

ZUR FUNKTION DER KINASE
DYRK1A
IM GEHIRN DER ADULTEN MAUS

DISSERTATION

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

ANGEFERTIGT AM
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE

VORGELEGT VON
JAN HENDRIK SITZ
- DIPLOM-HUMANBIOLOGE -
AUS DORTMUND

MÜNCHEN 2003

Erstgutachter: PD Dr. Beat Lutz

Zweitgutachter: Professor Dr. Thomas Cremer

Eingereicht am: 3. März 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 8. August 2003

IM ANDENKEN AN MEINE ELTERN

DR. ULRICH SITZ (23. AUGUST 1942 – 12. NOVEMBER 2002)

ORTRUD SITZ (6. SEPTEMBER 1943 – 27. AUGUST 2003)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 DAS DOWN-SYNDROM.....	3
2.1.1 <i>Genetische Grundlagen des Down-Syndroms</i>	3
2.1.2 <i>Mentale Retardierung und kognitive Defizite als Bestandteil des Down-Syndroms</i>	6
2.1.3 <i>Down-Syndrom-Tiermodelle</i>	7
2.2 <i>DYRK1A, EIN VERTEBRATENHOMOLOG DES DROSOPHILA-GENS MINIBRAIN</i>	9
2.2.1 <i>Klonierung der minibrain-/Dyrk-Gene</i>	9
2.2.2 <i>Strukturelle und enzymatische Eigenschaften von Dyrk1A</i>	10
2.2.3 <i>Expression und Lokalisation von Dyrk1A</i>	12
2.2.4 <i>Bekannt mit Dyrk1A interagierende Proteine</i>	13
2.2.4.1 <i>STAT3</i>	14
2.2.4.2 <i>FKHR</i>	14
2.2.4.3 <i>Tau und eIF2Bϵ</i>	15
2.2.4.4 <i>CREB</i>	15
2.2.4.5 <i>Dynamin</i>	16
2.2.4.6 <i>Gli1</i>	17
2.2.5 <i>Hinweise zur Funktion von Dyrk1A</i>	17
3 ZIELSETZUNG	21
Analyse der Expression und Lokalisation von Dyrk1A	21
Generierung Dyrk1A konditional überexprimierender Mäuse	21
Identifizierung und Charakterisierung Dyrk1A-interagierender Proteine.....	21
4 MATERIAL	23
4.1 BEZUGSQUELLENNACHWEIS	23
4.1.1 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	23
4.1.2 <i>Enzyme</i>	25
4.1.3 <i>Nukleotide und Nukleinsäuren</i>	26
4.1.4 <i>Kits und sonstiges Verbrauchsmaterial</i>	26

4.1.5	Geräte.....	28
4.2	MEDIEN UND PUFFER	29
4.2.1	Stammlösungen und Puffer.....	29
4.2.2	Medien für die Bakterienkultur.....	32
4.2.3	Medien für die Kultur von Hefen.....	33
4.2.4	Medien für die Zellkultur.....	34
4.3	BAC-BIBLIOTHEK	35
4.4	OLIGONUKLEOTIDE.....	35
4.5	PLASMIDE	41
4.6	PLASMID-DNA-KLONE ZUR HERSTELLUNG VON RIBOSONDEN.....	42
4.7	ANTIKÖRPER.....	42
4.8	ORGANISMEN.....	43
4.8.1	Bakterienstämme.....	43
4.8.2	Hefen.....	43
4.8.3	Säuger-Zelllinien	44
4.8.4	Mäuse.....	44
4.8.5	Ratten und neuronale Primärkulturen.....	44
5	METHODEN.....	45
5.1	MIKROBIOLOGISCH-BAKTERIOLOGISCHE METHODEN	45
5.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien für die Transformation per Hitzeschock.....	45
5.1.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien per Hitzeschock.....	46
5.1.3	Kultur der BAC-Wirtsbakterien des Stammes DH10B.....	46
5.1.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH10B-Bakterien für die Transformation per Elektroporation	47
5.1.5	Elektroporation von <i>E. coli</i> DH10B-Bakterien.....	47
5.1.6	GET-Rekombination.....	48
5.1.6.1	Amplifikation und Reinigung der Rekombinationskassette.....	48
5.1.6.2	Transformation der Rekombinationskassette	48
5.2	ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN	49
5.2.1	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	49
5.2.1.1	Plasmidpräparation für analytische Zwecke (Mini-Präparation)	49
	Plasmidpräparation für die Analyse per Restriktionsverdau	49
	Plasmidpräparation für die Analyse per Sequenzierung.....	50
5.2.1.2	Plasmidpräparation für präparative Zwecke	50
5.2.1.3	Präparation von Plasmiden für die Transfektion.....	50
5.2.2	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	50

5.2.3	Isolierung von RNA.....	50
5.2.4	Spektralphotometrische Analyse von DNA und RNA.....	51
5.2.5	Enzymatische Methoden.....	51
5.2.5.1	Reverse Transkription.....	51
5.2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	52
5.2.5.3	Restriktionsverdau.....	53
5.2.5.4	Auffüllen von überhängenden Enden nach Restriktionsverdau.....	53
5.2.5.5	Ligation von DNA.....	53
5.2.5.6	Sequenzierung von DNA.....	54
5.2.6	Aufreinigung von DNA mittels Adsorptionschromatographie.....	54
5.2.6.1	QIAquick® Gel Extraction-Kit.....	54
5.2.6.2	QIAquick® Nucleotide Removal-Kit.....	54
5.2.6.3	QIAquick® PCR Purification-Kit.....	55
5.2.7	Radioaktive Hybridisierung.....	55
5.2.7.1	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mittels <i>random priming</i>	55
5.2.7.2	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit Terminaler desoxynucleotidyl-Transferase.....	55
5.2.7.3	Transfer von DNA auf Nylon-Membranen (Hybond-N ⁺).....	56
5.2.7.4	Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden.....	56
5.2.8	Nichtradioaktive Hybridisierung.....	57
5.2.9	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	57
5.2.9.1	Herstellung von Ribonukleotidsonden mittels <i>in vitro</i> -Transkription.....	57
	Markierung von Ribosonden mit ³⁵ S-UTP.....	57
	Markierung von Ribosonden mit Digoxigenin.....	58
5.2.9.2	Herstellung von Gefrierschnitten.....	59
5.2.9.3	Radioaktive <i>in situ</i> -Hybridisierung mit ³⁵ S-markierten Ribosonden.....	59
	Prähybridisierungsbehandlung und Hybridisierung.....	59
	Hybridisierungsnachbehandlung.....	59
5.2.9.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Ribosonden.....	60
	Prähybridisierungsbehandlung und Hybridisierung.....	60
	Hybridisierungsnachbehandlung.....	60
5.2.10	Spezielle Methoden für Arbeiten mit BACs.....	61
5.2.10.1	Absuchen der Bibliothek nach BAC-Klonen.....	61
	Markierung der Sonden.....	62
	Hybridisierung der Membranen.....	62
5.2.10.2	Identifizierung von BACs durch PCR-Amplifikation aus Bakterien.....	62
5.2.10.3	Isolierung von BAC-DNA aus <i>E. coli</i>	63

Isolierung von BAC-DNA im kleinen Maßstab	63
Isolierung von BAC-DNA im mittleren Maßstab.....	63
Isolierung von hochreiner BAC-DNA für die Sequenzierung	63
Sequenzierung von BAC-DNA.....	63
5.2.10.4 λ -Terminase-Verdau.....	64
Linearisierung von Plasmiden mit λ -Terminase.....	64
Linearisierung von BACs mit λ -Terminase	64
5.2.10.5 Analyse von BAC-DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese	65
5.3 METHODEN FÜR DIE ARBEIT MIT <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	66
5.3.1 Kultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
5.3.2 Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA.....	66
5.3.3 Verpaarung von Hefen zum Absuchen der prätransformierten cDNA-Bibliothek..	66
.....	66
5.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen	67
5.4 ARBEITEN MIT SÄUGER-ZELLINIEN UND –PRIMÄRKULTUREN.....	67
5.4.1 Vorbehandlung von Deckgläschen.....	67
5.4.2 Kultivierung von Säuger-Zelllinien.....	68
5.4.2.1 Kultur von HT22-Zellen.....	68
5.4.2.2 Kultur von HEK293-Zellen	68
5.4.3 Transfektion von Zelllinien und Primärkulturen	69
5.4.3.1 Transfektion von HT22-Zellen mit LIPOFECTAMINE™ 2000.....	69
5.4.3.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit LIPOFECTAMINE™ 2000	69
5.4.3.3 Transfektion von HEK293-Zellen per Elektroporation	70
5.4.3.4 Transfektion von HEK293-Zellen mit Calciumphosphat.....	70
5.4.3.5 Transfektion von Primärkultur-Zellen mit Effectene®	71
5.5 ARBEITEN MIT PROTEINEN	71
5.5.1 Koimmunpräzipitation	71
5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	72
5.5.3 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western Blot)	72
5.5.4 Immundetektion von Proteinen nach dem Western Blot	72
5.5.5 Entfernung von gebundenen Antikörpern (Stripping)	73
5.5.6 Immunhistochemie	73
6 ERGEBNISSE.....	74
6.1 ANALYSE DER EXPRESSION UND LOKALISATION VON DYRK1A	76
6.1.1 Untersuchungen zur Expression von <i>Dyrk1A</i> im Gehirn der adulten Maus	
mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	76
6.1.1.1 <i>Dyrk1A</i> -Expression in der Hippocampusformation und im Cerebellum.....	76

6.1.2	<i>Analyse der Lokalisation von Dyrk1A im Gehirn der adulten Maus mittels Immunhistochemie</i>	78
6.1.2.1	Die intrazelluläre Lokalisation von Dyrk1A in ausgewählten Gehirnregionen	78
6.2	HERSTELLUNG VON BAC-KONSTRUKTEN ZUR GENERIERUNG VON <i>DYRK1A</i> -TRANSGENEN MÄUSEN	82
6.2.1	<i>Identifizierung und Charakterisierung von Dyrk1A-BAC-Klonen</i>	82
6.2.1.1	Identifizierung von BAC-Klonen mittels Hybridisierung der Bibliotheks-Membranen	83
6.2.1.2	Identifizierung der BAC-Klone mittels PCR	84
6.2.1.3	Charakterisierung der BAC-Klone: Restriktionsverdau und <i>Southern Blot</i> -Hybridisierungen.....	86
6.2.1.4	Charakterisierung der BAC-Klone: Sequenzierungen	87
6.2.2	<i>Modifizierung eines BAC-Klons mittels GET-Rekombination</i>	91
6.2.2.1	Generierung einer Rekombinationskassette mittels überlappender PCR ..	92
6.2.2.2	Modifikation des BAC-Klons J.38 mit der Rekombinationskassette 1	96
6.2.2.3	Nachweis der korrekten Insertion der Rekombinationskassette 1 und der Funktionsfähigkeit der <i>cos</i> -Stelle.....	97
6.2.3	<i>Konstruktion und Generierung einer Rekombinationskassette zur Modifikation eines BAC-Klons für die konditionale Überexpression von Dyrk1A</i>	101
6.2.3.1	Klonierung der Rekombinationskassette 2 zur gezielten Aktivierung des <i>Dyrk1A</i> -Locus	103
6.2.3.2	Expression und Analyse einer hrGFP- <i>Dyrk1A</i> -Fusion	106
6.3	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON <i>DYRK1A</i> -INTERAKTOREN	108
6.3.1	<i>Identifizierung der Interaktoren in der Yeast two-hybrid-Suche</i>	108
6.3.1.1	Generierung des Köder-Vektors.....	110
6.3.1.2	Analyse von AH109[pGBKT7- <i>Dyrk1A</i> JS.40/JS.41]-Transformanden	110
6.3.1.3	<i>Yeast two-hybrid</i> -Suche nach Interaktoren	113
6.3.1.4	Analyse der gefundenen Klone durch Restriktionsverdau und Sequenzierung	114
6.3.2	<i>Bestätigung der Interaktion in Hefezellen und Analyse der Spezifität der gefundenen Interaktoren</i>	121
6.3.2.1	Klonierung der gesamten proteinkodierenden <i>Dyrk1A</i> -cDNA	121
6.3.2.2	Kotransformation von Hefe-Zellen zur Bestätigung und zur Untersuchung der Spezifität der gefundenen Interaktionen.....	121
6.3.3	<i>Interaktion von Dyrk1A mit Sept4, Sept5 und Arip4 in Säugerzellen</i>	124

6.3.3.1	Klonierung von <i>Dyrk1A</i> , <i>Sept4</i> , <i>Sept5</i> und <i>Arip4</i> in eukaryotische FLAG- und EGFP-Fusions-Expressionsvektoren	125
6.3.3.2	Koimmunpräzipitation zum Nachweis der Interaktion zwischen <i>Dyrk1A</i> und <i>Sept4</i> , <i>Sept5</i> sowie <i>Arip4</i>	129
6.3.4	<i>Vergleichende Analyse der Expression von Dyrk1A, Sept4 und Arip4 im Gehirn der Maus</i>	133
6.3.4.1	Expression von <i>Dyrk1A</i> und <i>Sept4</i> im Gehirn der Maus	134
6.3.4.2	Expression von <i>Dyrk1A</i> und <i>Arip4</i> im Gehirn der Maus	137
6.3.5	<i>Vergleichende Analyse der Lokalisation von Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 in transfizierten Säugerzellen</i>	139
6.3.5.1	Lokalisation von <i>Dyrk1A</i> , <i>Sept4</i> , <i>Sept5</i> und <i>Arip4</i> in hippocampalen neuronalen Primärkulturen	139
6.3.5.2	Transfektion und konfokale Mikroskopie von <i>Dyrk1A</i> und <i>Arip4</i> in HEK293-Zellen.....	143
7	DISKUSSION	147
7.1	EXPRESSION UND LOKALISATION VON DYRK1A	147
7.1.1	<i>Die Expression von Dyrk1A im Gehirn</i>	147
7.1.2	<i>Intrazelluläre Lokalisation von Dyrk1A in Neuronen</i>	148
7.2	BAC-KONSTRUKTE ZUR GENERIERUNG <i>DYRK1A</i> KONDITIONAL ÜBEREXPRIMIERENDER TRANSGENER MÄUSE	149
7.2.1	<i>Identifizierung und Charakterisierung eines geeigneten BAC-Klons</i>	151
7.2.2	<i>Modifizierung eines Dyrk1A-BAC-Klons mittels GET-Rekombination</i>	152
7.2.2.1	Modifizierung des Klons J.38 mit der Rekombinationskassette 1	152
7.2.2.2	Modifizierung des Klons J.81.5 mit der Rekombinationskassette 2	153
7.2.3	<i>Ausblick</i>	155
7.3	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON DYRK1A-INTERAKTOREN	156
7.3.1	<i>Identifizierung von Dyrk1A-Interaktoren in der Yeast two-hybrid-Suche</i>	156
7.3.2	<i>Die neu identifizierten Dyrk1A-interagierenden Proteine Sept4, Sept5 und Arip4: aktueller Kenntnisstand</i>	157
7.3.2.1	Die GTPasen der Septin-Familie.....	157
	Die Septine der Vertebraten	157
	Das Septin <i>Sept4/H5/Pnutl2</i>	158
	<i>Sept5/Pnutl1/CDCrel-1</i>	159
7.3.2.2	<i>Arip4, eine Chromatin-modellierende ATPase der SNF2-Familie</i>	161
	Der SWI/SNF-Komplex.....	161
	Das SWI2/SNF2-Protein	161
	<i>Arip4, ein Protein der SNF2-Superfamilie</i>	162

7.3.3	<i>Bestätigung der spezifischen Interaktion von Dyrk1A mit Sept4 und Arip4 in Saccharomyces cerevisiae</i>	164
7.3.4	<i>Bestätigung der Interaktion von Dyrk1A mit Sept4, Sept5 und Arip4 in HEK293-Zellen mittels Koimmunpräzipitation</i>	164
7.3.5	<i>Vergleichende Expressions- und Lokalisationsanalyse von Sept4, Arip4 und Dyrk1A</i>	166
7.3.5.1	Expression von <i>Sept4</i> , <i>Arip4</i> und <i>Dyrk1A</i> im Gehirn der Maus.....	167
	Expression von Dyrk1A und Sept4	167
	Expression von Dyrk1A und Sept5	167
	Expression von Dyrk1A und Arip4	168
7.3.5.2	Intrazelluläre Lokalisation von Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 in neuronalen Primärkulturen und in HEK293-Zellen	168
	Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 in neuronalen Primärkulturen.....	168
	Kolokalisation von Dyrk1A und Arip4 in HEK293-Zellen.....	169
7.3.6	<i>Zur Relevanz der Interaktion zwischen Dyrk1A und den Septinen</i>	170
7.3.7	<i>Funktionelle Analyse der Interaktion zwischen Dyrk1A und Arip4: aktueller Stand und Ausblick</i>	171
7.4	HINWEISE ZUR FUNKTION VON DYRK1A IN PHYSIOLOGISCHEN UND PATHOPHYSIOLOGISCHEN ZUSTÄNDEN.....	171
8	LITERATURVERZEICHNIS	173
9	ANHANG	185
9.1	PLASMIDKARTEN	185
9.2	SEQUENZEN.....	189
9.2.1	<i>Sequenz von Sept4_v7 (cDNA und Protein)</i>	189
9.2.2	<i>Sequenz von Sept5 (cDNA und Protein)</i>	191
9.3	DANKSAGUNG	194
9.4	LEBENS LAUF	195
9.5	ERKLÄRUNG.....	196

