spleißen von *CCNL1* und *CCNL2* nach dem gleichen Grundprinzip erfolgt: Das große Transkript, das das Exon 6a von *CCNL2* bzw. das äquivalente Exon von *CCNL1* enthält, kodiert für das kurze Protein, in dem die RS-Domäne und ein Teil der Cyclindomäne fehlt. Dem kurzen Transkript fehlt das alternativ gespleißte Exon, und es kodiert demzufolge das Protein in voller Länge. Bei den beiden Genen besteht allerdings ein Unterschied im Expressionsverhältnis zwischen den Transkripten. Das Transkript T2 von *CCNL2* (langes Protein) war in allen untersuchten Geweben bis auf Hoden weniger stark exprimiert als das Transkript T1 (kurzes Protein), wohingegen das Transkript T2' von *CCNL1* in gleichem Ausmaß oder sogar stärker (Skelettmuskel, periphere Blutlymphozyten, Hoden) exprimiert wurde als T1'.

3.3.3.2 RT-PCR-Analysen

Mit Hilfe der *Northern-Blot*-Analyse konnte für *CCNL2* keine Aussage über das Expressions-Verhältnis von T3 zu T2 gemacht werden. Hierfür hätte eine Sonde aus dem N-Terminus (Exon 1 bis 5) verwendet werden müssen, die aber aufgrund der Homologie zu *CCNL1* in diesem Bereich zu einer Kreuz-Hybridisierung geführt hätte. Um das Expressionsverhältnis der Spleißvarianten T1/T3 zu T2 von *CCNL2* und damit das wahrscheinliche Verhältnis von kurzer zu langer Proteinform zu untersuchen, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt, die es erlaubt, alle drei Spleißvarianten in einem Ansatz zu amplifizieren. Hierbei wurde ein Vorwärts-*Primer*, der mit allen drei Spleißvarianten hybridisiert (E2for, Abb. 3.10), mit zwei Rückwärts-*Primern* kombiniert (Multiplex-PCR). Der *Primer* E6arev erlaubt eine spezifische Amplifikation von T1 und T3. Mit dem *Primer* E7brev könnten T1 und T2 amplifiziert werden. Die Polymerisationszeit wurde allerdings so verkürzt, dass nur noch die Amplifikation des kürzeren Produktes von T2 möglich war. Eine Kontrollamplifikation mit jeweils nur einem der beiden Rückwärts-*Primer* ist in Abb. 3.10 dargestellt. Eine Analyse von

menschlichen cDNAs aus verschiedenen Geweben bestätigte die Expression von T2 in allen untersuchten Geweben. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *Northern-Blot*-Analyse wurden in den untersuchten Geweben stärkere Signale der T1/T3 Transkripte erhalten als für die T2 Transkripte. Eine Ausnahme bildete auch hier Hoden, der größere Mengen des T2-PCR-Produktes ergab. Eine Analyse von Geweben der Maus zeigte ebenfalls ein höheres Verhältnis von T2 zu T1/T3 in Hoden als im Gehirn. Es muss darauf hingewiesen werden, dass ein Vergleich der absoluten Transkriptmengen zwischen den einzelnen Geweben durch diese Art der Analyse nicht vorgenommen werden kann, sondern lediglich ein Vergleich der Transkriptverhältnisse.

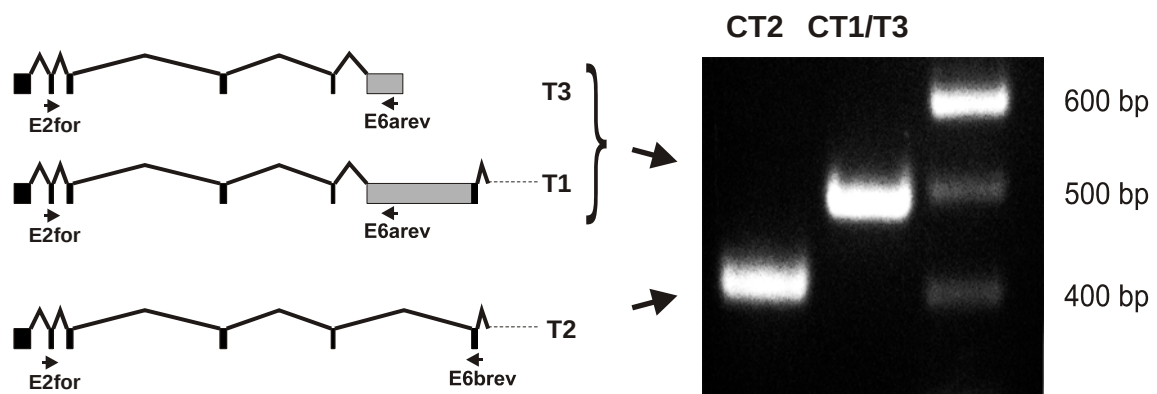


Abb. 3.10: Primer-Auswahl für die Amplifikation der CCNL2-Spleißvarianten durch RT-PCR

Der gemeinsame Vorwärts-Primer (E2for) kann mit zwei Rückwärts-Primern in einer PCR-Reaktion kombiniert werden. E6arev bindet spezifisch Exon 6a in den Transkripten T1 und T3. E6brev bindet das Exon 6b und erlaubt aufgrund einer auf 30 s begrenzten Polymerisationszeit nur die Amplifikation von T2 (T1 wird zwar gebunden, kann aber aufgrund der Produktgröße von 2.3 kb nicht vollständig amplifiziert werden). Durch Kontroll-PCRs mit einer menschlichen cDNA-Bibliothek (Hoden) wurden die Transkripte T1/T3 (CT1/3) bzw. T2 (CT2) mit nur jeweils einem der Rückwärts-Primer amplifiziert. Die Identität der Produkte wurde durch Sequenzierung bestätigt.

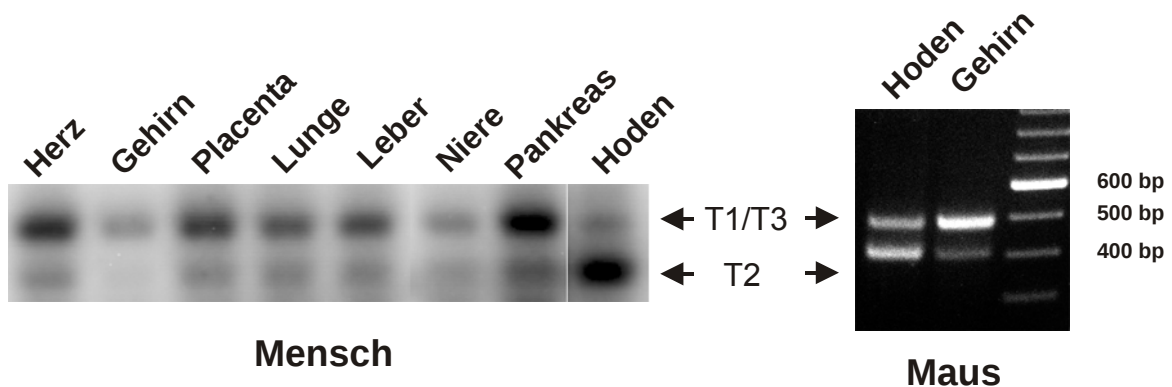


Abb. 3.11: RT-PCR-Analyse der Spleißvarianten von CCNL2

Erststrang-cDNAs der angegebenen menschlichen und murinen Gewebe wurden in einer RT-PCR-Analyse (Triple-PCR) mit den Primern E2for, E6arev und E6brev eingesetzt (Abb. 3.10). Die Reaktionsprodukte aus menschlichen Geweben wurden durch eine *Southern-Blot*-Analyse detektiert. Die PCR-Produkte aus Maus-cDNA wurden mit Ethidiumbromid angefärbt.

3.3.4 Regulation der Genexpression von *CCNL1* und *CCNL2*

CCNL1 wurde von Berke und Kollegen (2001) als ein *immediate early Gene* bezeichnet, das durch vielfältige Signale zur Expression der verschiedenen Spleißvarianten stimuliert wird. Es wurde untersucht, ob die Expression von *CCNL2* in ähnlichem Ausmaß reguliert wird (Abb. 3.12).

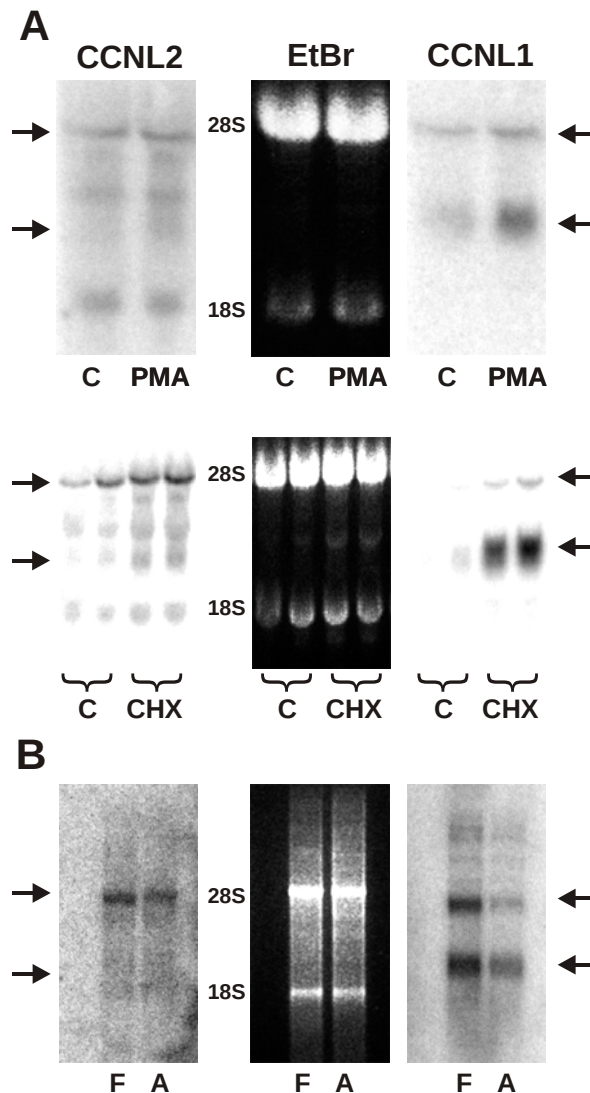


Abb. 3.12: Differentielle Regulation von *CCNL1*- und *CCNL2*-Transkripten

A, Northern-Blots aus Gesamt-RNA einer humanen Blasen-Karzinom-Zelllinie (RT112), die entweder 30 min mit Phorbol ester (PMA) oder 16 h mit Cycloheximid (CHX) stimuliert wurde. C, RNA aus unbehandelten Zellen.

B, Die RNA wurde aus undifferenzierten murinen 3T3-L1 Fibroblasten (F) und aus differenzierten 3T3-L1 Adipozyten (A) isoliert und für polyadenylierte RNA angereichert. Es wurden jeweils 3.5 µg RNA pro Spur in einem Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet.

Die Northern-Blots wurden mit den gleichen *CCNL1*- und *CCNL2*-spezifischen Sonden hybridisiert, die in Abb. 3.8 verwendet wurden (E11 und L1-E14). Die Pfeile markieren die Transkripte T1 und T2 von *CCNL2* bzw. die analog gespleißten Transkripte T1' und T2' von *CCNL1*. Die 18S rRNA und 28S rRNA sind markiert. EtBr, RNA gefärbt mit Ethidiumbromid.

Dazu wurde eine humane Blasen-Karzinom-Zelllinie (RT112) nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen in einer *Northern-Blot*-Analyse mit den Sonden E11 bzw. L1-E14 untersucht. Die Stimulation der RT112-Zellen mit Phorbolester (PMA) und Cycloheximid führte zu einer Induktion beider *CCNL1*-Transkripte (T1' und T2'), in besonderem Maße aber zu einem Expressions-Anstieg des 2.3 kb-Transkriptes (T2'), das für das komplette Protein kodiert. Die *CCNL2*-Expression wurde dagegen nicht (PMA), oder nur sehr gering (Cycloheximid) induziert. Auch eine längere Stimulation mit PMA (12 h, Daten nicht gezeigt) führte zu keinem sichtbaren Anstieg der mRNA-Level. Des Weiteren wurde die Expression von *CCNL1* und *CCNL2* in murinen 3T3-L1-Zellen untersucht, einem Modellsystem für Zelldifferenzierung. Die Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten führte zu einer deutlich verminderten Expression beider *CCNL1*-Transkripte, wohingegen kein Effekt auf die *CCNL2*-Expression beobachtet werden konnte.

3.3.5 Herstellung eines Cyclin L2-spezifischen Antiserums und Nachweis des Proteins *in vivo*

Nach der Identifizierung von Cyclin L2 als ein neues unbekanntes Protein und Aufklärung der Proteinsequenz durch Datenbankanalyse wurde ein spezifisches Antiserum hergestellt, um das Protein *in vivo* nachzuweisen. Eine Immunisierung der Kaninchen mit dem kompletten Protein konnte nicht erfolgen, da eine Kreuzreaktion des Antiserums mit Spleißfaktoren aufgrund der RS-Domäne von Cyclin L2 möglich gewesen wäre. Darüber hinaus musste vermieden werden, dass das Antiserum mit Cyclin L1 interagiert, was aufgrund einer Homologie von 62% (über das komplette Protein) sehr wahrscheinlich gewesen wäre. Aus diesem Grund wurde ein Peptid synthetisiert, das den Aminosäuren 437 bis 448 im C-Terminus von Cyclin L2 entspricht (PYKGSEIRGSRK), und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (Abb. 3.5). Das erhaltene unaufgereinigte Serum wurde in verschiedenen Konzentrationen zum Nachweis von überexprimiertem Cyclin L2 getestet. Abb. 3.13A zeigt, dass mit Hilfe des Serums die in COS-7 Zellen exprimierten Konstrukte pEGFP-*CCNL2* und pEGFP-*CCNL2* Δ N nachgewiesen werden konnten. Das hier hergestellte Serum ist spezifisch für die lange Proteinform, deren stärkste Expression in Hoden-Gewebe vermutet wurde (Kap. 3.3.3.1, Transkript T2). Aus diesem Grund wurden Kernproteine aus Maus-Hoden isoliert und in einer *Western-Blot*-Analyse untersucht. Um die Größe des endogenen Cyclin L2 besser abschätzen zu können, wurde das Konstrukt p Δ GFP-*CCNL2* in COS-7 Zellen transfiziert. Dieses Konstrukt exprimiert eine Version von Cyclin L2 ohne *Tag*. Das Lysat der transfizierten COS-7 Zellen wurde zusammen mit den isolierten Hoden-Proteinen in einer *Western-Blot*-Analyse mit Antiserum untersucht, das zuvor mit dem immunogenen Peptid Affinitäts-gereinigt wurde.

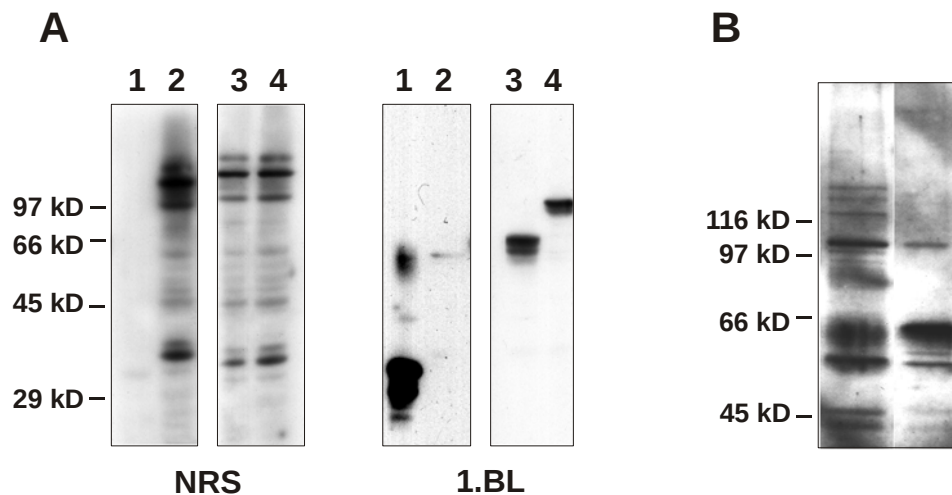


Abb. 3.13: Nachweis von Cyclin L2 durch ein spezifisches Antiserum

A, Nachweis von überexprimiertem Cyclin L2. Der *Western-Blot* wurde entweder mit Serum aus der ersten Blutung nach Immunisierung der Kaninchen (1.BL) inkubiert oder mit Serum, das vor der Immunisierung gewonnen wurde (NRS). 1, bakteriell exprimiertes His₆-CCNL2ΔN; 2, Lysat untransfizierter COS-7 Zellen; 3, Lysat aus COS-7 Zellen, die mit pEGFP-CCNL2ΔN transfiziert worden waren; 4, Lysat aus COS-7 Zellen, die mit pEGFP-CCNL2 transfiziert worden waren.

B, Nachweis von endogenem Cyclin L2. Es wurden Kernproteine aus Maus-Hoden isoliert und zusammen mit einem Lysat aus COS-7 Zellen, die Cyclin L2 überexprimierten, im *Western-Blot* analysiert. Zum Nachweis wurde Affinitäts-gereinigter Antikörper aus der 3. Blutung nach Immunisierung der Kaninchen verwendet.

Es konnte eine Proteinbande in Hoden detektiert werden, die exakt die gleiche Position im Gel einnimmt wie überexprimiertes Cyclin L2 (Abb. 3.13B). Ein Spezifitätsnachweis durch Blockierung des Antikörpers mit dem immunogenen Peptid wurde von Oliver Spelten im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt.

3.3.6 Subzelluläre Lokalisation von Cyclin L2, Cyclin L1 und Koloalisation mit Spleißfaktoren

Bei der Expression der GFP-Konstrukte von Cyclin L2 wurde eine punktförmige Verteilung des Proteins im Kern beobachtet. Dabei lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um so genannte *Nuclear Speckles* handelte. Diese Strukturen gelten als Sammelpunkte inaktiver Spleißfaktoren, die nach Phosphorylierung an die Orte transportiert werden, an denen aktive Transkription und RNA-Prozessierung stattfinden (Lamond und Spector, 2003). Um zu untersuchen, ob es sich tatsächlich um *Nuclear Speckles* handelte, wurde die Lokalisation von Cyclin L2 und Cyclin L1 mit der Lokalisation des Spleißfaktors SC35 verglichen. SC35 ist bekanntermaßen in den *Nuclear Speckles* lokalisiert (Fu und Maniatis, 1990) und wird oft als Referenzprotein für dieses Zellkompartiment verwendet (Ko *et al.*, 2001; van Rijk *et al.*, 2003).

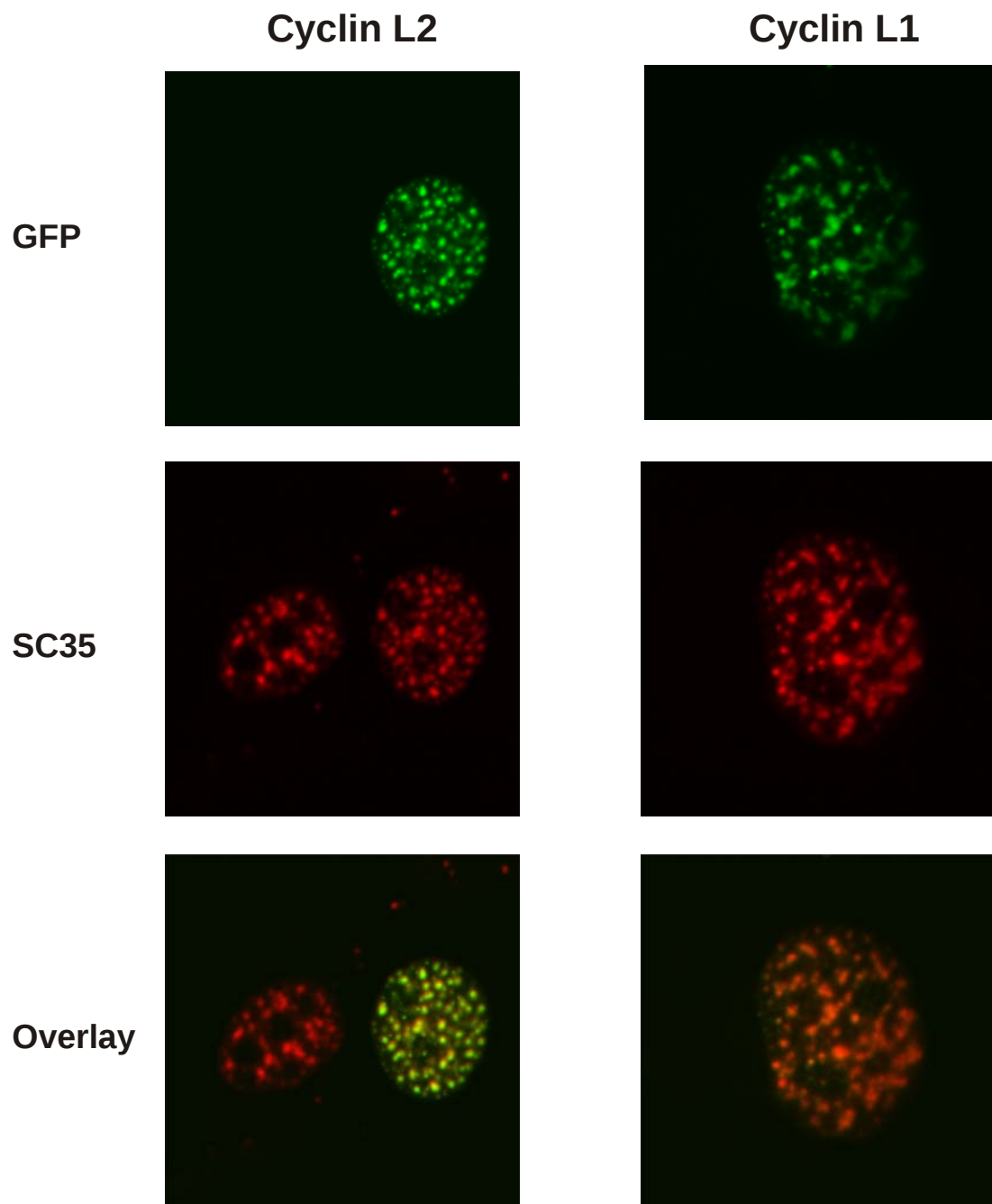


Abb. 3.14: Kolokalisation von Cyclin L2 und Cyclin L1 mit SC35 in *Nuclear Speckles*

Cyclin L1 und Cyclin L2 wurden als GFP-Konstrukte in COS-7 Zellen exprimiert (GFP). Der Spleißfaktor SC35 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen (SC35, rote Fluoreszenz durch einen *Alexa-Red* konjugierten, sekundären Antikörper). Im *Overlay* der beiden Aufnahmen sind kolokalisierte Proteine an der gelb-orangen Färbung zu erkennen. In den Aufnahmen von Cyclin L2 sind eine transfizierte und eine untransfizierte Zelle zu sehen. Da endogenes SC35 detektiert wurde, ist der Spleißfaktor auch in der untransfizierten Zelle zu sehen.

Cyclin L2 und Cyclin L1 wurden als GFP-Fusionsproteine in COS-7 Zellen exprimiert (pEGFP-CCNL2, pEGFP-CCNL2 Δ N, pEGFP-CCNL1). Der Spleißfaktor SC35 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. In Abb. 3.14 ist die punktförmige Verteilung von Cyclin L2 im Kern deutlich zu erkennen. Durch Vergleich mit der Verteilung von SC35 in derselben Zelle und einer Überlagerung der beiden Fluoreszenz-Bilder wird deutlich, dass beide Proteine kolokalisiert sind. Demzufolge handelt es sich bei dem beobachteten punktförmigen Muster um *Nuclear Speckles*. Geringe Mengen von Cyclin L2 sind auch außerhalb dieser *Speckles* vorhanden. Ein nahezu identisches Bild ergab sich auch für das N-terminal deletierte GFP-Konstrukt von Cyclin L2 (GFP-CCNL2 Δ N, Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung von Cyclin L1 ergab, dass auch dieses Protein in *Nuclear Speckles* mit SC35 kolokalisiert ist.

3.3.7 Identifizierung der Cyclin L2 bindenden Domäne von DYRK1A

Cyclin L2 wurde nicht nur als Substrat von DYRK1A identifiziert, sondern auch als Interaktionspartner der Kinase (Hekerman, 1999). Im Folgenden sollte diese Interaktion bestätigt werden und die dafür verantwortliche Domäne von DYRK1A identifiziert werden. Dazu wurden *Pulldown*-Experimente mit immobilisierten Deletionskonstrukten der Kinase DYRK1A durchgeführt, die im Folgenden beschrieben sind (Abb. 3.15A). In GST-DYRK1A Δ C ist die C-terminale nicht-katalytische Domäne deletiert, GST-DYRK1A Δ C Δ N exprimiert ausschließlich die katalytische Domäne der Kinase. GST-DYRK1A Δ N Δ T beinhaltet den N-Terminus, einen kurzen Abschnitt, der *DYRK-Homologie (DH)*-Box genannt wird (Becker und Joost, 1999), und einen kleinen Anteil der katalytischen Domäne. Zum Vergleich wurde auch GST-DYRK2 eingesetzt, dessen *DH*-Box und katalytische Domäne 46% zu DYRK1A identische Aminosäuren enthält. Als Positivkontrolle fungierte GST-SF2, ein Arginin-Serin-reicher Spleißfaktor, da bekannt ist, dass viele Spleißfaktoren durch ihre RS-Domänen interagieren (Graveley, 2000). Wie der Abb. 3.15B entnommen werden kann, reichte die katalytische Domäne von DYRK1A für eine Interaktion mit Cyclin L2 aus (GST-DYRK1A Δ C Δ N), auch wenn die Bindung deutlich schwächer ausfiel als mit DYRK1A Δ C. Durch dieses Konstrukt wurden ähnliche Mengen gebunden wie durch die Positivkontrolle GST-SF2. Eine Interaktion zwischen DYRK1A Δ N Δ T und Cyclin L2 konnte nicht detektiert werden. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass dieses Konstrukt in *E. coli* stark fragmentiert wird, und deswegen kaum intaktes Protein für eine Interaktion zur Verfügung stand. DYRK2 interagiert in annähernd gleichem Maße mit Cyclin L2 wie DYRK1A Δ C. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die katalytische Domäne für eine Interaktion mit Cyclin L2 zwar ausreichend ist, aber die *DH*-Box diese deutlich verstärkt.