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2-1: Trisomie 21	4
Abbildung 2-2: Das humane Chromosom 21 und die entsprechenden Regionen konservierter Syntänie der Chromosomen 16, 10 und 17 der Maus.....	5
Abbildung 2-3: Die <i>Drosophila</i> -Mutante <i>minibrain</i>	9
Abbildung 2-4: Epigallocatechin-3-gallat.....	11
Abbildung 6-1: Schematische Darstellung von Dyrk1A-Protein (A) und <i>Dyrk1A</i> -cDNA (B) ...	75
Abbildung 6-2: Expressionsanalyse von <i>Dyrk1A</i> in der Hippocampusformation und im Cerebellum mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	77
Abbildung 6-3: Analyse der Lokalisation von Dyrk1A im Gehirn der adulten Maus mittels Immunhistochemie.....	80
Abbildung 6-4: PCR zur Identifizierung von <i>Dyrk1A</i> -BAC-Klonen.....	84
Abbildung 6-5: PCR zum Nachweis von Exon 14 von <i>Dyrk1A</i> in der Insertion der BAC-Klone	85
Abbildung 6-6: <i>Dyrk1A</i> -BAC-Klone nach <i>Not</i> I-Verdau	86
Abbildung 6-7: Pulsfeld-Gelelektrophorese und <i>Southern Blot</i> zum Nachweis der Exons 1 und 4 von <i>Dyrk1A</i> in den Insertionen der BAC-Klone	88
Abbildung 6-8: Schematische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse des <i>Dyrk1A</i> -BAC-Klons J.38 sowie seiner Insertion und des Chromosoms 16 der Maus.....	90
Abbildung 6-9: Strategie zur Modifikation des <i>Dyrk1A</i> -BAC-Klons in zwei Schritten	91
Abbildung 6-10: Generierung der Rekombinationskassette 1 mittels überlappender PCR....	94
Abbildung 6-11: Verdau des Klons J.76 (pBS-Rekombinationskassette 1) mit λ -Terminase	96
Abbildung 6-12: Analyse der BAC-Klone nach Modifikation mit der Rekombinationskassette 1	99
Abbildung 6-13: Schematische Darstellung der Modifikation des BAC-Klons J.38 mit der Rekombinationskassette 1 zur Klonierung von J.81	100
Abbildung 6-14: Nachweis der Funktionsfähigkeit der <i>cos</i> -Stelle der BAC-Klone	100
Abbildung 6-15: Strategie zur Einführung einer konditional aktiven dritten Kopie von <i>Dyrk1A</i> als BAC-Transgen.....	102
Abbildung 6-16: HT22-Zellen nach Transfektion mit hrGFP und hrGFP-Dyrk1A.....	106
Abbildung 6-17: Das Prinzip des <i>Yeast two-hybrid</i> -Verfahrens	109
Abbildung 6-18: PCR zum Nachweis der Anwesenheit des Köderplasmids J.73 in den Hefe-Klonen	112
Abbildung 6-19: Charakterisierung der Insertionen der gefundenen Hefe-Klone mittels PCR und Restriktionsverdau mit <i>Alu</i> I.....	115

Abbildung 6-20: Schematische Darstellung der in den Hefe-Klonen DI1 und DI6 gefundenen cDNA-Fragmente und der entsprechenden Proteine	120
Abbildung 6-21: Analyse der in der <i>Yeast two-Hybrid</i> -Suche gefundenen Klone DI1 und DI6 mittels Kotransformation in Hefe	123
Abbildung 6-22: Die <i>Sept5</i> -cDNA und das entsprechende Protein	126
Abbildung 6-23: Klonierung der vollständigen <i>Arip4</i> -cDNA in den Vektor pEGFP-C2	128
Abbildung 6-24: Kotransfektion von HEK293-Zellen per Elektroporation	129
Abbildung 6-25: Koimmunpräzipitation von Dyrk1A, Sept4 und Arip4 nach Kotransfektion von HEK293-Zellen	131
Abbildung 6-26: Koimmunpräzipitation von Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 nach Kotransfektion von HEK293-Zellen	132
Abbildung 6-27: Expression von <i>Dyrk1A</i> und <i>Sept4</i> in ausgewählten Gehirnregionen	136
Abbildung 6-28: Expression von <i>Dyrk1A</i> und <i>Arip4</i> in ausgewählten Gehirnregionen	138
Abbildung 6-29: Astrocyt in hippocampaler Primärkultur nach Transfektion von EGFP-Dyrk1A	141
Abbildung 6-30: Hippocampale neuronale Primärkulturen nach Transfektion mit Konstrukten für die Expression von EGFP-Fusionsproteinen	142
Abbildung 6-31: HEK293-Zellen nach Transfektion mit pEGFP-Dyrk1A und EGFP-Arip4 ..	143
Abbildung 6-32: Konfokale Mikroskopie mit Dyrk1A und Arip4 kotransfizierter HEK293-Zellen	146
Abbildung 9-1: Karte des Plasmids J.73 (pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41)	185
Abbildung 9-2: Karte des Plasmids J.96 (pGBKT7-Dyrk1A JS.60/JS.61)	186
Abbildung 9-3: Karte des Plasmids J.98 (pEGFP-Dyrk1A)	186
Abbildung 9-4: Karte des Plasmids J.132 (pCMV-Tag2A[FLAG]-Sept4)	187
Abbildung 9-5: Karte des Plasmids J.137 (pBS-Rekombinationskassette 2) mit allen Elementen der Rekombinationskassette 2	188

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
5'-UTR	5'- <i>untranslated region</i> (5'-nichtkodierende Region)
A (in Nukleinsäure-Sequenzen)	Adenin
A (in Aminosäuresequenzen)	Alanin
AR	Androgen-Rezeptor
Arip4	<i>Androgen receptor interacting protein 4</i>
ARTS	<i>apoptosis-related protein in TGF-β signalling</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
C	Cystein
C	Cytosin
C/EBP β	<i>CCAAT-enhancer binding protein β</i>
CaMKII α	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II α
CB1	Cannabinoid-Rezeptor 1
cc	<i>central complex</i> , Zentralkomplex
CCK	Cholezystokinin
CDCrel-1	<i>cell division cycle-related-1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CDS	<i>coding sequence</i> (kodierende Sequenz)
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
D	Aspartat
Dcra	<i>Down Syndrome Critical Region gene A</i>
DI	Dyrk1A-interagierendes Protein
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle-Medium</i>
Dyrk	<i>Dual specificity Yak1-related kinase</i> oder <i>Dual specificity tyrosin (Y)-regulated kinase</i>
E	Glutamat
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF2B	eukaryotischer (Translations-) Initiationsfaktor 2

Abkürzung	Bedeutung
eIF2B ϵ	ϵ -Untereinheit von eIF2B
ERK2	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
F	Phenylalanin
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor 2</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2)
FKHR	<i>Forkhead in rhabdomyosarcoma</i>
FKHRL1	<i>Forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1</i>
<i>FRT</i>	<i>Flp recognition target site</i>
Fw	<i>forward</i>
Fw-Primer	<i>forward-Primer</i> (Primer, dessen Sequenz der der mRNA bzw. der des codogenen [sense-]Stranges einer DNA entspricht)
G (in Nukleinsäure-Sequenzen)	Guanin
G (in Proteinsequenzen)	Glycin
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> (γ -Aminobutyrat)
GAD67	<i>glutamic acid decarboxylase of 67 kDa</i>
GAL4-AD	GAL4-Aktivierungsdomäne
GAL4-DNA-BD	GAL4-DNA-Bindungsdomäne
GDP	Guanosin-diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GET-Rekombination	Homologe Rekombination, vermittelt durch RecE, RecT und Red γ
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Gli1	<i>glioma-associated oncogene</i>
GSK3	Glycogen-Synthase-Kinase 3
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Stunde
H	Histidin
Hexb	Hexosaminidase B
hrGFP	<i>humanized renilla green fluorescent protein</i>
I	Isoleucin
IL-6	Interleukin 6
ips	Impulse pro Sekunde
JAK	<i>just another kinase / janus kinase</i>
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
L	Leucin
LA	Linker Homologiearm
lo	Lobula
<i>loxP</i>	<i>location of crossover</i>
M	molar

Abkürzung	Bedeutung
M	Methionin
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mb	Megabasenpaare
me	Medulla
MEM	<i>minimal essential medium</i>
min	Minute
<i>mnb</i>	<i>minibrain (Drosophila-Mutante)</i>
MNB	<i>minibrain</i> -Kinase
N	Asparagin
NES	<i>nuclear export sequence</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
OD _{600nm}	Optische Dichte für Licht einer Wellenlänge von 600 nm
P	Prolin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PFA	Paraformaldehyd
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
Pnutl	<i>peanut-like</i>
Q	Glutamin
RA	Rechter Homologiearm
Rev	<i>reverse</i>
Rev-Primer	<i>reverse</i> -Primer (Primer, dessen Sequenz zu der der mRNA invers komplementär ist bzw. der des <i>antisense</i> -Stranges einer DNA entspricht)
RK	Rekombinationskassette
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin
s.	siehe
SD	<i>synthetic dropout</i> (synthetisch definiertes Medium [Minimalmedium für Hefen])
Sept	Septin
SH2	<i>src homology region 2</i>
SH3	<i>src homology region 3</i>
Shh	<i>sonic hedgehog</i>

Abkürzung	Bedeutung
SHIRPA	<i>SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell, MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit; Imperial College School of Medicine at St Mary's; Royal London Hospital, St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine; phenotype assessment</i>
Sh-Protein	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i> Bleomycin-Protein
Snf	<i>sucrose nonfermenting</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Sumo	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
Swi	<i>switching of mating type</i>
T (in Nukleinsäure-Sequenzen)	Thymin
T (in Proteinsequenzen)	Threonin
TdT	Terminale desoxynukleotidyl-Transferase
t-SNARE	<i>target membrane-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor</i>
U	Uracil
ü. N.	über Nacht
V	Valin
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
v-SNARE	<i>vesicle-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor</i>
W	Tryptophan
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>
YPDA	Vollmedium für Hefen mit Zusatz von Adenin

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das *minibrain*-Gen der Taufliege *Drosophila melanogaster* kodiert für eine Proteinkinase (MNB) mit bislang nicht eindeutig geklärter Funktion. Mutanten mit einer reduzierten *minibrain*-Expression weisen neben einer deutlich verringerten Gehirngröße unter anderem Defizite im Lernverhalten auf.

Dyrk1A ist das Säuger-Homologe des *minibrain*-Gens; das entsprechende Protein ist das prototypische Mitglied der Dyrk-Proteinkinasen. Das humane *Dyrk1A*-Gen gilt aus mehreren Gründen als zumindest mitverantwortlich für die kognitiven Defizite, die mit dem Down-Syndrom einhergehen: wegen seiner chromosomalen Lokalisation in der sogenannten *Down Syndrome Critical Region* auf Chromosom 21, wegen seiner Überexpression in Down-Syndrom-Individuen und aufgrund von Lern- und Gedächtnisdefiziten *Dyrk1A*-überexprimierender Mäuse. Diese und die an den *Drosophila*-Mutanten erhobenen Befunde deuten auf eine gendosisabhängige Funktion von *Dyrk1A/minibrain* im Zusammenhang mit kognitiven Leistungen wie Lernen und Gedächtnis hin.

Gegenstand dieser Arbeit war die Analyse der Funktion von *Dyrk1A* im Gehirn adulter Säuger. Hierzu wurden drei Ansätze gewählt:

Erstens wurde eine Analyse der Expression von *Dyrk1A* im Gehirn der Maus sowie eine Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des entsprechenden Proteins durchgeführt. *Dyrk1A* ist in einer Reihe von Gehirnarealen exprimiert, unter anderem im Neocortex, in der Hippocampusformation und im Cerebellum. Innerhalb von Neuronen ist *Dyrk1A* – je nach Region und Zelltyp – teils überwiegend nukleär, teils auch oder ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert.

Zweitens sollten – um die gendosisabhängige Funktion von *Dyrk1A* zu charakterisieren – transgene Mäuse hergestellt werden, die eine dritte Kopie des *Dyrk1A*-Gens exprimieren, wie dies auch bei der humanen Trisomie 21, dem Down-Syndrom, der Fall ist. Die transgenen Mäuse sollten diese dritte Kopie des *Dyrk1A*-Gens allerdings orts- und zeitspezifisch aktivierbar – beispielsweise in Prinzipalneuronen des Vorderhirns – exprimieren. Dies sollte unerwünschte Einflüsse auf den Phänotyp durch Entwicklungsdefekte und Beeinflussung anderer neuronaler Systeme ausschließen und gestatten, die Rolle von *Dyrk1A* in Gehirnregionen, die für Lernen und Gedächtnis verantwortlich sind, spezifisch zu untersuchen.

Hierfür wurde ein BAC (*bacterial artificial chromosome*) isoliert und charakterisiert, das den gesamten *Dyrk1A*-Locus der Maus als Insertion trägt. Dieses BAC wurde mittels

homologer Rekombination in *E. coli* (GET-Rekombination) gezielt modifiziert, um es zur Herstellung von transgenen Mäusen verwenden zu können. Weiterhin wurde eine Rekombinationskassette für einen zweiten Modifikationsschritt konstruiert, um die oben beschriebene orts- und zeitspezifische Expression des Gens zu ermöglichen.

Drittens wurden zur weiteren Charakterisierung der Funktion der Proteinkinase Dyrk1A mit dem *Yeast two-hybrid*-Verfahren Dyrk1A-interagierende Proteine identifiziert. Zwei der erhaltenen Klone wurden als spezifisch mit Dyrk1A interagierende Proteine bestätigt: Sept4, eine GTPase der Septin-Familie, und Arip4, ein Chromatin-modellierender Steroidhormon-Rezeptor-Kofaktor mit ATPase-Aktivität. Die Interaktionen wurden in Säuger-Zellen durch Koimmunpräzipitation bestätigt. Mittels *in situ*-Hybridisierung konnte eine Koexpression von *Dyrk1A* mit den Genen beider Interaktoren in verschiedenen Gehirnregionen nachgewiesen werden. In neuronalen Primärkulturen und Säuger-Zelllinien wurde eine Kolokalisation von Dyrk1A und Arip4 in nukleären Strukturen gefunden. So konnte hier Arip4 als ein neues *in vitro* und höchstwahrscheinlich auch *in vivo* mit Dyrk1A interagierendes Protein identifiziert werden. Damit weist diese Arbeit auf eine mögliche Rolle von Dyrk1A in der Steroidhormon-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion hin.

Weiterhin wurde die Interaktion von Dyrk1A mit Sept5 gezeigt, einem nahen Verwandten von Sept4 mit einer wahrscheinlichen inhibitorischen Rolle in der Fusion von synaptischen Vesikeln und der Transmitterfreisetzung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Beitrag zum Verständnis der Rolle von Dyrk1A im physiologischen und pathophysiologischen Kontext. Dies sollte letztendlich dazu beitragen, eine Strategie zur Beeinflussung der Funktion von Dyrk1A und damit eventuell zur Therapie der mentalen Retardierung im Rahmen des Down-Syndroms zu entwickeln.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Down-Syndrom

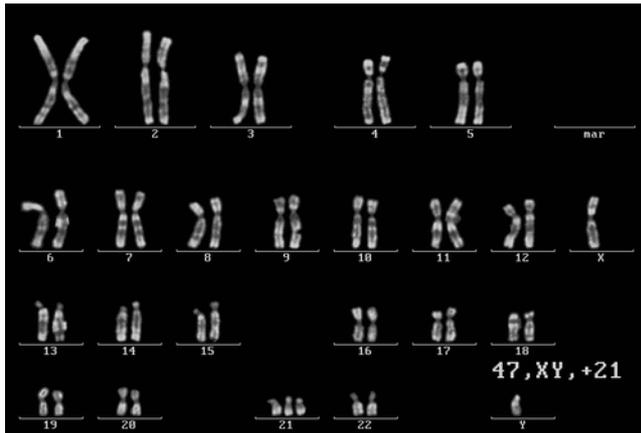
Das Down-Syndrom wurde erstmals 1866 von dem britischen Arzt John L. H. Langdon-Down in einer Studie über Kinder mit mentaler Retardierung beschrieben (Langdon-Down, 1866). Diese von Langdon-Down, der medizinischer Leiter eines Heimes für geistig Behinderte (*Asylum for Idiots at Earlswood in Surrey*) war, beschriebenen Kinder wiesen distinkte Merkmale auf und unterschieden sich von anderen geistig behinderten Kindern, die beispielsweise an Kretinismus litten. Die genetische Ursache des Down-Syndroms, die Trisomie des Chromosoms 21, wurde 1959 von Lejeune *et al.* erkannt (Lejeune & Gautier, 1959).

2.1.1 Genetische Grundlagen des Down-Syndroms

Das Down-Syndrom beruht in den meisten Fällen auf einer Trisomie 21, also der Präsenz eines zusätzlichen Chromosoms 21 entweder als freies, einzelnes Chromosom (s. Abbildung 2-1) oder als Teil eines Fusionschromosoms, entstanden durch eine robertsonsche Translokation¹. In den seltenen Fällen einer partiellen Trisomie 21 kommt nur ein Teil des Chromosoms 21 nach einer reziproken Translokation² in drei Kopien vor (Übersicht in Epstein, 1995).

¹ Eine robertsonsche Translokation ist die Fusion zweier akrozentrischer Chromosomen, z. B. der Chromosomen 21 und 14 des Menschen. Dieses Ereignis kann in der nächsten Generation zu einer Trisomie 21 führen, da sich das Fusionschromosom in der Meiose wie ein normales Chromosom 14 verhält; das an das Chromosom 14 angeheftete Chromosom 21 wird also zusätzlich zum normalen haploiden Chromosomensatz weitergegeben.

² Bei der reziproken Translokation kommt es zum Austausch eines Fragmentes zwischen zwei Chromosomen. Nach einer Meiose kann dies zur partiellen Duplikation eines Chromosomenabschnitts und in der Folge zu einer partiellen Trisomie führen.

**Abbildung 2-1: Trisomie 21**

Karyotyp eines Menschen mit Down-Syndrom (Trisomie 21); Bild: Association Romande Trisomie 21, Lausanne

Nach Untersuchungen an Patienten mit einer derartigen partiellen Trisomie 21 wurden Regionen des Chromosoms 21, die wahrscheinlich für einzelne Symptome des Down-Syndroms

verantwortlich sind, eingegrenzt. So wurden die geistige Behinderung und eine Reihe weiterer Merkmale auf eine dritte Kopie der Region um den Marker D21S55 zurückgeführt (Rahmani *et al.*, 1989; Rahmani *et al.*, 1990; Delabar *et al.*, 1993). Rahmani *et al.* bezeichnen diese Region, die der Bande 21q22.2 und dem proximalen Teil von 21q22.3 auf dem langen Arm des Chromosoms 21 entspricht, demzufolge als *Down Syndrome Critical Region* (DSCR); Delabar *et al.* als *Down Syndrome Chromosome Region* (DCR). In neueren Untersuchungen wurde die kritische Region auf einen 2,5 Mb großen Bereich zwischen den Genen *CBR1* und *ERG* eingegrenzt (s. Abbildung 2-2; Dahmane *et al.*, 1998). Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit einer derartigen partiellen Trisomie 21, wegen der erheblichen phänotypischen Variabilität unter den Betroffenen sowie dem teilweisen Mangel an spezifischen phänotypischen Daten und standardisierten Untersuchungen ist dieser Ansatz nicht für die Identifizierung von einzelnen Genen, sondern nur für eine Eingrenzung von Kandidatengenen auf Chromosom 21 geeignet (Epstein, 1995; Korenberg, 1995). Weiterhin liegen auch Hinweise auf einen Beitrag von Genen außerhalb der DSCR zum Phänotyp des Down-Syndroms vor (Korenberg *et al.*, 1994). Die Expressionsmuster oder bekannte physiologische Funktionen der auf dem Chromosom 21 lokalisierten Gene bzw. ihrer Produkte liefern keine eindeutigen Hinweise auf deren Beitrag zu den mentalen Defiziten beim Down-Syndrom, da innerhalb und außerhalb der DSCR eine Reihe von Genen vorkommt, deren essentielle Bedeutung für das Nervensystem gezeigt wurde oder angenommen wird (s. Abbildung 2-2). Zu diesen gehören beispielsweise die Gene *APP* (*Amyloid β A4 precursor protein*), *SOD1* (*Superoxid-Dismutase 1*), *S100 β* (*S 100 Calcium-bindendes Protein β*) und *DYRK1A* (*Dual specificity Yak1-related kinase* oder *Dual specificity tyrosin (Y)-regulated kinase* [Guimera *et al.*, 1996]). *DYRK1A* kodiert für eine Proteinkinase, die eine wichtige Rolle im Nervensystem – im gesunden Organismus, aber insbesondere auch im Zusammenhang mit dem Down-Syndrom – zu spielen scheint (s. u.).

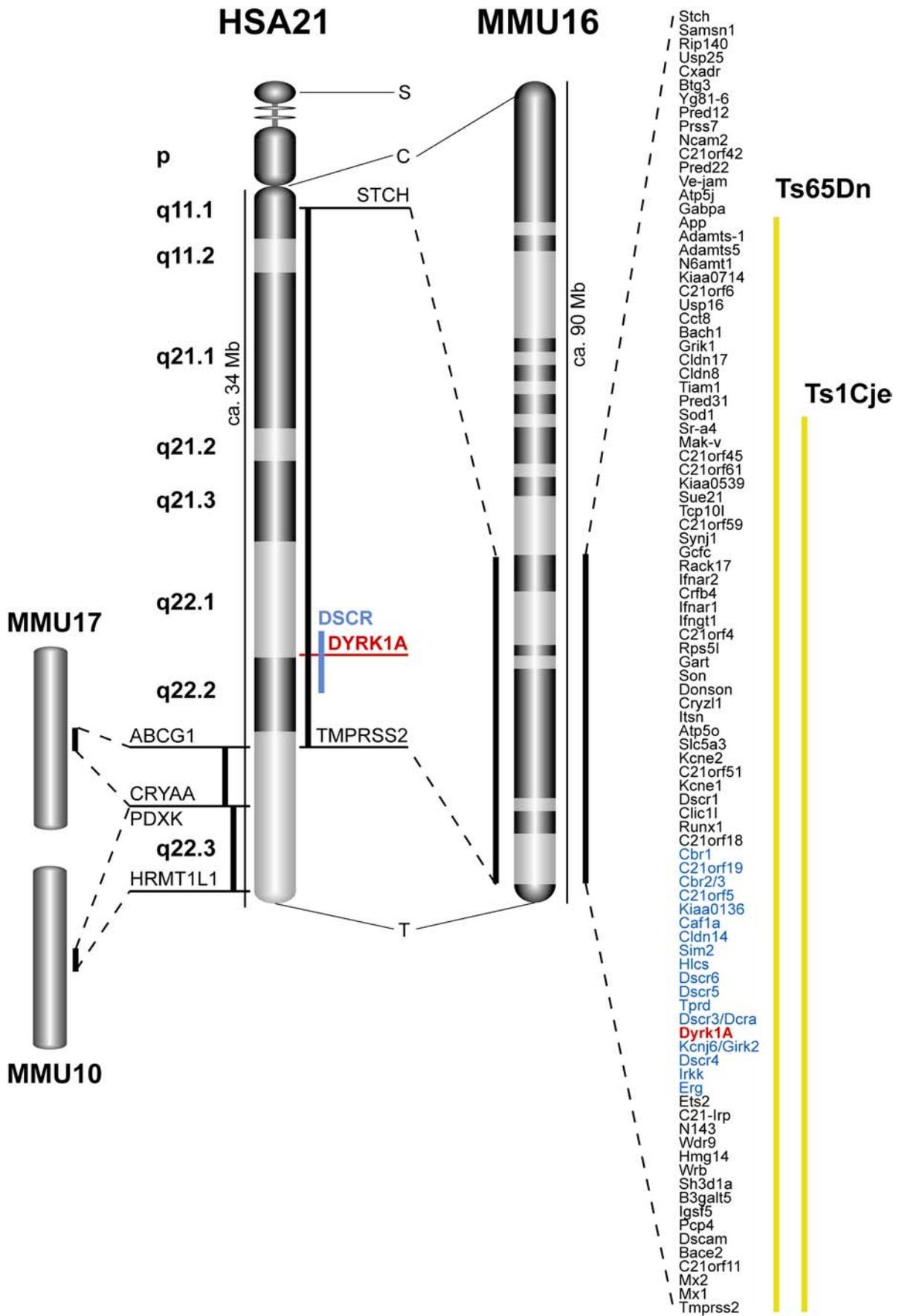


Abbildung 2-2: Das humane Chromosom 21 und die entsprechenden Regionen konservierter Syntänie der Chromosomen 16, 10 und 17 der Maus

Abbildung 2-2 (vorige Seite): Das humane Chromosom 21 und die entsprechenden Regionen konservierter Syntänie der Chromosomen 16, 10 und 17 der Maus

Verzeichnet sind die bekannten Gene, die auf dem humanen Chromosom 21 (HSA21) und dem Chromosom 16 der Maus (MMU16) vorkommen, sowie die Regionen von HSA21, deren Pendant auf den Chromosomen 10 (MMU10) und 17 (MMU17) der Maus liegen, mit den diese Regionen begrenzenden Genen. Markiert (gelbe Balken) sind diejenigen Gene, die in Ts65Dn- bzw. in Ts1Cje-Mäusen in drei Kopien vorkommen, weiterhin (blau) die DSCR (*Down Syndrome Critical Region*); *DYRK1A* (human) und *Dyrk1A* (Maus) sind rot markiert. S: Satellit, C: Centromer, T: Telomer. Nicht maßstabsgetreu. Modifiziert nach Antonarakis *et al.*, 2001; Hattori *et al.*, 2000; Mural *et al.*, 2002.

Das humane Chromosom 21 und das Chromosom 16 der Maus, auf dem die der DSCR entsprechende Region liegt, wurden inzwischen vollständig sequenziert und in mehreren Studien miteinander verglichen (Toyoda *et al.*, 2002; Mural *et al.*, 2002; Hattori *et al.*, 2000). Mit *in silico*- und *in vitro*-Methoden wurden detaillierte Karten der Gene in der DSCR erstellt (Dahmane *et al.*, 1998; Ohira *et al.*, 1997). Dabei ist die Anordnung der meisten Gene konserviert; allerdings wurde nicht zu allen humanen Genen in der DSCR ein orthologes Gen der Maus in der entsprechenden Region gefunden. Zur weiteren Charakterisierung der auf dem humanen Chromosom 21 vorhandenen Gene wurden kürzlich Expressionsanalysen der orthologen Gene in der Maus mittels *in situ*-Hybridisierung vorgenommen (Gitton *et al.*, 2002; Reymond *et al.*, 2002).

2.1.2 Mentale Retardierung und kognitive Defizite als Bestandteil des Down-Syndroms

Die Trisomie 21 ist mit einer Inzidenz von 1:700 die häufigste genetische Ursache mentaler Retardierung beim Menschen. Das Down-Syndrom ist durch eine Vielzahl genetisch bedingter Merkmale charakterisiert, die unter anderem die Entwicklung, Struktur und Funktion des Nervensystems betreffen (Übersicht in Epstein, 1995). So wurden ein proportional zur Körpergröße – die bei Down-Syndrom-Individuen geringer ist – verringertes Gehirnvolumen und –gewicht, eine reduzierte Anzahl und Dichte von Neuronen sowie eine anomale Zytoarchitektur des cerebralen Cortex, vor allem der Laminae II und IV, beschrieben (Raz *et al.*, 1995; Wisniewski, 1990). Darüber hinaus weisen Individuen mit Down-Syndrom ein überproportional verkleinertes Cerebellum auf. Sie zeichnen sich ferner durch einen reduzierten Intelligenzquotienten, Störungen des Sprachvermögens und eine Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses aus (Carlesimo *et al.*, 1997). In vergleichsweise geringem Alter (nach der dritten Dekade) kommt es zur Degeneration von cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn und dem Auftreten histopathologischer Veränderungen, die denen der Alzheimer-Krankheit gleichen. Kinder mit Down-Syndrom erreichen die Meilensteine der motorischen und geistigen Entwicklung verzögert; die mentale Entwicklung erreicht in der Regel im Alter von 10 bis 15 Jahren ein Plateau. Im Alter wurden ein

progressiver Verlust intellektueller Fähigkeiten und der Sprachrezeption sowie eine verringerte Fähigkeit zur Bildung eines Langzeitgedächtnisses und eine schlechtere visuell-räumliche Orientierung auch ohne Auftreten einer Alzheimer-Demenz beschrieben. Vicari *et al.* nahmen eine genauere Untersuchung des Langzeitgedächtnisses in jungen Erwachsenen mit Down-Syndrom vor. Dabei fanden sie im Vergleich zu Kindern von entsprechendem mentalen Alter ähnliche Leistungsfähigkeiten des impliziten Gedächtnisses, aber schlechtere Fähigkeiten des expliziten (Vicari *et al.*, 2000). Auf der Suche nach einem neuroanatomischen Korrelat dieser Defizite fanden Raz *et al.* in einer Magnetresonanztomographie-Studie, ebenfalls an jungen Erwachsenen mit Down-Syndrom, folgende, für das Down-Syndrom spezifische Veränderungen: reduzierte Volumina der cerebralen und cerebellären Hemisphären, des ventralen Pons, der Corpora mamillaria und Hippocampusformation nach Normierung der Werte auf die Körpergröße. Der Gyrus parahippocampalis hingegen war in den Down-Syndrom-Individuen größer als in der Kontrollgruppe; das Volumen des Gyrus parahippocampalis korrelierte negativ mit dem allgemeinen Intelligenzniveau und den sprachlichen Fähigkeiten. Hingegen wurde keine Beziehung zwischen der Größe des gesamten Gehirnes und den kognitiven Fähigkeiten gefunden (Raz *et al.*, 1995).

2.1.3 Down-Syndrom-Tiermodelle

Für ein besseres Verständnis der für die Symptome des Down-Syndroms verantwortlichen Gene und Mechanismen sind Untersuchungen an Tiermodellen notwendig, da nur nach einer gezielten Manipulation der Expression einzelner Gene deren Beitrag zum Phänotyp der mentalen Retardierung analysiert werden kann. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Maus-Modelle des Down-Syndroms etabliert, deren Phänotyp in einer Reihe von Übersichtsartikeln ausführlich beschrieben wurde (Galdzicki *et al.*, 2001; Dierssen *et al.*, 2001; Kola & Pritchard, 1999):

Mäuse-Embryonen mit einer Trisomie 16 haben einige phänotypische Merkmale, die denen von Menschen mit Down Syndrom ähneln. Allerdings sterben diese Embryonen *in utero*, so daß dieses Modell nur zur Analyse der frühen Entwicklung geeignet ist. Außerdem sind auf dem Chromosom 16 der Maus eine Reihe von Genen lokalisiert, die beim Menschen nicht auf Chromosom 21 liegen.

In der Folge wurden zwei Mauslinien generiert, die eine partielle Trisomie 16 aufweisen, erstens die Linie Ts65Dn, in der der Bereich von *App* bis *Mx1/Tmprss2* in drei Kopien vorkommt, und zweitens die Linie Ts1Cje, hier liegt der Bereich von *Sod1* bis *Mx1* dreifach vor (s. Abbildung 2-2). Beide Modelle verfügen dementsprechend auch über drei Kopien von *Dyrk1A*.

Ts65Dn-Mäuse weisen eine Reihe von Merkmalen auf, die denen des Down-Syndroms ähneln, darunter Defizite in verschiedenen Lern- und Gedächtnistests – so im Hippocampus-abhängigen räumlichen Lernen sowie im Arbeits- und Langzeitgedächtnis (Reeves *et al.*, 1995; Escorihuela *et al.*, 1995; Escorihuela *et al.*, 1998). Außerdem konnten Hyperaktivität, ein Mangel an Flexibilität im Lernverhalten, eine verringerte Antwort auf nozizeptive Stimuli, Degeneration cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn, ein reduziertes Volumen des Kleinhirnes und eine veränderte Morphologie des Gesichtsschädels gezeigt werden (Baxter *et al.*, 2000; Dierssen *et al.*, 2001; Kola & Pritchard, 1999). Costa *et al.* konnten in einer Analyse der Motorik der Ts65Dn-Mäuse Defizite nachweisen, die insbesondere die motorische Koordination und die Regulation des Gleichgewichts betreffen, ähnlich wie dies auch bei Down-Syndrom-Individuen der Fall ist.

Die in den Ts1Cje-Mäusen in drei Kopien vorhandene Region ist etwas kleiner als die in Ts65Dn-Mäusen. Auch Ts1Cje-Tiere weisen Defizite in Lernen und Gedächtnis auf, die in Untersuchungen im *Morris water maze* erkannt wurden. Allerdings zeigen die Ts1Cje-Mäuse hier nur in der Version mit nicht sichtbarer Plattform zum Test von räumlichem Lernen Defizite und nicht – wie dies bei Ts65Dn-Mäusen der Fall ist – in allen eingesetzten Versionen inklusive der zum Test von nicht-räumlichem Lernen mit sichtbarer Plattform (Galdzicki *et al.*, 2001).

Um die für die kognitiven Defekte verantwortlichen Gene in der DSCR des humanen Chromosoms 21 mit dosisabhängiger Funktion näher zu bestimmen, wurden transgene Mäuse mit YACs (*Yeast artificial chromosomes*) generiert, die jeweils eine Kopie einzelner Regionen der Bande 21q22.2 des menschlichen Chromosoms 21 zusätzlich zu ihrem Genom besitzen (Smith *et al.*, 1995). Auf diese Weise wurden vier transgene Mauslinien etabliert, von denen zwei Lern- und Gedächtnisdefizite zeigten. Eine dieser Linien verfügt über eine zusätzliche Kopie einer 180kb-Region der Bande 21q22.2, in der das *DYRK1A*-Gen liegt (Smith & Rubin, 1997a; Smith *et al.*, 1997). Die Fähigkeit der transgenen Mäuse zu räumlichem Lernen war im *Morris water maze* leicht beeinträchtigt; in der reversen Version, welche ein Test für die Flexibilität eines erlernten Verhaltens ist, waren die Leistungen der *DYRK1A*-YAC-transgenen Mäuse dagegen deutlich schlechter als die von Kontrollmäusen und von solchen YAC-Transgenen, die andere Bereiche der DSCR in ihrem Genom aufweisen.

2.2 *Dyrk1A*, ein Vertebratenhomolog des *Drosophila*-Gens *minibrain*

2.2.1 Klonierung der *minibrain*-/*Dyrk*-Gene

Minibrain (*mnb*) ist die Bezeichnung einer *Drosophila*-Mutante, die 1979 erstmals beschrieben wurde (Heisenberg & Böhl, 1979). Das entsprechende Gen wurde 1995 kloniert (Tejedor *et al.*, 1995) und kodiert für die Proteinkinase MNB, die als Begründerin einer neuen Familie von Kinasen angesehen wird. *Minibrain*-Mutanten weisen eine gestörte Neurogenese auf: Im Larvenstadium kommt es zu einer veränderten Anordnung von Neuroblasten im äußeren Proliferationszentrum (*outer proliferation center*, OPC). In der Folge produzieren die OPC-Neuroblasten der *minibrain*-Mutanten weniger Neurone als in Wildtyp-Kontrollen. Dies führt letztendlich zu einer spezifischen und deutlichen Größenreduktion der optischen Loben und der zentralen Gehirnhemisphären (s. Abbildung 2-3). Alle vier beschriebenen mutierten Allele des *minibrain*-Gens bedingen eine gegenüber dem Wildtyp auf ungefähr die Hälfte verringerte Expression (Tejedor *et al.*, 1995). *Minibrain*-Mutanten zeigen Defizite im Geruchsunterscheidungs-Lernen sowie Hypoaktivität.