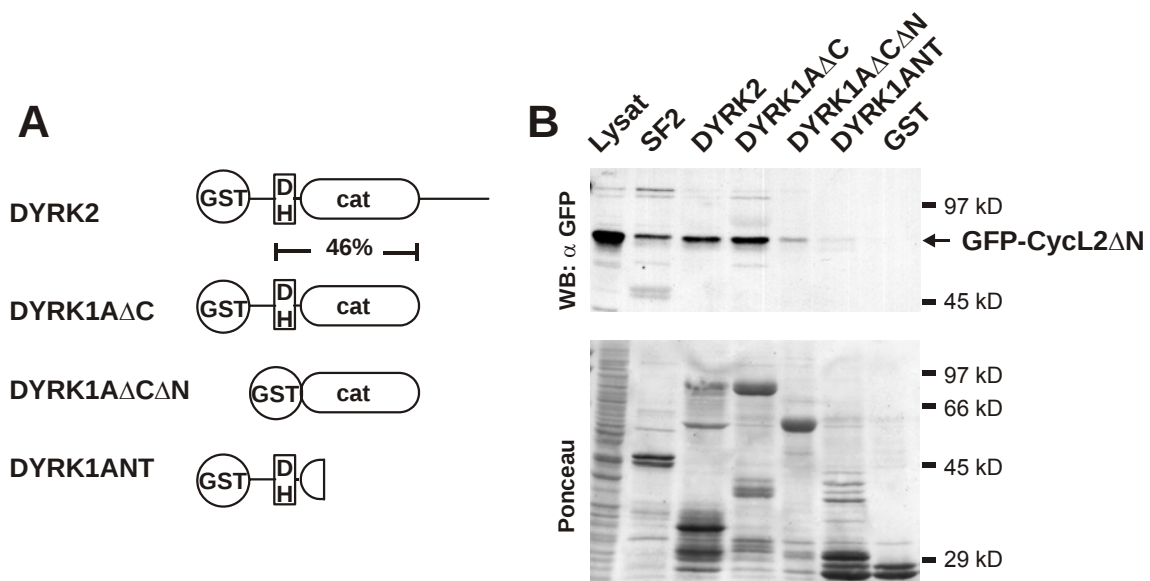


Abb. 3.15: Eingrenzung der Cyclin L2 bindenden Domäne von DYRK1A

A, Struktur der Konstrukte der Kinasen DYRK1A und DYRK2, die für das *Pulldown*-Experiment eingesetzt wurden. Die *DYRK-Homology-Box* (DH) und die katalytische Domäne (cat) von DYRK1A und DYRK2 weisen 46% identische Aminosäuren auf.

B, Die Konstrukte wurden in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe des GST-Tags Affinitäts-gereinigt. Die an der Sepharose immobilisierten GST-Fusionsproteine wurden mit Lysaten von COS-7 Zellen inkubiert, die zuvor mit pEGFP-CCNL2 Δ N transfiziert worden waren. Die nach mehreren Waschschritten zurückgebliebenen Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Mengen der eingesetzten immobilisierten Proteine wurden durch Ponceau-Färbung verglichen (untere Abb.). Der Nachweis von interagierendem Cyclin L2 erfolgte durch Antikörper-vermittelte Chemilumineszenz (WB α GFP, obere Abb.). Lysat: Es wurden 5% der für die einzelnen *Pulldowns* eingesetzten Menge aufgetragen.

3.3.8 Phosphorylierung von Cyclin L2

3.3.8.1 Identifizierung der *in vitro*-Phosphorylierungsstellen

Durch die Phosphorylierung der Expressionsbibliothek wurde Cyclin L2 als *in vitro*-Substrat der Kinase DYRK1A identifiziert (Kap. 3.1). Im Vergleich zu anderen Proteinen, die RS-Domänen enthalten, wurde Cyclin L2 besonders gut durch die Kinase phosphoryliert (Kap. 3.2). Um die dafür verantwortlichen Phosphorylierungsstellen zu identifizieren, wurde His₆-CCNL2 Δ *in vitro* durch DYRK1A phosphoryliert und massenspektrometrisch analysiert. Für die Phosphorylierung wurde das Konstrukt GST-DYRK1Acat eingesetzt, da es bei der Produktion in *E. coli* weniger fragmentiert als GST-DYRK1A Δ C. Somit konnte eine Verunreinigung der später aus dem Gel präparierten Proteine vermieden werden. Wie Abb. 3.16 zu entnehmen ist, treten nach Phosphorylierung durch DYRK1A zwei zusätzliche Banden auf, die im Gel verzögert laufen (Bande 2 und 3).

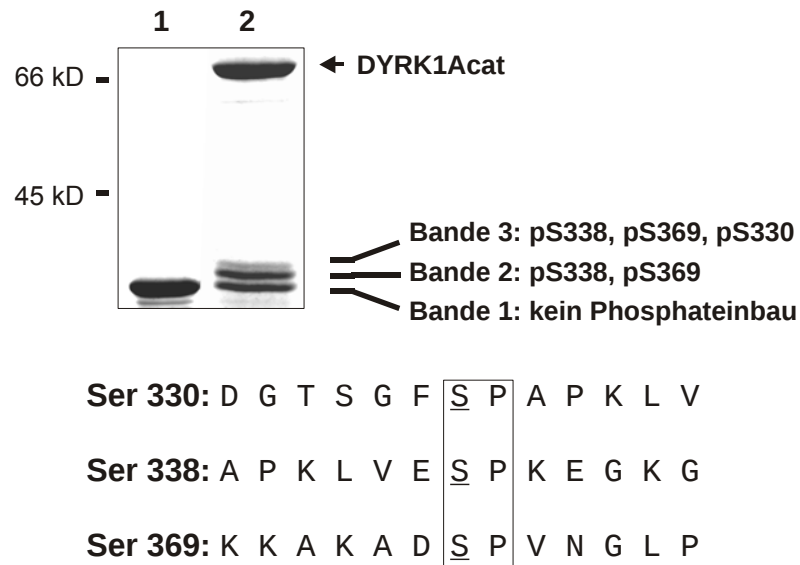


Abb. 3.16: Identifizierung der *in vitro*-Phosphorylierungsstellen von DYRK1A in Cyclin L2

His₆-CCNL2ΔN wurde in Form von *Inclusion Bodies* in *E. coli* produziert und aufgereinigt. Das durch Gelfiltration renaturierte Protein wurde durch GST-DYRK1Acat phosphoryliert (2), zusammen mit unphosphoryliertem Protein (1) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Durch Phosphorylierung entstanden aus der ursprünglichen Bande (Bande 1) zwei weitere Banden (Bande 2 und 3). Die drei Banden wurden einzeln ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die identifizierten phosphorylierten Aminosäuren der einzelnen Banden sind in ihrem Aminosäurekontext angegeben.

Die drei Protein-Banden wurden separat aus dem Gel ausgeschnitten und durch Len Packmann (Cambridge, UK) massenspektrometrisch untersucht. Die Bande mit dem kleinsten Molekulargewicht enthielt keine phosphorylierten Aminosäuren. Bande 2 enthielt phosphoryliertes Ser-338 und Ser-369. In der Bande mit dem größten apparenten Molekulargewicht konnte zusätzlich zu Ser-338 und Ser-369 noch das phosphorylierte Ser-330 nachgewiesen werden. Alle diese Serine befinden sich N-terminal von einem Prolin-Rest. Der genaue Aminosäurekontext dieser Serine ist in Abb. 3.16 dargestellt. Alle identifizierten Phosphorylierungsstellen liegen zwischen der Cyclin-Box und der RS-Domäne. Eine Phosphorylierung der RS-Domäne durch DYRK1A kann aber nicht ausgeschlossen werden, da die meisten tryptischen Peptide dieser Region während der Analyse aufgrund ihrer kleinen Größe verloren gingen.

3.3.8.2 *In vivo*-Phosphorylierung von Cyclin L2

Für einige Spleißfaktoren ist bekannt, dass ihre RS-Domänen *in vivo* phosphoryliert vorliegen. Als mögliche verantwortliche Kinasen gelten unter anderem Mitglieder der CLK-Familie (Colwill *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Cyclin L2 *in vivo* als Phosphoprotein vorliegt und ob sein Phosphorylierungsstatus durch DYRK1A oder CLK3, als ein Vertreter der CLK-Familie, beeinflusst werden kann. Dazu wurden

COS-7 Zellen, die zuvor mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert worden waren, mit radioaktivem Phosphat inkubiert. Nach der Immunpräzipitation der Proteine wurden die Proteine für eine *Western-Blot*-Analyse verwendet. Der Einbau von ^{32}P wurde durch Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 3.17A). In der Autoradiographie ist deutlich zu erkennen, dass Cyclin L2 *in vivo* als Phosphoprotein vorliegt. Weder die Koexpression von DYRK1A noch die von CLK3 hatte einen detektierbaren Einfluss auf die Menge an eingebautem radioaktivem Phosphat. Allerdings resultierte die Koexpression von DYRK1A in einer Vergrößerung des apparenten Molekulargewichts von Cyclin L2. Diese Vergrößerung war auch in *Western-Blot*-Analysen von entsprechend transfizierten COS-7 Zellen zu detektieren, die nicht radioaktiv inkubiert worden waren (Abb. 3.17B). Die Koexpression einer DYRK1A-Mutante mit minimaler Kinaseaktivität (DYRK1A-K188R) veränderte hingegen das apparente Molekulargewicht von Cyclin L2 nicht. Das bedeutet, dass DYRK1A das Protein in COS-7 Zellen phosphoryliert. Dass die Phosphorylierung in der Autoradiographie nicht detektiert werden konnte, liegt höchstwahrscheinlich an der starken Phosphorylierung des Proteins durch endogene Kinasen.

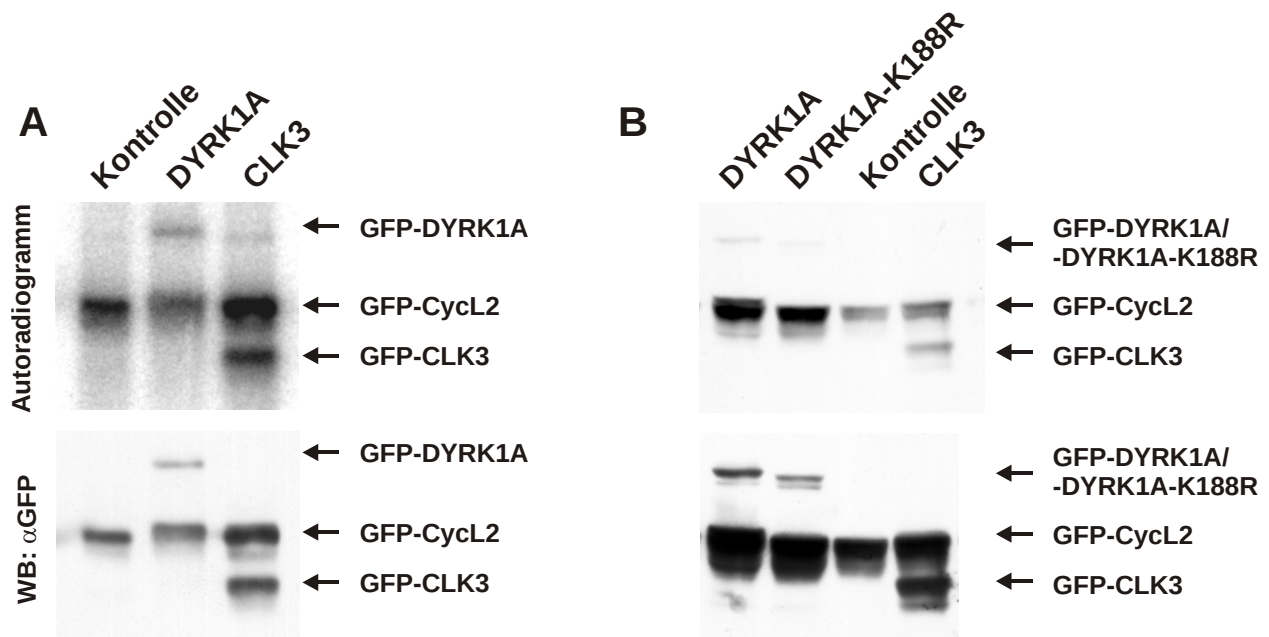


Abb. 3.17: *In vivo*-Phosphorylierung von Cyclin L2

A, COS-7 Zellen wurden mit pEGFP-CCNL2 und entweder pEGFP (Kontrolle) oder den GFP-Konstrukten der angegebenen Kinasen kotransfiziert und anschließend mit radioaktiv markierter H_3PO_4 inkubiert. Die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen lysiert und die Proteine nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose durch Antikörper-vermittelte Chemilumineszenz nachgewiesen (untere Abb.). Das eingebaute Phosphat wurde auf einem Autoradiogramm sichtbar gemacht (obere Abb.).

B, COS-7 Zellen wurden mit pEGFP-CCNL2 und entweder pEGFP (Kontrolle) oder den GFP-Konstrukten der angegebenen Kinasen kotransfiziert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Die Lysate wurden in einer *Western-Blot*-Analyse mit einem anti GFP Antikörper eingesetzt. Da die Signalintensitäten der einzelnen Proteine stark differierten, sind die Röntgenfilme zweier verschiedener Expositionszeiten gezeigt.

3.4 SF3B1

Durch die Festphasen-Phosphorylierung der Expressionsbibliothek wurde SF3B1 als *in vitro*-Substrat der Proteinkinase DYRK1A identifiziert. SF3B1 wird in der Literatur auch als SAP155 bezeichnet und ist Teil des Multiprotein-Komplexes SF3B. Der Spleißfaktor ist an einer zentralen Stelle im aktiven Spleißosom lokalisiert (Will *et al.*, 2001). Wang und Kollegen (1998a) konnten zeigen, dass SF3B1 während des Spleißprozesses phosphoryliert wird und präsentierten einige Hinweise für eine funktionelle Verknüpfung dieser Phosphorylierung mit der Spleißreaktion. Die dafür verantwortliche Kinase konnte bislang nicht identifiziert werden. Dies war ein wesentlicher Grund, SF3B1 aus den identifizierten Substraten der Expressionsbibliothek für weitergehende Untersuchungen auszusuchen.

3.4.1 DYRK1A phosphoryliert SF3B1 mit hoher Affinität

3.4.1.1 K_m -Wert-Bestimmung der Phosphorylierung von His₆-SF3B1 Δ durch DYRK1A

Der aus der Bibliothek isolierte Klon J16582 exprimiert die Aminosäuren 304 bis 493 von SF3B1 in Fusion an einen N-terminalen His₆-Tag und wird in dieser Arbeit mit pQE-SF3B1 Δ bezeichnet. Um die Qualität der Phosphorylierung durch DYRK1A zu beurteilen, wurde der K_m -Wert der Reaktion bestimmt.

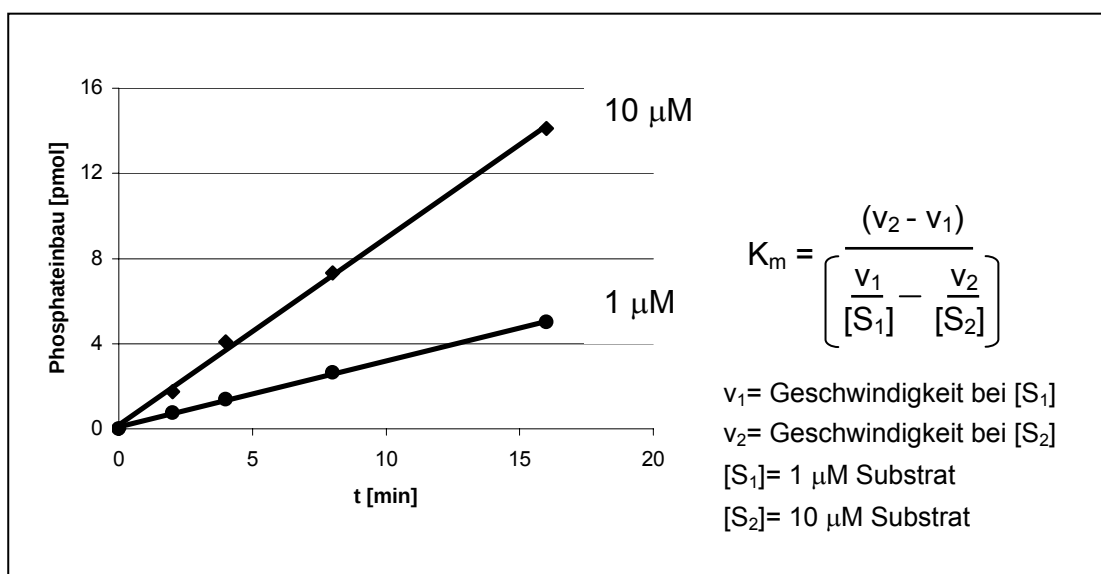


Abb. 3.18: K_m -Wert-Abschätzung durch Phosphorylierung von 1 µM und 10 µM His₆-SF3B1 Δ durch GST-DYRK1A Δ C

Die bakteriell produzierten Proteine His₆-SF3B1 Δ und GST-DYRK1A Δ C wurden Affinitäts-gereinigt und in einem radioaktiven *in vitro*-Kinase-Assay eingesetzt. Der Phosphateinbau wurde bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen (1 µM und 10 µM) nach 2, 4, 8 und 16 min gemessen und mit den Messwerten die Geschwindigkeiten der beiden Reaktionen bestimmt (Steigung der Geraden). Mit Hilfe der angegebenen Gleichung wurde der K_m -Wert abgeschätzt (Suelter, 1990).

Zunächst wurde ein geeignetes Spektrum von Substratkonzentrationen für die K_m -Wert-Bestimmung durch eine grobe Abschätzung des K_m -Wertes festgelegt. Hierfür wurde die Geschwindigkeit der Phosphorylierung bei zwei Substratkonzentrationen von SF3B1 (1 μ M und 10 μ M) gemessen und mit Hilfe der angegebenen Gleichung ein ungefährer K_m -Wert von 2.4 μ M errechnet (Abb. 3.18). Für eine genauere K_m -Wert-Bestimmung wurde die Reaktionsgeschwindigkeit bei sechs Substratkonzentrationen untersucht, die sich um den ermittelten Wert gruppieren (0.3125 μ M, 0.625 μ M, 1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M und 10 μ M). In drei unabhängigen Experimenten wurden durch nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten die K_m -Werte 4.53 μ M, 1.47 μ M und 0.5 μ M bestimmt. Dies ergibt einen gemittelten K_m -Wert von 2.16 $\pm$ 1.72 (SEM). Damit konnte eine hohe Affinität der Kinase DYRK1A zu dem Substrat SF3B1 nachgewiesen werden.

3.4.1.2 Vergleichende Phosphorylierung der Konstrukte His₆-SF3B1 Δ und SF3B1NT-His₆ durch DYRK1A

Die Proteinstruktur von SF3B1 lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: ein C-terminaler Abschnitt, der eine hohe Ähnlichkeit zu der regulatorischen Untereinheit A der Phosphatase PP2A besitzt (Wang *et al.*, 1998a) und ein N-terminaler Bereich mit einer Anhäufung von Threonin-Prolin-Dipeptiden (Abb. 3.19B). Der Bibliotheksklon exprimiert die Aminosäuren 304 bis 493 aus diesem N-terminalen Bereich. Für weitere Versuche wurde die N-terminale Domäne aus einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Hoden amplifiziert und kloniert. Das Konstrukt pET-SF3B1NT exprimiert die Aminosäuren 1 bis 511 mit einem C-terminal fusionierten His₆-Tag, enthält also auch den Aminosäure-Abschnitt des Bibliotheksklons, der durch DYRK1A phosphoryliert wird. Es musste dennoch überprüft werden, ob das neue Konstrukt ein gleichwertiges Substrat der Kinase DYRK1A darstellt. Veränderte Sekundärfaltungen des neuen Konstruktes hätten zuvor phosphorylierbare Aminosäuren für die Kinase unzugänglich machen können. Abb. 3.19 zeigt eine vergleichende Phosphorylierung der beiden Konstrukte. In das neue Konstrukt SF3B1NT-His₆ wurde deutlich mehr Phosphat eingebaut als in das kleinere Konstrukt His₆-SF3B1 Δ . Entweder sind durch die zusätzlichen Aminosäuren neue Phosphorylierungsstellen hinzugekommen, oder die sekundäre Faltung des Proteins begünstigt eine Phosphorylierung durch DYRK1A. Interessanterweise konnte das größere Konstrukt SF3B1NT-His₆ als intaktes Protein isoliert werden, wohingegen His₆-SF3B1 Δ in *E. coli* teilweise, und in vermehrtem Maße während der Aufreinigung, in Fragmente zerfällt (Abb. 3.19A). Dies spricht dafür, dass die Aminosäuren 1 bis 511 eine komplette Domäne bilden, die aufgrund ihrer Faltung eine stabilere Konformation einnehmen kann. Alle weiteren *in vitro*-Versuche wurden wegen der genannten Vorteile mit dem Konstrukt SF3B1NT-His₆ durchgeführt.

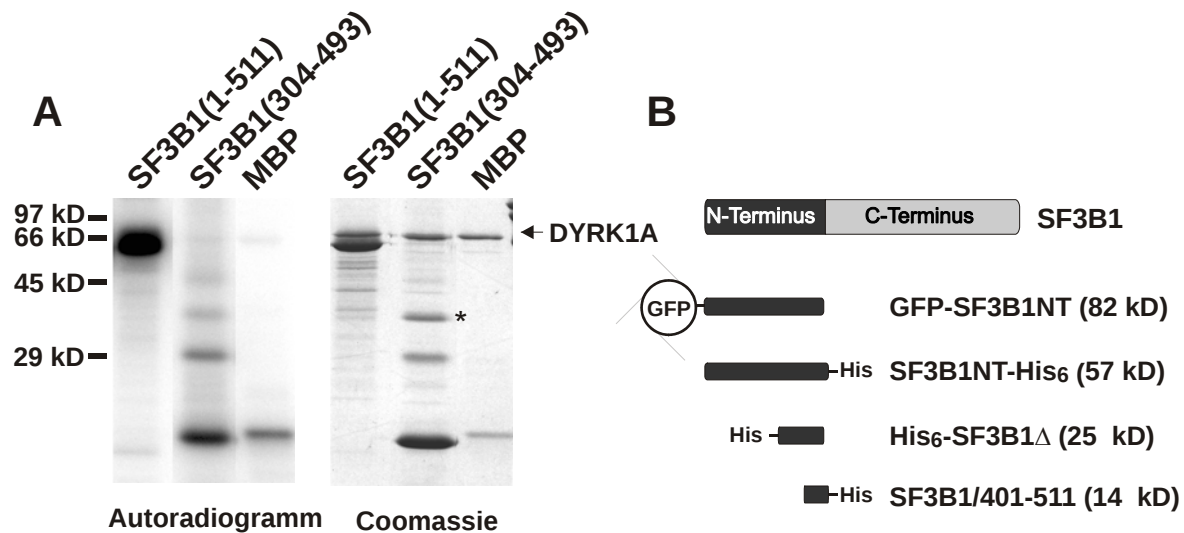


Abb. 3.19: Vergleichende Phosphorylierung von SF3B1NT-His₆ (AS 1 - 511) und His₆-SF3B1Δ (AS 304 - 493) durch DYRK1A

A, Die Affinitäts-gereinigten Proteine und MBP (Positivkontrolle) wurden radioaktiv *in vitro* durch GST-DYRK1AΔC phosphoryliert, in einer SDS-PAGE separiert und mit Coomassie angefärbt. Der Phosphateinbau in die beiden Konstrukte wurde durch ein Autoradiogramm des getrockneten Gels detektiert. Die Konstrukte sind durch die von ihnen exprimierten Aminosäuren gekennzeichnet. Ein unspezifisch kogereinigtes *E. coli*-Protein ist durch einen Stern (*) markiert.

B, Konstrukte von SF3B1. Die in A angegebenen und weitere, in dieser Arbeit verwendete Konstrukte, sind schematisch dargestellt.

3.4.2 Vergleichende Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A und CDK2

3.4.2.1 SF3B1 als *in vitro*-Substrat von CDK2/Cyclin E

Die Kinase, die SF3B1 während des Spleißprozesses phosphoryliert, konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Als möglicher Kandidat für diese wichtige Funktion gilt CDK2 (*cyclin dependent kinase 2*) in Kombination mit der regulatorischen Untereinheit Cyclin E. Seghezzi und Kollegen (1998) konnten eine Interaktion zwischen Cyclin E und SF3B1 nachweisen und zeigen, dass der CDK2/CyclinE-Komplex in der Lage ist, SF3B1 *in vitro* zu phosphorylieren. Aus diesem Grund wurde die Phosphorylierung von SF3B1 durch CDK2/Cyclin E näher untersucht. Zuerst wurde überprüft, ob CDK2/Cyclin E das Konstrukt SF3B1NT-His₆ *in vitro* phosphoryliert. Dabei wurde die Phosphorylierung in einem radioaktiven Assay mit der Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (RB) verglichen, das ein gut untersuchtes *in vivo*-Substrat von CDK2/Cyclin E ist (Abb. 3.20). CDK2/Cyclin E phosphoryliert das Konstrukt SF3B1NT-His₆ stärker als RB. Ob dies tatsächlich durch eine höhere Affinität zu dem Substrat oder durch eine größere Anzahl von Phosphorylierungsstellen in SF3B1 zustande kommt, kann mit diesem Versuch nicht beantwortet werden. SF3B1 konnte durch diesen Versuch als *in vitro*-Substrat von CDK2/Cyclin E bestätigt werden.