Unabhängig von den Untersuchungen an *Drosophila* wurde 1995 in einer PCR-basierten Suche zur Identifizierung neuer Proteinkinasen eine Kinase entdeckt und *Dyrk* (*Dual specificity Yak1-related kinase* oder *Dual specificity tyrosin (Y)-regulated kinase*) benannt (Kentrup *et al.*, 1996; Becker & Joost, 1999). Inzwischen wurden die zum *Drosophila-minibrain*-Gen homologen Gene von Maus und Mensch identifiziert und eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 99 % von deren Produkten untereinander und mit dem *Dyrk1A*-Protein aus der Ratte festgestellt. Die Übereinstimmung von *Dyrk1A* mit dem *Drosophila*-MNB-Protein beträgt in der Kinase-Domäne 85 %. Das humane *DYRK1A*-Gen wurde auf dem Chromosom 21 in der Region 21q22.2 – jener Region, die für die mit

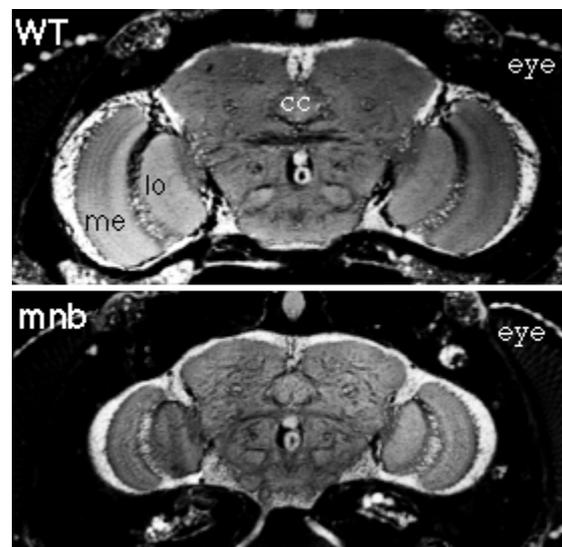


Abbildung 2-3: Die *Drosophila*-Mutante *minibrain*

Die Abbildung zeigt einen Schnitt durch den Kopf einer *minibrain*-Mutante (*mnb*, unten) im Vergleich zu einer Wildtyp-*Drosophila* (WT, oben). Deutlich zu erkennen ist das kleinere Gehirn infolge der *minibrain*-Mutation bei unveränderter Kopfgröße. cc: *central complex* (Zentralkomplex); me: Medulla; lo: Lobula; aus Tejedor *et al.*, 1995.

dem Down-Syndrom einhergehenden neuronalen Defekte eine wichtige Rolle spielt (s. o.), – und das Gen der Maus in der entsprechenden Region auf dem Chromosom 16 lokalisiert (Shindoh *et al.*, 1996; Guimera *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1996 bzw. Song *et al.*, 1997). *DYRK1A* besteht aus 14 Exons, die im humanen Genom über 150 kb verteilt sind. In Gehirnen von Down-Syndrom-Individuen konnte eine im Vergleich mit dem euploiden Zustand 1,5fach und in Ts65Dn-Maus-Gehirnen eine 2,1fach erhöhte Expression auf der Ebene der mRNA nachgewiesen werden (Guimera *et al.*, 1999).

Außerdem wurden weitere Gene mit einer geringeren Ähnlichkeit zum *Drosophila-minibrain*-Gen identifiziert. Nach dem heutigen Kenntnisstand ist das *minibrain*-Homolog *Dyrk1A* Mitglied einer Familie von Proteinkinasen, die in Säugern von mindestens sechs Genen gebildet wird (Becker *et al.*, 1998; W. Becker, persönliche Mitteilung). Dabei ist allein das *Dyrk1A*-Gen auf Chromosom 21 (Mensch) bzw. Chromosom 16 (Maus) lokalisiert. Die Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Mitgliedern der Dyrk-Familie besteht hauptsächlich in der Sequenz der zentralen Kinase-Domäne, während sich die N- und C-Termini teilweise deutlich unterscheiden (Becker *et al.*, 1998; Becker & Joost, 1999).

2.2.2 Strukturelle und enzymatische Eigenschaften von Dyrk1A

Die Kinasen der Dyrk-Familie sind in der Lage, sowohl Tyrosin- als auch Serin- und Threoninreste zu phosphorylieren. Ein Charakteristikum der Dyrk-Kinasen ist ein Motiv bestehend aus den Aminosäureresten Tyrosin-X-Tyrosin (YXY, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht), welches in seiner Position (Aminosäurereste 319 bis 321 in Dyrk1A von Maus, Ratte und Mensch) zwischen den konservierten Kinase-Subdomänen VII und VIII dem Motiv Threonin-X-Tyrosin der regulatorischen Schleife der MAP-Kinasen entspricht (Kentrup *et al.*, 1996). Es wurde postuliert, daß über die Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste des YXY-Motivs der Dyrk-Kinasen deren Aktivität reguliert wird (Becker & Joost, 1999) – ebenso wie dies bei den MAP-Kinasen mittels Phosphorylierung des Threonin- und des Tyrosinrestes geschieht (Canagarajah *et al.*, 1997). Himpel *et al.* allerdings konnten per Massenspektrometrie zeigen, daß Dyrk1A, in COS-7-Zellen überexprimiert, nur an Y-321 phosphoryliert ist, nicht aber an Y-319, sowie daß die Mutation von Y-321 zu Phenylalanin (Y321F) die Aktivität von Dyrk1A drastisch reduziert, nicht aber die Mutation Y319F. In einer katalytisch inaktiven Mutante (Dyrk1A^{K188R}) konnte kein Phosphotyrosin detektiert werden (Himpel *et al.*, 2001). Zu diesen Befunden paßt auch, daß zwar Phosphotyrosin-321 in einem dreidimensionalen Modell von Dyrk1A mit den Argininresten an den Positionen 325 und 328 interagieren kann, für Y-319 bzw. für dessen phosphorylierte Form aber keine solchen Interaktionspartner in diesem Modell vorhanden sind (Himpel *et al.*, 2001). So scheint in Dyrk1A nur Y-321, nicht aber Y-319, phosphoryliert zu werden – und zwar durch Dyrk1A per

Autophosphorylierung – und die Aktivität von Dyrk1A zu regulieren. Inwieweit diese Autophosphorylierung von Dyrk1A durch weitere Proteine, wie Kinasen oder Phosphatasen, oder andere Stimuli beeinflusst wird und ob neben der Autophosphorylierung noch eine Phosphorylierung durch andere Kinasen eine Rolle spielt, ist zur Zeit noch nicht geklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, daß Dyrk1A in H19-7-Zellen nach Applikation von FGF-2 phosphoryliert und aktiviert wird (Yang *et al.*, 2001; s. 2.2.4). Autophosphoryliert wird auch der Aminosäurerest Y-111. Die Funktion dieser Phosphorylierung ist allerdings unklar, da die nichtphosphorylierbare Mutante Dyrk1A^{Y111F} sich hinsichtlich ihrer Aktivität und Lokalisation (als GFP-Fusionsprotein) nicht vom Wildtyp-Dyrk1A unterscheidet (Himpel *et al.*, 2001).

Die Aktivität von Dyrk1A scheint in unterschiedlichen Zelllinien auf verschiedene Weise reguliert zu sein: Im Gegensatz zu den Daten von Yang *et al.*, die eine Aktivierung von Dyrk1A in H19-7-Zellen durch FGF-2 zeigen, ist Dyrk1A in unstimulierten HEK293-Zellen nach Woods *et al.* (Woods *et al.*, 2001b) konstitutiv aktiv; nach Transfektion in COS-7-Zellen wurde Dyrk1A von Himpel *et al.* (Himpel *et al.*, 2001) vollständig an Y-321 phosphoryliert gefunden und ist somit, da die Phosphorylierung dieses Restes die Aktivität reguliert, auch hier offenbar konstitutiv aktiv.

In einem *in vitro*-Kinase-Test wurde gezeigt, daß die Aktivität von Dyrk1A durch Epigallocatechin-3-gallat, einen polyphenolischen Bestandteil von Tee, deutlich gehemmt wird; weiterhin waren die Kinase-Inhibitoren Roscovitine und Purvalanol A zur Hemmung von Dyrk1A wirksam (Bain *et al.*, 2003).

Es konnte – ebenfalls in *in vitro*-Experimenten – weiterhin nachgewiesen werden, daß Dyrk1, Dyrk2 und Dyrk3 sowie MNB Histone phosphorylieren können, wobei sich die Spezifität der Dyrk-Familienmitglieder für verschiedene Histone unterscheidet (Becker *et al.*, 1998); dies deutet auf unterschiedliche Substratspezifitäten der Dyrk-Kinasen auch *in vivo* und dementsprechend auf unterschiedliche Rollen dieser Proteine hin. Diese *in vitro*-Ergebnisse bedeuten allerdings nicht, daß die Histone auch physiologische Substrate der Dyrk-Kinasen sind. Neben diesen reinen *in vitro*-Experimenten wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen weitere Studien über Dyrk1A-Substrate – teils *in vitro*, teils *in vivo* – durchgeführt (s. u.).

Himpel *et al.* konstruierten eine Peptid-Bibliothek mit Varianten einer Sequenz, die einen in Histon H3 als Dyrk1A-Substrat identifizierten Threoninrest umgibt, und analysierten die Fähigkeit von Dyrk1A, diese Peptide *in vitro* zu phosphorylieren. Dabei konnte Dyrk1A Peptide mit der Konsensussequenz RPX^{S/I}-P am effizientesten phosphorylieren (Himpel *et*

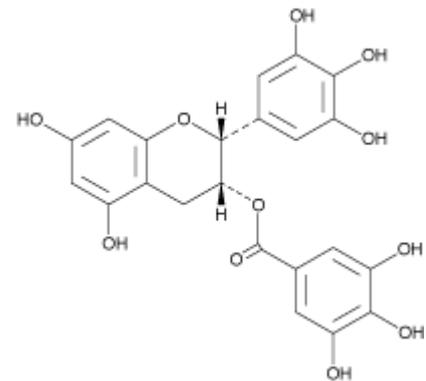


Abbildung 2-4:
Epigallocatechin-3-gallat

Epigallocatechin-3-gallat ist ein potenter Dyrk1A-Inhibitor, der in Tee enthalten ist.

al., 2000). Auch hier zeigt sich eine auffallende Ähnlichkeit zu der MAP-Kinase ERK2, deren Substrate die Konsensussequenz $PX^S/T/P$ haben, und gleichzeitig ein wichtiger Unterschied in der Substratspezifität, denn der Argininrest an der Position -3 relativ zum phosphorylierten Serin oder Threonin ist für Dyrk1A zur Erkennung eines Substrates notwendig. Dyrk2 und Dyrk3 weisen zu Dyrk1A ähnliche, aber nicht identische Substratspezifitäten auf. So fehlt in den Substrat-Konsensussequenzen dieser beiden Kinasen das Prolin an der Position -2 (Campbell & Proud, 2002).

Dyrk1A, Dyrk1B und MNB unterscheiden sich von den übrigen Familienmitgliedern auch dadurch, daß sie eine Signalsequenz für die nukleäre Lokalisation enthalten (Becker *et al.*, 1998; Leder *et al.*, 1999).

Aufgrund der Existenz einer Leucin-reichen Sequenz wurde vermutet, daß die Dyrk-Proteine DNA-bindende Proteine sind, die über eine *Leucine zipper*-Domäne dimerisieren könnten (Guimera *et al.*, 1999), wie dies bei den Transkriptionsfaktoren der *Leucine zipper*-Familie der Fall ist. Während die Dimerisierung inzwischen in einem *Yeast two-hybrid*-Experiment nachgewiesen werden konnte (Song *et al.*, 1997), erscheint es nach heutigem Kenntnisstand eher unwahrscheinlich, daß die Dyrk-Proteine über die Leucin-reiche Domäne dimerisieren, da anhand von Sequenzvergleichen mit anderen Kinasen, deren Sekundär- und Tertiärstruktur bekannt ist, festgestellt wurde, daß die in Frage kommenden Leucin-Reste nicht innerhalb einer α -Helix liegen, wie dies für die Bildung einer *Leucine zipper*-Domäne notwendig wäre (Becker & Joost, 1999). Auch ein dreidimensionales Modell von Dyrk1A, das mit Hilfe der bekannten Struktur der MAP-Kinase ERK2 aufgestellt wurde (Himpel *et al.*, 2001), lieferte keine Hinweise auf die Existenz einer *Leucine zipper*-Domäne. Somit ist ungeklärt, über welche Domäne eine Dimerisierung erfolgen könnte.

2.2.3 Expression und Lokalisation von Dyrk1A

Mehrere Gruppen haben in den vergangenen Jahren die Lokalisation der Dyrk-Proteine und der entsprechenden mRNAs in Mensch, Ratte und Maus untersucht. Dabei ergab sich folgendes Expressionsmuster: Dyrk1A wurde auf mRNA-Ebene in der Ratte (Becker *et al.*, 1998) und auf Protein-Ebene in Maus (Rahmani *et al.*, 1998) und Ratte (Okui *et al.*, 1999) in allen untersuchten Geweben, sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus, gefunden und scheint demnach ubiquitär exprimiert zu sein. Guimera *et al.* (Guimera *et al.*, 1999) fanden *DYRK1A* im Menschen besonders stark in Gehirn, Herz und Hoden exprimiert. Im Gehirn war in allen untersuchten Regionen eine Expression nachzuweisen. Dagegen wurden die mRNAs der übrigen Dyrk-Familienmitglieder bisher nur im Hoden der Ratte nachgewiesen (Becker *et al.*, 1998). Neuere Daten deuten allerdings darauf hin, daß das Dyrk1B-Protein auch im Hirn der Ratte zu finden ist (W. Becker,

persönliche Mitteilung). Mittels Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung wurde im Gehirn der Maus eine hohe Dyrk1A-Expression in Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Pyramidenzellen des Hippocampus und einigen hypothalamischen Nuclei gezeigt (Rahmani *et al.*, 1998; Guimera *et al.*, 1996). Rahmani *et al.* (1998) beschreiben, konsistent mit der Existenz einer nukleären Lokalisationssequenz (Kentrup *et al.*, 1996) eine nukleäre Dyrk1A-Immunreaktivität in hippocampalen und cerebellären Neuronen.

Für Dyrk1A (Becker *et al.*, 1998; Kentrup *et al.*, 1996) und Dyrk1B (Leder *et al.*, 1999) wurde die nukleäre Lokalisation auch mit Hilfe von GFP-Fusionen, die in Zelllinien überexprimiert wurden, nachgewiesen. Auffällig war dabei, daß Dyrk1A ausschließlich im Zellkern zu finden war, während Dyrk1B zwar vornehmlich nukleär, aber auch in geringer Konzentration zytoplasmatisch nachgewiesen werden konnte. Weiterhin zeigte die Fluoreszenz der Dyrk1A-GFP-Fusionsproteine ein gepunktetes Muster; Dyrk1A ist also nicht homogen im Nukleus verteilt. Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß der N-Terminus von Dyrk1A (Aminosäuren 1-176) für die Lokalisation in dem nukleären Subkompartiment ausreichend und notwendig ist (Becker *et al.*, 1998).

Auch eine induzierbare Translokation in den Zellkern nach Phosphorylierung wie im Falle der MAP-Kinasen (Khokhlatchev *et al.*, 1998) wurde für Dyrk1A in PC12-Zellen und in Neuronen im Gehirn der Maus gezeigt (Bartsch *et al.*, 1998). An welchem Aminosäurerest diese Phosphorylierung allerdings stattfindet ist bisher nicht geklärt, denn sowohl die Deletionsmutante Dyrk1A¹⁻¹⁷⁶ als auch die Punktmutanten Dyrk1A^{Y321F} und Dyrk1A^{K188R} sowie Dyrk1A^{Y111F} lassen sich hinsichtlich ihrer Lokalisierung nicht von Wildtyp-Dyrk1A unterscheiden (Becker *et al.*, 1998; Himpel *et al.*, 2001; W. Becker, persönliche Mitteilung). Auch ist bisher nicht geklärt, inwieweit die von Bartsch *et al.* beschriebene nukleäre Translokation von Dyrk1A mit einer Aktivierung korreliert; die nukleäre Lokalisation der katalytisch inaktiven Mutanten Dyrk1A¹⁻¹⁷⁶ und Dyrk1A^{K188R} in HEK293- und COS-7-Zellen deuten allerdings darauf hin, daß Aktivität und Lokalisierung von Dyrk1A unterschiedlich reguliert werden.

2.2.4 Bekannte mit Dyrk1A interagierende Proteine

Zu Beginn dieser Arbeit waren weder Dyrk1A-Substrate noch Aktivatoren oder Inhibitoren von Dyrk1A bekannt. In den vergangenen Jahren konnte allerdings eine Reihe von Substraten identifiziert werden:

2.2.4.1 STAT3

Matsuo *et al.* stellten 2001 eine Suche nach Kinasen an, die STAT3 an Serin-727 phosphorylieren (Matsuo *et al.*, 2001). STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in inaktiver Form im Zytoplasma vorliegt und nach Aktivierung durch Zytokine der IL-6-Familie, die an den gemeinsamen Rezeptor gp130 binden, durch mit diesem Rezeptor assoziierte Tyrosinkinase der JAK-Familie phosphoryliert wird. Daraufhin dimerisiert STAT3, transloziert in den Nukleus und aktiviert dort verschiedene Gene (Übersicht in Levy & Darnell, 2002). Neben der Phosphorylierung an Tyrosin wird STAT3 auch an Serin-727 phosphoryliert; die Phosphorylierung an Serin-Resten scheint ebenfalls die Aktivität der STATs zu regulieren (Wen *et al.*, 1995; Wen & Darnell, 1997). In einem Verfahren in *E. coli* zur Identifizierung von Kinasen, die STAT3 an Serin-727 phosphorylieren, fanden Matsuo *et al.* mehrere Klone, die für einen Teil von Dyrk1A inklusive der Kinase-Domäne, aber ohne die äußeren N- und C-Termini, kodieren. Sie konnten die Phosphorylierung von STAT3 an Serin-727 in Säuger-Zellen, die mit Expressionsplasmiden für STAT3 und das gefundene Dyrk1A-Fragment transfiziert worden waren, nachweisen, nicht aber die Phosphorylierung von STAT3 durch endogenes Dyrk1A in einem *in vitro*-Kinase-Experiment (Matsuo *et al.*, 2001). So erscheint fraglich, ob STAT3 *in vivo* ein Substrat von Dyrk1A ist.

2.2.4.2 FKHR

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der als Dyrk1A-interagierendes Protein identifiziert wurde, ist FKHR (*forkhead in rhabdomyosarcoma*; Woods *et al.*, 2001b). FKHR und sein naher Verwandter FKHL1 spielen Rollen in der Kontrolle der Genexpression durch Insulin bzw. der Regulation der Apoptose durch Wachstums- und Überlebensfaktoren (Brunet *et al.*, 1999). Diese Signale führen zur Proteinkinase-B-(PKB-/Akt-)katalysierten und Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3-Kinase-)abhängigen Phosphorylierung von FKHR. Diese resultiert in einem Export aus dem Nukleus und in einer Inaktivierung von FKHR. In Experimenten mit Hexahistidin-Fusionsproteinen in HEK293-Zellen zur Untersuchung der Phosphorylierung und des Aktivierungsmechanismus von FKHR fanden Woods *et al.* eine kontaminierende Aktivität, die Serin-329 von FKHR phosphoryliert. Diese Phosphorylierung hat ebenfalls eine Verringerung der Transaktivierung durch FKHR und des FKHR-Anteils im Zellkern zur Folge. Die phosphorylierende Aktivität ist allerdings – im Gegensatz zur durch PKB vermittelten – in HEK293-Zellen konstitutiv vorhanden und wird nicht durch Stimulation mit Insulin verstärkt. Die Autoren konnten zeigen, daß die Aktivität, durch die FKHR an Serin-329 phosphoryliert wird, durch Dyrk1A hervorgerufen wird, daß FKHR und Dyrk1A in

diskreten nukleären Regionen in transfizierten COS-7-Zellen kolokalisieren und daß beide miteinander aus Zellextrakten koimmunpräzipitiert werden können.

2.2.4.3 Tau und eIF2B ϵ

In einer weiteren Studie konnten Woods *et al.* zwei weitere Substrate von Dyrk1A identifizieren (Woods *et al.*, 2001a): die ϵ -Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2B (eIF2B ϵ) und das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau. eIF2B ist ein Guanylnukleotid-Austauschfaktor (GEF, *guanyl nucleotide exchange factor*), der den für die Proteinbiosynthese notwendigen Initiationsfaktor eIF2 regeneriert, indem er den Austausch von gebundenem GDP – in diesem Zustand ist eIF2 inaktiv - durch GTP aktiviert. eIF2B ϵ wird durch das Enzym GSK3 (Glycogen-Synthase-Kinase 3) phosphoryliert und damit inaktiviert. GSK3 wiederum wird nach Stimulation von Zellen mit Insulin, Phorbolestern und Wachstumsfaktoren inaktiviert, was zur Dephosphorylierung von eIF2B ϵ und dessen Aktivierung führt (Welsh *et al.*, 1996). So können diese Stimuli die Proteinbiosynthese-Rate einer Zielzelle erhöhen. Woods *et al.* konnten zeigen, daß eIF2B ϵ durch Dyrk1A und Dyrk2 an Serin-539 phosphoryliert wird, daß diese Phosphorylierung notwendig ist für die nachfolgende Phosphorylierung durch GSK3 an Serin-535 *in vitro* und daß eIF2B ϵ in HeLa-Zellen in hohem Maße an Serin-539 phosphoryliert ist. Außerdem konnten die Autoren zeigen, daß das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau durch Dyrk1A und Dyrk2 *in vitro* an Threonin-212 phosphoryliert wird und daß dies eine Notwendigkeit für die anschließende Phosphorylierung von Tau an Threonin-208 *in vitro* durch GSK3 darstellt. Beide Aminosäurereste sind in Gehirnen von Patienten, die an der Alzheimer-Krankheit litten, verstärkt phosphoryliert (Morishima *et al.*, 1995). Im Falle beider in dieser Studie beschriebenen Substrate, eIF2B ϵ und Tau, weist Dyrk2 eine geringfügig höhere Aktivität als Dyrk1A auf. Außerdem sind beide Substrate ebenso wie Dyrk2 zytoplasmatisch lokalisiert, während Dyrk1A bisher nur im Zellkern beschrieben wurde, so daß die Autoren Dyrk2 mit höherer Wahrscheinlichkeit für die physiologische Kinase von eIF2B ϵ und Tau halten.

2.2.4.4 CREB

In einer *Yeast two-hybrid*-Suche nach Kinasen, die das *cAMP response element-binding protein* (CREB) phosphorylieren, isolierten Yang *et al.* (Yang *et al.*, 2001) einen Klon, der für einen Teil von Dyrk1A kodiert. CREB ist ein Transkriptionsfaktor, der für unterschiedliche Formen der synaptischen Plastizität, wie sie z. B. Lern- und Gedächtnisprozessen zugrunde liegen, von Bedeutung zu sein scheint. CREB kontrolliert die Expression einer Reihe von

Genen und wird durch Phosphorylierung aktiviert (Übersicht in Mayr & Montminy, 2001). Die Phosphorylierung und Aktivierung von CREB und die nachfolgende Induktion von weiteren Genen – die für Regulatoren wie z. B. den Transkriptionsfaktor C/EBP β und für Effektoren wie BDNF kodieren – scheinen wichtige Rollen in der Etablierung des Langzeitgedächtnisses zu spielen (Übersichten in: Lonze & Ginty, 2002; Weeber & Sweatt, 2002; Kandel, 2001). Auch am Wachstum, an der Differenzierung und dem Überleben von Neuronen ist CREB beteiligt (Lonze *et al.*, 2002). Ein *in vitro*-Modellsystem für die neuronale Differenzierung stellt die Zelllinie H19-7 dar, die durch Immortalisierung von embryonalen hippocampalen Neuronen der Ratte etabliert wurde. Diese Zellen differenzieren nach Stimulation mit FGF-2 (*Fibroblast growth factor 2*, Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2) bei 39 °C; die Differenzierung ist abhängig von CREB (Sung *et al.*, 2001). Yang *et al.* konnten zeigen, daß die Aktivität von Dyrk1A während der FGF-2-stimulierten Differenzierung dieser Zellen induziert wird, daß Dyrk1A nach FGF-2-Applikation verstärkt an CREB bindet und dieses aktiviert. Dyrk1A ist außerdem in der Lage, CREB an Serin-133 zu phosphorylieren und daraufhin die Transkription von Genen, die durch CREB reguliert werden, zu stimulieren. Eine Blockierung der Dyrk1A-Aktivierung durch Transfektion einer nicht aktivierbaren, kinasedefizienten Mutante von Dyrk1A (K188R) inhibiert das FGF-2-induzierte Wachstum von Neuriten und die CREB-Phosphorylierung (Yang *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der Aktivierung von Dyrk1A und einer nachfolgenden CREB-Phosphorylierung in der neuronalen Differenzierung im ZNS hin, wie hier am Beispiel der hippocampalen Zelllinie gezeigt.

2.2.4.5 Dynamin

In einem Festphasenverfahren zur Identifizierung von Dyrk1A-Substraten identifizierten Chen-Hwang *et al.* (Chen-Hwang *et al.*, 2002) Dynamin 1 als ein weiteres Dyrk1A-Substrat. Dynamin ist eine GTPase mit einer essentiellen Rolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose und im Recycling synaptischer Vesikel. Die Autoren konnten zeigen, daß Dyrk1A verschiedene Dynamin-1- und Dynamin-2-Isoformen phosphoryliert. Diese Phosphorylierung hat, abhängig von ihrem Ausmaß, unterschiedliche Folgen: Nach schwacher Phosphorylierung bei geringer Dyrk1A-Konzentration bindet Dynamin 1 mit geringerer Affinität an seinen Interaktionspartner Amphiphysin 1. Amphiphysin kommt wie Dynamin in hoher Konzentration in Nervenendigungen vor und scheint als Adapterprotein Dynamin in die Endozytosemaschinerie einzubinden. Starke Phosphorylierung von Dynamin 1 durch Dyrk1A hingegen hat eine stärkere Bindung an Amphiphysin 1 zur Folge. Weiterhin reduziert die Phosphorylierung die Interaktion mit Endophilin 1, welches ebenfalls stark angereichert in Nervenendigungen vorkommt und im Vesikelrecycling eine Rolle zu spielen scheint, während

die Bindung an das aus SH2- und SH3-Domänen bestehende Adapterprotein Grb2 verstärkt wird. Diese Resultate deuten auf eine Rolle von Dyrk1A als Regulator der Endozytosemaschinerie und des Vesikelrecycling hin (Übersichten zu Dynamin u. a.: Wigge & McMahon, 1998; McPherson, 1999; Brodin *et al.*, 2000).

2.2.4.6 Gli1

Zur Untersuchung der zellulären Funktion von Dyrk1A führten Mao *et al.* eine Reihe von Reporter-gen-Experimenten durch (Mao *et al.*, 2002). Sie konnten zeigen, daß der Transkriptionsfaktor Gli1 (*glioma-associated oncogene 1*) mit Dyrk1A interagiert: Dyrk1A steigert die Gli1-abhängige Transkription, nicht aber die durch LEF-1, c-Jun oder Elk vermittelte Transaktivierung. Zu einem Teil beruht der Effekt von Dyrk1A auf die Gli1-induzierte Genexpression darauf, daß Gli1, welches eine nukleäre Exportsequenz (NES) besitzt, durch Dyrk1A phosphoryliert wird und verstärkt im Zellkern akkumuliert. Außerdem hat Dyrk1A auch einen direkten verstärkenden Effekt auf die Aktivität von Gli1. Weiterhin konnten Mao *et al.* zeigen, daß Dyrk1A synergistisch mit Sonic hedgehog (Shh) agiert, welches Gli1 ebenfalls aktiviert (Übersicht über Shh-/Gli1-Signaltransduktion in: Parisi & Lin, 1998; Hahn *et al.*, 1999; Toftgard, 2000). Dieser Synergismus zeigte sich sowohl in der Aktivierung eines Reportergens als auch in der Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen. Dabei scheinen Dyrk1A und der Shh-Signaltransduktionsweg nicht direkt miteinander zu interagieren, da erstens Shh keinen stimulierenden Effekt auf die Phosphorylierung an Tyrosin und damit die Aktivität von Dyrk1A hatte, und zweitens eine kinasedefiziente Mutante von Dyrk1A keinen negativen Effekt auf die Shh-induzierte Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen zu Osteoblasten hatte. So deuten diese Daten darauf hin, daß Gli1 der Regulation durch zwei unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden unterliegt, einerseits der durch Shh aktivierten und andererseits einer, in der Dyrk1A eine Schlüsselrolle spielt.

2.2.5 Hinweise zur Funktion von Dyrk1A

Die physiologische Funktion der Dyrk-Proteine, insbesondere die von Dyrk1A im Gehirn der Säuger, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Anhand der bisherigen Untersuchungen lassen sich allerdings begründete Vermutungen anstellen:

Mehrere Befunde deuten auf eine Rolle von Dyrk-Familienmitgliedern in der Regulation von neuronaler Proliferation und Differenzierung hin: Erstens weisen die Defekte in der postlarvalen Neurogenese der *minibrain*-Mutanten in diese Richtung. Zweitens spielt das Dyrk-homologe Protein Yak1 eine Rolle als negativer Regulator des Zellzyklus in

Saccharomyces cerevisiae (Hartley *et al.*, 1994) und ein weiteres Homologes, YakA, in der Inhibierung der Proliferation und Induzierung der Differenzierung in *Dictyostelium discoideum*. Drittens wird diese These durch eine Studie von Hämmerle *et al.* unterstützt (Hämmerle *et al.*, 2002), die die Expression von *Dyrk1A* während der Entwicklung des Nervensystems des Huhns untersucht haben. Dabei fanden sie eine Expression in drei Regionen, aus denen neuronale Vorläuferzellen stammen: Im Neuralepithel des Neuralrohres, in der Neuralleiste und in den Plakoden. *Dyrk1A* wird während eines einzigen Zellzyklus vor dem Beginn der Neurogenese exprimiert, dabei ist die mRNA während der Mitose asymmetrisch lokalisiert und wird an eine der Tochterzellen nach der Teilung weitergegeben. Hämmerle *et al.* schlagen vor, daß die *Dyrk1A*-Expression einen Übergangsschritt zwischen Proliferation und Neurogenese definiert.

Dyrk1A scheint im Gehirn der Säuger eine wichtige Rolle für kognitive Prozesse, die mit synaptischer Plastizität einhergehen, zu spielen, wie die Interaktion mit CREB (s. o.) sowie die Analyse des humanen Down-Syndroms und der YAC-transgenen Mäuse (s. o.), die verschiedene Bereiche der DSCR in einer zusätzlichen Kopie besitzen (Smith *et al.*, 1997; Smith & Rubin, 1997a), zeigen. Auf eine Beeinflussung von *Dyrk1A* durch neuronale Aktivität und demzufolge auch auf eine Funktion in der synaptischen Plastizität deutet zudem hin, daß nach Metrazol-induzierten Krämpfen eine Phosphorylierung von *Dyrk1A* im Hippocampus der Maus stattfindet und daß eine Depolarisierung von hippocampalen Neuronen sowie NGF³-Applikation in PC12-Zellen eine Phosphorylierung und Translokation in den Zellkern bewirken (Bartsch *et al.*, 1998).

Zur Untersuchung der Funktion von *Dyrk1A* in der Maus wurden ferner unterschiedliche Mauslinien generiert, die *Dyrk1A* entweder überexprimieren oder *Dyrk1A* nicht oder nur in verringertem Maße exprimieren.

Altafaj *et al.* generierten transgene Mäuse, die die *Dyrk1A*-cDNA unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors überexprimieren (Altafaj *et al.*, 2001). Die Untersuchung der Tiere zeigte eine verzögerte craniocaudale Entwicklung des Nervensystems, die sich negativ auf die motorischen Fähigkeiten der Mäuse auswirkte. Bei adulten Tieren wurde Hyperaktivität in Situationen, in denen Wildtyp-Mäuse zu vorsichtigem Verhalten neigen, nachgewiesen. Dies schreiben die Autoren einer Dysfunktion des präfrontalen Cortex zu. Weiterhin wurde eine Beeinträchtigung des räumlichen Lernens und der kognitiven Flexibilität beobachtet, was die Autoren als ein Anzeichen gestörter Funktionen von Hippocampus und präfrontalem Cortex werten. *Dyrk1A*-überexprimierende transgene Mäuse zeigen außerdem eine Störung des Referenz-, nicht aber des Arbeitsgedächtnisses (Altafaj *et al.*, 2001).

³ NGF: *Nerve growth factor*

Weitere Hinweise zur Funktion von Dyrk1A lieferten die *Dyrk1A*-Knockout-Mäuse mit einer Deletion eines Abschnitts des *Dyrk1A*-Gens (Fotaki *et al.*, 2002). Die homozygote Deletion von *Dyrk1A* (*Dyrk1A*^{-/-}) ist embryonal letal; die Mäuse sterben *in utero* zwischen Tag 9,5 und Tag 14,5 der Embryonalentwicklung. Vorher zeigen sie eine Retardierung der Entwicklung; die Größe der Embryonen war um ein Drittel bis die Hälfte reduziert, und verschiedene Organe wie u. a. Gehirn und Herz waren unterentwickelt. In den betroffenen Organen wurde in Wildtyp-Mäusen die Expression von *Dyrk1A* mittels *in situ*-Hybridisierung vom Tag 9,5 an nachgewiesen (Fotaki *et al.*, 2002; Song *et al.*, 1996). Weiterhin zeigen *Dyrk1A*^{-/-}-Mäuse eine verringerte Zahl von β -Tubulin-positiven postmitotischen, differenzierenden Neuronen im Neuralrohr um den Tag E10,5. Dies deutet auf ein Proliferationsdefizit der Neuroblasten oder auf eine Verzögerung der Entwicklung des Nervensystems hin. Die Ursache der Letalität der homozygoten *Dyrk1A*-Deletion konnte nicht geklärt werden; die Autoren spekulieren über einen Hämatopoese- oder Zirkulationsdefekt, da sich bei der Mehrzahl der *Dyrk1A*^{-/-}-Embryonen ein auffällig blasser Dottersack und in vielen Fällen eine Hypertrophie des Perikards zeigten.

Heterozygote *Dyrk1A*-Knockout-Mäuse (*Dyrk1A*^{+/-}) weisen während der Embryonalentwicklung keinen besonderen Phänotyp auf. Dahingegen waren sie während der postnatalen Entwicklung kleiner und leichter als Wildtyp-Mäuse. Das verminderte Gewicht blieb bis in den adulten Zustand bestehen. Eine genauere Analyse der Organe zeigte, daß das Gewicht von Vorderhirn und Herz proportional zum gesamten Körper verringert war, wohingegen das Kleinhirn (mit posteriorem Mesencephalon) und die Leber überproportional leichter waren – also deutlicher in ihrem Gewicht reduziert waren, als allein aufgrund des geringeren Gesamtgewichts der Mäuse zu erwarten gewesen wäre. Die Gehirne der adulten *Dyrk1A*^{+/-}-Mäuse waren um 30 % kleiner. Insbesondere die Größe des Hypothalamus, des mesencephalen Tectums, des Pons und der Medulla oblongata waren geringer als im Wildtyp. Diese geringere Größe konnte auf mikroskopischer Ebene im Colliculus superior auf eine geringere Anzahl an Neuronen und an Afferenzen zurückgeführt werden, während im somatosensorischen Cortex und im ventroposteromedialen (VPM) Thalamuskern eine höhere Dichte an Neuronen gefunden wurden. Verhaltensbiologische Untersuchungen der *Dyrk1A*^{+/-}-Mutanten ergaben ein verzögertes Auftreten verschiedener Reflexe während der postnatalen Entwicklung. Im adulten Zustand wurden in einer Verhaltensanalyse nach dem SHIRPA-Protokoll (Rogers *et al.*, 1997) eine verlängerte Angststarre (*freezing*) und eine verringerte Schreckantwort (*startle-response*) festgestellt (Fotaki *et al.*, 2002).

Diese und die an den *Drosophila*-Mutanten erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, daß sowohl eine erhöhte als auch eine verringerte Gendosis von *Dyrk1A* bzw. *minibrain* neuronale Defekte verursacht.

Die Deletion von *Dyrk1B* hat trotz der starken Ähnlichkeit zu *Dyrk1A* keine auffälligen phänotypischen Konsequenzen (W. Becker, persönliche Mitteilung). Diese Befunde deuten darauf hin, daß *Dyrk1A* und *Dyrk1B* unterschiedliche Funktionen ausüben und *Dyrk1B* einen Verlust von *Dyrk1A* nicht ausgleichen kann, dagegen kann die Deletion von *Dyrk1B* offenbar durch verwandte Gene kompensiert werden.