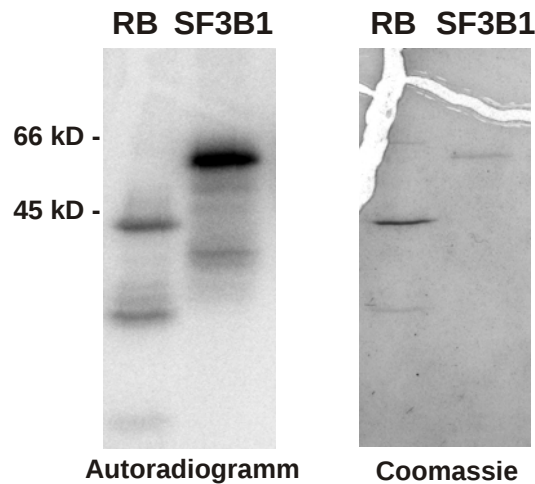


Abb. 3.20: Vergleichende Phosphorylierung von SF3B1 und RB durch CDK2/Cyclin E

Die Substrate SF3B1NT-His₆ und GST-RB (Datenbanknummer P06400, AS 779 - 928) wurden radioaktiv durch CDK2/Cyclin E phosphoryliert und nach einer SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt. Die Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie des getrockneten Gels nachgewiesen.

3.4.2.2 Vergleich der Affinitäten von DYRK1A und CDK2 zu SF3B1

Um die Qualität der Phosphorylierung von SF3B1 durch die beiden Kinasen DYRK1A und CDK2 zu vergleichen, wurde der ungefähre K_m -Wert beider Reaktionen ermittelt. Zwei verschiedene Substrat-Konzentrationen (0.7 μ M und 7 μ M SF3B1NT-His₆) wurden radioaktiv mit den beiden Kinasen im jeweils optimalen Puffersystem phosphoryliert.

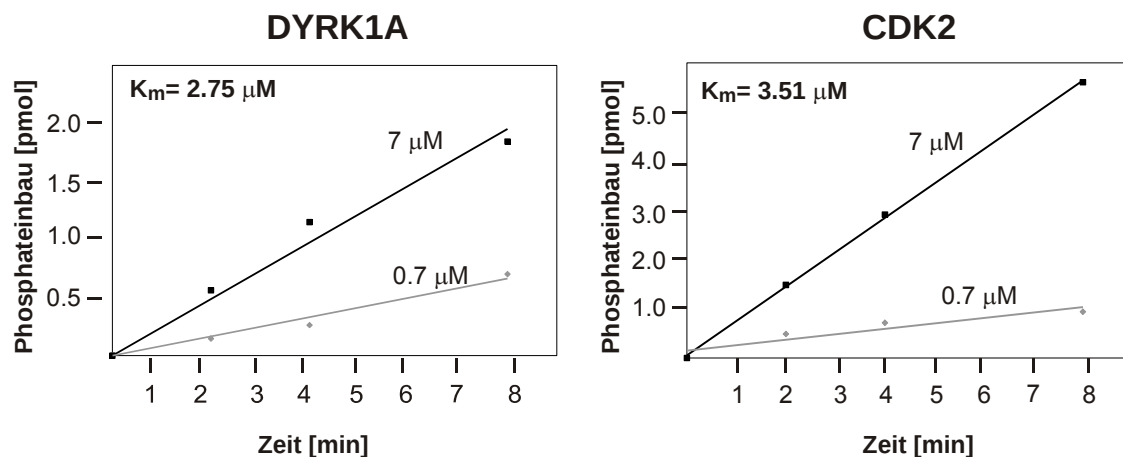


Abb. 3.21: K_m -Wert-Abschätzung der *in vitro*-Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A und CDK2

Bakteriell exprimiertes SF3B1NT-His₆ wurde Affinitäts-gereinigt und in radioaktive Kinase-Assays mit GST-DYRK1A Δ C und CDK2/Cyclin E eingesetzt. Der Phosphat-Einbau bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen (0.7 μ M und 7 μ M) wurde nach 2, 4 und 8 min gemessen und die Geschwindigkeit der Reaktionen durch lineare Regression bestimmt. Der Geschwindigkeits-Unterschied zwischen niedriger und hoher Substratkonzentration ist ein Maß für die Affinität von Enzym zu Substrat. Die K_m -Werte wurden mit der in Abb. 3.18 angegebenen Gleichung berechnet.

In Abb. 3.21 sind die Messwerte dieses Versuchs graphisch dargestellt. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration ist ein Maß für die Affinität von Enzym zu Substrat. Je kleiner der Geschwindigkeitsunterschied bei den zwei Substratkonzentrationen ist, desto größer ist die Affinität. Für beide Kinasen wurden ähnliche Geschwindigkeitsunterschiede gemessen, was sich in den ermittelten K_m -Werten von 2.75 μM (DYRK1A) und 3.51 μM (CDK2) widerspiegelt. Beide Kinasen besitzen demzufolge eine ähnliche Affinität zum Substrat SF3B1 und könnten somit die Rolle der *in vivo*-Kinase ausüben.

3.4.2.3 Vergleich der Phosphorylierungsmuster von SF3B1 nach DYRK1A- und CDK2-Phosphorylierung mit dem *in vivo*-Phosphorylierungsmuster

CDK2 und DYRK1A können Serine und Threonine, die C-terminal von einem Prolin flankiert sind, in Peptiden und Proteinen phosphorylieren (Himpel *et al.*, 2000). Die N-terminale Domäne von SF3B1 enthält 31 solcher Dipeptide (29x TP, 2x SP, siehe Abb. 3.27). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die beiden Kinasen dieselben Aminosäuren in SF3B1 phosphorylieren. Da eine einzelne Überprüfung aller 31 Serin- bzw. Threonin-Prolin-Dipeptide sehr aufwendig gewesen wäre, wurde eine Methode gewählt, die zwar nicht die direkte Identifizierung von phosphorylierten Aminosäuren erlaubt, durch die aber eine Art Fingerabdruck einer Kinase auf einem Substrat sichtbar gemacht werden kann. Bei der Methode des *Peptide Mappings* wird ein Substrat nach einer radioaktiven Phosphorylierung durch die gewählte Kinase mit Hilfe von Trypsin in Peptide zerlegt. Trypsin ist eine Protease, die Proteine spezifisch C-terminal von basischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) schneidet und somit definierte Peptide herstellt. Die Größe und die Aminosäurezusammensetzung der Peptide bestimmen ihre physikochemischen Eigenschaften. Diese können genutzt werden, um durch zweidimensionale Auftrennung (elektrisches Feld und Dünnschicht-Chromatographie) eine Karte der Peptide zu erstellen. Die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren durch eine Kinase führt zu einer definierten Verteilung der Phosphopeptide auf der Dünnschichtplatte und damit zu einem definierten Muster im Autoradiogramm („Fingerabdruck“). Mit dieser Methode wurde das Phosphorylierungsmuster von SF3B1NT-His₆ nach *in vitro*-Phosphorylierung durch DYRK1A bzw. CDK2/Cyclin E untersucht. Abb. 3.22 zeigt die Autoradiogramme der Phosphopeptid-Karten. Sowohl die Phosphorylierung mit DYRK1A (Abb. 3.22A) als auch die Phosphorylierung mit CDK2/Cyclin E (Abb. 3.22B) führte zu einer großen Anzahl von detektierbaren Phosphopeptiden. Beide Kinasen phosphorylieren demzufolge mehrere Reste in der N-terminalen Domäne von SF3B1. Dabei kann man stark phosphorylierte Peptide und schwach phosphorylierte Peptide unterscheiden. Nach DYRK1A-Phosphorylierung entstanden zwei besonders stark phosphorylierte Peptide, die im Folgenden als P1 und P2 bezeichnet werden (Abb. 3.22A).

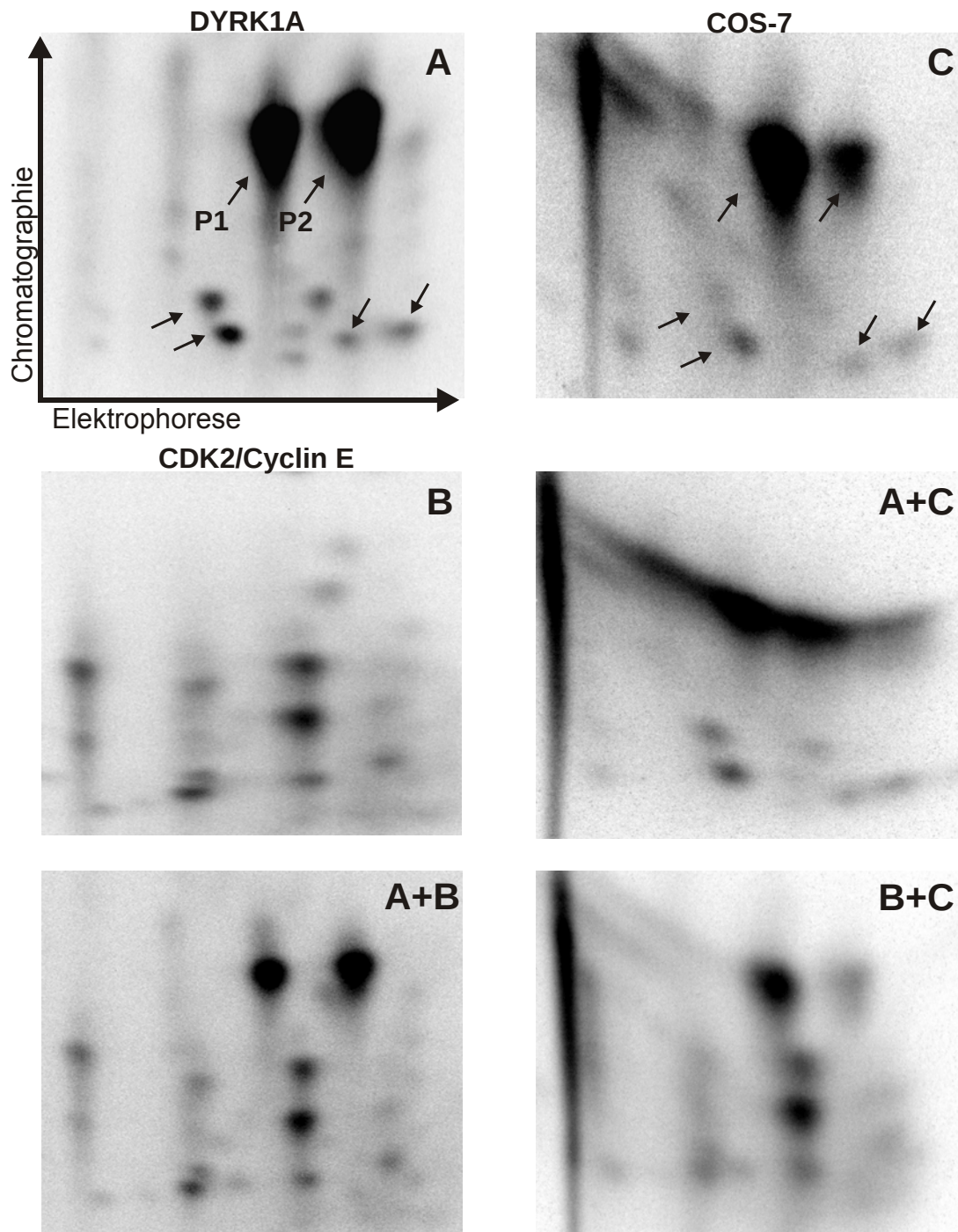


Abb. 3.22: Phosphopeptid-Karten von SF3B1 nach *in vitro*-Phosphorylierung durch DYRK1A bzw. CDK2/Cyclin E und nach *in vivo*-Phosphorylierung in COS-7 Zellen

Das bakteriell exprimierte Konstrukt SF3B1NT-His₆ wurde radioaktiv *in vitro* durch GST-DYRK1A Δ C bzw. CDK2/Cyclin E phosphoryliert und durch eine SDS-PAGE von der Kinase getrennt. COS-7 Zellen wurden mit dem Konstrukt pEGFP-SF3B1NT transfiziert und mit radioaktivem Phosphat inkubiert. GFP-SF3B1 wurde aus denaturierten Lysaten immungefällt und durch SDS-PAGE von den Antikörpern getrennt. Anschließend wurden die *in vitro* und *in vivo* phosphorylierten Proteine für die Herstellung von Phosphopeptid-Karten verwendet.

(Fortsetzung Legende Abb. 3.22)

A, Phosphopeptid-Karte von SF3B1NT-His₆ nach Phosphorylierung mit GST-DYRK1AΔC *in vitro*

B, Phosphopeptid-Karte von SF3B1NT-His₆ nach Phosphorylierung mit CDK2/Cyclin E *in vitro*

C, Phosphopeptid-Karte von GFP-SF3B1NT nach Phosphorylierung *in vivo* durch endogene Kinasen

A+B, A+C, B+C, Gleichzeitige Beladung einer Dünnschichtplatte mit den Phosphopeptiden (gleiche Mengen an Radioaktivität) aus den angegebenen Versuchen. Die prominentesten Phosphopeptide aus Versuch A sind mit P1 und P2 bezeichnet. Die Pfeile im Autoradiogramm von Versuch A markieren Phosphopeptide, die sowohl durch DYRK1A-Phosphorylierung als auch durch *in vivo*-Phosphorylierung erhalten werden.

Die Positionen der Phosphopeptide, die durch DYRK1A-Phosphorylierung erhalten wurden, unterscheiden sich deutlich von den durch CDK2-Phosphorylierung entstandenen Phosphopeptiden. In dem Autoradiogramm einer Dünnschicht-Platte mit Phosphopeptiden aus beiden Versuchen (Abb. 3.22A+B) konnten keine Phosphopeptide mit identischer Position detektiert werden. Dies zeigte, dass DYRK1A und CDK2 hauptsächlich unterschiedliche Aminosäuren von SF3B1 phosphorylieren. Es kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Kinasen auch teilweise dieselben Aminosäuren phosphorylieren. Wenn zusätzlich zu einem Aminosäurerest, der durch beide Kinasen phosphoryliert wird, eine der Kinasen noch einen zweiten Rest in demselben Peptid phosphoryliert, käme es zu einer Verschiebung der Position. Da das Phosphorylierungsmuster beider Kinasen so charakteristisch ist, wurde es mit dem endogenen Phosphorylierungsmuster verglichen. Zu diesem Zweck wurde die cDNA von SF3B1, die für die Aminosäuren 1 bis 493 kodiert, aus einer menschlichen Hoden-cDNA-Bibliothek amplifiziert und in pEGFP-C1 kloniert. COS-7 Zellen wurden mit diesem Konstrukt (pEGFP-SF3B1NT) transient transfiziert und mit radioaktivem Phosphat ($\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$) inkubiert. GFP-SF3B1NT (Abb. 3.19B) wurde aus den COS-7 Zellen isoliert und für die Herstellung einer Phosphopeptid-Karte eingesetzt. Vergleicht man das endogene Phosphorylierungsmuster (Abb. 3.22C) mit dem Phosphopeptid-Muster, das durch DYRK1A-Phosphorylierung erhalten wird (Abb. 3.22A), kann man deutliche Übereinstimmungen erkennen. Durch gleichzeitige Beladung einer Dünnschicht-Platte mit Phosphopeptiden aus diesen Versuchen (Abb. 3.22A+C) wurde gezeigt, dass die in A mit Pfeilen markierten Peptide an Positionen liegen, die auch von endogenen Phosphopeptiden eingenommen werden. Allerdings ist die Intensität des Signals von P1 *in vivo* stärker als *in vitro*. Es handelt sich also höchstwahrscheinlich um dieselben Phosphopeptide. Dabei ist besonders bemerkenswert, dass neben den kolokalisierten Phosphopeptiden keine anderen bedeutenden Signale auftreten, die auf eine zusätzliche Phosphorylierung durch eine andere Kinase hindeuten würden. Dementsprechend konnten auch keine Übereinstimmungen im endogenen Phosphorylierungsmuster mit dem Muster nach CDK2-Phosphorylierung identifiziert werden. Die Beladung der Dünnschichtplatte mit Phosphopeptiden aus den Versuchen B und C (Abb. 3.22B+C) zeigte deutlich die unterschiedlichen Positionen der

Phosphopeptide. Diese Ergebnisse zeigen, dass CDK2 nicht für die endogene Phosphorylierung von SF3B1 in COS-7 Zellen verantwortlich ist, und dass DYRK1A oder eine eng verwandte Kinase mit denselben Phosphorylierungs-Zielsequenzen sehr wahrscheinlich als *in vivo*-Kinase des Spleißfaktors fungiert.

3.4.3 Identifizierung von Aminosäuren in SF3B1, die durch DYRK1A *in vitro* phosphoryliert werden

3.4.3.1 Massenspektrometrische Analyse von SF3B1 nach Phosphorylierung durch DYRK1A

Für die massenspektrometrische Analyse wurde das Konstrukt His₆-SF3B1Δ *in vitro* durch GST-DYRK1Acat phosphoryliert und durch SDS-PAGE von der Kinase getrennt. Die weitere Verarbeitung des Proteins (Trypsinierung, Gelextraktion usw.) inklusive der massenspektrometrischen Analyse wurde freundlicherweise von Len Packman (Cambridge, UK) durchgeführt. In dieser Analyse wurden Thr-303 und Thr-426 als phosphorylierte Reste identifiziert. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Aminosäure Thr-303 in dem Konstrukt His₆-SF3B1Δ N-terminal nicht von ihrem natürlichen Aminosäurekontext, sondern von Vektor-kodierten Aminosäuren flankiert ist. Dementsprechend kann über die Phosphorylierung dieses Restes keine Aussage getroffen werden. Zusätzlich wurde ein phosphoryliertes Peptid detektiert, bei dem aber die Lokalisation des Phosphatrestes nicht eindeutig bestimmt werden konnte (Thr-432, Thr-434 oder Thr-436). Thr-432 erschien aber als mögliche Phosphorylierungsstelle unwahrscheinlich, da dieser Aminosäurerest C-terminal nicht von einem Prolin-Rest flankiert ist (Kap. 1.5). Eine quantitative Aussage über die Phosphorylierung der einzelnen Reste ist mit dieser Methode nicht möglich.

3.4.3.2 Untersuchungen von Punktmutanten durch Kinase-Assays

Aufgrund der Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse wurden die Aminosäuren Thr-426, Thr-434 und Thr-436 in dem Konstrukt pET-SF3B1NT in Alanin mutiert. Zusätzlich wurden noch Alaninmutanten der Threonine 273 und 303 erzeugt, da aufgrund der bekannten Konsensussequenz für die DYRK1A-Phosphorylierung die Arginine in den flankierenden Aminosäuren (GRGDT²⁷³P bzw. TERDT³⁰³P) eine Phosphorylierung wahrscheinlich machen (Himpel *et al.*, 2000; Campbell und Proud, 2002; Kap. 1.5). In der massenspektrometrischen Analyse konnten die Aminosäuren Thr-273 und Thr-303 nicht detektiert werden, da Thr-273 in dem untersuchten Protein nicht enthalten ist, und Thr-303 N-terminal von Vektor-kodierten Aminosäuren flankiert wird. Neben den Einzelmутanten von Thr-273A, Thr-303A, Thr-426A, Thr-434A und Thr-436A wurden auch Mutanten hergestellt, in denen zwei Threonine in Alanine umgewandelt worden waren (Thr-273/303A, Thr-434/436A). Zusätzlich zu den

Punktmutanten wurde das Teilkonstrukt pET-SF3B1/401-511 hergestellt, das die Aminosäuren 401 bis 511 exprimiert (Abb. 319B). Dieses Konstrukt sollte eine Eingrenzung der Phosphorylierung ermöglichen. Die Proteine wurden *in vitro* durch DYRK1A radioaktiv phosphoryliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert (Abb. 3.23).

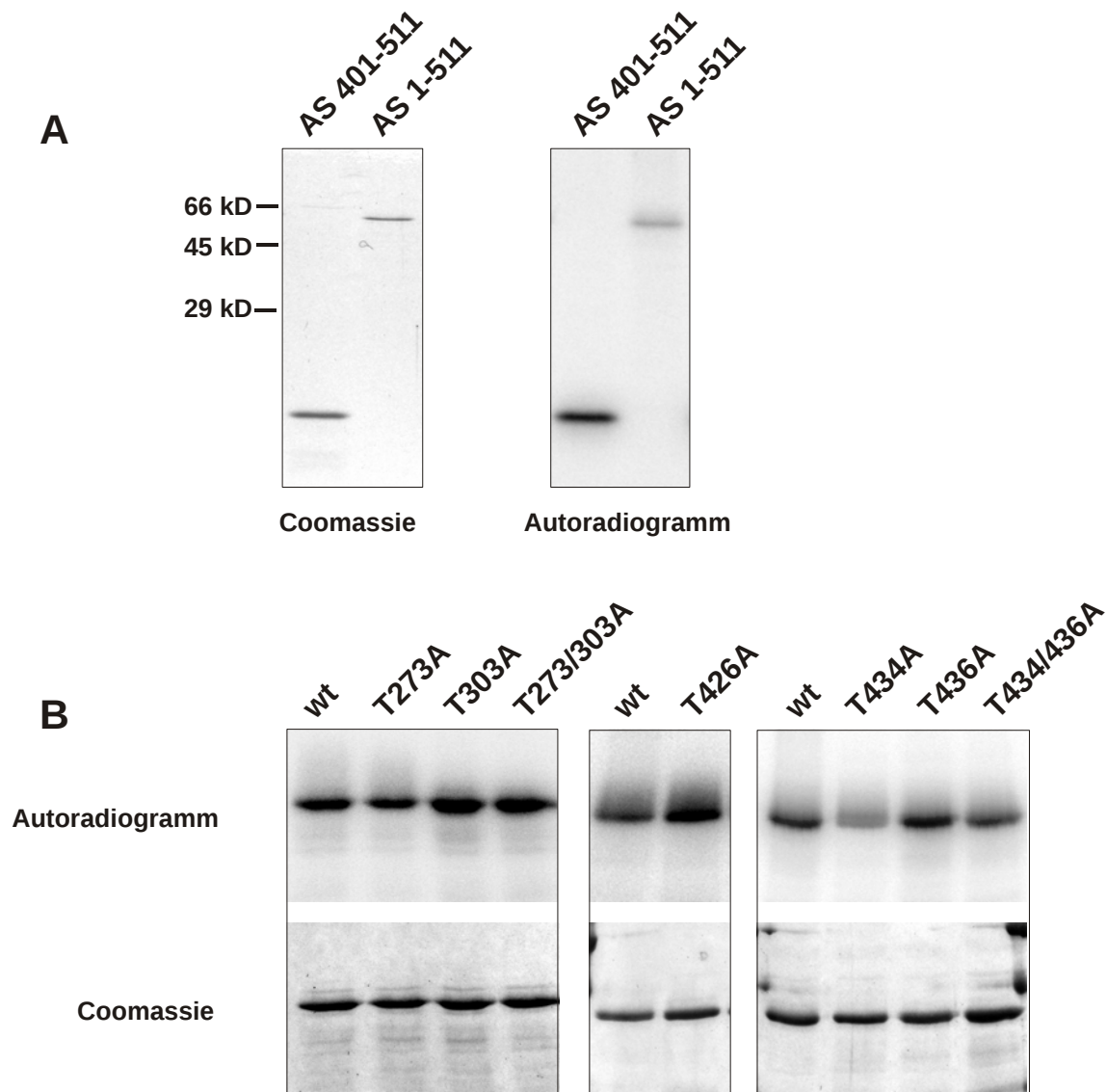


Abb. 3.23: Phosphorylierung eines Teilabschnitts (AS 401 - 511) von SF3B1 und von Punktmutanten möglicher Phosphorylierungsstellen

A, Vergleichende Phosphorylierung der Aminosäuren 401 bis 511 (pET-SF3B1/401-511) und 1 bis 511 (pET-SF3B1NT) von SF3B1 durch DYRK1A

B, Vergleichende Phosphorylierung von Punktmutanten möglicher Phosphorylierungsstellen durch DYRK1A. Die Art und Position der Mutationen im Konstrukt pET-SF3B1NT sind angegeben.

Die Proteine wurden in *E. coli* produziert, Affinitäts-gereinigt und radioaktiv *in vitro* durch GST-DYRK1A Δ C phosphoryliert. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden für einen Mengenvergleich mit Coomassie gefärbt und der Phosphatereinbau im Autoradiogramm verglichen.

Die Aminosäuren 401 - 511 von SF3B1 wurden mindestens im gleichen Maß wie die komplette N-terminale Domäne phosphoryliert (Abb. 3.23A). Dies deutete darauf hin, dass ein Großteil der Phosphorylierung in dem Bereich dieser 110 Aminosäuren stattfindet. Ein reduzierter Phosphateinbau durch DYRK1A konnte nur in den Mutanten Thr-434A und Thr-434/436A detektiert werden (Abb. 3.23B). Damit konnte Thr-434 als Phosphorylierungsstelle eindeutig bestätigt werden. Ein Ausschluss der restlichen untersuchten Threonine als Phosphorylierungsstellen ist nicht möglich, da der Nachweis einer verminderten Phosphorylierung aufgrund der Vielzahl an Phosphorylierungsstellen erschwert ist. Da die Mutation von Threonin 434 einen deutlich sichtbaren Effekt hatte, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine Haupt-Phosphorylierungsstelle von DYRK1A handeln muss.

3.4.3.3 Untersuchung der Punktmutanten mit Hilfe des *Peptide Mappings*

Die in Kap. 3.4.3.2 untersuchten Mutanten wurden *in vitro* radioaktiv durch DYRK1A phosphoryliert und für die Herstellung von Peptidkarten verwendet. Die Phosphopeptid-Karten von Thr-303 und Thr-426 unterschieden sich nicht von der Phosphopeptid-Karte des Wildtyps (Daten nicht gezeigt). Die beiden Aminosäuren wurden also durch DYRK1A in diesem Versuch nicht phosphoryliert, oder die Signale lagen unter der Detektionsgrenze. Abb. 3.24 zeigt die Phosphopeptid-Karten des Teilkonstruktes von SF3B1 und der Mutanten, deren Karten sich von der des Wildtyps unterschieden. Die Phosphopeptid-Karte des Teilkonstruktes enthielt die beiden stärksten Signale der Peptide P1 und P2 (Kap. 3.4.2.3), wie es auch nach den Versuchen in Kap. 3.4.3.2 erwartet wurde. Die schwächeren Phosphopeptide konnten nicht detektiert werden. Die entsprechenden Phosphorylierungsstellen müssen sich demnach unter den Aminosäuren 1 bis 401 befinden. Die Mutation von Thr-434 in Alanin führte zum Verlust der beiden prominentesten Signale der Phosphopeptid-Karte. Damit konnte Thr-434 als die Haupt-Phosphorylierungsstelle von DYRK1A in der N-terminalen Domäne von SF3B1 identifiziert werden. Der Wegfall von zwei Signalen lässt darauf schließen, dass es offensichtlich zwei Phosphopeptide gab, die die Aminosäure 434 enthielten. Vermutlich wurde das Protein aufgrund der Aminosäuresequenz (–A R K L T A T₄₃₄ P T P L G G M T G F H M Q T E D R T–) alternativ C-terminal des Arginins oder des Lysins durch Trypsin gespalten und führte zu zwei Peptiden mit unterschiedlichem Laufverhalten (P1 und P2). Durch den Verlust eines Phosphopeptids in der Karte der Mutante Thr-273A konnte Threonin 273 als eine untergeordnete Phosphorylierungsstelle von DYRK1A identifiziert werden (Abb. 3.24, P3). Der Wegfall der Signale weist darauf hin, dass die mutierten Aminosäuren die einzigen Phosphorylierungsstellen auf den entsprechenden Peptiden waren.

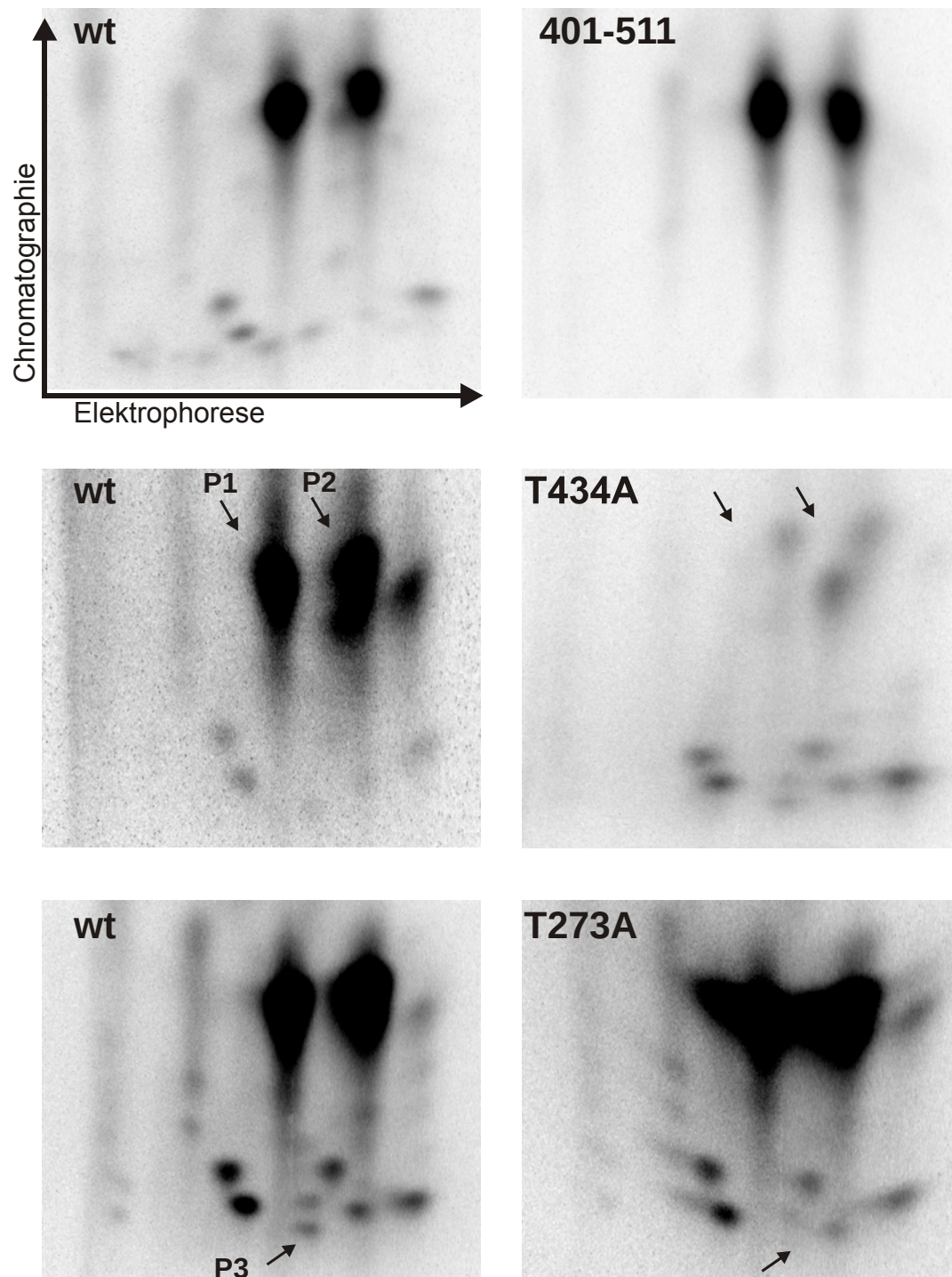


Abb. 3.24: Phosphopeptid-Karten des Teilkonstruktes SF3B1/401-511 und der Punktmutanten Thr-273A und Thr-434A

Die bakteriell exprimierte Konstrukte SF3B1NT-His₆, SF3B1/401-511, SF3B1NT-His₆-T273A und SF3B1NT-His₆-T434A wurden radioaktiv *in vitro* durch GST-DYRK1AΔC phosphoryliert und nach Aufreinigung zur Herstellung von Phosphopeptid-Karten verwendet. Da es sich um 3 unabhängige Versuche handelte, wurde die Phosphopeptid-Karte des Wildtyp-Proteins (SF3B1NT-His₆, wt) für jeden einzelnen Versuch individuell hergestellt. Die Peptidkarte des Teilkonstruktes ist durch die exprimierten Aminosäuren 401 bis 511 gekennzeichnet. Die in der Phosphopeptid-Karte des Wildtyps detektierten Phosphopeptide P1, P2 und P3, die in den Mutanten (Thr-273A und Thr-434A) fehlen, sind durch Pfeile markiert.

3.4.3.4 Identifizierung einer neuartigen Zielsequenz, die durch DYRK1A phosphoryliert wird

Die Aminosäuren Thr-273 und Thr-434 von SF3B1 wurden als *in vitro*-Phosphorylierungsstellen von DYRK1A identifiziert. Beide Aminosäurereste sind C-terminal von einem Prolin flankiert und bestätigen so die Klassifizierung von DYRK1A als eine *Proline directed Kinase* (Himpel *et al.*, 2001). Untersuchungen weiterer *in vitro*-Substrate (Tab. 1.2) zeigen, dass ein Arginin-Rest an der Position P-2 oder P-3 für eine Phosphorylierung durch DYRK1A extrem wichtig ist (Himpel *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 2001b; Campbell und Proud, 2002). Die hier identifizierte Aminosäure Thr-273 erfüllt dieses Kriterium (**GRGDT²⁷³P**). Die identifizierte Haupt-Phosphorylierungsstelle Thr-434 in SF3B1 befindet sich allerdings in einem Aminosäurekontext, der kein Arginin und auch keine andere basische Aminosäure an den Positionen P-2 und P-3 enthält. Demnach stellte sich die Frage, ob die Sequenzabfolge alleine für eine Phosphorylierung ausreicht, oder ob eine definierte Sekundärstruktur benötigt wird. Analog zu der Sequenz, die Thr-434 umgibt, wurde synthetisch das Peptid SAPtide produziert (**ARKLTAT⁴³⁴PTPLGG**). SAPtide wurde in *in vitro*-Kinase-Assays mit DYRK1A untersucht. Dabei wurde die Geschwindigkeit bei vier verschiedenen SAPtide-Konzentrationen gemessen und durch nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten ein K_m -Wert von ca. 45 μM ermittelt (Abb. 3.25).

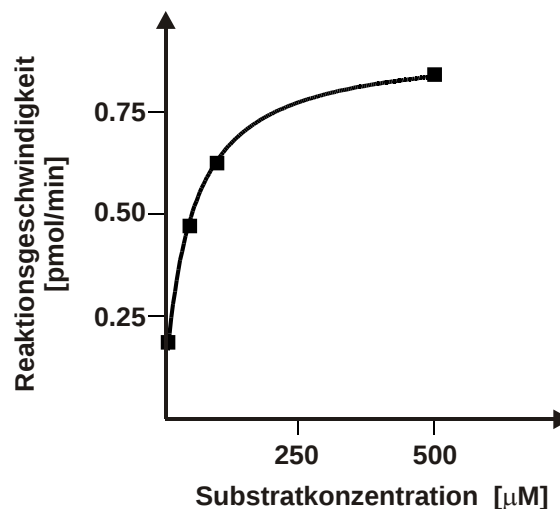


Abb. 3.25: Kinetik der Phosphorylierung von SAPtide durch DYRK1A

Fünf verschiedene Konzentrationen des Peptids SAPtide (10, 50, 100 und 500 μM) wurden radioaktiv durch GST-DYRK1A ΔC phosphoryliert und die Geschwindigkeiten des Phosphateinbaus bestimmt. Durch nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten wurde der K_m -Wert ermittelt.

Ein Vergleich zum K_m -Wert, der für DYRKtide ermittelt wurde (ca. 35 μ M, Himpel *et al.*, 2000), ein hochaffines Peptidsubstrat von DYRK1A, zeigt, dass DYRK1A eine ähnlich hohe Affinität zu SAPtide hat. Die Phosphorylierung von Thr-434 beruht demnach im Wesentlichen auf der Aminosäurenabfolge, die eine neue Zielsequenz für die Phosphorylierung durch DYRK1A darstellt. Welche Aminosäuren dieser Sequenz für die Phosphorylierung kritisch sind, kann zurzeit noch nicht beantwortet werden.

3.4.4 Identifizierung einer *in vivo*-Phosphorylierungsstelle in SF3B1

In der Phosphopeptid-Karte von endogen phosphoryliertem SF3B1 (Abb. 3.22C) wurden zwei Signale detektiert, die die gleiche Position einnahmen wie die Signale der Peptide P1 und P2, die durch Phosphorylierung von Thr-434 mit DYRK1A erhalten wurden (Kap. 3.4.3.3). Das Phosphopeptid P3, das den phosphorylierten Rest Thr-273 nach *in vitro*-Phosphorylierung durch DYRK1A enthielt (Abb. 3.24), wurde in der Karte von endogen phosphoryliertem SF3B1 nicht detektiert (Abb. 3.22C). Eine *in vivo*-Phosphorylierung dieses Aminosäurerestes ist aber dennoch nicht auszuschließen, da die *in vivo*-Phosphorylierung durch andere Kinasen die Position des entsprechenden Peptids verändern würde. Aus diesem Grund wurde die Phosphorylierung beider Mutanten *in vivo* untersucht. Die Mutationen Thr-434A und Thr-273A wurden durch Klonierung in den Klon pEGFP-SF3B1NT eingefügt und die Proteine in COS-7 Zellen exprimiert. Nach radioaktiver Inkubation der Zellen wurden die Konstrukte isoliert und für die Herstellung von Phosphopeptid-Karten verwendet (Abb. 3.26). Die Mutation von Thr-273 in Alanin verursachte keine Veränderung des Phosphopeptid-Musters im Vergleich zum Wildtyp. Dementsprechend ist Thr-273 *in vivo* nicht phosphoryliert oder nur so schwach, dass es hier nicht detektiert werden konnte. Durch Mutation von Thr-434 allerdings konnte der völlige Wegfall eines der Phosphopeptide beobachtet werden. Dieses Phosphopeptid ist offensichtlich identisch mit dem Peptid P2, das durch Phosphorylierung mit DYRK1A erhalten wird (Abb. 3.22A). Überraschenderweise war an der Peptid-1-äquivalenten Position noch immer ein Signal zu detektieren. Die Intensität dieses Signals war allerdings im Vergleich zu anderen Signalen schwächer als in der Karte des Wildtyps. Anscheinend entsteht *in vivo* durch die Phosphorylierung einer anderen Kinase ein Phosphopeptid (P0), das in etwa die gleiche Position einnimmt, wie das durch Thr-434-Phosphorylierung entstandene Peptid P1 (Abb. 3.26). Dieser Versuch zeigt, dass Thr-434 *in vivo* als phosphorylierte Aminosäure vorliegt und es sich dabei um eine von zwei Haupt-Phosphorylierungsstellen in SF3B1 handelt. Die zweite Haupt-Phosphorylierungsstelle wird anscheinend durch eine andere Kinase phosphoryliert, da das entsprechende Peptid P0 nach *in vitro*-Phosphorylierung durch DYRK1A nicht detektiert wurde.

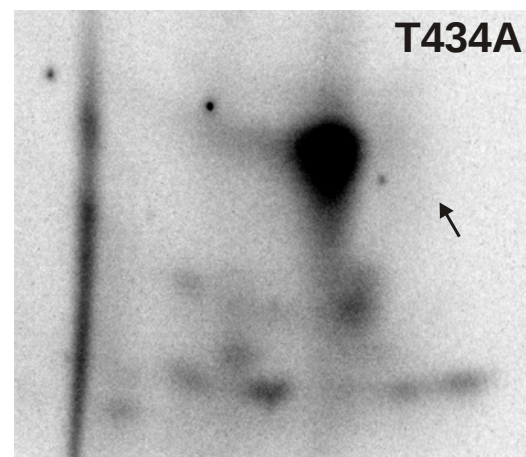
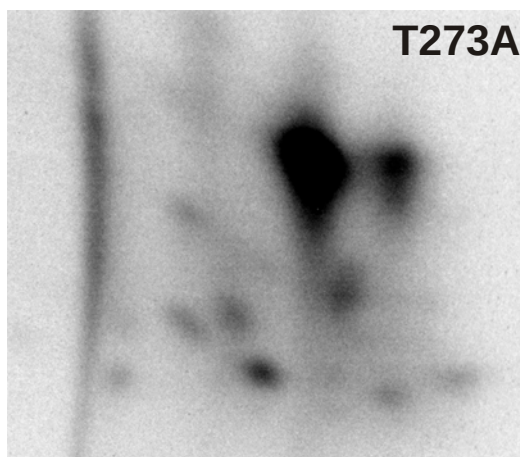
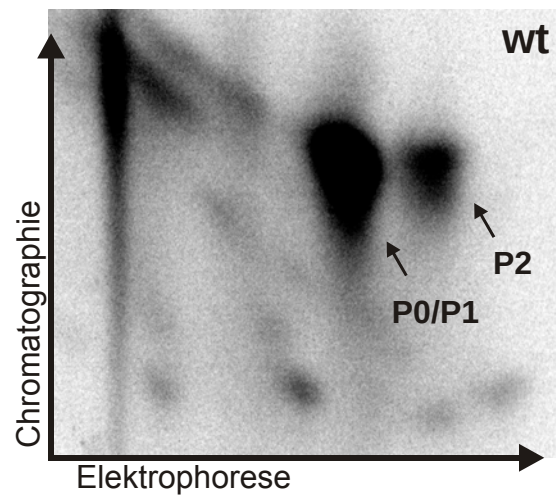


Abb. 3.26: Phosphopeptid-Karten der Mutanten T434A und T273A nach Phosphorylierung durch endogene Kinasen *in vivo*

COS-7 Zellen wurden mit den Konstrukten pEGFP-SF3B1NT (wt) und den Punktmutanten desselben Konstruktes (T273A und T434A) transfiziert und mit radioaktivem Phosphat inkubiert. Die GFP-Fusionsproteine wurden durch Immunfällung und Gelelektrophorese von endogenen Proteinen gereinigt und für die Herstellung von Phosphopeptid-Karten verwendet. Das Phosphopeptid, das nach Mutation von Thr-434 in Alanin nicht mehr detektiert wurde, ist mit P2 bezeichnet und seine Position durch einen Pfeil markiert. P0/P1-siehe Text.

3.4.5 *In vivo*-Phosphorylierung von SF3B1 in COS-7 Zellen

3.4.5.1 Charakterisierung eines phosphospezifischen Antikörpers, der die Phosphorylierung in SF3B1 durch DYRK1A detektiert

Neben den 2 identifizierten *in vitro*-Phosphorylierungsstellen (Thr-273, Thr-434) von DYRK1A müssen in der N-terminalen Domäne von SF3B1 noch einige weitere Phosphorylierungsstellen existieren (siehe Phosphopeptid-Karten). DYRK1A kann in exogenen Substraten Serin- und Threonin-Reste phosphorylieren. Wie bereits erwähnt, ist ein notwendiges Kriterium, dass diese Reste C-terminal von einem Prolin-Rest

flankiert sind. Die hier untersuchte N-terminale Domäne enthält 29 Threonine, die von einem Prolin flankiert sind, aber nur zwei Serin-Prolin-Dipeptide (Abb. 3.27). Die Wahrscheinlichkeit ist also hoch, dass es sich bei den noch nicht identifizierten Phosphorylierungsstellen um Threonine handelt. Aus diesem Grund wurde versucht, die Phosphorylierung mit Hilfe eines Antikörpers nachzuweisen, der spezifisch mit phosphorylierten Threoninen interagiert, die C-terminal von einem Prolin flankiert sind (anti pTP; P-Thr-Pro-101, Cell Signaling Technology). Die bakteriell exprimierten Proteine SF3B1NT-His₆ und SF3B1NT-T434A-His₆ wurden *in vitro* durch DYRK1A radioaktiv phosphoryliert, und die Detektion der Phosphorylierung durch Autoradiographie wurde mit der Antikörper-vermittelten Detektion verglichen. In Abb. 3.28 ist deutlich zu erkennen, dass der Antikörper anti pTP die Phosphorylierung von SF3B1NT durch DYRK1A detektieren kann. Allerdings führt die schwächere Phosphorylierung der Thr-434A-Mutante (Abb. 3.28, Autoradiogramm) beim Antikörper-Nachweis (Abb. 3.28, WB anti pTP) kaum zu einem schwächeren Signal. Anscheinend interagiert der Antikörper mit anderen phosphorylierten Thr-Pro-Motiven in Abhängigkeit der umgebenden Aminosäuresequenz stärker als mit Thr-434. Unphosphoryliertes SF3B1NT wurde durch den Antikörper nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

```

1  MAKIAKTHED IEAQIREIQG KKAALDEAQG VGLDSTGYDD QEIYGGSDSR
51  FAGYVTSIAA TELEDDEDDY SSSTSLLGQK KPGYHAPVAL LNDIPQSTEQ
101 YDPFAEHRPP KIADREDEYK KHRRTMIISP ERLDPFADGG KTPDPKMNVR
151 TYMDVMREQH LTKEEREIRQ QLAEKAKAGE LKVVNGAAAS QPPSKRKRRW
201 DQTADQTPGA TPKKLSSWDQ AETPGHTPSL RWDETPGRAK GSETPGATPG
251 SKIWDPTPSH TPAGAATTPGR GDTPGHATPG HGGATSSARK NRWDETPKTE
301 RDTPGHGSGW AETPRTDRGG DSIGETPTPG ASKRKSRWE TPASQMGGST
351 PVLTPGKTPI GTPAMNMATP TPGHIMSMTPEQLQAWRWER EIDERNRPLS
401 DEELDAMFPE GYKVLPPPAG YVPIRTPARK LTATPTPLGG MTGFHMQTED
451 RTMKSVNDQP SGNLPFLKPD DIQYFDKLLV DVDESTLSPE EQK

```

Abb. 3.27: Thr-Pro-Dipeptide in der N-terminalen Domäne von SF3B1

Es ist der Aminosäureabschnitt dargestellt, der durch das Konstrukt pEGFP-SF3B1NT exprimiert wird. Die häufige Aminosäureabfolge Threonin-Prolin (29 Dipeptide) und das zweimal vorkommende Dipeptid Serin-Prolin sind hervorgehoben. Die durch DYRK1A *in vitro* phosphorylierten Aminosäuren, die auch *in vivo* phosphoryliert vorliegen, sind mit einem Stern gekennzeichnet (*).

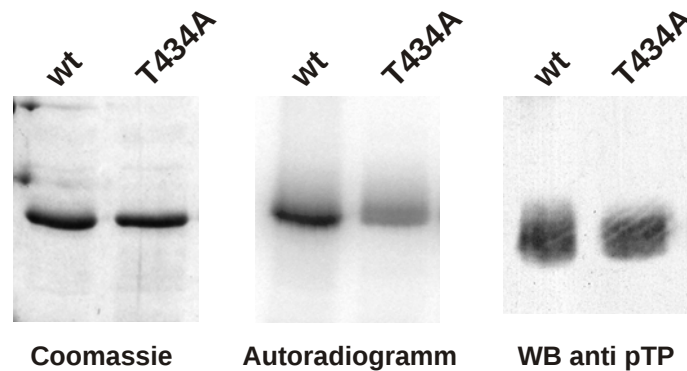


Abb. 3.28: Detektion der *in vitro*-Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A mit dem Antikörper anti pTP

SF3B1NT-His₆ und die Thr-434A-Mutante dieses Konstruktes wurden radioaktiv *in vitro* durch GST-DYRK1AΔC phosphoryliert. Die Produkte wurden auf zwei SDS-Gele verteilt. Die Proteine eines Gels wurden mit Coomassie gefärbt, und ihre Phosphorylierung wurde durch ein Autoradiogramm detektiert. Die Proteine des zweiten Gels wurden auf Nitrocellulose gebロットet, und ihre Phosphorylierung wurde in einer *Western-Blot*-Analyse mit dem Antikörper anti pTP nachgewiesen.

3.4.5.2 Dosis-abhängige Phosphorylierung durch DYRK1A

Die Ergebnisse der Phosphopeptid-Karten deuteten darauf hin, dass die Phosphorylierung von SF3B1 *in vivo* durch DYRK1A oder eine eng verwandte Kinase stattfindet (Kap. 3.4.2.3). Um eine *in vivo*-Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A nachzuweisen, wurde SF3B1 mit ansteigenden Mengen DYRK1A in COS-7 Zellen koexprimiert und der Phosphat einbau in SF3B1 mit dem oben beschriebenen Antikörper untersucht (Abb. 3.29A). Um die durch den Antikörper detektierte Phosphorylierung beurteilen zu können, wurde zusätzlich ein radioaktiver Nachweis der *in vivo*-Phosphorylierung durchgeführt (Abb. 3.29B). Die *in vivo*-Phosphorylierung von SF3B1, die durch den Antikörper anti pTP erkannt wird, nimmt durch Anstieg der Menge an koexprimierter GFP-DYRK1A konzentrationsabhängig zu. Eine verstärkte Phosphorylierung ist sogar schon bei einer geringen Menge DYRK1A (0.2 µg Plasmid transfiziert, Abb. 3.29A, 2. Reihe von links) zu beobachten. DYRK1A ist also in der Lage, in diesem Überexpressions-System SF3B1 zu phosphorylieren oder eine Phosphorylierung zu induzieren. Der Antikörper erkennt bei endogen phosphoryliertem GFP-SF3B1NT hauptsächlich 2 Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 97 und 116 kD (Abb. 3.29A, 1. Reihe von links). Diese Banden treten in den meisten Fällen auch in endogen radioaktiv phosphoryliertem GFP-SF3B1 auf (Abb. 3.34). Allerdings ist der radioaktive Einbau in die obere Bande (116 kD) manchmal so schwach, dass sie nicht mehr zu detektieren ist (wie in diesem Fall, Abb. 3.29B, 1. Reihe). Der Antikörper scheint also eine besonders starke Interaktion mit der/den Phosphorylierungsstelle/n in der oberen Bande einzugehen und diese überproportional zu detektieren.

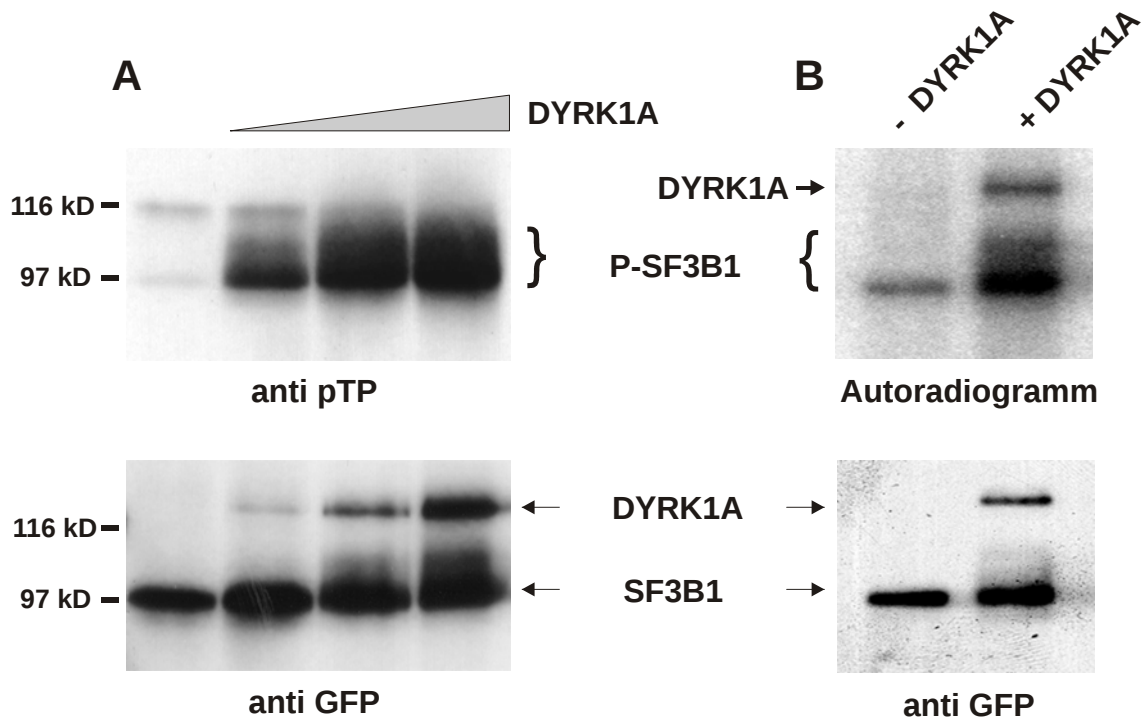


Abb. 3.29: Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A in COS-7 Zellen

A, COS-7 Zellen wurden mit jeweils 1 µg pEGFP-SF3B1NT und ansteigenden Mengen (0 µg, 0.2 µg, 1.0 µg, 2.0 µg) pEGFP-DYRK1A transfiziert. Die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen lysiert, die Proteine mit Hilfe des GFP-Tags immunpräzipitiert und für die Herstellung von zwei identischen *Western-Blots* aufgeteilt. Der Nachweis der Proteinmenge wurde mit einem anti-GFP Antikörper (untere Abb.), die Detektion der Phosphorylierung mit dem anti pTP Antikörper durchgeführt (obere Abb.).