3 ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion der Proteinkinase Dyrk1A im Gehirn der adulten Säuger zu untersuchen. Hierfür wurden drei Ansätze gewählt:

Analyse der Expression und Lokalisation von Dyrk1A

Es sollten die Expression von Dyrk1A im Gehirn der adulten Maus sowie die intrazelluläre Lokalisation in Neuronen *in situ* und in Zellen in Kultur untersucht werden, um aus dem Expressionsmuster des Gens und der Lokalisation des Proteins sowie der jeweiligen Bedeutung der Regionen, in denen Dyrk1A vorkommt, Rückschlüsse auf die Funktion der Kinase Dyrk1A zu ziehen.

Generierung Dyrk1A konditional überexprimierender Mäuse

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Funktion von Dyrk1A in dieser Arbeit war, transgene Mäuse herzustellen, die über eine dritte Kopie des *Dyrk1A*-Gens in ihrem Genom verfügen. Die Funktion von Dyrk1A ist gendosisabhängig, da sowohl eine verringerte (vgl. *Drosophila-minibrain*-Mutante) als auch eine erhöhte Gendosis (vgl. Down-Syndrom und transgene Mäuse, siehe Einleitung) die Fähigkeiten des Gehirns – insbesondere kognitive Leistungen – beeinträchtigt. Die negativen Auswirkungen der erhöhten Dosis haben im Zusammenhang mit der Pathophysiologie des Down-Syndroms eine besondere Relevanz und stellten daher den Ansatzpunkt für diesen Teil der vorliegenden Arbeit dar. Im Gegensatz zu den von Smith *et al.* (Smith *et al.*, 1997) generierten transgenen Mäusen mit YACs (siehe Einleitung, Abschnitt 2.1.3) sollten im hier beschriebenen Projekt transgene Mäuse hergestellt werden, welche die dritte Kopie von *Dyrk1A* aktivierbar und in begrenzten Regionen des ZNS exprimieren, um die Effekte der erhöhten Gendosis auf neuronale Systeme im adulten Zustand spezifisch und unbeeinflusst durch Entwicklungsdefekte untersuchen zu können.

Identifizierung und Charakterisierung Dyrk1A-interagierender Proteine

Es war weiter geplant, über die Identifizierung möglicher Substrate und Regulatoren der Kinase Dyrk1A deren Funktion näher zu charakterisieren und eine Einordnung in schon beschriebene intrazelluläre Signaltransduktionssysteme vorzunehmen oder mögliche neue

Signaltransduktionswege, an denen Dyrk1A beteiligt sein könnte, zu identifizieren. Interaktionspartner sollten nach der Identifizierung in einem geeigneten System auf die biologische Relevanz der Interaktion hin untersucht werden. Diese molekulare Analyse sollte helfen, das Down-Syndrom besser zu verstehen und möglicherweise Ansatzpunkte zur pharmakologischen Therapie dieses Syndroms ergeben.

4 MATERIAL

4.1 Bezugsquellennachweis

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle (Katalognummer)
-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech, Palo Alto, CA, USA (8619-1)
Agar	GibcoBRL, Eggenstein (30391-023)
Agarose	GibcoBRL, Eggenstein (15510-027)
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa [®] -Wasser	Fresenius AG, Bad Homburg
Autoradiographie-Emulsion NTB-2	Kodak, New Haven, USA
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Co. (214010)
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Co. (211705)
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Co. (212750)
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim (1096176)
Bromphenolblau	MERCK, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Deisenhofen (8076.2)
Chloramphenicol	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	MERCK, Darmstadt
DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)	Roche, Mannheim 236 276
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe (K028.1)
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen (D8906)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
DPX Einbettmedium	Serva, Heidelberg
DTT (Dithiothreitol)	MERCK, Darmstadt (1.120.130.001)

Substanz	Bezugsquelle (Katalognummer)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Deisenhofen (E5134)
Entwicklerlösung D 19	Kodak, New Haven, USA
Essigsäureanhydrid	Sigma, Deisenhofen (A0933)
Ethanol	MERCK, Darmstadt (1.00983.1000)
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll	Sigma, Deisenhofen (F2637)
Fixierlösung	Kodak, New Haven, USA
Formamid	MERCK, Darmstadt (1.09684.2500)
Glutaraldehyd (25%)	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	GibcoBRL, Eggenstein (30393-029)
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe (2316.2)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
L-Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich (A9126)
-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech (8608-1)
L-Histidin	Sigma-Aldrich (H9511)
LIPOFECTAMINE™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe (11668-027)
L-Leucin	Sigma-Aldrich (L1512)
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich (T0254)
Magnesiumchlorid	MERCK, Darmstadt
Maleinsäure	MERCK, Darmstadt (8.003.800.500)
Methanol	MERCK, Darmstadt
Minimal SD Base	Clontech (8602-1)
N,-N-Dimethylformamid	MERCK, Darmstadt
Natriumacetat	MERCK, Darmstadt
Natriumchlorid	MERCK, Darmstadt
Natriumhydroxid	MERCK, Darmstadt
Paraformaldehyd	MERCK, Darmstadt (1.045005.1000)
Phenol	Roth, Karlsruhe (0038.2)
Poly-D-Lysin (MW70,000-150,000)	Sigma, Deisenhofen (P-6407)
ProTags®-Mountflour-Eindeckmedium	Quartett Immunodiagnostics, Berlin (401603095)
Salzsäure	MERCK, Darmstadt
SeaKem-GTG-Agarose	FMC BioProducts, Rockland, ME, USA

Substanz	Bezugsquelle (Katalognummer)
Szintillationslösung	Roth, Karlsruhe (0016.2)
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Triethanolamin (TEA)	Roth, Karlsruhe (6390.1)
Tris (Trishydroxymethyl-aminoethan)	Riedel-de Haen, Seelze (33742)
Trockenperlen	Roth, Karlsruhe (0728.1)
Trypton	GibcoBRL, Eggenstein (50014-034)
Tween 20	Sigma, Deisenhofen (P9416)
Wasserstoffperoxid (30%)	MERCK, Darmstadt (1.072.100.250)
X- α -Gal	Clontech (8061-1)
X-Gal	Roth, Karlsruhe (2315.2)
Xylencyanol	MERCK, Darmstadt
YPD Medium	Clontech (8600-1)
Zeocin [™]	Invitrogen, Karlsruhe (R250-01)

4.1.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle (Katalognummer)
λ -Terminase	TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japan (2810)
λ -Terminase	Epicentre Technologies, Madison, USA (LT4450)
DNase I, RNase-frei	Roche, Mannheim (84105421-23)
Herculase	Stratagene, La Jolla, USA (600260)
Pfu Turbo	Stratagene, La Jolla, USA (600250)
Proteinase K	Roth, Karlsruhe (7528.2)
Restriktionsenzyme inkl. 10x Puffer	NEB, Beverly, MA, USA (verschiedene)
RNase A	Roche, Mannheim (109142)
RNasin	Promega, Mannheim (10154206)
Streptavidin-AP	Roche, Mannheim (85777720)
Superscript [™] II Plus Reverse Transkriptase	GibcoBRL, Eggenstein (18064-022)
T3-, T7-RNA-Polymerase	Roche, Mannheim (85121525-22 / 85502020-45)
T4 DNA-Ligase	NEB, Beverly, MA, USA (202S)

Enzym	Bezugsquelle (Katalognummer)
T4 DNA-Polymerase	NEB, Beverly, MA, USA (203S)
Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim (1647679)
TdT (Terminale desoxynukleotidyl-Transferase)	GibcoBRL, Eggenstein (10533-065)

4.1.3 Nukleotide und Nukleinsäuren

Nukleotide / Nukleinsäuren	Bezugsquelle (Katalognummer)
α - ³² P-dCTP	Amersham
α - ³⁵ S-UTP	NEN Lifescience, Boston, USA (NEG039H)
Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche, Mannheim (1277049)
DIG RNA labeling mix	Roche, Mannheim (1277073)
DNA-Längenstandards:Marker X Smart Ladder MidRange II PFG Marker Lambda Ladder PFP Marker	Roche, Mannheim (1498037) Eurogentec, Belgien (MW-1700-02) NEB, Beverly, MA, USA (N3552S) NEB, Beverly, MA, USA (N0340S)
Heringssperma-DNA	Roche, Mannheim (85346024-39)
Oligo(dT) ₁₅ -Primer	Roche, Mannheim (814 270)
Ribonukleotide (rATP, rCTP, rGTP, rUTP)	Roche, Mannheim (85730020-50)
tRNA	Roche, Mannheim (84694421-87)

4.1.4 Kits und sonstiges Verbrauchsmaterial

Kit / Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle (Katalognummer)
Bakterienkulturschalen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Chemilumineszenzsubstrat ECL	Amersham (RPN 2109)
Deckgläschen (f. Zellkultur)	Roth (P231.1)
Deckgläser (f. Histologie)	Fisher Scientific
DIG Control Teststrips	Roche, Mannheim (1669966)
DIG Quantification Teststrips	Roche, Mannheim (1669958)
Einbettmedium	Medite, Burgdorf (CBK12.300)

Kit / Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle (Katalognummer)
Einmalpipetten	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Elektroporationsküvetten f. Bakterien- und Hefezellen, 2 mm Elektrodenabstand	Peqlab, Erlangen (71-1020)
Elektroporationsküvetten f. Säugerzellen	Peqlab, Erlangen (71-1030)
EndoFree™ Plasmid Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
Falcon®-Gefäße	Becton Dickinson
Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Glaskügelchen	Sigma, Deisenhofen (G-8772)
Hybond-N ⁺	Amersham (RPN 203 B)
Parafilm M	American National Can TM , Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Peske, Aindling-Pichl (20-001)
peqGOLD RNAPure	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PSI CLONE BAC DNA Mini isolation-Kit	emp Biotech, Berlin (PP-120)
PVDF-Membran Immobilon P	Millipore, Eschborn (PVH 00010)
QIAfilter™ Plasmid Kit (Midi und Maxi)	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quick Ligation Kit	NEB, Beverly, USA (M2200S)
Random Primers DNA Labeling System	GibcoBRL, Eggenstein (18187-013)
Reaktionsgefäße (1,5 / 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Biomax MR	Kodak, New Haven, USA (V1435726)
Sterilfilter 0,45 µm	Sartorius, Göttingen (17598)
SuperFrost® Plus Objekträger	Fisher Scientific
TSA Biotin System	NEN Lifescience, Boston, USA (NEL700)
Vector® M.O.M.™ Immunodetection Kit, Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame, USA (PK-2200)
Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I	Vector Laboratories, Burlingame, USA (SK-5100)

4.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Typ 24	Melag, Berlin
Elektrophoresekammern für DNA	MWG-Biotech, Ebersberg
Entwicklermaschine	3M, USA
Gefrierschrank (-140°C)	Heraeus, Hanau
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Ochsenbach
Gefrierschränke (-80°C)	Heraeus, Hanau
Geldokumentationssystem Gel Print 2000i	MWG-Biotech, Ebersberg
Gelelektrophorese-Kammer (f. SDS-PAGE) und Blotting-Apparatur Mini PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad (165-3301)
Gene Pulser II	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Glaswaren	Schott, Mainz
Heizblöcke Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Heizer / Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Inkubationsofen 400 HY	Bachhofer, Reutlingen
Kryostat HM 560	Microm, Walldorf
Kühlschränke (4°C)	Liebherr, Ochsenbach
Kühlzentrifuge J2-MC (Rotoren: JLA-16.250 / JA-20)	Beckman Instruments, USA
Laser scanning system LSM 510	Carl Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop DMRB	Leica, Solms
Netzgeräte	Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR-Geräte Robo Cycler Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
pH-Meter pH 538	WTW, Weilheim
Photometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten	Gilson, USA
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Roth, Karlsruhe
Pulsed Field Electrophoresis System CHEF- Mapper® XA	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 CN	Seral, Ransbach-Baumbach
Schüttler/Schwenker Unimax 2010, Polymax 1040, REAX 2	Heidolph, Nürnberg

Gerät	Hersteller
Szintillationsmesser	Beckman Instruments, USA
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Vortex MS1 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen 40SM-200A / LP 4200 S	Precisa, Dietikon, Schweiz / Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	GFL, Burgwedel

4.2 Medien und Puffer

4.2.1 Stammlösungen und Puffer

Alle hier aufgeführten Medien und Puffer wurden mit Milli-Q-H₂O (ddH₂O) angesetzt und bei Bedarf entweder steril filtriert oder autoklaviert.

Stammlösung / Puffer	Zusammensetzung
Ampicillin	100 mg/ml in 75 % Ethanol (Lagerung bei -20°C)
BBS, 2x	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,80
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol, 70 %
DEPC-H ₂ O	2 ml DEPC <i>ad</i> 2 l ddH ₂ O Die Lösung wurde kräftig geschüttelt, für mindestens 4 h bei RT stehengelassen und anschließend 2x autoklaviert.
dNTP-Mix	5 mM Desoxyadenosintriphosphat (dATP) 5 mM Desoxycytosintriphosphat (dCTP) 5 mM Desoxyguanintriphosphat (dGTP) 5 mM Desoxythymidintriphosphat (dTTP)

Stammlösung / Puffer	Zusammensetzung
PBS, 10x	1,2 M NaCl 27 mM KCl 70 mM Na ₂ HPO ₄ 30 mM NaH ₂ PO ₄ ergibt pH 7,4; autoklaviert
Probenpuffer f. SDS-PAGE, 2x	125 mM Tris-HCl, pH 6.8 4 % SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,2 % Bromphenolblau 100 mM β-Mercaptoethanol
SSC, 20x	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, autoklaviert
TAE-Puffer, 50x	2 M Tris-Base 1 M Natriumacetat 50 mM EDTA (pH 8,0), autoklaviert
TBE, 10x	1 mM Tris-Base 0,83 mM Borsäure 20 mM EDTA (pH 8,0), autoklaviert
TBS, 10x	500 mM Tris 1,38 M NaCl 27 mM KCl, pH 8,0
TBST	1x TBS 0,1 % Tween 20
TENS-Lösung	0,1 M NaOH 0,5 % SDS in TE-Puffer
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)
Tetracyclin	5 mg/ml in Ethanol, 70 %
TNM-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
TNT-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 7,6) 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20

Stammlösung / Puffer	Zusammensetzung
TSS	1x LB 10 % PEG 8000 5 % DMSO 50 mM MgCl ₂ , pH 6.5
Wasch-Puffer (f. DIG-ISH)	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 pH 7,5
X-Gal-Lösung	20 mg/ml in N,-N-Dimethylformamid, sterilfiltriert

4.2.2 Medien für die Bakterienkultur

Medium	Zusammensetzung
LB-(Luria Bertani-)Medium	1,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCl, autoklaviert
LB-Medium mit geringer Salzkonzentration	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
SOC-Medium	2,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂ , autoklaviert 20 mM Glukose (steril filtriert, nach dem Autoklavieren zugegeben)

- Je nach Bedarf wurde dem Medium nach dem Autoklavieren geeignetes Antibiotikum zugegeben.
- Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5 % Agar zugesetzt.
- Das SOC-Medium (ohne Antibiotikum) wurde nach der Transformation von Bakterien verwendet.

4.2.3 Medien für die Kultur von Hefen

Medium	Zusammensetzung
Adeninhemisulfat-Stammlösung	0,2 % Adeninhemisulfat
Agarmedien	1,5 % Bacto Agar in dem jeweiligen Flüssigmedium
LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl
SD-Medium ohne Leucin	640 mg/l -Leu/-Trp DO-Supplement 20 mg/l L-Tryptophan
SD-Medium ohne Tryptophan	640 mg/l -Leu/-Trp Dropout-(DO-)Supplement 100 mg/l L-Leucin
SD-Medium ohne Tryptophan und Leucin	640 mg/l -Leu/-Trp DO-Supplement
SD-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin	600 mg/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DO-Supplement 20 mg/l L-Histidin
SD-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin	600 mg/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DO-Supplement 20 mg/l L-Adenin
SD-Medium ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin	600 mg/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DO-Supplement
synthetisch definierte Medien für Hefe (SD-Medien)	26,7 g/l Minimal SD-Base
X- α -Gal-Stammlösung	20 mg/ml X- α -Gal in N,N-Dimethylformamid
YPDA-Medium	50 g/l YPD-Medium 0,003 % Adeninhemisulfat

4.2.4 Medien für die Zellkultur

Medium/Supplement	Zusammensetzung
Antibiotikum/Antimykotikum	10000 U/ml Penicillin-G-Natrium 10000 U/ml Streptomycinsulfat 25 µg/ml Amphotericin in 0,85 % NaCl GibcoBRL, Eggenstein (15240-062)
<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i> (DMEM)	GibcoBRL, Eggenstein (41965-039)
<i>Dulbecco's</i> PBS	GibcoBRL, Eggenstein (14190-094)
Fötales Rinderserum	GibcoBRL, Eggenstein (10437-028), hitzeinaktiviert (56°C, 30 min)
L-Glutamin-Lösung	GibcoBRL, Eggenstein (25030-024),
<i>Minimal Essential Medium</i> (MEM)	1x MEM (10x Stammlösung, mit <i>Earle's</i> Salzen und L-Glutamin) von GibcoBRL, Eggenstein (21430-012) 2 mM Glutamin 28 mM Glukose 26 mM Natriumhydrogenkarbonat
OPTI-MEM [®]	GibcoBRL, Eggenstein (31985)
Pferdeserum	GibcoBRL, Eggenstein (26050-047), hitzeinaktiviert (56°C, 30 min)
Trypsin/EDTA	GibcoBRL, Eggenstein (35400-027)

4.3 BAC-Bibliothek

Es wurde eine BAC-Bibliothek von Research Genetics mit folgenden Eigenschaften gekauft und eingesetzt:

Bibliothek	RPCI-23
Insertionen (Mausstamm)	genomische DNA von C57BL/6J-Mäusen
Vektor	pBACe3.6
Wirtsorganismus	<i>E. coli</i> DH10B
Durchschnittliche Insertionsgröße	197 kb
Klone	180 396
Repräsentation des Maus-Genoms	11,2x

4.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt. Sie wurden lyophilisiert erhalten und zur Konzentrationsbestimmung sowie weiteren Verdünnung in 100 µl 0,1x TE gelöst und für 15 min bei 65°C erwärmt. Anschließend wurde für 10 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von diesem wurde die Konzentration über die Absorption bei 260 nm gemessen. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht für einzelsträngige Oligonukleotide einer Konzentration von 33 µg/ml. Nach Bestimmung der Konzentration wurden 100 µl-Aliquots von 10 pmol/µl angelegt, die für die PCR-Amplifikationen verwendet wurden. Diese Aliquots wurden ebenso wie die Stocklösungen bis zur Verwendung bei – 20°C gelagert.

Die folgenden Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit entworfen und / oder eingesetzt:

Oligonukleotid	Gen / Produkt	Position ⁴ (bp), Orientierung	Sequenz
JS.7	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1-24, <i>sense</i>	CCCCATCAGGATGATATGAGACTT

⁴ falls anwendbar

Oligonukleotid	Gen / Produkt	Position ⁴ (bp), Orientierung	Sequenz
JS.8	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1465-1442, <i>antisense</i>	CTGTGCTGCAGGGCATAATAAGGT
JS.9	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1360-1383, <i>sense</i>	CGGGTCATACTGTAGCTGACTACT
JS.10	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	2442-2419, <i>antisense</i>	GCGGTTTCAGTGTGTTAATCTCCTT
JS.11	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1524-1547, <i>sense</i>	CCTGCGATGGAGCAGTCTCAGTCT
JS.12	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1918-1895, <i>antisense</i>	GTCCGGTTACCCAAGGCTTGCTGT
JS.17	<i>DYRK1A</i> (human, AP000153)	14924-14953 (Exon 1), <i>sense</i>	GATGGTTAAGGACAAGCAGGCGAATTAAGA
JS.18	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1-30, <i>sense</i>	CCCCATCAGGATGATATGAGACTTGAAAGA
JS.19	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	2170-2193, <i>sense</i>	CTGGCATAGCTGGACATCCAACAT
JS.24	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	499-522, <i>sense</i>	GGATGGATCGGTATGAAAATCGACT
JS.25	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1523-1500	GCTGGTAGACACACTGTTACTTGT
JS.26	LA RK ⁵ 1	<i>sense</i>	GGCCCGGAATTCCAAGAGGCCCGGCAGTAC- CG
JS.33	RA RK 1	<i>antisense</i>	GCGCGGGATCCCGTAACCTGTAGAACGGA- GTAAC
JS.38	RK 1 (gesamt)	<i>sense</i>	CAAGAGGCCCGGCAGTACCG
JS.39	RK 1 (gesamt)	<i>antisense</i>	CGTAACCTGTAGAACGGAGTAAC
JS.40	<i>Eco</i> RI-Stelle, 3mal GGT, <i>Dyrk1A</i> - Kinase-Domäne (U58497.1)	492-522, <i>sense</i>	GGCCCGGAATTCGGTGGTGGTGAAAAGTGG- ATGGATCGGTATGAAAATCGACT

⁵ RK: Rekombinationskassette

Oligonukleotid	Gen / Produkt	Position ⁴ (bp), Orientierung	Sequenz
JS.41	<i>Dyrk1A</i> -Kinase-Domäne, Stop-Codon, <i>Bam</i> HI-Stelle (U58497.1)	1493-1470, <i>antisense</i>	GCGCGCGGATCCTCAACCTTCATCAGCTGT- TTTCTTGAA
JS.42	LA RK 1	<i>antisense</i>	CAACCTCATGTCTTAAGGGTTCCGGGTCAA- TTCTC
JS.43	<i>cos</i> -Region RK 1	<i>sense</i>	CGGAACCCCTTAAGACATGAGGTTGCCCGT- ATTC
JS.48	<i>cos</i> -Region RK 1	<i>antisense</i>	GTGCTGCAGGTCGACTTCCATTGTTTCATTC- CACGG
JS.49	Zeocin-Resistenz RK 1	<i>sense</i>	ACAATGGAAGTCGACCTGCAGCACGTGTTG- ACAA
JS.50	Zeocin-Resistenz RK 1	<i>antisense</i>	TCGAGGGACCTACAAACCACAACACTAGAATG- CAGTGA
JS.51	RA RK 1	<i>sense</i>	AGTTGTGGTTTGTAGGTCCTCGACTAATA- GGTCA
JS.54	pACT2-Insertion	<i>sense</i>	CTATTCGATGATGAAGATACCCCAACAAAC- CC
JS.55	pACT2-Insertion	<i>antisense</i>	AAGTGAACCTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTA- CG
JS.56	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1-21, <i>sense</i>	ATTCCGGAATTCCCCATCAGGATGATATG- AGA
JS.57	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1392-1360, <i>antisense</i>	TGAACTTCAAGTAGTCAGCTACAGTATGAC- CCG
JS.58	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	1369-1401, <i>sense</i>	CTGTAGCTGACTACTTGAAGTTCAAAGACC- TCA
JS.59	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	2442-2422, <i>antisense</i>	CTAGCTAGTCTAGAGCGGTTTCAGTGTGTTA- ATCTC
JS.60	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	36-56, <i>sense</i>	GGATATCCATATGAAGATCTTCGGTGGTGG- TATGCATACAGGAGGAGAGACT
JS.61	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	2327-2307, <i>antisense</i>	CCGGAATTCCTCGCTCGAGTCACGAGCTAGC- TACAGGACT
JS.66	LA RK 2	<i>sense</i>	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGGTTCATAGGCA- CATTTTAAAACT

Oligonukleotid	Gen / Produkt	Position ⁴ (bp), Orientierung	Sequenz
JS.67	LA RK 2	<i>antisense</i>	TTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATC- GTCTTCTTTCAAGTCTCATATCA
JS.68	NLS- <i>lacZ</i> RK 2	<i>sense</i>	TTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATC- GCCACCATGGCTCCAAAAAGAAG
JS.69	NLS- <i>lacZ</i> RK 2	<i>antisense</i>	TTATGATCATTCATTTTTGACACCAGACCA- ACTGGTA
JS.70	3-p(A) RK 2	<i>sense</i>	GGTGTCAAAAATGAATGATCATAATCAGCC- ATACCACATTT
JS.71a	3-p(A) RK 2	<i>antisense</i>	TCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCG- TACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGA
JS.74	<i>hrGFP</i> RK 2	<i>sense</i>	AGGAACTTCATAACTTCGTATAGCATAACAT- TATACGAAGTTATAGCCACCATGGTGAGCA- AGCAGATCCTGAAG
JS.75	<i>hrGFP</i> RK 2	<i>antisense</i>	CTGTATGGCCGCCGCCACCCACTCGTGCA- GGCTGCCAG
JS.76	RA RK 2	<i>sense</i>	AGTGGGTGGGCGGCGCCATACAGGTGACT- CAAGTTTTGAA
JS.77	RA RK 2	<i>antisense</i>	TTTTTCCTTTTGC GGCCGCCAGGAATACAGG- GAGACATATATT
JS.81	<i>Sept5</i> (AF033350)	1087-1068, <i>antisense</i>	CGGCCGTCTATCCTTGTCGA
JS.82	<i>Tet-R</i> RK 2	<i>sense</i>	TCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCA- ATTCTCATGTTTGACAGCTTATC
JS.83	<i>Tet-R</i> RK 2	<i>antisense</i>	GCTATACGAAGTTATGAAGTTCTATACTT- TCTAGAGAATAGGAACTTCGATGCGCCGCG- TGCGGCTGCTGGA
JS.93	<i>Sept5</i> (BB573642)	5-24, <i>sense</i>	GCTCGCAGGAATTCTGAGGT
JS.95	<i>Sept4</i> (NM_011129)	35-54, <i>sense</i>	CATGGACCATTCACTGGGAT
JS.96	<i>Sept4</i> (NM_011129)	402-383, <i>antisense</i>	CCTTGTCATCCTCAGAGGAA
JS.99	<i>Arip4</i> (AJ132389)	2264-2283, <i>sense</i>	CAGGAACGGGGCAATAACAT

Oligonukleotid	Gen / Produkt	Position ⁴ (bp), Orientierung	Sequenz
JS.100	<i>Arip4</i> (AJ132389)	2638-2619, <i>antisense</i>	CCTTGTGGAGAGAAGGAACA
JS.106	<i>Arip4</i> (AJ132389)	185-203	GGAGCCATGTCAGACGAAT
JS.118	<i>Dyrk1A</i> Intron 3	<i>sense</i>	GGCCTTGATAATCACTGTGAA
JS.119	<i>lac Z</i>	<i>antisense</i>	TTCCAGTCACGACGTTGTAA
JS.120	<i>hrGFP</i>	<i>sense</i>	CAAGTTCTACAGCTGCCACAT
JS.121	<i>Dyrk1A</i> Intron 4	<i>antisense</i>	GCAGTGCTGTGCTAACCATAA
JS.128	<i>Arip4</i> (AJ132389)	815-834 , <i>sense</i>	GATACGCTGCACATCGTGGA
JS.129	<i>Arip4</i> (AJ132389)	1989-1917 , <i>antisense</i>	CAATCCCGAAACGGTCCAT
JS.133	<i>Arip4</i> (AJ132389)	1511-1535 , <i>sense</i>	CAGGAGTTTCGGAGAGAGTTTGAGA
JS.134	<i>Arip4</i> (AJ132389)	1705-1685 , <i>antisense</i>	CACCATGCACCAGTACTCAAT
JS.143	<i>Dyrk1A</i> (U58497.1)	171-154 , <i>antisense</i>	GCTGGCGACGGTCACTGT
JS.144	<i>Dyrk1A</i> Intron 3	<i>sense</i>	GGGGTTGTAGTIAIATTAGATAC
JS.145	<i>Dyrk1A</i> Intron 8	<i>sense</i>	CTTTCAGTGGTAAACATAAAATG
JS.150	<i>Arip4</i> (AJ132389)	340-321	CAGGGATGTGTCATCCAGCA
JS.151	<i>cos</i> -Sonde	<i>sense</i>	CCTTTCGGTGATCCGACAGGTTA
JS.152	<i>cos</i> -Sonde	<i>antisense</i>	CGCTTTCAGCACCTGTCGTTTCCT
GAL4-AD	pACT2-Insertion (5'-Ende)	5137-5153, <i>sense</i>	TACCACTACAATGGATG

Oligonukleotid	Gen / Produkt	Position ⁴ (bp), Orientierung	Sequenz
pACT2-rev	pACT2-Insertion (3'-Ende)	4913-4895, <i>antisense</i>	AACGATGTATAAATGAAAG
pEGFP-C	pEGFP-C2- Insertion (Sequenzierprimer 5'-Ende)	1266-1287, <i>sense</i>	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
pEGFP-C-rev	pEGFP-C2- Insertion (Sequenzierprimer 3'-Ende)	3915-3896, <i>antisense</i>	CCACAACACTAGAATGCAGTGA
gSP6.22	pBACe3.6- Insertion	2908-2887, <i>antisense</i>	GTTTTTTGCGATCTGCCGTTTC

4.5 Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
<i>IMAGE</i> -Klone	RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH), Berlin
pBAD-ET γ -Tet	zur Verfügung gestellt von Dr. Erich Greiner, Heidelberg
pBluescript [®] II KS+	Stratagene, Heidelberg (212207)
pBS-3-p(A)	zur Verfügung gestellt von Dr. Alessandro De Grandi, Neuherberg
pCMV-Tag2 (A, B, C)	Stratagene, Heidelberg (211172)
pCR [®] II	Invitrogen, Karlsruhe
pCR [®] II-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pDsRed2-C1	Clontech, Palo Alto, USA (6974-1)
pEGFP-C2	Clontech, Palo Alto, USA (6083-1)
pGADT7	Clontech, Palo Alto, USA (K1612-1)
pGADT7-T	Clontech, Palo Alto, USA (K1612-1)
pGBKT7	Clontech, Palo Alto, USA (K1612-1)
pGBKT7-Lam	Clontech, Palo Alto, USA (K1612-1)
pGBKT7-p53	Clontech, Palo Alto, USA (K1612-1)
pGETrec	zur Verfügung gestellt von Dr. Panos Ioannou, Melbourne, Australien
pHM	zur Verfügung gestellt von Dr. Klaus Kaestner, Heidelberg
pHRGFP-C	Stratagene, Heidelberg (240035)

4.6 Plasmid-DNA-Klone zur Herstellung von Ribosonden

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden Sonden verwendet, die mittels *in vitro*-Transkription mit den im folgenden aufgelisteten Plasmiden als Matrize hergestellt wurden.

Gen	Datenbank-Referenznummer	Matrize der Sonde (Klon)	Länge Insertion / Vektor (bp)	RNA-Polymerase (antisense / sense)	Linearisiert mit (AS / S)
<i>Dyrk1A</i>	U58497.1	pBS-Dyrk1A JS.9/JS.10 ¹ (J.9)	1058 / 2961	T3 / T7	<i>Xba</i> I / <i>Eco</i> RV
<i>Sept4</i>	NM_011129.1	pBS-DI1 ² (J.103)	1490 / 2961	T3 / T7	<i>Eco</i> RI / <i>Xho</i> I
<i>Arip4</i>	XM_193101.1	pBS-DI6 ² (J.104)	1351 / 2961	T3 / T7	<i>Xba</i> I / <i>Xho</i> I

Tabelle 4-1: Verwendete Ribonukleotid-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

¹ Siehe Abbildung 6-1; ² siehe Abbildung 6-20

4.7 Antikörper

Antikörper (Herkunft)	Verdünnung (Einsatzzweck)	Bezugsquelle (Katalognummer)
Anti-Digoxigenin (F _{ab})-POD-Antikörperfragment	1:1200 (<i>in situ</i> -Hybridisierung)	Roche, Mannheim (851299923-07)
Anti-Dyrk1A (monoklonal, Maus)	1:250 (<i>Western Blot</i>) 1:25 (Immunhistochemie)	BD Transduction Laboratories (610674)
Anti-FLAG [®] M2 (monoklonal, Maus)	1:4000 (<i>Western Blot</i>)	Sigma (F 3165)
Anti-FLAG [®] M2 Affinity Gel Freezer-Safe (monoklonal, Maus)	5 % (Trockenvolumen des Gels pro Zellysat, f. Immunpräzipitation)	Sigma (A 2220)
Anti-GFP (monoklonal, Maus)	1:1000 (<i>Western Blot</i>)	Roche (1 814 460)
Anti-GFP (polyklonal, Kaninchen)	1:200 (<i>Western Blot</i>)	Clontech, Palo Alto, USA (8367-1)
Anti-Kaninchen-HRP	1:2000 (<i>Western Blot</i>)	Dako, Hamburg
Anti-Maus-HRP	1:2000 (<i>Western Blot</i>)	Dako, Hamburg

4.8 Organismen

4.8.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYAargF)U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>deoR thi-1 supE44 λ-gyrA96 relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^fZDM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	(Stratagene)
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ rpsL nupG</i>	Raleigh <i>et al.</i> , 1988

4.8.2 Hefen

Stamm	Bezugsquelle (Katalognummer)
Prätransformierte <i>Matchmaker</i> -Bibliothek, cDNA aus dem Gehirn der Maus im Vektor pACT2, kloniert über <i>Eco</i> RI-/ <i>Xho</i> I-Schnittstellen im Vektor und im Adapter (<i>Eco</i> RI) bzw. im Oligo-d(T)-Primer (<i>Xho</i> I) der cDNA, vereinigt von 200 BALB/c-Männchen, Alter 9-12 Wochen, im <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stamm Y187	Clontech (MY4008AH)
<i>S. cerevisiae</i> -Stamm AH109	Clontech (MY4008AH)
<i>S. cerevisiae</i> -Stamm Y187	Clontech (MY4008AH)

4.8.3 Säuger-Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Herkunftsorgan
HEK239	Mensch	embryonale Niere
HT22	Maus	Hippocampus

4.8.4 Mäuse

Zur Präparation von Gehirnen für die *in situ*-Hybridisierungen und Immunhistochemie wurden Mäuse des Inzucht-Stammes C57BL/6J verwendet, die nicht älter als drei Monate waren.

4.8.5 Ratten und neuronale Primärkulturen

Die neuronalen Primärkulturen wurden von Dr. Nadhim Bayatti (MPI f. Psychiatrie, München) aus Sprague-Dawley-Rattenembryonen präpariert. Dafür wurden trächtige Ratten von Charles River, Sulzfeld, bezogen.

5 METHODEN

Molekular- und zellbiologische Arbeiten wurden, soweit hier nicht anders angegeben, nach den etablierten Standardmethoden durchgeführt, wie sie z. B. in Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001), Ausubel *et al.* (Ausubel *et al.*, 1999) und Harlow & Lane (Harlow & Lane, 1999) niedergelegt sind. Reagenzien und Proben für die Durchführung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt, Enzyme und gegebenenfalls auch Antikörper bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reaktionen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit den mitgelieferten Puffersystemen der Hersteller angesetzt. Das verwendete Wasser für Reaktionen und Ansätze im kleineren Maßstab war in der Regel hochreines, steriles Ampuwa[®]-Wasser; für Puffer etc. im größeren Maßstab wurde deionisiertes und gereinigtes Milli-Q-Wasser eingesetzt.

5.1 Mikrobiologisch-bakteriologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter möglichst sterilen Bedingungen neben einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden autoklaviert, Lösungen wurden ebenfalls durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert.

5.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien für die Transformation per Hitzeschock

Für Routine-Klonierungen von Plasmiden wurden kompetente *E. coli* DH5 α - oder XL1-Blue-Zellen benutzt, die nach einem Verfahren nach Chung *et al.* (Chung *et al.*, 1989) mit TSS (*transformation and storage solution*) hergestellt wurden.

Eine 100 ml-Kultur (vorgewärmtes LB-Medium) wurde mit 1 ml einer frischen ü. N.-Kultur von *E. coli* DH5 α - oder XL1-Blue-Bakterien angeimpft und bei 37°C und 175 U/min geschüttelt, bis eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,3-0,4 erreicht war. Danach wurden die Zellen 10 min bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem TSS aufgenommen. Die nun kompetenten Zellen wurden nach dieser letzten Behandlung entweder direkt für die Transformation verwendet oder als 250 μl -Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt und

schockgefroren. Dazu wurden die Reaktionsgefäße in mit Ethanol überschichtetes Trockeneis gestellt. Die weitere Lagerung kompetenter Zellen erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Alle Lösungen und Geräte bei dieser Prozedur wurden vorgekühlt, um eine hohe Transformationseffizienz beim Einsatz der kompetenten Bakterien zu ermöglichen.