B, COS-7 Zellen wurden mit jeweils 1.5 µg pEGFP-SF3B1 und 1.5 µg pEGFP (-DYRK1A) oder 1.5 µg pEGFP-DYRK1A (+DYRK1A) transfiziert und mit radioaktivem Phosphat ($H_3^{32}PO_4$) inkubiert. Die Proteine wurden immungefällt und für die Herstellung eines *Western-Blots* verwendet. Die Proteinmengen wurden mit einem anti GFP Antikörper nachgewiesen. Der Einbau des radioaktiven Phosphats wurde durch Autoradiographie detektiert.

Die in diesen Versuchen hergestellten COS-7-Lysate wurden immer unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. Der Lysis-puffer enthielt 1% SDS, und das Lysat wurde direkt nach der Herstellung 5 min gekocht. Dadurch sollte verhindert werden, dass katalytisch aktive DYRK1A SF3B1 im Lysat oder während der Immunfällung phosphoryliert. Die Zerstörung der DYRK1A-Enzym-Aktivität durch diese Lysebedingungen wurde wie folgt überprüft: COS-7 Zellen wurden in zwei Kulturschalen ausgesät. Eine Schale wurde mit pEGFP-SF3B1NT, die andere mit pEGFP-DYRK1A transfiziert. Die Zellen wurden in dem denaturierenden Lysis-puffer geerntet und die Lysate vereinigt. Erst dann wurde das Lysat gekocht, und die Proteine wurden, wie oben beschrieben, für eine *Western-Blot*-Analyse aufgereinigt.

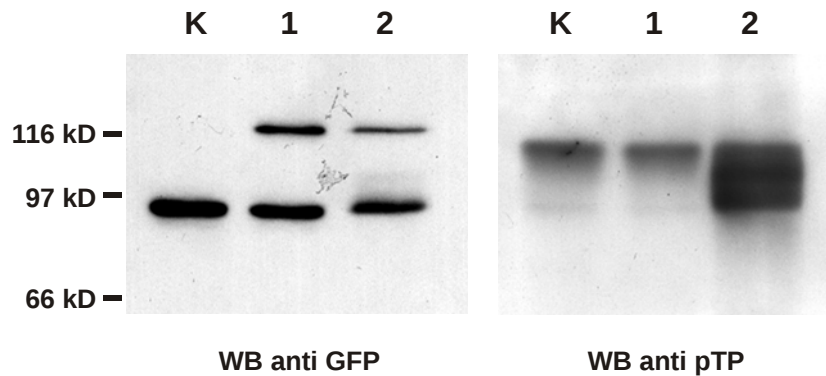


Abb. 3.30: Die Kinaseaktivität von DYRK1A wird durch Lyse der COS-7 Zellen unter denaturierenden Bedingungen zerstört

COS-7 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Die Proteine wurden immungefällt und in *Western-Blot*-Analysen mit einem GFP-Antikörper bzw. dem anti pTP Antikörper eingesetzt. K, Transfektion mit pEGFP-SF3B1NT. 1, eine Schale COS-7 Zellen wurde mit pEGFP-SF3B1NT, eine andere mit pEGFP-DYRK1A transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate vor der Inkubation bei 95 °C vereinigt. 2, Transfektion einer Schale mit pEGFP-SF3B1NT und pEGFP-DYRK1A.

Eine Phosphorylierung von SF3B1 nach Vereinigung der Lysate konnte nicht detektiert werden (Abb. 3.30). Die bisher beobachteten Phosphorylierungen fanden also tatsächlich in den lebenden Zellen statt.

3.4.5.3 Phosphorylierung von SF3B1 durch die Aktivitäts-reduzierte Punktmutante DYRK1AK188R und die verwandte Kinase CLK3

Als nächstes wurde untersucht, ob die in Abb. 3.29 beobachtete Phosphorylierung von SF3B1 spezifisch durch die Kinaseaktivität von DYRK1A zustande kommt. Zu diesem Zweck wurde der in Kap. 3.4.5.2 beschriebene Versuch mit den Kinasen DYRK1A, DYRK1AK188R und CLK3 durchgeführt (Abb. 3.31A). DYRK1AK188R ist eine Punktmutante, die durch gestörte ATP-Bindung nur eine minimale katalytische Aktivität besitzt (Kentrup *et al.*, 1996). CLK3 wurde exemplarisch als eine der DYRK Familie verwandte Kinase gewählt (Abb. 1.1). Durch koexprimierte DYRK1A nahm, wie erwartet, der Phosphateinbau in SF3B1 zu. Durch die Aktivitäts-reduzierte Punktmutante (K188R) wurde auch eine Zunahme der Phosphorylierung von SF3B1 erzielt. Unter Berücksichtigung der Expressionslevel der Kinasen fiel diese allerdings sehr gering aus. Die Überexpression der Kinase CLK3 (katalytische Aktivität überprüft durch Immunkomplex-Kinase-Assay mit MBP als Substrat, Abb. 3.31B) führte dagegen nicht zu einer Zunahme der SF3B1-Phosphorylierung (Abb. 3.31A). Diese Versuche belegen die Spezifität der Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A.

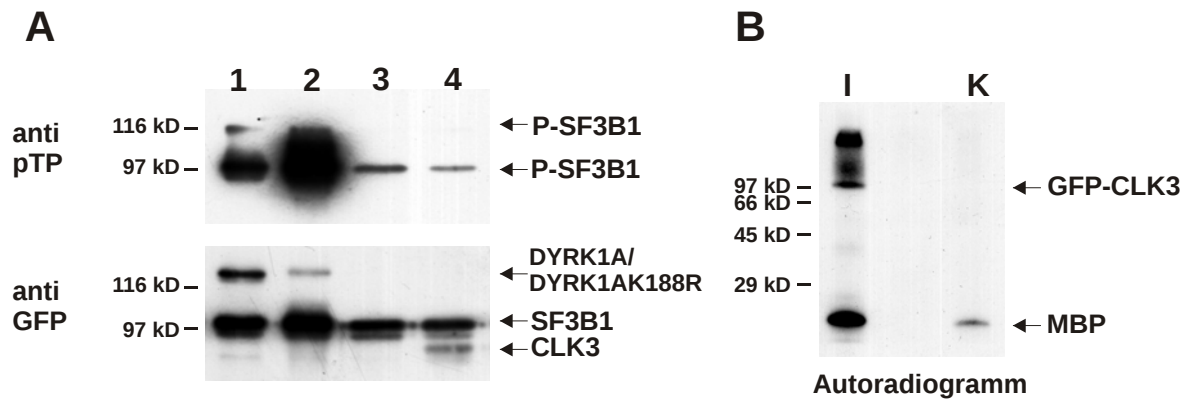


Abb. 3.31: *In vivo*-Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1AK188R und CLK3

A, COS-7 Zellen wurden mit pEGFP-SF3B1NT und dem GFP-Leervektor (3) bzw. den GFP-Konstrukten der Kinasen DYRK1AK188R (1), DYRK1A (2) und CLK3 (4) kotransfiziert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Die Proteine wurden immunpräzipitiert und in einer *Western-Blot*-Analyse mit den Antikörpern anti GFP (untere Abb.) und anti pTP (obere Abb.) untersucht.

B, Nachweis der katalytischen Aktivität von GFP-CLK3

GFP-CLK3 wurde in COS-7 Zellen exprimiert und nach nativer Lyse der Zellen mit Hilfe eines anti GFP Serums immungefällt. Der Immun-Kinase-Komplex wurde anschließend für eine radioaktive Phosphorylierung von MBP eingesetzt (I). Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen der gleichen Prozedur unterworfen (K). Die Phosphorylierung von MBP durch immungefällte CLK3 und die Autophosphorylierung der Kinase wurden durch das dargestellte Autoradiogramm detektiert und belegen die katalytische Aktivität von GFP-CLK3. Die geringe Phosphorylierung von MBP in der Negativkontrolle wurde anscheinend durch endogene Kinasen verursacht, die unspezifisch an der Sepharose gebunden waren.

3.4.5.4 Phosphorylierung von SF3B1 durch Mitglieder der DYRK-Familie

DYRK1A bildet mit den Kinasen DYRK1B, DYRK2, DYRK3 und DYRK4 die Familie der „*Dual-Specificity Tyrosine (Y) Phosphorylation-Regulated Kinase*“ (DYRK, Kap. 1.2). Es sollte untersucht werden, ob andere Mitglieder dieser Familie in der Lage sind, SF3B1 in COS-7 Zellen zu phosphorylieren. Es wurden COS-7 Zellen mit pEGFP-SF3B1NT mit den GFP-Konstrukten der Kinasen DYRK1A, DYRK1B, DYRK2 und DYRK3 kotransfiziert und die Phosphorylierung mit dem pTP-Antikörper untersucht. Wie in Abb. 3.32 zu sehen ist, konnte durch Koexpression von DYRK1B die Phosphorylierung von SF3B1 verstärkt werden. Allerdings fiel diese Verstärkung unter Berücksichtigung der Kinasenmengen deutlich schwächer aus als mit DYRK1A. Interessanterweise waren auch DYRK2 und DYRK3 in der Lage, die Phosphorylierung in geringem Maße zu verstärken. Dieser Effekt trat aber nur für die obere Bande (größeres apparentes Molekulargewicht) auf. Der Mengenvergleich für DYRK2 und DYRK3 konnte nicht erfolgen, da sie die gleichen Molekulargewichte wie SF3B1 besitzen und so die Signale überlappten.

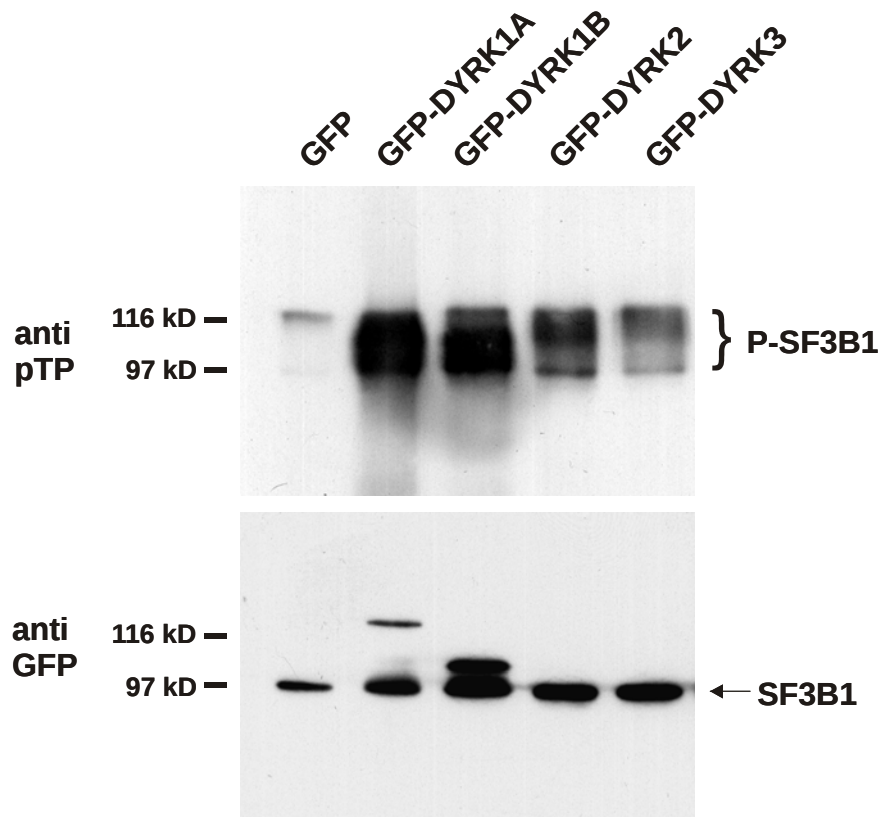


Abb. 3.32: Phosphorylierung von SF3B1 durch Mitglieder der DYRK-Familie in COS-7 Zellen

COS-7 Zellen wurden mit pEGFP-SF3B1 und GFP bzw. GFP-Konstrukten der angegebenen Kinasen kotransfiziert. Die Proteine wurden aus denaturierten Lysaten immungefällt und für *Western-Blot*-Analysen mit dem anti GFP (untere Abb.) und anti pTP Antikörper (obere Abb.) verwendet.

3.4.5.5 Überexprimierte DYRK1A phosphoryliert endogene Phosphorylierungsstellen von SF3B1

In Kap. 3.4.5.2 wurde mit Hilfe des anti pTP Antikörpers gezeigt, dass die Überexpression von DYRK1A in COS-7 Zellen einen Anstieg der Phosphorylierung von SF3B1 verursacht. Ob es sich dabei um bereits endogen phosphorylierte oder um unphosphorylierte Aminosäuren handelte, konnte nicht beantwortet werden. Dies wurde mit Hilfe von Phosphopeptid-Karten untersucht. COS-7 Zellen wurden mit pEGFP-SF3B1NT zusammen mit pEGFP-C1 oder pEGFP-DYRK1A kotransfiziert und anschließend mit radioaktivem Phosphat inkubiert. SF3B1 wurde isoliert und für die Herstellung von Phosphopeptid-Karten verwendet (Abb. 3.33). Die Phosphopeptid-Karten mussten auf ein Phosphopeptid normalisiert werden, um die Signalintensitäten der anderen Phosphopeptide vergleichen zu können. Für diesen Zweck wurde das Phosphopeptid P0 (Abb. 3.26) ausgewählt, da vorherige Versuche gezeigt hatten, dass es sich hierbei um ein Peptid handelt, das nicht durch DYRK1A phosphoryliert wird (Kap. 3.4.4) und dessen Signalintensität sich in diesem Versuch nicht verändern sollte.

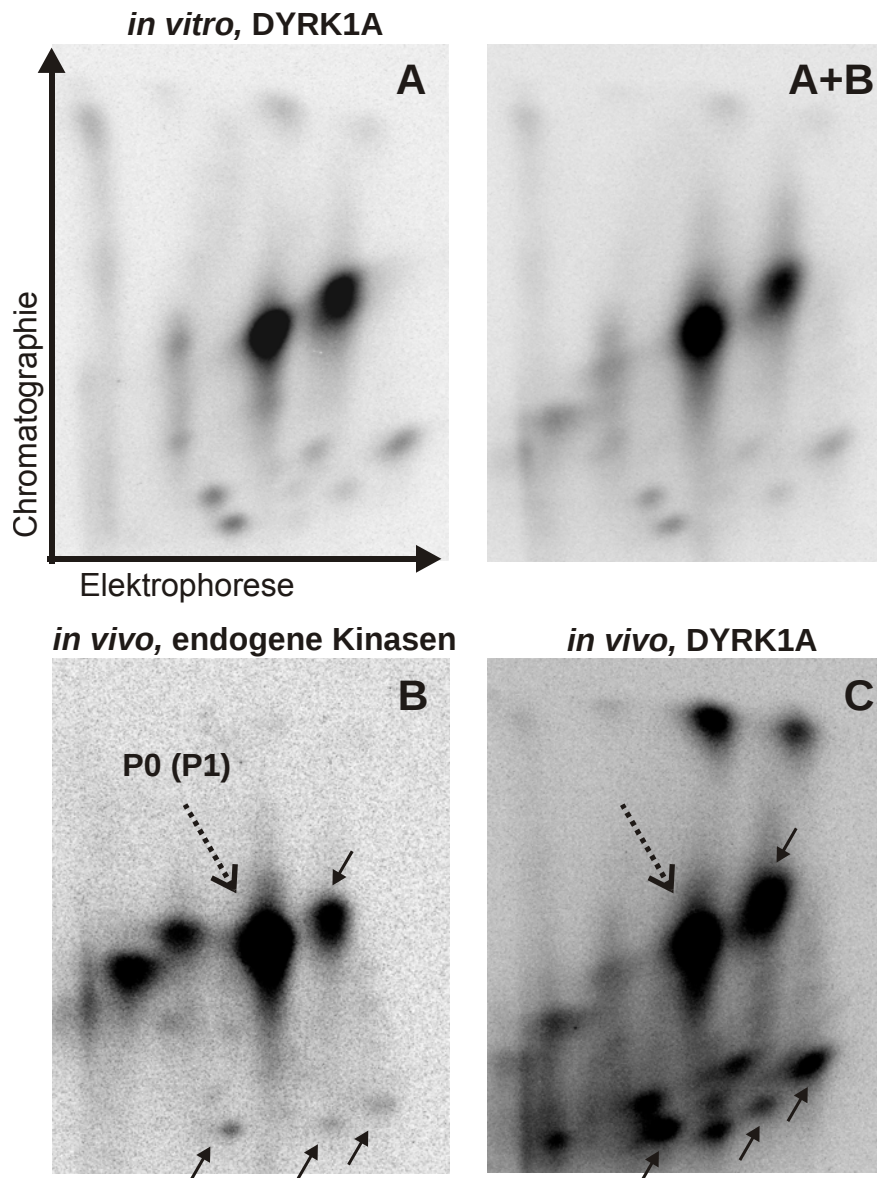


Abb. 3.33: Phosphopeptid-Karten von SF3B1 nach endogener Phosphorylierung und nach Phosphorylierung durch überexprimierte DYRK1A

Das bakteriell exprimierte Konstrukt SF3B1NT-His₆ wurde radioaktiv *in vitro* durch GST-DYRK1A Δ C phosphoryliert und durch eine SDS-PAGE von der Kinase getrennt (A). COS-7 Zellen wurden mit pEGFP-SF3B1NT und entweder pEGFP (B) oder pEGFP-DYRK1A (C) kotransfiziert und mit radioaktivem Phosphat inkubiert. GFP-SF3B1NT wurde durch Immunfällung und Gelelektrophorese von endogenen Proteinen und der überexprimierten Kinase getrennt. Die phosphorylierten Proteine wurden für die Herstellung von Phosphopeptid-Karten verwendet. Die Phosphopeptid-Karten B und C wurden auf die Signalintensität des Peptids P0 normalisiert (gestrichelter Pfeil). Diese Normalisierung ist allerdings durch das an gleicher Position liegende Peptid P1 beeinflusst. Phosphopeptide, die durch überexprimierte DYRK1A verstärkt phosphoryliert werden, sind mit Pfeilen markiert.

A, Phosphopeptid-Karte von SF3B1NT-His₆ nach Phosphorylierung *in vitro* durch DYRK1A

B, Phosphopeptid-Karte von GFP-SF3B1NT nach Expression in COS-7 Zellen

C, Phosphopeptid-Karte von GFP-SF3B1NT nach Koexpression mit GFP-DYRK1A in COS-7 Zellen

A+B, Beladung einer Dünnschichtplatte mit Phosphopeptiden aus den Versuchen A und B

Allerdings liegt an der gleichen Position das Phosphopeptid P1, das den phosphorylierten Threonin-Rest 434 enthält. Mit einem Anstieg der Phosphorylierung dieses Peptids wurde allerdings gerechnet. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte tatsächlich größer sind, da die Signalzunahme von P1 die Normalisierung entsprechend beeinflusst hat. In den normalisierten Karten konnten mindestens vier Peptide identifiziert werden, die endogen bereits phosphoryliert sind und durch überexprimierte DYRK1A zusätzlich phosphoryliert werden. Dabei muss es sich nicht nur um die gleichen Peptide, sondern auch um die gleichen Phosphorylierungsstellen handeln. Würde es sich um zusätzliche Phosphorylierungsstellen im selben Peptid handeln, müsste es zu einer Positionsverschiebung dieses Peptids kommen, was hier nicht der Fall ist. Diese Versuche zeigen, dass neben Thr-434 mindestens 3 weitere Positionen von endogen bereits phosphorylierten Aminosäuren durch überexprimierte DYRK1A phosphoryliert werden.

3.4.6 Verminderung der DYRK1A-Expression durch RNA-Interference und Auswirkung auf die Phosphorylierung von SF3B1

In vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass überexprimierte DYRK1A GFP-SF3B1NT *in vivo* phosphoryliert. Dementsprechend sollte eine *Down*-Regulation von endogener DYRK1A zu einer Reduktion der Phosphorylierung von SF3B1 führen. Da bislang keine Faktoren bekannt sind, die die Expression von DYRK1A in dieser Weise regulieren, wurde mit Hilfe von RNA-Interference die endogene DYRK1A-Menge reduziert und die Phosphorylierung von SF3B1 überprüft (Abb. 3.34). Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte radioaktiv und nicht mit dem zuvor benutzten Antikörper, da er die Haupt-Phosphorylierungsstelle Thr-434 von DYRK1A nicht gleichwertig detektiert (Kap. 3.4.5.1). COS-7 Zellen wurden mit pEGFP-SF3B1 und den RNAi-Konstrukten pSUPER-673 und pSUPER-2060, bzw. im Kontrollversuch mit pEGFP-SF3B1 und pSUPERleer, kotransfiziert. Anschließend wurden sie mit radioaktivem Phosphat inkubiert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Durch *Western-Blot*-Analyse eines Teils des Lysates wurde die *Down*-Regulation von DYRK1A überprüft. Um die Spezifität der *Down*-Regulation zu überprüfen, wurde zusätzlich die Expression des Transkriptionsfaktors STAT3 analysiert, die nicht durch die RNAi-Konstrukte verändert sein sollte. Immungefälltes SF3B1 wurde für die Herstellung eines *Western-Blots* verwendet und durch einen anti GFP Antikörper detektiert. Die Phosphorylierung wurde durch ein Autoradiogramm desselben *Western-Blots* nachgewiesen. Wie Abb. 3.34 zeigt, wurde die endogene DYRK1A-Menge durch Transfektion mit den RNAi-Konstrukten deutlich gesenkt. Allerdings zeigte der STAT3-*Western-Blot*, dass die Proteinmenge anderer endogener Proteine nach RNAi-Behandlung reduziert war. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch *Down*-Regulation von DYRK1A die Vitalität der

Zellen sinkt, und es so zu langsamerem Wachstum bzw. verfrühtem Absterben der Zellen kommt. Die spezifisch reduzierte Expression von DYRK1A nach RNAi-Behandlung ist also nicht so groß, wie der DYRK1A-Western-Blot suggeriert. In den Zellen, in denen die Expression von endogener DYRK1A *down*-reguliert wurde, ist die Phosphorylierung von SF3B1NT schwächer als in den Zellen mit normaler DYRK1A Expression. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass auch die Gesamtmenge an SF3B1 in den entsprechenden Banden etwas geringer ist. Dass die Reduktion von DYRK1A aber tatsächlich eine reduzierte Phosphorylierung von SF3B1 bedingt, ist daran zu erkennen, dass sich das Verhältnis der beiden phosphorylierten Banden zueinander verändert. In vorherigen Experimenten wurde beobachtet, dass überexprimierte DYRK1A zu einem verstärkten Signal der unteren Bande führte (Abb. 3.29). In RNAi-behandelten Zellen mit reduzierter DYRK1A-Expression ist das Signal der unteren Bande deutlich schwächer als das Signal der oberen Bande.

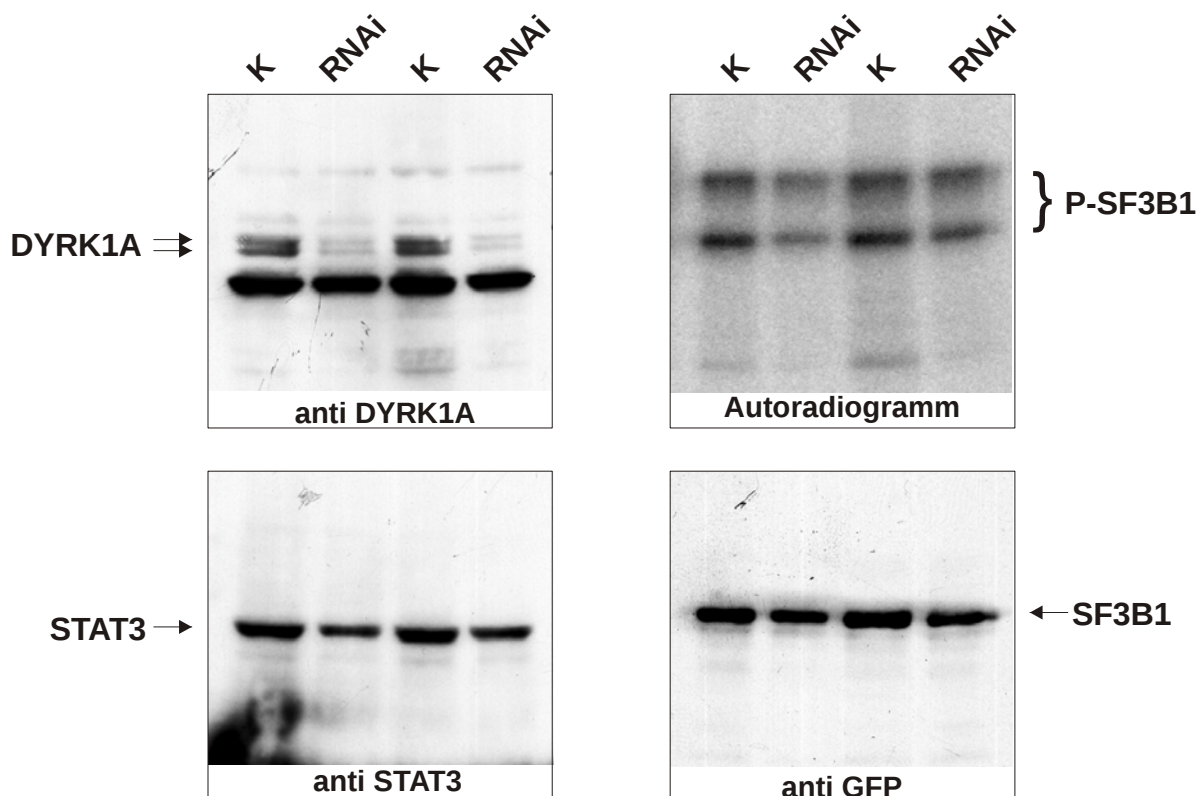


Abb. 3.34: Down-Regulation von DYRK1A durch RNA-Interference und Auswirkungen auf die SF3B1-Phosphorylierung

COS-7 Zellen wurden mit pEGFP-SF3B1NT und spezifischen RNAi-Konstrukten bzw. Leervektor transfiziert, mit radioaktivem Phosphat inkubiert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Ein Teil des Lysats wurde für die Western-Blot-Analysen der DYRK1A- und STAT3-Mengen verwendet (links). Aus dem restlichen Lysat wurde SF3B1 immungefällt und in eine Western-Blot-Analyse mit einem anti GFP Antikörper eingesetzt (rechts, unten). Der Phosphateinbau wurde durch Autoradiographie desselben Blots untersucht (rechts, oben).

4. Diskussion

Durch Festphasen-Phosphorylierung einer cDNA-Expressionsbibliothek wurden in dieser Arbeit mehrere *in vitro*-Substrate der Proteinkinase DYRK1A identifiziert. Bei einem Großteil handelte es sich um Spleißfaktoren. Von den identifizierten Substraten wurden zwei Proteine näher untersucht. Cyclin L2 ist ein bislang nicht näher beschriebenes Protein, das aufgrund von Sequenzcharakteristika mutmaßlich mit Spleißprozessen assoziiert ist. SF3B1 ist ein bekannter Spleißfaktor, der an konstitutiven Spleißprozessen beteiligt ist.

4.1 Cyclin L2

Cyclin L2 ist ein Protein mit bislang unbekannter Funktion, das aus zwei charakteristischen Domänen aufgebaut ist: eine Cyclindomäne und eine Arginin-Serin-reiche-Domäne (RS-Domäne). Diese ungewöhnliche Domänen-Kombination ist im Menschen nur bei dem sehr nah verwandten Protein Cyclin L1 zu finden (Dickinson *et al.*, 2002). Diese Domänenstruktur scheint für die Funktion des Proteins wichtig zu sein, da sie auch in entfernt verwandten orthologen Proteinen enthalten ist (z.B. *Arabidopsis thaliana* und *Drosophila melanogaster*; Berke *et al.*, 2001).

4.1.1 Cyclin L2, ein neues Cyclin aus der Gruppe der Transkriptions-regulatorischen Cycline

Die bekanntesten Vertreter der Cyclin-Familie, z.B. Cyclin E, D, A und B, sind an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Der Name der Familie leitet sich aus der alternierenden Expression der Proteine im Verlauf des Zellzyklus ab. Darüber hinaus existieren andere Cycline, die eine Funktion in Transkriptionsprozessen ausüben (Knockaert *et al.*, 2002). Der in Abb. 4.1 dargestellte Stammbaum einiger Cycline verzweigt sich in zwei Hauptäste, die die funktionelle Unterteilung der Cycline widerspiegeln. Einen Ast bildet die Gruppe der Zellzyklus-regulatorischen Cycline (Cyclin E1, Cyclin A1, Cyclin B1, Cyclin D1). Die andere Verzweigung führt zu Cyclinen, die an Transkriptions-Initiation und -Elongation beteiligt sind. Cyclin L2 konnte durch Sequenzvergleiche der letztgenannten Gruppe zugeordnet werden, deren bekannteste Vertreter Cyclin K, Cyclin T1/T2 und Cyclin H sind (Kap. 3.3.1). Cycline vom T-Typ (T1, T2a, T2b) bilden mit der Cyclin-abhängigen Kinase CDK 9 den Transkriptions-Elongationsfaktor pTEFb, der durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II (C-terminale Domäne der größten Untereinheit) die Elongationsphase der Transkription aufrecht erhält (de Luca *et al.*, 2003). Auch Cyclin K kann als Cyclin-Partner von CDK9 bei dieser Phosphorylierung mitwirken (Fu *et al.*, 1999). Cyclin H ist als Trimer mit CDK7 und einer weiteren Komponente Bestandteil des Transkriptionsfaktors TFIIH, der an der Transkriptions-Initiation und -Elongation beteiligt ist (Oelgeschläger *et al.*, 2002).

Cycline sind die regulatorischen Untereinheiten der Cyclin-abhängigen Kinasen. In unserer Arbeitsgruppe konnte eine Interaktion von Cyclin L2 mit der Proteinkinase PITSLRE nachgewiesen werden (Spelten und Becker, unveröffentlichte Daten), wie sie zuvor schon für Cyclin L1 gezeigt wurde (Berke *et al.*, 2001; Dickinson *et al.*, 2002). Dieser Cyclin-abhängigen Kinase wird eine Rolle in Signaltransduktions-Prozessen zugeschrieben, die die Transkription und/oder RNA-Prozessierung regulieren (Trembley *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003). Die strukturelle Ähnlichkeit zu den genannten Cyclinen und die Interaktion mit PITSLRE *in vivo* lassen vermuten, dass Cyclin L2 ebenfalls an Transkriptionsprozessen oder RNA-Prozessierung beteiligt ist.

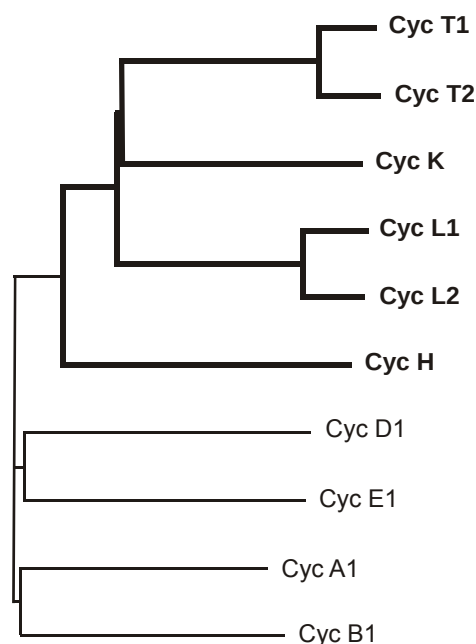


Abb. 4.1: Stammbaum einiger Mitglieder der Cyclin-Familie

Das Dendrogramm wurde mit Hilfe des Programms ClusTree aus dem Sequenzvergleich in Abb. 3.6 erstellt.

4.1.2 Die RS-Domäne von Cyclin L2 vermittelt die Interaktion mit Spleißfaktoren und eine Kolokalisation mit diesen Proteinen in *Nuclear Speckles*

Cyclin L2 und Cyclin L1 besitzen zusätzlich zu der Cyclindomäne als weiteres Strukturmerkmal eine RS-Domäne, wie sie in vielen Spleißfaktoren zu finden ist. Die Proteine mit RS-Domänen werden in zwei Klassen eingeteilt: Die SR-Proteine sind essentielle Spleißfaktoren, die neben der RS-Domäne mindestens ein RNA-Erkennungsmotiv besitzen. Die zweite Klasse der SR-verwandten Polypeptide (SRrP) weist statt eines RNA-Erkennungsmotivs andere Struktur-Charakteristika auf (Fu, 1995). Beispiele dieser zweiten Klasse sind die RNA-Helicase, die neben der RS-Domäne eine putative DEAH-Box besitzt (Ono *et al.*, 1994) und die Proteinkinase

CLK/STY, die das RS-Motiv mit einer Kinasedomäne kombiniert (Johnson und Smith, 1991). Cyclin L2 kann dieser inhomogenen Gruppe der SR-verwandten Polypeptide zugeordnet werden, da ein RNA-Erkennungsmotiv fehlt, und die RS-Domäne mit einer Cyclindomäne kombiniert ist. Viele der SR-verwandten Polypeptide sind in Spleißprozessen beteiligt, wie zum Beispiel der bekannte Spleißregulator hTra2 α (Dauwalder *et al.*, 1996). Andere scheinen eher Funktionen in Transkription und RNA-Prozessierung zu erfüllen (Blencowe *et al.*, 1999). In den letzten Jahren verdichteten sich die Hinweise auf eine funktionelle Verknüpfung von Transkription, Transkript-Prozessierung und -Spleißen in einem übergeordneten Komplex (Hirose und Manley, 2000). Es ist demnach denkbar, dass Cyclin L2 sowohl für Transkriptions- als auch Spleißprozesse eine funktionelle Bedeutung hat.

RS-Domänen fungieren als Protein-Protein-Interaktionsdomänen und vermitteln die Interaktion von Spleißfaktoren untereinander (Graveley, 2000). Für die RS-Domänen einiger Proteine konnte gezeigt werden, dass sie sogar gegeneinander austauschbar sind, ohne dass die Funktion der jeweiligen Proteine verändert wird (Wang *et al.*, 1998b). In der vorliegenden Arbeit wurde in *Pulldown*-Experimenten gezeigt, dass Cyclin L2 mit dem Spleißfaktor SF2 interagiert (Abb. 3.15). Auch eine Interaktion von Cyclin L2 mit einem weiteren SRrP, der Proteinkinase CLK3, wurde in solchen Experimenten beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es ist anzunehmen, dass die Interaktion durch die RS-Domänen der Proteine vermittelt wurde, da dem verwendeten Konstrukt von Cyclin L2 ein großer Teil der Cyclindomäne fehlt.

Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von vielen Spleißfaktoren haben gezeigt, dass diese im Kern in punktförmigen Strukturen akkumulieren. Diese *Nuclear Speckles* werden auch als *Interchromatin Granule Clusters* bezeichnet und sind zu unterscheiden von anderen punktförmigen Strukturen des Zellkerns wie *Nucleoli*, *Cajal (Coiled) Bodies*, *Gemini of Coiled Bodies (GEMS)* und *Promyelocytic Leukaemia (PML) Bodies* (Spector, 2001). *Nuclear Speckles* gelten als Aufbewahrungsorte für Spleißfaktoren, aus denen sie kontrolliert zum Ort ihres Einsatzes rekrutiert werden können (Lamond und Spector, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fluoreszenz-markiertes Cyclin L2 mit dem Spleißfaktor SC35 in *Nuclear Speckles* akkumuliert (Abb. 3.14). Diese Akkumulation wird offensichtlich durch die RS-Domäne vermittelt, da ein N-terminal deletiertes Konstrukt von Cyclin L2 (GFP-CCNL2 Δ N), dem ein Großteil der Cyclindomäne fehlt (153 von 227 AS), die gleiche Verteilung im Zellkern zeigt (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus ist die kurze Variante Cyclin L2^s, die keine RS-Domäne besitzt, diffus in der Zelle lokalisiert (Spelten und Becker, unveröffentlichte Daten). Es gibt allerdings auch Proteine, die aufgrund anderer Strukturmerkmale in *Nuclear Speckles* akkumulieren. Cyclin T1 und die Proteinkinase

DYRK1A enthalten eine Histidin-reiche Region, die für die subzelluläre Lokalisation in *Nuclear Speckles* verantwortlich gemacht wird (Herrmann und Mancini, 2001; Álvarez *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 1998).

Die Akkumulation in *Nuclear Speckles* und die Interaktion mit anderen RS-Domänen enthaltenden Proteinen (SF2, CLK3) lässt eine Funktion von Cyclin L2 in Spleißprozessen vermuten. Für Cyclin L1, das nächst-verwandte Protein von Cyclin L2, konnte bereits gezeigt werden, dass es das Spleißen einer β -Globin prä-mRNA *in vitro* stimuliert (Dickinson *et al.*, 2002).

4.1.3 Vergleichende Charakterisierung von Cyclin L2 und Cyclin L1

Eine Datenbankanalyse zeigte, dass Cyclin L1 das nächst-verwandte Protein von Cyclin L2 ist. Über die gesamte Proteinelänge besitzen die beiden Proteine 62% identische Aminosäuren. Die Cyclindomäne weist sogar eine Übereinstimmung von 84% auf (Kap. 3.3.1). Cyclin L1 ist bislang als Cyclin L (Dickinson *et al.*, 2002) oder Cyclin Ania-6a (Berke *et al.*, 2001) bezeichnet worden. In Anlehnung an die Bezeichnungen von Cyclin T1 und T2 wurde bei der *Human Genome Organisation* die systematische Bezeichnung Cyclin L1 für das bereits bekannte und Cyclin L2 für das hier charakterisierte Protein vorgeschlagen. Die offiziellen Gensymbole für die menschlichen Gene lauten nun *CCNL1* und *CCNL2*.

Die genomische Organisation und alternativ gespleißte Transkripte von *CCNL2* wurden in dieser Arbeit aufgeklärt (Kap. 3.3.2; Kap. 3.3.3). Das Gen umfasst ca. 12 kb und kodiert für die drei Spleißvarianten T1, T2 und T3. Diese Spleißvarianten exprimieren zwei unterschiedliche Proteine. Das komplette Protein Cyclin L2 wird durch die Spleißvariante T2 exprimiert. Es enthält die Cyclin- und die RS-Domäne. Eine verkürzte Version des Proteins, Cyclin L2^s, wird durch die Transkripte T1 und T3 kodiert. In diesem Protein fehlen die RS-Domäne und ein Teil der Cyclindomäne. Auch für Cyclin L1 wurde die Expression einer langen und einer kurzen Proteinform postuliert (Berke *et al.*, 2001; Dickinson *et al.*, 2002). Die durch *CCNL1* kodierten Transkripte wurden in dieser Arbeit ebenfalls analysiert (Kap. 3.3.3). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass das große Transkript (T1'; 4.3 kb) für das kurze Protein und das kleine Transkript (T2'; 2.3kb) für das komplette Protein kodiert. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der von Dickinson und Kollegen (2002) postulierten Zusammensetzung und Zuordnung der einzelnen Transkripte. Ihre Analysen beruhten allerdings nur auf vereinzelten Sequenzen der Datenbanken und wurden nicht durch *Northern-Blot*-Analysen mit Exon-spezifischen Sonden überprüft. Die hier gewonnenen Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen des Maus-Orthologs von Cyclin L1, Cyclin Ania-6a (Berke *et al.*, 2001).

Die *Northern-Blot*-Analysen verschiedener menschlicher Gewebe zeigen, dass die beiden Proteinformen von Cyclin L2 und Cyclin L1 (indirekt nachgewiesen über die beiden Transkriptformen T1 und T2) unterschiedlich stark exprimiert werden (Kap. 3.3.3.1). Transkripte von Cyclin L2^s sind in den meisten Geweben stärker exprimiert als Transkripte der kompletten Variante. Nur menschlicher Hoden und Skelettmuskel enthalten annähernd gleiche Transkriptmengen beider Proteine. Die Expression von CCNL1-Transkripten beider Proteinvarianten ist in den meisten Geweben annähernd gleich; in Skelettmuskel, Blutlymphozyten, Hoden und Prostata überwiegt sogar das Transkript T2', das für das komplette Protein kodiert. Das hier detektierte Expressionsmuster von Cyclin L1 in Niere, Prostata, Hoden, Dünndarm, Dickdarm und Blutlymphozyten stimmt mit Ergebnissen von Dickinson und Kollegen (2002) überein.

Ein Vergleich der Transkripte, die durch *CCNL1* und *CCNL2* kodiert werden, lässt einige Gemeinsamkeiten erkennen: Beide Gene produzieren Transkripte, die sich in der Zusammensetzung und in der Größe der einzelnen Exons kaum unterscheiden; Beide Gene kodieren für eine kurze und eine lange Proteinvariante, die jeweils durch die Integration bzw. Nicht-Integration eines alternativen Exons entstehen. Dies lässt vermuten, dass *CCNL1* und *CCNL2* durch Gen-Duplikation entstanden sind. Die Expression von Cyclin L1-Transkripten wird durch verschiedene Stimuli reguliert (PMA, CHX, Zelldifferenzierung; Abb. 3.12). Dies steht im Einklang mit einer ausführlicheren Untersuchung von Sgambato und Kollegen (2003). Im Gegensatz dazu konnte kein Stimulus identifiziert werden, der die Expression von Cyclin L2 in ähnlichem Maße beeinflusst. Dass beide Gene anscheinend unterschiedlich reguliert werden, und dass sie in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden, spricht dafür, dass sie unterschiedliche Funktionen erfüllen.

Beide Gene kodieren für eine verkürzte Variante des Proteins, in der die RS-Domäne und ein Teil der Cyclindomäne fehlen. Es handelt sich hierbei anscheinend nicht um aberrante Spleißprodukte ohne Funktion, da diese Proteinform auch in der Maus konserviert ist (Berke *et al.*, 2001). Darüber hinaus kann das Transkript T1' der kurzen Proteinvariante von Cyclin L1 gezielt reguliert werden (Berke *et al.*, 2001; Sgambato *et al.*, 2003). Die Existenz von verkürzten Spleißvarianten ist auch von anderen Proteinen bekannt. Interessanterweise existieren von einigen Spleißfaktoren verkürzte Proteine, denen die RS-Domäne fehlt (Fu, 1995). Einige dieser verkürzten Proteinvarianten beeinflussen autoregulatorisch das alternative Spleißen ihrer eigenen prä-mRNA (Jumaa und Nielsen, 1997; Mattox und Baker, 1991). Auch ein Mitglied der CLK-Familie, CLK1, zeigt dieses Prinzip der Autoregulation (Duncan *et al.*, 1997). Darüber hinaus wirkt diese inaktive Form der Kinase mutmaßlich als kompetitiver Inhibitor von Protein-Protein-Interaktionen (Duncan *et al.*, 1998). Eine solche antagonistische Funktion der kurzen Proteinformen von Cyclin L1 und Cyclin L2 ist eher

unwahrscheinlich, da sie nicht mit der Cyclin-abhängigen Kinase PITSLRE interagieren können (Berke *et al.*, 2001; Spelten und Becker, unveröffentlichte Daten).

4.1.4 Interaktion der Proteinkinase DYRK1A mit Cyclin L2

Cyclin L2 wurde in einer vorangegangenen Arbeit unseres Instituts als Interaktionspartner der Proteinkinase DYRK1A identifiziert (Hekerman, 1999). Bei dem identifizierten Klon der Expressionsbibliothek handelte es sich um einen Partialklon des Proteins, dem die Cyclindomäne fehlt. Offensichtlich wird die Interaktion mit der Kinase durch die RS-Domäne von Cyclin L2 vermittelt. In dieser Arbeit wurde der für die Interaktion verantwortliche Abschnitt von DYRK1A bestimmt (Kap. 3.3.7). *Pulldown*-Experimente zeigen, dass die katalytische Domäne von DYRK1A ausreicht, um Cyclin L2 zu binden. Diese Interaktion wird aber deutlich gesteigert, wenn zusätzlich ein kurzer konservierter Abschnitt N-terminal der katalytischen Domäne enthalten ist. Dieser Abschnitt wird als *DYRK-Homology-Box* (*DH-Box*) bezeichnet und enthält eine große Anzahl von sauren Resten (Himpel *et al.*, 2001). Ein solcher Abschnitt von sauren Aminosäuren in direkter Nachbarschaft der katalytischen Domäne ist nicht nur für die DYRK-Familie bekannt, sondern auch für einige verwandte Kinasen, die an der Regulation von Spleißprozessen beteiligt sind (CLK Familie, PRP4; Becker und Joost, 1999). Es ist anzunehmen, dass ionische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen *DH-Box* und der positiv geladenen RS-Domäne eine Interaktion von DYRK1A mit Cyclin L2 begünstigen. Da DYRK1A auch in *Nuclear Speckles* lokalisiert ist (Álvarez *et al.*, 2003), ist eine Interaktion mit Cyclin L2 *in vivo* durchaus denkbar. Dies wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

In der Festphasen-Phosphorylierung der Expressionsbibliothek konnte Cyclin L2 als *in vitro*-Substrat von DYRK1A identifiziert werden (Kap. 3.1). Verglichen mit anderen RS-Domänen-Proteinen wurde Cyclin L2 besonders stark durch die Proteinkinase phosphoryliert (Kap. 3.2). Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die RS-Domäne nicht das alleinige Ziel einer Phosphorylierung durch DYRK1A ist. Dies wurde durch die Identifizierung von drei Phosphorylierungsstellen bestätigt, die sich alle außerhalb der RS-Domäne befinden (Kap. 3.3.8.1). Eine Phosphorylierung von Aminosäureresten der RS-Domäne kann allerdings nicht ausgeschlossen werden (siehe Kap. 3.3.8.1). Viele RS-Domänen-Proteine liegen *in vivo* phosphoryliert vor (Graveley, 2000). Diese Phosphorylierung scheint den Transport von SR-Proteinen aus *Nuclear Speckles* zu Orten mit aktiver Transkription und RNA-Prozessierung zu induzieren (Mermoud *et al.*, 1994; Misteli *et al.*, 1998; Lamond und Spector, 2003). Für die Phosphorylierung von RS-Domänen *in vivo* werden unter anderem die Mitglieder der CLK-Familie verantwortlich gemacht. Durch Überexpression einer aktiven Form der Kinase CLK/STY kommt es zu einem Efflux von Spleißfaktoren aus *Nuclear Speckles*, wohingegen eine

Kinase-inaktive Mutante die Akkumulation verschiedener *Speckles*-Komponenten verstärkt (Sacco-Bubulya und Spector, 2002). Eine Auflösung von *Nuclear Speckles* konnte auch durch die Überexpression aktiver DYRK1A induziert werden (Álvarez *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Cyclin L2 *in vivo* phosphoryliert vorliegt (Kap. 3.3.8.2). Eine zusätzliche Phosphorylierung durch CLK3, als Vertreter der CLK-Familie, konnte allerdings nicht beobachtet werden. Überexprimierte DYRK1A konnte in COS-7 Zellen die Menge an eingebautem Phosphat zwar nicht sichtbar steigern, führte aber zu einem *Shift* der Proteinbande von Cyclin L2 im Gel, wie sie für phosphorylierte Proteine oft beobachtet wird (Abb. 3.17). Ob die Phosphorylierung durch DYRK1A die Lokalisation von Cyclin L2 beeinflusst, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden.

4.2 SF3B1

Der Spleißfaktor SF3B1 (Synonym SAP155; Wang *et al.*, 1998a; Schmidt-Zachmann *et al.*, 1998) ist Bestandteil des Multi-Proteinkomplexes SF3B (Das *et al.*, 1999). Das Protein ist zum Zeitpunkt des Spleißens mit beiden Seiten der *Branch Point Sequence* in Kontakt und nimmt damit eine zentrale Rolle im aktiven Spleißosom ein (Gozani *et al.*, 1998). SF3B1 wurde in dieser Arbeit durch Festphasen-Phosphorylierung der Expressionsbibliothek als *in vitro* -Substrat von DYRK1A identifiziert (Kap. 3.1).

4.2.1 Phosphorylierung durch die Proteinkinase CDK2

Die Phosphorylierung von SF3B1 während des Spleißprozesses findet mit der gleichen Kinetik statt wie der Spleißprozess selbst (Wang *et al.*, 1998a). Aufgrund der zentralen Position von SF3B1 im aktiven Spleißosom (Gozani *et al.*, 1998) wird dieser Phosphorylierung eine hohe Bedeutung für die Katalyse der Reaktion zugesprochen (Wang *et al.*, 1998a). Dementsprechend ist es von besonderem Interesse, die dafür verantwortliche Kinase zu identifizieren.

Für die Proteinkinase CDK2 in Kombination mit der regulatorischen Untereinheit Cyclin E konnte gezeigt werden, dass sie SF3B1 *in vitro* phosphoryliert (Seghezzi *et al.*, 1998). Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Kap. 3.4.2.1). Darüber hinaus besitzt CDK2/Cyclin E eine sehr hohe Affinität zu dem Substrat (Kap. 3.4.2.2). Das Phosphopeptid-Muster des in lebenden Zellen phosphorylierten SF3B1 zeigt jedoch keine Übereinstimmungen mit dem Phosphopeptid-Muster, das nach CDK2-Phosphorylierung erhalten wird (Kap. 3.4.2.3). Die hier detektierte *in vivo*-Phosphorylierung stellt allerdings eine Mischung aus verschiedenen Zellstadien dar. Es ist also denkbar, dass SF3B1 an einer bestimmten Stelle im Zellzyklus durch CDK2

phosphoryliert wird, dass aber die Phosphorylierungen durch andere Kinasen zu anderen Zeitpunkten diese Phosphorylierung überdecken.

In Immunkomplexen, die mit einem Cyclin E Antikörper durchgeführt wurden, konnte ein Großteil der gebundenen Kinaseaktivität, die SF3B1 phosphoryliert, durch einen spezifischen CDK-Inhibitor blockiert werden (Seghezzi *et al.*, 1998). In Immunkomplexen, die mit einem SF3B1-Antikörper durchgeführt wurden, wurde jedoch nur ein kleiner Teil (< 30%) der gebundenen Kinaseaktivität durch diesen Inhibitor gehemmt. Dass der Großteil der SF3B1-Phosphorylierung nicht durch eine Cyclin-abhängige Kinase zustande kommt, wurde durch Boudrez und Kollegen (2002) bestätigt.

Eine Phosphorylierung von SF3B1 durch eine Cyclin-abhängige Kinase *in vivo* ist aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen denkbar, und CDK2/Cyclin E kommt aufgrund der hohen Affinität zu SF3B1 als möglicher Kandidat in Frage. Diese Phosphorylierung kann aber nur einen relativ kleinen Teil der Gesamt-Phosphorylierung von SF3B1 ausmachen, da sie in den hier durchgeführten Experimenten nicht detektiert wurde.

4.2.2 *In vivo*-Phosphorylierung

Es wurde gezeigt, dass viele Aminosäuren der N-terminalen Domäne von SF3B1 *in vivo* phosphoryliert sind (Kap. 3.4.2.3). Mehrere Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass ein Großteil dieser Phosphorylierung durch DYRK1A katalysiert wird. Die Haupt-Phosphorylierungsstelle von DYRK1A *in vitro* ist Thr-434 (Abb. 3.24). Bei dieser Aminosäure handelt es sich um die zweitstärkste *in vivo*-Phosphorylierungsstelle der N-terminalen Domäne (Kap. 3.4.2.3). Durch Koexpression von aktiver DYRK1A in COS-7 Zellen stieg die Phosphorylierung von SF3B1 dosisabhängig an (Abb. 3.29). Dies konnte durch die verwandte Kinase CLK3 nicht erzielt werden (Abb. 3.31B). Lediglich DYRK1B, eine Kinase derselben Familie mit 85% Homologie zu DYRK1A in der katalytischen Domäne und im N-Terminus (Leder *et al.*, 1999), bewirkte ebenfalls einen deutlichen, wenn auch schwächeren Anstieg der Phosphorylierung (Abb. 3.32). Eine Reduktion von DYRK1A in COS-7 Zellen durch RNA-*Interference* reduzierte die Phosphorylierung von SF3B1 (Kap. 3.4.6). Es ist anzunehmen, dass SF3B1 *in vivo* direkt durch DYRK1A phosphoryliert wird, da die Kinase die *in vivo* phosphorylierten Aminosäuren mit hoher Affinität *in vitro* phosphoryliert.

Die durch Überexpression von DYRK1A beobachtete Verstärkung der SF3B1-Phosphorylierung betrifft fast ausschließlich Aminosäuren, die *in vivo* bereits deutlich phosphoryliert sind (Kap. 3.4.5.5). Demnach wird höchstwahrscheinlich der Großteil der

beobachteten *in vivo*-Phosphorylierung durch endogene DYRK1A verursacht. Es konnte allerdings *in vivo* das Phosphopeptid P0 (Abb. 3.26; Abb. 3.33) detektiert werden, das die am stärksten phosphorylierte(n) Aminosäure(n) enthält. Die Phosphorylierung dieses Peptids wurde nicht durch DYRK1A-Überexpression in COS-7 Zellen verstärkt und wurde auch nicht nach *in vitro*-Phosphorylierung durch die Kinase beobachtet. Demnach muss eine weitere Kinase an der *in vivo*-Phosphorylierung von SF3B1 beteiligt sein. Bei dieser Kinase kann es sich aber nicht um CDK2 handeln, da in Phosphopeptid-Karten von SF3B1 nach Phosphorylierung mit der Kinase kein solches Phosphopeptid detektiert wurde (Kap. 4.2.1).

Die durch DYRK1A erzielte Phosphorylierung könnte während des Spleißprozesses stattfinden. DYRK1A ist in der Zelle in *Nuclear Speckles* lokalisiert (Álvarez *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 1998) und damit am selben Ort wie SAP155 (Eilbracht und Schmidt-Zachmann, 2001). Die während des Spleißprozesses phosphorylierten Aminosäuren von SF3B1 sind bislang nicht bekannt, so dass hier keine Aussagen über mögliche Übereinstimmungen getroffen werden können. Eine funktionelle Bedeutung für die SF3B1-Phosphorylierung könnte eine veränderte Protein-Protein-Interaktion sein, die den Spleißprozess dirigiert (Wang *et al.*, 1998a). Für den Spleißfaktor NIPP1 konnte bereits gezeigt werden, dass eine Interaktion nur mit phosphoryliertem SF3B1 erfolgt. (Boudrez *et al.*, 2002). Ob für diese Interaktion die Phosphorylierung von Thr-434 oder anderen durch DYRK1A phosphorylierten Aminosäuren notwendig ist, wurde bislang nicht untersucht.

4.2.3 Identifizierung einer neuartigen Phosphorylierungs-Zielsequenz von DYRK1A

DYRK1A phosphoryliert SF3B1 mit hoher Affinität. Es konnte für die Phosphorylierung zweier unterschiedlicher Konstrukte von SF3B1 jeweils ein K_m -Wert im mikromolaren Bereich ermittelt werden ($2.16 \mu\text{M} \pm 1.72 \mu\text{M}$ (SEM), Kap. 3.4.1.1; $2.75 \mu\text{M}$, Kap. 3.4.2.2). Als Haupt-Phosphorylierungsstelle von DYRK1A wurde der Threonin-Rest an Position 434 identifiziert (Kap. 3.4.3). Das phosphorylierte Threonin liegt in einem Aminosäurekontext, der von bisher bekannten, notwendigen Kriterien einer DYRK1A-Phosphorylierung abweicht. Diese Konsensussequenz für DYRK1A wurde durch Phosphorylierung einer Peptid-Bibliothek erstellt (Himpel *et al.*, 2000). In diesem Experiment wurden Peptidsubstrate von einer bekannten Phosphorylierungsstelle abgeleitet. Dabei wurde jede einzelne Position im Bereich der Phosphorylierung für jeden möglichen Aminosäureaustausch getestet, und so die Bedeutung von Aminosäuren an jeder Position bestimmt. Auf diese Weise konnte DYRK1A als *Proline directed Kinase* definiert werden, da ein Prolin in direkter C-terminaler Nachbarschaft zur Phosphorylierungsstelle für eine Phosphorylierung durch DYRK1A eine besonders

wichtige Rolle spielt. Die Bedeutung dieses Prolin-Restes wurde auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Woods *et al.*, 2001b; Campbell und Proud, 2002). Die Phosphorylierungsstellen von Cyclin L2 und SF3B1, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, sind alle C-terminal von einem Prolin flankiert.

Die Phosphorylierung der Peptid-Bibliothek (Himpel *et al.*, 2000) und Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Woods *et al.*, 2001b; Campbell und Proud, 2002) zeigten, dass eine weitere Voraussetzung für eine Phosphorylierung durch DYRK1A ein Arginin-Rest N-terminal der Phosphorylierungsstelle an den Positionen P-2 oder P-3 ist. Campbell und Proud (2002) messen diesem Arginin-Rest eine so große Bedeutung zu, dass sie DYRK1A sogar als *Arginine directed Kinase* bezeichneten. Die hier identifizierte Phosphorylierungsstelle Thr-273 in SF3B1 entspricht der bekannten Konsensussequenz (GRGDT₂₇₃P, Kap. 3.4.3). Alle anderen identifizierten Phosphorylierungsstellen in SF3B1 (Thr-434, Kap. 3.4.3) und in Cyclin L2 (Ser-330, Ser-338, Ser-369, Kap. 3.3.8.1) enthalten erstaunlicherweise keinen Arginin-Rest oder anderen basischen Rest an entsprechender Position. Obwohl Thr-434 der bekannten Konsensussequenz nicht entspricht, konnte es als hochaffine Phosphorylierungsstelle nachgewiesen werden. Ein von der Phosphorylierungsstelle abgeleitetes Peptid (SAPtide: ARKLTAT₄₃₄PTPLGG) ließ sich ähnlich gut phosphorylieren (K_m -Wert ca. 45 μ M, Kap. 3.4.3.4) wie das Peptid DYRKtide, das der Konsensussequenz genau entspricht (ca. 35 μ M, Himpel *et al.*, 2000). Dies bedeutet, dass Thr-434 auch unabhängig von der Tertiärstruktur des Proteins in einem Peptid eine hochaffine Phosphorylierungsstelle darstellt. Da neben dem Dipeptid Thr₄₃₄-Pro₄₃₅ noch 28 weitere Thr-Pro-Dipeptide in der N-terminalen Domäne von SF3B1 vorkommen (Abb. 3.27), muss diese hochaffine Phosphorylierung durch einen speziellen Aminosäurekontext verursacht werden. Dieser Aminosäurekontext stellt somit eine neuartige, Arginin-unabhängige Zielsequenz für DYRK1A dar. Da dieser Aminosäurekontext keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten mit den phosphorylierten Aminosäuren in Cyclin L2 aufweist, kann nur eine experimentelle Untersuchung die Kriterien dieser neuen Zielsequenz aufklären.

In den letzten Jahren wurden einige Substrate von DYRK1A identifiziert (Tab. 1.1). Die meisten identifizierten Phosphorylierungsstellen entsprechen der bekannten Konsensussequenz für DYRK1A. Die phosphorylierten Aminosäuren sind C-terminal von einem Prolin flankiert, und an den Positionen P-2 oder P-3 befindet sich ein Arginin-Rest (FKHR, MBP, eIF2B ϵ , Tau, Tab. 1.2). Darüber hinaus wurden zwei Substrate identifiziert, die diesen Kriterien nicht entsprechen. Der Transkriptionsfaktor STAT3 enthält zwar einen Prolin-Rest an Position P+1, aber keine Arginine N-terminal der Phosphorylierungsstelle. Da STAT3 auch *in vivo* durch DYRK1A phosphorylierbar ist

(Matsuo *et al.*, 2000), scheint es sich hierbei um eine weitere Arginin-unabhängige Zielsequenz zu handeln. Die identifizierte Phosphorylierungsstelle des Transkriptionsfaktors CREB1 (RRPS₁₃₃VRK, Yang *et al.*, 2001; Tab. 1.2) ist die einzige Phosphorylierungsstelle ohne einen C-terminal gelegenen Prolin-Rest. Yang und Kollegen haben allerdings keine direkte Phosphorylierung durch DYRK1A nachgewiesen, und Daten unserer Arbeitsgruppe und von Li und Kollegen (2002) sprechen dafür, dass CREB kein Substrat von DYRK1A ist. Demnach kommen die beobachteten Effekte wohl eher dadurch zu Stande, dass DYRK1A *in vivo* eine Kinase phosphoryliert, die wiederum CREB phosphoryliert. Die Qualität der genannten Substrate wurde nicht näher untersucht, so dass keine Vergleiche der Phosphorylierungsstellen gezogen werden können.

Die bekannte Konsensussequenz für DYRK1A scheint in vielen Fällen gültig zu sein. Dafür sprechen die in den letzten Jahren identifizierten Substrate, das Peptid DYRKtide (Tab. 1.2) und die hier identifizierte Phosphorylierungsstelle Thr-273 in SF3B1. Daneben scheint es noch andere Zielstellen für die Kinase zu geben (Ser-727 in STAT3; Thr-434 in SF3B1; Ser-330, Ser-338, Ser-369 in Cyclin L2), bei denen andere noch unbekannte Sequenzkriterien eine Rolle spielen. Die weitere Identifizierung von Substraten und die Phosphorylierung von Peptid-Bibliotheken werden neue Erkenntnisse über solche Kriterien liefern.

4.3 Über welche Effektoren wird die Funktion von DYRK1A vermittelt?

DYRK1A wird eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung zugeschrieben. Über welche Effektoren die Kinase diese Rolle auf molekularer Ebene ausübt, ist bislang nicht bekannt. In letzter Zeit wurden einige Interaktionspartner und/oder Substrate der Kinase identifiziert (Tab. 1.1). Dabei handelte es sich in den meisten Fällen um Transkriptionsfaktoren, so dass DYRK1A auf molekularer Ebene als Regulator der mRNA-Transkription vermutet werden kann (Galceran *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnten bekannte Spleißfaktoren (SF3B1, SWAP2, SFRS5, SFRS4, TRA2 β 1 und SF2) und ein mutmaßlicher Spleißfaktor (Cyclin L2) als *in vitro*-Substrate der Kinase identifiziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SF3B1 als *in vivo*-Substrat der Kinase fungieren kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass DYRK1A an der Regulation von Spleißprozessen beteiligt ist. Ein zusätzlicher Hinweis ist die Interaktion von DYRK1A mit verschiedenen Spleißfaktoren (Hekerman, 1999; Kap. 3.3.7). Die Möglichkeit einer Beteiligung von DYRK1A an Spleißprozessen wird unterstützt durch die Lokalisation der Kinase in *Nuclear Speckles* (Álvarez *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 1998). Es ist denkbar, dass durch die Phosphorylierung von Spleißfaktoren alternatives und/oder konstitutives

Spleißen reguliert wird, da eine Überexpression der Kinase eine Umverteilung von Spleißfaktoren zur Folge hat (Álvarez *et al.*, 2003). Ein weiterer Hinweis ist, dass nah verwandte Proteinkinasen wie PRP4 und Mitglieder der CLK- und SRPK-Familie an der Regulation von Spleißprozessen beteiligt sind (Dellaire *et al.*, 2002; Graveley, 2000; Abb. 1.1).

Es ist auch nicht auszuschließen, dass DYRK1A seine Funktion sowohl über Transkriptionsfaktoren als auch über Spleißfaktoren ausüben kann, da beide Prozesse in der Zelle sehr eng verknüpft zu sein scheinen (Hirose und Manley, 2000). Trotz dieser Erkenntnisse ist die Rolle von DYRK1A in zellulären Prozessen noch lange nicht hinreichend geklärt, und die Identifizierung weiterer Substrate und Interaktionspartner wird Aufschluss darüber geben, an welchen zellulären Prozessen DYRK1A maßgeblich beteiligt ist.

4.4 Eine neue Methode zur Identifizierung von Substraten

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode entwickelt, um Substrate der Kinase DYRK1A zu identifizieren. Eine cDNA-Expressionsbibliothek, die in definierten Positionen auf einer Filtermembran aufgebracht worden war, wurde mit DYRK1A phosphoryliert. 31 Expressionsklone, die auf der Membran starke Signale erzeugten, wurden sequenziert, und die exprimierten Fusionsproteine konnten als *in vitro*-Substrate der Proteinkinase bestätigt werden.

Ein identischer Filter wurde in einer vorangegangenen Arbeit unseres Instituts bereits für die Identifizierung von Interaktionspartnern von DYRK1A verwendet (Hekerman, 1999). Durch den Vergleich der Ergebnisse konnten Proteine identifiziert werden, die sowohl durch DYRK1A phosphoryliert werden als auch mit der Kinase interagieren (Cyclin L2, SRP75). Es wurden aber auch Substrate identifiziert, die im Interaktions-Assay nicht detektiert werden konnten (Tab. 3.2, mit Ausnahme von Cyclin L2 und SRp75). Dies zeigt, dass Substrate oft nur temporär in dem kurzen Zeitraum der Phosphorylierung mit der Kinase interagieren und so nicht in Interaktions-Assays detektiert werden können. Dennoch wurden in der Vergangenheit mit Methoden wie dem *Yeast-Two-Hybrid* Verfahren (McLaughlin *et al.*, 1996; Airhart *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 1992) oder durch Interaktions-Assays mit Phagen-Expressionsbibliotheken (Zhao *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2002) erfolgreich Substrate identifiziert. Eine mögliche Strategie, um eine Kinase-Substrat-Interaktion zu stabilisieren, ist die Verwendung von Kinase-negativen Mutanten (Zhou *et al.*, 1995). Es wird angenommen, dass Kinasen ihr Substrat fester binden, wenn sie es nicht mehr phosphorylieren können. Eine Kinase-negative Mutante wurde allerdings auch im oben erwähnten Interaktions-Assay mit der

Expressionsbibliothek verwendet. Diese Methode führte jedoch nicht zur Identifizierung der durch Festphasen-Phosphorylierung detektierten Substrate.

Andere Methoden zielen darauf ab, durch Phosphorylierung von Peptid-Bibliotheken die Konsensussequenz einer Phosphorylierungsstelle zu bestimmen, um damit Datenbanken nach potentiellen Substraten zu durchsuchen (O'Neill *et al.*, 2002). Bei dieser Methode wird allerdings die tertiäre Struktur des Substrates nicht berücksichtigt, die für die Substraterkennung und die Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstelle entscheidend sein kann. Auch in der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konsensussequenz alleine nicht immer für eine Phosphorylierung ausreicht (T303, Kap. 3.4.3). Solche Datenbanksuchen sind eher erfolgreich, wenn neben der Konsensussequenz der Phosphorylierungsstelle weitere Motive im Substrat berücksichtigt werden (Hall *et al.*, 2001).

Eine direktere Methode zur Identifizierung von Substraten, die die tertiäre Struktur der Proteine berücksichtigt, ist von Knebel und Kollegen (2001) angewandt worden. Sie phosphorylierten Zellextrakte, isolierten die phosphorylierten Proteine und identifizierten sie durch massenspektrometrische Analysen. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass der Pool an möglichen Substraten aus tatsächlich existierenden Proteinen besteht. In der hier verwendeten cDNA-Bibliothek wurden sehr viele Klonierungs-Artefakte (Fusionen im falschen Leseraster, Expression ribosomaler RNA) gefunden. Andererseits müssen die phosphorylierten Proteine aus den Zelllysaten erst isoliert, massenspektrometrisch sequenziert und anschließend kloniert werden. Diese arbeitsaufwendigen Schritte sind bei der Verwendung einer Expressionsbibliothek nicht nötig.

Eine Methode, die der hier vorgestellten sehr ähnlich ist, wurde von Fukunaga und Hunter (1997) entwickelt. Sie infizierten *E. coli*-Zellen mit einer λ -Expressionsbibliothek und plattierten sie auf Agarplatten aus. Nach Induktion der Proteinexpression transferierten sie die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen und verwendeten die Membranen für eine Festphasen-Phosphorylierung. Auf den ersten Blick wurden so mehr Proteine untersucht (3×10^5) als auf dem hier verwendeten Bibliotheksfilter vorhanden waren (37 830). Allerdings bestand die ursprüngliche Bibliothek, die für den Expressionsfilter verwendet wurde, aus 2×10^5 Klonen. Die Reduktion kam dadurch zustande, dass die Bibliothek für Proteine angereichert wurde, die im richtigen Leseraster fusioniert sind (66% der cDNA-Fusionen im richtigen Leseraster: Büssow *et al.*, 1998, 2000). Diese Anreicherung konnte in dem Interaktions-Assay des Bibliotheksfilters bestätigt werden (74% im richtigen Leseraster; Hekerman, 1999). Allerdings wurden in der Festphasen-Phosphorylierung nur 19% korrekt fusionierte cDNAs identifiziert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Phosphorylierung

meist nur einen kurzen Konsensusabschnitt benötigt, der zufällig in falschen Leserastern entstehen kann. Zusätzlich führen Fusionen im falschen Leseraster oft zu kurzen Peptiden, die dann in den Bakterien in einer großen Anzahl produziert werden können und dementsprechend zu starken Signalen auf dem Bibliotheksfilter führen. Die zufällige Entstehung von komplexen Strukturen, wie sie für Interaktionen nötig sind, ist eher unwahrscheinlich.

Letztendlich wäre das ideale Werkzeug zur Identifizierung von Interaktionspartnern und Substraten ein Bibliotheksfilter mit bereits sequenzierten Expressionsklonen, deren cDNAs im richtigen Leseraster fusioniert sind.

5. Zusammenfassung

Der Proteinkinase DYRK1A wird eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems zugesprochen. Das Gen ist in der Down-Syndrom-kritischen Region lokalisiert, die durch Untersuchungen von Patienten mit partieller Trisomie 21 definiert wurde. Obwohl in den letzten Jahren einige Substrate der Kinase identifiziert werden konnten, ist bislang nicht hinreichend bekannt, wie die Funktion von DYRK1A auf molekularer Ebene vermittelt wird. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung weiterer Substrate von DYRK1A, um Erkenntnisse über die zellulären Funktionen der Kinase zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurde eine neue Methode für die Substrat-Identifizierung entwickelt.

Eine cDNA Expressionsbibliothek, die auf einem Filter-Array aufgebracht war, wurde mit DYRK1A radioaktiv phosphoryliert. Neben vielen Fusionsartefakten, wie zum Beispiel Fusionen im falschen Leseraster, wurden acht Klone als Substrate identifiziert, die bekannte oder hypothetische Proteine exprimieren. Es handelte sich dabei um zwei Proteine unbekannter Funktion, den Transkriptionsfaktor MAFF und fünf Proteine, die nachgewiesenermaßen oder mutmaßlich an Spleißprozessen beteiligt sind (SFRS4, SFRS5, SWAP2, SF3B1, Cyclin L2). Zwei der identifizierten Substrate, Cyclin L2 und SF3B1, wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Cyclin L2, ein bislang nicht näher beschriebenes Protein, wurde in dieser Arbeit ausführlich charakterisiert. Es besitzt die interessante Kombination einer Cyclindomäne und einer Arginin-Serin-reichen (RS)-Domäne, die für Cyclin L2 und das nächstverwandte Protein Cyclin L1 einzigartig ist. Die hohe Ähnlichkeit der Cyclindomäne zu Cyclin K und Cyclin T1/T2 lässt eine Funktion in Transkriptionsprozessen oder RNA-Prozessierung vermuten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die RS-Domäne eine Interaktion mit dem RS-Domänen-haltigen Spleißfaktor ASF und die Lokalisation von Cyclin L2 in *Nuclear Speckles* vermittelt, die als Aufbewahrungsorte für Spleißfaktoren gelten. Es existieren drei alternativ gespleißte Transkripte (T1-T3) des Cyclin L2-Gens. Die Spleißvariante T2 kodiert für das komplette Protein mit vollständiger Cyclin- und RS-Domäne. Durch die Herstellung eines spezifischen Antikörpers konnte diese Proteinform in Maushoden nachgewiesen werden. Die Spleißvarianten T1 und T3 kodieren für eine verkürzte Version des Proteins, Cyclin L2^s, in dem die RS-Domäne und ein Teil der Cyclindomäne fehlen. Auch für Cyclin L1 existieren ähnliche Spleißvarianten, die analog zu Cyclin L2 das komplette und verkürzte Protein kodieren. *Northern-Blot*-Analysen zeigen, dass die Expression der Transkripte beider Proteinformen je nach Gewebe unterschiedlich stark ist und im Falle von Cyclin L1 durch extrazelluläre Signale differentiell reguliert wird. Die Aminosäuren Ser-330, Ser-338 und Ser-369 von Cyclin L2 wurden als

in vitro-Phosphorylierungsstellen von DYRK1A identifiziert. Die Überexpression von DYRK1A in COS-7 Zellen führte zu einer Vergrößerung des apparenten Molekulargewichts von Cyclin L2 im Gel und bestätigt eine Phosphorylierung durch die Kinase *in vivo*. Welche Funktion Cyclin L2 im Kern hat, und ob diese durch Phosphorylierung durch DYRK1A beeinflusst wird, werden weitere Versuche zeigen.

SF3B1 ist zentraler Bestandteil des Spleißosoms und wird während des Spleißprozesses phosphoryliert. Als mögliche verantwortliche Kinase gilt CDK2 in Kombination mit der regulatorischen Untereinheit Cyclin E. In dieser Arbeit wurde SF3B1 durch kinetische Analysen als ein hoch affines Substrat der Kinasen DYRK1A ($K_m \approx 2.75 \mu\text{M}$) und CDK2/Cyclin E ($K_m \approx 3.51 \mu\text{M}$) nachgewiesen. Mit einem phosphospezifischen Antikörper wurde gezeigt, dass die Überexpression von DYRK1A in COS-7 Zellen zu einer verstärkten Phosphorylierung von GFP-SF3B1 führt. Eine durch RNA-*Interference* verminderte Expression von endogener DYRK1A führte zu einer reduzierten Phosphorylierung des Proteins. Die Herstellung von Phosphopeptid-Karten zeigt, dass es sich bei mindestens fünf der durch DYRK1A phosphorylierten Aminosäuren um *in vivo*-Phosphorylierungsstellen handelt. Bei der Phosphorylierung von SF3B1 durch CDK2/Cyclin E konnte keine Übereinstimmung mit endogenen Phosphorylierungsstellen detektiert werden. Eine der *in vivo* phosphorylierten Aminosäuren wurde als Thr-434 identifiziert. Bei diesem Aminosäurerest handelt es sich um die Haupt-Phosphorylierungsstelle von DYRK1A *in vitro*. Die in COS-7 Zellen detektierte Phosphorylierung erfolgt nach den Ergebnissen dieser Arbeit hauptsächlich durch DYRK1A. Somit ist die Kinase ein aussichtsreicher Kandidat für die regulatorische Phosphorylierung von SF3B1 bei Spleißprozessen.

Bei den in früheren Arbeiten identifizierten Substraten handelte es sich hauptsächlich um Transkriptionsfaktoren. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eher eine Rolle von DYRK1A in Spleißprozessen vermuten. Da Transkription und Spleißen nach bisherigen Kenntnissen *in vivo* in einem großen übergeordneten Komplex stattfinden, ist eine Rolle der Kinase bei der Koordination beider Prozesse denkbar.

6. Anhang

6.1 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CHX	Cycloheximid
cpm	<i>Counts per Minute</i>
dATP	2`-Desoxyadenosin-5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxycytidin-5`-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2`-Desoxyguanosin-5`-triphosphat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2`-Desoxythymidin-5`-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FCS	foetales Kälberserum
for	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung (9.806 m/s ²)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
<i>HUGO</i>	<i>Human Genome Organisation</i>
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
Mb	Megabase(n)

MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
min	Minute(n)
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
Mr	Molekulargewicht
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
Na	Natrium
NLS	Kern-Lokalisationssignal
nm	Nanometer
NRS	<i>non reacting Serum</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rotations per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde(n)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
Ser	Serin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Thr	Threonin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tyr	Tyrosin
U	<i>Units</i>
UTR	<i>untranslated Region</i>
Vol	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp

6.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1:	Die CMGC-Gruppe der Proteinkinasen.....	1
Abb. 1.2:	Der strukturelle Aufbau der Proteinkinase DYRK1A.....	3
Abb. 2.1:	Konstruktion von pQE-SF3B1 Δ	20
Abb. 2.2:	Konstruktion von pET-SF3B1NT.....	21
Abb. 2.3:	Konstruktion von pET-SF3B1/401-511	22
Abb. 2.4:	Konstruktion von pQE-CCNL2 Δ N	23
Abb. 2.5:	Konstruktion von pEGFP-SF3B1NT	24
Abb. 2.6:	Konstruktion von pEGFP-CCNL2 Δ N.....	24
Abb. 2.7:	Konstruktion von pEGFP-CCNL2	25
Abb. 2.8:	Konstruktion von pEGFP-CLK3	26
Abb. 3.1:	Festphasen-Phosphorylierung der Expressionsbibliothek durch DYRK1A	41
Abb. 3.2:	Festphasen-Phosphorylierung ausgewählter Klone der Expressionsbibliothek	42
Abb. 3.3:	Phosphorylierung Arginin-Serin-reicher Proteine durch DYRK1A <i>in vitro</i> ...	47
Abb. 3.4:	Vergleich der Proteinsequenz von Cyclin L2 mit Protein-Datenbanken	48
Abb. 3.5:	Vergleich der Proteinsequenzen von Cyclin L1 und Cyclin L2.....	50
Abb. 3.6:	Sequenzvergleich der Cyclindomänen von Cyclin L1 und Cyclin L2 mit den Cyclindomänen anderer Vertreter der Cyclin-Familie.	51
Abb. 3.7:	Genomische Organisation von CCNL2 und alternative Transkripte.....	52
Abb. 3.8:	<i>Northern-Blot</i> -Analyse der Spleißvarianten von Cyclin L2 und Cyclin L1....	54
Abb. 3.9:	<i>Northern-Blot</i> -Analyse der RNA aus Phoenix-Zellen mit Exon-spezifischen Sonden	55
Abb. 3.10:	<i>Primer</i> -Auswahl für die Amplifikation der CCNL2-Spleißvarianten durch RT-PCR	57
Abb. 3.11:	RT-PCR-Analyse der Spleißvarianten von CCNL2.....	57
Abb. 3.12:	Differentielle Regulation von CCNL1- und CCNL2-Transkripten	58
Abb. 3.13:	Nachweis von Cyclin L2 durch ein spezifisches Antiserum.....	60
Abb. 3.14:	Kolokalisation von Cyclin L2 und Cyclin L1 mit SC35 in <i>Nuclear Speckles</i>	61
Abb. 3.15:	Eingrenzung der Cyclin L2 bindenden Domäne von DYRK1A.....	63
Abb. 3.16:	Identifizierung der <i>in vitro</i> -Phosphorylierungsstellen von DYRK1A in Cyclin L2	64
Abb. 3.17:	<i>In vivo</i> -Phosphorylierung von Cyclin L2.....	65
Abb. 3.18:	K _m -Wert-Abschätzung durch Phosphorylierung von 1 μ M und 10 μ M His ₆ -SF3B1 Δ durch GST-DYRK1A Δ C	66
Abb. 3.19:	Vergleichende Phosphorylierung von SF3B1NT-His ₆ (AS 1 - 511) und His ₆ -SF3B1 Δ (AS 304 - 493) durch DYRK1A.....	68

Abb. 3.20: Vergleichende Phosphorylierung von SF3B1 und RB durch CDK2/Cyclin E	69
Abb. 3.21: K_m -Wert-Abschätzung der <i>in vitro</i> -Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A und CDK2	69
Abb. 3.22: Phosphopeptid-Karten von SF3B1 nach <i>in vitro</i> -Phosphorylierung durch DYRK1A bzw. CDK2/CyclinE und nach <i>in vivo</i> -Phosphorylierung in COS-7 Zellen	71
Abb. 3.23: Phosphorylierung eines Teilabschnitts (AS 401 - 511) von SF3B1 und von Punktmutanten möglicher Phosphorylierungsstellen.....	74
Abb. 3.24: Phosphopeptid-Karten des Teilkonstruktes SF3B1/401-511 und der Punktmutanten Thr-273A und Thr-434A	76
Abb. 3.25: Kinetik der Phosphorylierung von SAPtide durch DYRK1A	77
Abb. 3.26: Phosphopeptid-Karten der Mutanten T434A und T273A nach Phosphorylierung durch endogene Kinasen <i>in vivo</i>	79
Abb. 3.27: Thr-Pro-Dipeptide in der N-terminalen Domäne von SF3B1	80
Abb. 3.28: Detektion der <i>in vitro</i> -Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A mit dem Antikörper anti pTP	81
Abb. 3.29: Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1A in COS-7 Zellen.....	82
Abb. 3.30: Die Kinaseaktivität von DYRK1A wird durch Lyse der COS-7 Zellen unter denaturierenden Bedingungen zerstört.....	83
Abb. 3.31: <i>In vivo</i> -Phosphorylierung von SF3B1 durch DYRK1AK188R und CLK3....	84
Abb. 3.32: Phosphorylierung von SF3B1 durch Mitglieder der DYRK-Familie in COS-7 Zellen	85
Abb. 3.33: Phosphopeptid-Karten von SF3B1 nach endogener Phosphorylierung und nach Phosphorylierung durch überexprimierte DYRK1A	86
Abb. 3.34: <i>Down</i> -Regulation von DYRK1A durch RNA- <i>Interference</i> und Auswirkungen auf die SF3B1-Phosphorylierung.....	88
Abb. 4.1: Stammbaum einiger Mitglieder der Cyclin-Familie.....	90

6.3 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.1: Substrate und Bindungspartner der Proteinkinase DYRK1A	5
Tab. 1.2: Bekannte Zielsequenzen der DYRK1A-Phosphorylierung	7
Tab. 2.1: <i>Primer</i> -Liste.....	15
Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Zelllinien	28
Tab. 3.1: Charakterisierung von 32 ausgesuchten Klonen.....	44
Tab. 3.2: cDNA-Klone bekannter oder hypothetischer Proteine.....	45

7. Literatur

- Airhart, N., Yang, Y.F., Roberts, C.T.Jr., Silberbach, M. (2003). Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction. *J. Biol. Chem.* 278, 38693-38698
- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Martí, E., Visa, J., Guimerà, J., Oset, M., González, J.R., Flórez, J., Fillat, C., Estivill, X. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing *Dyrk1A* (*minibrain*), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1915-1923
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402
- Álvarez, M., Estivill, X., de la Luna, S. (2003). DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *J. Cell Sci.* 116, 3099-3107
- Andersen, G., Busso, D., Poterszman, A., Hwang, J.R., Wurtz, J.M., Ripp, R., Thierry, J.C., Egly, J.M., Moras, D. (1997). The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features. *EMBO J.* 16, 958-967
- Bähler, J., Pringle, J.R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.* 12, 1356-1370
- Bahrenberg, G., Brauers, A., Joost, H.G., Jakse, G. (2001). PSCA expression is regulated by phorbol ester and cell adhesion in the bladder carcinoma cell line RT112. *Cancer Lett.* 168, 37-43
- Bairoch, A. (1992). PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res.* 20, 2013-2018
- Beaudoing, E., Freier, S., Wyatt, J.R., Claverie, J.M., Gautheret, D. (2000). Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* 10, 1001-1010
- Becker, W., Joost, H.G. (1999). Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62, 1-17

-
- Becker, W., Kentrup, H., Heukelbach, J., Joost, H.G. (1996). cDNA cloning and characterization of rat Clk3, a LAMMER kinase predominately expressed in testis. *Biochim. Biophys. Acta* 1312, 63-67
- Becker, W., Weber, Y., Wetzel, K., Eirnbter, K., Tejedor, F.J., Joost, H.G. (1998). Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273, 25893-25902
- Beil, B., Screaton, G., Stamm, S. (1997). Molecular cloning of htra2-beta-1 and htra2-beta-2, two human homologs of tra-2 generated by alternative splicing. *DNA Cell Biol.* 16, 679-690
- Berke, J.D., Sgambato, V., Zhu, P.P., Lavoie, B., Vincent, M., Krause, M., Hyman, S.E. (2001). Dopamine and glutamate induce distinct striatal splice forms of Ania-6, an RNA polymerase II-associated cyclin. *Neuron* 32, 277-287
- Blencowe, B.J., Bowman, J.A., McCracken, S., Rosonina, E. (1999). SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. *Biochem. Cell Biol.* 77, 277-291
- Boudrez, A., Beullens, M., Waelkens, E., Stalmans, W., Bollen, M. (2002). Phosphorylation-dependent interaction between the splicing factors SAP155 and NIPP1. *J. Biol. Chem.* 277, 31834-31841
- Büssow, K., Cahill, D., Nietfeld, W., Bancroft, D., Scherzinger, E., Lehrach, H., Walter, G. (1998). A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res.* 26, 5007-5008
- Büssow, K., Nordhoff, E., Lubbert, C., Lehrach, H., Walter, G. (2000). A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* 65, 1-8
- Campbell, L.E., Proud, C.G. (2002). Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases. *FEBS Lett.* 510, 31-36
- Chen, Z., Indjeian, V.B., McManus, M., Wang, L., Dynlacht, B.D. (2002). CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. *Dev. Cell* 3, 339-350
- Chen-Hwang, M.C., Chen, H.R., Elzinga, M., Hwang, Y.W. (2002). Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *J. Biol. Chem.* 277, 17597-17604

-
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159
- Cohen, P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 309-315
- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J.L., Bell, J.C., Duncan, P.I. (1996). The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J.* 15, 265-275
- Das, B.K., Xia, L., Palandjian, L., Gozani, O., Chyung, Y., Reed, R. (1999). Characterization of a protein complex containing spliceosomal proteins SAPs 49, 130, 145, and 155. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6796-6802
- Dauwalder, B., Amaya-Manzanares, F., Mattox, W. (1996). A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor *transformer-2* has conserved splicing regulatory functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9004-9009
- De Luca, A., De Falco, M., Baldi, A., Paggi, M.G. (2003). Cyclin T: three forms for different roles in physiological and pathological functions. *J. Cell. Physiol.* 194, 101-107
- de Wit, N.J., Burtscher, H.J., Weidle, U.H., Ruiter, D.J., van Muijen, G.N. (2002). Differentially expressed genes identified in human melanoma cell lines with different metastatic behaviour using high density oligonucleotide arrays. *Melanoma Res.* 12, 57-69
- Delabar, J.M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J.L., Prieur, M., Noel, B., Sinet, P.M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur. J. Hum. Genet.* 1, 114-124
- Dellaire, G., Makarov, E.M., Cowger, J.J., Longman, D., Sutherland, H.G., Lührmann, R., Torchia, J., Bickmore, W.A. (2002). Mammalian PRP4 kinase copurifies and interacts with components of both the U5 snRNP and the N-CoR deacetylase complexes. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5141-5156
- Denhez, F., Lafyatis, R. (1994). Conservation of regulated alternative splicing and identification of functional domains in vertebrate homologs to the *Drosophila* splicing regulator, *Suppressor-of-white-apricot*. *J. Biol. Chem.* 269, 16170 - 16179
- Dickinson, L.A., Edgar, A.J., Ehley, J., Gottesfeld, J.M. (2002). Cyclin L is an RS domain protein involved in pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 277, 25465-25473

-
- Dingwall, C., Laskey, R.A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? Trends Biochem. Sci. 16, 478-481
- Duncan, P.I., Stojdl, D.F., Marius, R.M., Bell, J.C. (1997). *In vivo* regulation of alternative pre-mRNA splicing by the Clk1 protein kinase. Mol. Cell. Biol. 17, 5996-6001
- Duncan, P.I., Stojdl, D.F., Marius, R.M., Scheit, K.H., Bell, J.C. (1998). The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing. Exp. Cell Res. 241, 300-308
- Eilbracht, J., Schmidt-Zachmann, M.S. (2001). Identification of a sequence element directing a protein to nuclear speckles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 3849-3854
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132, 6-13
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcántara, S., Martínez, S., Martí, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., Arbonés, M.L. (2002). *Dyrk1A* haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. Mol. Cell. Biol. 22, 6636-6647
- Fu, T.J., Peng, J., Lee, G., Price, D.H., Flores, O. (1999). Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. J. Biol. Chem. 274, 34527-34530
- Fu, X.D. (1995). The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. RNA 1, 663-680
- Fu, X.D., Maniatis, T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. Nature 343, 437-441
- Fukunaga, R., Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. EMBO J. 16, 1921-1933
- Galceran, J., de Graaf, K., Tejedor, F.J., Becker, W. (2003). The MNB/DYRK1A protein kinase: Genetic and Biochemical Properties. J. Neural Transm. Suppl., in press
- Garrett, S., Broach, J. (1989). Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. Genes Dev. 3, 1336-1348

-
- Ge, H., Zuo, P., Manley, J.L. (1991). Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators. *Cell* 66, 373-382
- Gozani, O., Potashkin, J., Reed, R. (1998). A potential role for U2AF-SAP 155 interactions in recruiting U2 snRNP to the branch site. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4752-4760
- Graham, F.L., van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467
- Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6, 1197-1211
- Guimerá, J., Casas, C., Pucharcòs, C., Solans, A., Domènech, A., Planas, A.M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., Pritchard, M.A. (1996). A human homologue of *Drosophila minibrain (MNB)* is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1305-1310
- Hall, C., Nelson, D.M., Ye, X., Baker, K., DeCaprio, J.A., Seeholzer, S., Lipinski, M., Adams, P.D. (2001). HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1854-1865
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580
- Hanks, S.K., Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576-596
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1-20
- Hekerman, P. (1999). Funktionelle Charakterisierung von Proteinkinasen der DYRK-Familie. Diplomarbeit, RWTH Aachen
- Herrmann, C.H., Mancini, M.A. (2001). The Cdk9 and cyclin T subunits of TAK/P-TEFb localize to splicing factor-rich nuclear speckle regions. *J. Cell Sci.* 114, 1491-1503
- Higgins, D.G., Bleasby, A.J., Fuchs, R. (1992). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 189-191

-
- Himpel, S., Panzer, P., Eirnbter, K., Czajkowska, H., Sayed, M., Packman, L.C., Blundell, T., Kentrup, H., Grötzinger, J., Joost, H.G., Becker, W. (2001) Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem. J.* 359, 497-505
- Himpel, S., Tegge, W., Frank, R., Leder, S., Joost, H.G., Becker, W. (2000) Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J. Biol. Chem.* 275, 2431-2438
- Hirose, Y., Manley, J.L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* 14, 1415-1429
- Hodgson, C.P., Fisk, R.Z. (1987). Hybridization probe size control: optimized 'oligolabelling'. *Nucleic Acids Res.* 15, 6295
- Hu, D., Mayeda, A., Trembley, J.H., Lahti, J.M., Kidd, V.J. (2003) CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 278, 8623-8629
- Johnson, K.W., Smith, K.A. (1991). Molecular cloning of a novel human cdc2/CDC28-like protein kinase. *J. Biol. Chem.* 266, 3402-3407
- Jumaa, H., Nielsen, P.J. (1997). The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO J.* 16, 5077-5085
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schürmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., Joost, H.G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J. Biol. Chem.* 271, 3488-3495
- Knebel, A., Morrice, N., Cohen, P. (2001). A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38delta. *EMBO J.* 20, 4360-4369
- Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 417-425
- Ko, T.K., Kelly, E., Pines, J. (2001). CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles. *J. Cell Sci.* 114, 2591-2603
- Lamond, A.I., Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 605-612

-
- Leder, S., Czajkowska, H., Maenz, B., de Graaf, K., Barthel, A., Joost, H.G., Becker, W. (2003). Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties. *Biochem. J.* 372, 881-888
- Leder, S., Weber, Y., Altafaj, X., Estivill, X., Joost, H.G., Becker, W. (1999). Cloning and characterization of DYRK1B, a novel member of the DYRK family of protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 474-479
- Levy, D.E., Lee, C. (2002). What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* 109, 1143 - 1148
- Li, K., Zhao, S., Karur, V., Wojchowski, D.M. (2002). DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival. *J. Biol. Chem.* 277, 47052-47060
- Lonze, B.E., Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934
- Mao, J., Maye, P., Kogerman, P., Tejedor, F.J., Toftgard, R., Xie, W., Wu, G., Wu, D. (2002). Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J. Biol. Chem.* 277, 35156-35161
- Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185
- Matsuo, R., Ochiai, W., Nakashima, K., Taga, T. (2001). A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody. *J. Immunol. Methods* 247, 141-151
- Mattox, W., Baker, B.S. (1991). Autoregulation of the splicing of transcripts from the transformer-2 gene of *Drosophila*. *Genes Dev.* 5, 786-796
- McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., Van Horn, S., Lee, J.C., Livi, G.P., Young, P.R. (1996). Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 8488-8492
- Mermoud, J.E., Cohen, P.T.W., Lamond, A.I. (1994). Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J.* 13, 5679-5688

-
- Misteli, T., Cáceres, J.F., Clement, J.Q., Krainer, A.R., Wilkinson, M.F., Spector, D.L. (1998). Serine Phosphorylation of SR Proteins Is Required for Their Recruitment to Sites of Transcription *In vivo*. *J. Cell Biol.* 143, 297-307
- Morton, S., Davis, R.J., McLaren, A., Cohen, P. (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* 22, 3876-3886
- Motohashi, H., Shavit, J.A., Igarashi, K., Yamamoto, M., Engel, J.D. (1997). The world according to Maf. *Nucleic Acids Res.* 25, 2953-2959
- Needleman, S.B., Wunsch, C.D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453
- Oelgeschläger, T. (2002). Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J. Cell. Physiol.* 190, 160-169
- Ohira, M., Seki, N., Nagase, T., Suzuki, E., Nomura, N., Ohara, O., Hattori, M., Sakaki, Y., Eki, T., Murakami, Y., Saito, T., Ichikawa, H., Ohki, M. (1997). Gene identification in 1.6-Mb region of the Down syndrome region on chromosome 21. *Genome Res.* 7, 47-58
- O'Neill, T., Giarratani, L., Chen, P., Iyer, L., Lee, C.H., Bobiak, M., Kanai, F., Zhou, B.B., Chung, J.H., Rathbun, G.A. (2002). Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *J. Biol. Chem.* 277, 35776-35777
- Ono, Y., Ohno, M., Shimura, Y. (1994). Identification of a putative RNA helicase (HRH1), a human homolog of yeast Prp22. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7611-7620
- Pinna, L.A., Ruzzene, M. (1996). How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta.* 1314, 191-225
- Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368
- Sacco-Bubulya, P., Spector, D.L. (2002). Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 156, 425-436
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual* (2. Auflage), Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York.

-
- Schmidt-Zachmann, M.S., Knecht, S., Krämer, A. (1998). Molecular characterization of a novel, widespread nuclear protein that colocalizes with spliceosome components. *Mol. Biol. Cell* 9, 143-160
- Schuringa, J.J., Jonk, L.J., Dokter, W.H., Vellenga, E., Kruijer, W. (2000). Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem. J.* 347, 89-96
- Screaton, G.R., Caceres, J.F., Mayeda, A., Bell, M.V., Plebanski, M., Jackson, D.G., Bell, J.I., Krainer, A.R. (1995). Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors. *EMBO J.* 14, 4336-4349
- Seghezzi, W., Chua, K., Shanahan, F., Gozani, O., Reed, R., Lees, E. (1998). Cyclin E associates with components of the pre-mRNA splicing machinery in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4526-4536
- Sgambato, V., Minassian, R., Nairn, A.C., Hyman, S.E. (2003). Regulation of *ania-6* splice variants by distinct signaling pathways in striatal neurons. *J. Neurochem.* 86, 153-164
- Smith, D.J., Stevens, M.E., Sudanagunta, S.P., Bronson, R.T., Makhinson, M., Watabe, A.M., O'Dell, T.J., Fung, J., Weier, H.U., Cheng, J.F., Rubin, E.M. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates *minibrain* in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet.* 16, 28-36
- Smith, T., Waterman, M. (1981). Comparison of biosequences. *Advances in Applied Mathematics* 2, 482-489
- Song, W.J., Chung, S.H., Kurnit, D.M. (1997). The murine Dyrk protein maps to chromosome 16, localizes to the nucleus, and can form multimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 640-644
- Souza, G.M., Lu, S., Kuspa, A. (1998). YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development* 125, 2291-2302
- Spector, D.L. (2001). Nuclear domains. *J. Cell Sci.* 114, 2891-2893
- Subrahmanyam, Y.V., Yamaga, S., Prashar, Y., Lee, H.H., Hoe, N.P., Kluger, Y., Gerstein, M., Goguen, J.D., Newburger, P.E., Weissman, S.M. (2001). RNA expression patterns change dramatically in human neutrophils exposed to bacteria. *Blood* 97, 2457-2468

-
- Suelter, C.H. (1990). *Experimentelle Enzymologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Teague, T.K., Hildeman, D., Kedl, R.M., Mitchell, T., Rees, W., Schaefer, B.C., Bender, J., Kappler, J., Marrack, P. (1999). Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12691-12696
- Tejedor, F., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14, 287-301
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680
- Trembley, J.H., Hu, D., Hsu, L.C., Yeung, C.Y., Slaughter, C., Lahti, J.M., Kidd, V.J. (2002). PITSLRE p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity. *J. Biol. Chem.* 277, 2589-2596
- van Rijk, A.E., Stege, G.J., Bennink, E.J., May, A., Bloemendal, H. (2003). Nuclear staining for the small heat shock protein alphaB-crystallin colocalizes with splicing factor SC35. *Eur. J. Cell Biol.* 82, 361-368
- Villavicencio, E.H., Walterhouse, D.O., Iannaccone, P.M. (2000). The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1047-1054
- von Groote-Bidlingmaier, F., Schmoll, D., Orth, H.M., Joost, H.G., Becker, W., Barthel, A. (2003). DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 764-769
- Wang, C., Chua, K., Seghezzi, W., Lees, E., Gozani, O., Reed, R. (1998a). Phosphorylation of spliceosomal protein SAP 155 coupled with splicing catalysis. *Genes Dev.* 12, 1409-1414
- Wang, J., Xiao, S.H., Manley, J.L. (1998b). Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev.* 12, 2222-2233

-
- Wiechmann, S., Czajkowska, H., de Graaf, K., Grötzinger, J., Joost, H.G., Becker, W. (2003). Unusual function of the activation loop in the protein kinase DYRK1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 403-408
- Will, C.L., Schneider, C., MacMillan, A.M., Katopodis, N.F., Neubauer, G., Wilm, M., Lührmann, R., Query, C.C. A novel U2 and U11/U12 snRNP protein that associates with the pre-mRNA branch site. *EMBO J.* 20, 4536-4546
- Woods, Y.L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., Proud, C.G. (2001b). The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem. J.* 355, 609-615
- Woods, Y.L., Rena, G. (2002). Effect of multiple phosphorylation events on the transcription factors FKHR, FKHL1 and AFX. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 391-397
- Woods, Y.L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T.G., Cohen, P. (2001a). The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 *in vitro*, a novel *in vivo* phosphorylation site. *Biochem. J.* 355, 597-607
- Xu, B., Bhattacharjee, A., Roy, B., Xu, H.M., Anthony, D., Frank, D.A., Feldman, G.M., Cathcart, M.K. (2003). Interleukin-13 induction of 15-lipoxygenase gene expression requires p38 mitogen-activated protein kinase-mediated serine 727 phosphorylation of Stat1 and Stat3. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3918-3928
- Yang, E.J., Ahn, Y.S., Chung, K.C. (2001). Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 276, 39819-39824
- Yang, X., Hubbard, E.J., Carlson, M. (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* 257, 680-682
- Zahler, A.M., Neugebauer, K.M., Stolk, J.A., Roth, M.B. (1993). Human SR proteins and isolation of a cDNA encoding SRp75. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4023-4028
- Zhang, Z., Smith, M.M., Mymryk, J.S. (2001). Interaction of the E1A oncoprotein with Yak1p, a novel regulator of yeast pseudohyphal differentiation, and related mammalian kinases. *Mol. Biol. Cell* 12, 699-710
- Zhao, J., Dynlacht, B., Imai, T., Hori, T., Harlow, E. (1998). Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes Dev.* 12, 456-461

Zhou, G., Bao, Z.Q., Dixon, J.E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. J. Biol. Chem. 270, 12665-12669

Herzlicher Dank

gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Herrn Prof. Dr. Walter Becker danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung meiner Dissertation, die ständige Diskussionsbereitschaft und Förderung meiner Arbeit. Vor allem aber danke ich ihm für den gewährten Freiraum in der wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Fritz Kreuzaler gilt besonderer Dank für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Lüscher, Dr. Richard Lilischkis und Sabine Rottmann bedanke ich mich für die Hilfe bei der Methode des *Peptide Mappings* und die zur Verfügung gestellten Proteine.

Herrn PD Dr. Gerd Müller-Newen und Andreas Herrmann danke ich für die Einarbeitung am konfokalen Mikroskop und für die konstruktiven Vorschläge zur Veröffentlichung der Daten.

Dank gebührt auch Oliver Spelten und Birgit Feulner für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Für die kritische Durchsicht meiner Arbeit danke ich Susanne Seeger, Barbara Mänz, Dorit Wudtke, Bernd Vincken und meinen Eltern. Georg Thiebes danke ich für die Hilfe beim Druck dieser Arbeit.

An alle Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie, im Besonderen aber an Hanna, Susanne, Andrea und Gregor ein herzliches Dankeschön für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die Vieles erleichtert hat.

Manfred danke ich für sein Verständnis und im Besonderen für die Hilfe „rund um den Computer“.

Großer Dank gebührt meinen Eltern, die mir durch ihre stete Unterstützung und durch ihr Vertrauen meinen Werdegang ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Katrin de Graaf
Geburtsdatum	18.06.1974
Geburtsort	Krefeld (Nordrhein-Westfalen)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schul Ausbildung:

1980-1984	Grundschule Brüggen
1984-1993	St. Wolfhelm Gymnasium Waldniel
1993	Abitur

Hochschulausbildung:

1993 -1994	Studium der Landschaftsplanung, GHK Kassel
1994 -2000	Studium der Biologie, RWTH Aachen
	17.03.1997 Vordiplom
	1999-2000 Diplomarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie, Lehr- und Forschungsgebiet Virologie, RWTH Aachen
	03.03.2000 Diplom
04.2000 - 02.2004	Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der RWTH Aachen

Hilfswissenschaftliche Tätigkeiten:

18.11.97-17.01.98	Institut für Botanik, RWTH Aachen
01.12.98-31.03.99	Institut für Pathologie, RWTH Aachen
01.06.99-30.06.99	Institut für medizinische Mikrobiologie, RWTH Aachen
01.10.99-31.03.00	Institut für medizinische Mikrobiologie, RWTH Aachen