5.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien per Hitzeschock

200 μl kompetente Zellen (s. 5.1.1) wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 ng eines Plasmids oder 10 μl eines Ligationsansatzes (entsprechend ca. 25 ng Vektor) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock wurden die Zellen für 90 s in einen auf 42°C eingestellten Heizblock transferiert und danach für 2 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Bakteriensuspension mit 800 μl SOC-Medium (RT) versetzt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Dann wurden zwei unterschiedliche Volumina, in der Regel 50 μl und 450 μl , auf LB-Agarplatten, welche die entsprechenden Antibiotika zur Selektion von ursprünglich enthaltenen und transformierten Plasmiden enthielten, ausplattiert. Bei Verwendung von Vektoren, die die α -Komplementation des *lac Z*-Gens erlauben, wurden zusätzlich vor dem Ausplattieren der Bakterien 40 μl X-Gal-Lösung und 8 μl IPTG-Lösung auf der Plattenoberfläche verteilt.

Die Bakterienkulturen wurden ü. N. bei 37°C inkubiert, um das Wachstum von Kolonien zu ermöglichen. Die Platten befanden sich dabei in einer invertierten Position (Agar oben). Anschließend wurden mit einer Anzahl der Kolonien (6-24 Stück) 3ml-Flüssigkulturen beimpft und diese ü. N. inkubiert. Im Falle des Tests auf α -Komplementation wurden nur weiße Kolonien verwendet, in denen das *lac Z*-Gen des Vektors durch die Insertion unterbrochen ist.

5.1.3 Kultur der BAC-Wirtsbakterien des Stammes DH10B

Die BAC-Wirtsbakterien wurden in der Regel auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol (12,5 $\mu\text{g/ml}$) und Glucose (0,2 % [w/v]) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. in LB-Medium mit Chloramphenicol (12,5 $\mu\text{g/ml}$) und Glucose (0,2 % [w/v]) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln (150 U/min) kultiviert. Die Glucoselösung (in H_2O) und das Antibiotikum wurden per Filtration sterilisiert und dem autoklavierten Medium zugeführt.

5.1.4 Herstellung kompetenter *E. coli* DH10B-Bakterien für die Transformation per Elektroporation

Die in dieser Arbeit eingesetzten BACs entstammten der Bibliothek RPCI-23 in *E. coli* des Stammes DH10B. Um diese BAC-Wirtsbakterien in einen zur Transformation per Elektroporation (z. B. mit pGETrec) kompetenten Zustand zu versetzen, wurde folgendes Protokoll angewandt:

Von einem Glycerolstock der zu transformierenden *E. coli* DH10B-Bakterien wurde eine 5ml-Kultur in LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum angeimpft und ü. N. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese 5 ml in 250 ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium, ebenfalls mit Antibiotikum, überführt und weitere 3-4 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis die Zellen bei einer OD_{600nm} die logarithmische Wachstumsphase erreichten. Anschließend wurden sie in 250ml-Zentrifugenröhrchen in Eiswasser für 15 min gekühlt und in einer vorgekühlten Zentrifuge für 10 min bei 7000 U/min (7500 x g) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit eiskaltem H₂O und zweimal mit eiskaltem 10%igem Glycerol (v/v in H₂O) gewaschen. Anschließend, nach sorgfältigem Abgießen des Überstandes und Entfernen der Flüssigkeit von den Wänden des Gefäßes, wurden die Bakterien in einem Volumen von 10%igem Glycerol resuspendiert, das etwa dem des Zellpellets entsprach. Die Suspension wurde in 50µl-Aliquots in 2ml-Zentrifugenröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -140 °C aufbewahrt. Von der ersten Zentrifugation an wurden alle Schritte im Kühlraum bei 4 °C und mit vorgekühlten Pipetten und Gefäßen durchgeführt.

5.1.5 Elektroporation von *E. coli* DH10B-Bakterien

Frische oder auf Eis aufgetaute kompetente Bakterien wurden zusammen mit der zu transformierenden DNA, beispielsweise 0,01-1 µg eines Plasmids, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) gegeben. Die Elektroporation erfolgte im *Gene Pulser II* (Bio-Rad) bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Die Zeitkonstante der Entladung beträgt in der Regel ca. 5 ms. Sofort anschließend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum (RT) überführt, dann 1-1,5 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wurde eine Reihe von Verdünnungen in LB-Medium (1:10 bis 1:1000) hergestellt. Es wurden jeweils 100 µl dieser Verdünnungen auf LB-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten inkubierten anschließend ü. N. bei 37 °C oder gegebenenfalls länger, bis Kolonien der transformierten Bakterien sichtbar waren. Mit dieser Methode wurden Transformationseffizienzen von bis zu $2,9 \cdot 10^9$ Kolonien/µg DNA erreicht.

5.1.6 GET-Rekombination

Für die homologe Rekombination eines BAC mit einer Rekombinationskassette wurde diese als PCR-Produkt per Elektroporation in das zuvor mit pGETrec (s. o.) transformierte und in einen rekombinationskompetenten Zustand gebrachte BAC-Wirtsbakterium eingeführt.

5.1.6.1 Amplifikation und Reinigung der Rekombinationskassette

Die Rekombinationskassette 1 wurde mittels PCR mit den Primern JS.38/JS.39 und der Polymerase *Herculase* (Stratagene) in 20 Zyklen amplifiziert. Dabei diente der Klon J.76 als Matrize; eingesetzt wurden 0,5 µg. Das PCR-Produkt wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit dem *QIAquick Gel Extraction*-Kit (s. 5.2.6.1) aufgereinigt, wobei die Elution abweichend von den Herstellerangaben mit 2mal 50 µl H₂O, dessen pH auf 8 eingestellt worden war, erfolgte. Um das Plasmid J.76 zu degradieren, wurde das Eluat mit dem Restriktionsenzym *Dpn* I verdaut. Anschließend wurde die Rekombinationskassette mit dem *QIAquick PCR Purification*-Kit aufgereinigt, mit 50 µl des mitgelieferten Elutionspuffers EB eluiert, mit Ethanol und Natriumacetat gefällt, in 70%igem Ethanol gewaschen und in 5 µl H₂O gelöst. Die Konzentration der Rekombinationskassette wurde photometrisch bestimmt.

5.1.6.2 Transformation der Rekombinationskassette

Für die homologe Rekombination wurden die BAC-Wirtsbakterien nach dem oben beschriebenen Protokoll in einen für die Aufnahme von DNA per Elektroporation kompetenten Zustand versetzt, allerdings mit folgenden Modifikationen des Standardprotokolls: Nach dem Beimpfen einer 250ml-Kultur – hier ohne Glucose – mit der Übernachtskultur wurde die größere Kultur nur für ca. 2 h inkubiert, bis eine OD_{600nm} von ungefähr 0,2 erreicht war. In diesem Status wurde Arabinose zur Kultur gegeben (Endkonzentration 0,2 %), um die Expression der Rekombinationsmaschinerie zu induzieren, und die Kultur weiter für 35 min bei 37 °C im Schüttler bei 150 U/min inkubiert. Danach wurde nochmals die OD_{600nm} gemessen, die zu diesem Zeitpunkt ca. 0,3 betrug. Anschließend wurden kompetente Zellen nach dem Standardprotokoll hergestellt. Ein 50µl-Aliquot dieser Zellen wurde zur Elektroporation (s. 5.1.5) mit 4 µl der gereinigten Rekombinationskassette in H₂O (s. o.), entsprechend ca. 180 ng, eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agar-Platten mit den Antibiotika Chloramphenicol (12,5 µg/ml) und Zeocin (25 µg/ml) sowie mit Glucose (0,2 % [w/v]) zur Reprimierung der Gene der Rekombinationsenzyme ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde LB-

Agar mit geringer Salzkonzentration (entsprechend der Herstellerempfehlung [Invitrogen]) eingesetzt, um die Aktivität des Zeocin zu erhalten.

Die auf den LB/Chloramphenicol/Zeocin-Platten gewachsenen Kolonien wurden zur Inokulation von Flüssigkulturen und anschließenden Aufreinigung der BAC-DNA eingesetzt (s. 5.2.10.3), um die erfolgte Rekombination zu prüfen.

5.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

5.2.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

5.2.1.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke (Mini-Präparation)

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen an DNA nach alkalischer Lyse der Bakterien (Birnboim & Doly, 1979) präpariert. Dazu kamen zwei unterschiedliche Verfahren zum Einsatz: eines zur Präparation von DNA mit mittlerem Reinheitsgrad, welche mittels Restriktionsverdau analysiert wurde, ein zweites zur Präparation von DNA mit einer für die Sequenzierung geeigneter Qualität.

Plasmidpräparation für die Analyse per Restriktionsverdau

3 ml LB-Flüssigmedium mit geeignetem Antibiotikum wurden mit einer Kolonie des zu untersuchenden Klons beimpft und ü. N. bei 37°C und 220 U/min auf einem Drehrad inkubiert. 2 ml der Übernachtskultur wurden am nächsten Tag in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 x g für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 300 µl TENS-Lösung resuspendiert. Danach wurden 150 µl Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben; der Ansatz wurde mit dem Vortex gemischt und für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde für 5 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße, die bereits 900 µl 100%igen Ethanol enthielten, überführt, mehrfach invertiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13.000 x g und 4 °C wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl 0,1x TE (mit 20 µg/ml RNase A, zur Inaktivierung von DNAsen hitzebehandelt) gelöst. 3 µl der so hergestellten Plasmid-Lösung wurden zur Kontrolle der Ligationsreaktion einem Restriktionsverdau unterzogen, der mittels Gelelektrophorese analysiert wurde.

Plasmidpräparation für die Analyse per Sequenzierung

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab für die Sequenzierung wurde der *QIAprep® Spin Miniprep*-Kit (Qiagen) eingesetzt. Die Anwendung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

5.2.1.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Plasmide von Klonen, die nach analytischer Präparation dem erwünschten Ergebnis entsprachen, wurden in größerem Maßstab und höherem Reinheitsgrad für weitere Anwendungen isoliert. Dazu wurde der *QIAfilter™ Plasmid Midi-* oder *-Maxi*-Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das verwendete Kulturvolumen betrug 50 ml (*Midi*) bzw. 100-500 ml (*Maxi*; je nach Kopienzahl des Plasmids pro Bakterienzelle und gewünschter Menge an präparierter DNA). Die Lösung der präparierten DNA erfolgte je nach Größe des sichtbaren Pellets nach der Ethanol-Präzipitation mit 50-100 ml TE-Puffer, 0,1x.

5.2.1.3 Präparation von Plasmiden für die Transfektion

Zur Präparation von Endotoxin-(Lipopolysaccharid-)freier Plasmid-DNA für die Transfektion von Säuger-Zellen (s. 5.4.3) wurde der *EndoFree™ Plasmid Maxi*-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben eingesetzt.

5.2.2 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese von DNA von bis zu 40 kb Größe wurde in Agarosegelen (0,6-2 %) nach der in Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001) beschriebenen Methode durchgeführt. Als Laufpuffer wurde hier TAE (1x) eingesetzt. Zur Markierung der DNA wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) in das Gel gegeben.

5.2.3 Isolierung von RNA

Die im Rahmen dieser Arbeit für die reverse Transkription benötigte Gesamt-RNA wurde aus Gehirnen von adulten Mäusen isoliert.

Zur Extraktion der RNA wurde das gebrauchsfertige Reagens *peqGOLD RNAPure* der Firma Peqlab gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Methode basiert auf der mechanischen und chemischen Lyse des Gewebes in Guanidinium-Isothiocyanat-Puffer

(Chomczynski & Sacchi, 1987). Das dafür verwendete Dispergiergerät führt durch schnelle Rotation einer Klinge zusätzlich zur Scherung der genomischen DNA. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

5.2.4 Spektralphotometrische Analyse von DNA und RNA

Die in Nukleinsäuren enthaltenen Basen absorbieren ultraviolettes Licht mit Wellenlängen von 250 bis 270 nm. Das Maximum dieser Absorption ist je nach Base etwas unterschiedlich und liegt im Durchschnitt bei 260 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Absorption proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz in einer Lösung. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen zu bestimmen. Proteine mit aromatischen Aminosäureresten und Phenol haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, so daß durch den Quotienten (Q) der Absorptionswerte einer Lösung bei 260 nm und 280 nm das Ausmaß der Verunreinigung durch Proteine und Phenol festgestellt werden kann. Dabei gelten folgende Richtwerte:

Reine DNA-Lösung: $1,8 < Q < 1,95$

Reine RNA-Lösung: $1,9 < Q < 2,0$

Werte unter den angegebenen Untergrenzen deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin, Werte für DNA über 2,0 sind ein Zeichen für Anwesenheit von RNA oder von denaturierter DNA. Die angegebenen Werte für DNA gelten nicht für einzelsträngige DNA und Oligonukleotide.

Die Proben wurden in der Regel vor der Messung 1:100 verdünnt. Bei einer $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1,0 enthält die Probe 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 33 $\mu\text{g/ml}$ eines Oligonukleotids.

5.2.5 Enzymatische Methoden

Alle eingesetzten Enzyme wurden bei -20°C gelagert und wurden zum Transport und während der Versuchsvorbereitung im *Stratacooler* (-20°C) aufbewahrt.

5.2.5.1 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (Jones, 1993) dient dazu, mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Für diese Reaktion wurde die *SUPERSCRIPT™ II RNase⁻ reverse Transkriptase* (Invitrogen) nach Herstellerangaben mit einem Oligo-(dT)₁₅-Primer benutzt. Es wurden 1-5 μg Gesamt-RNA aus dem Gehirn adulter Mäuse für einen 20 μl -Ansatz

eingesetzt. Anschließend an die reverse Transkription wurde eine alkalische Hydrolyse der RNA durch Zugabe von 2 µl NaOH (1 M) und Inkubation für 15 min bei 70 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ebenfalls 2 µl HCl (1 M) neutralisiert. Für die nachfolgende PCR wurden 1-2 µl des Produktes eingesetzt.

5.2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis *et al.*, 1986) ist eine enzymatische Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Als Polymerasen wurden je nach Erfordernissen *Taq* (Roche), *Pfu* (Stratagene), *Vent*[®] (NEB), *Pfu Turbo*[®] (Stratagene) oder *Herculase*[™] (Stratagene) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen wie die Anlagerungs-/Schmelztemperatur (T_m) der Primer, die Mg^{2+} -Konzentration ($C_{Mg^{2+}}$) und die Extensionszeit wurden für jedes Primerpaar und die jeweilige Matrize optimiert.

Ein typisches Programm des benutzten Thermocyclers (Robocycler [Stratagene]) als Startpunkt der Optimierung bestand aus den folgenden Schritten:

1 Zyklus	2 min	94°C
30 Zyklen	1 min	94°C
	1 min	58°C
	1 min	72°C
1 Zyklus	7 min	72°C
1 Zyklus	fortdauernd	4°C

Für eine 50 µl-Reaktion wurden in einem speziellen PCR-Reaktionsgefäß auf Eis gemischt:

H ₂ O	36 µl
dNTP-Mix (je 5 mM)	2 µl
10x <i>Taq</i> -Puffer (Roche)	5 µl
Fw-Primer (10 µM)	2,5 µl
Rev-Primer (10 µM)	2,5 µl
DNA-Matrize (10 ng)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)	1 µl

Der Ansatz wurde in den Thermocycler überführt und das jeweilige PCR-Programm gestartet. Nach dessen Beendigung wurden die hergestellten Produkte in der Regel per Gelelektrophorese analysiert und gegebenenfalls aus dem Gel extrahiert.

5.2.5.3 Restriktionsverdau

Die beim Restriktionsverdau eingesetzten Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA sequenzspezifisch schneiden. Sie wurden z. B. eingesetzt, um die Anwesenheit bestimmter Sequenzen in DNA-Molekülen zu überprüfen, um ringförmige Plasmid-DNA vor deren Einsatz als Matrize für die *in vitro*-Transkription zu linearisieren und um Fragmente von verschiedenen DNA-Molekülen mit spezifischen überhängenden Enden herzustellen, die anschließend ligiert wurden.

Restriktionen von DNA erfolgten in der Regel mit dem Zehnfachen der theoretisch benötigten Aktivität an Enzym in dem vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffer bei der für das Enzym optimalen Temperatur. Ausnahmen von dieser Regel waren partielle Verdaue und die Anwendung von Enzymen mit hoher unspezifischer Aktivität; in diesen Fällen wurde erheblich weniger Enzym eingesetzt und kürzer verdaut. Erfolg und Vollständigkeit von Restriktionsverdauen wurden per Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

5.2.5.4 Auffüllen von überhängenden Enden nach Restriktionsverdau

1-5 µg verdaute DNA in 30 µl H₂O oder Elutionspuffer (Qiagen; nach Gelextraktion eines Restriktionsfragments) wurden mit 10 µl 10x T4 DNA-Polymerasepuffer, 5 µl BSA (10 mg/ml), 2 µl dNTP-Mix (5 mM), 51,5 µl H₂O und 1,5 µl T4 DNA-Polymerase auf Eis gemischt und für 20 min bei 11°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA inaktiviert und der Ansatz mit dem *QIAquick PCR Purification*-Kit (Qiagen) oder durch Gelextraktion gereinigt.

5.2.5.5 Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA-Molekülen wurde eine Ligase aus dem Bakteriophagen T4 eingesetzt. Verwendet wurden hier die T4 DNA-Ligase von NEB (molares Verhältnis der Konzentrationen von Vektor und Insertion 1:4 und 1:8 sowie 1:0 zur Kontrolle der Religationsfrequenz des Vektors) sowie der *Quick Ligation*[™]-Kit (NEB) nach Herstellerangaben. Zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien wurde jeweils die Hälfte eines 20µl-Ligationsansatzes, der in der Regel 50 ng Vektor enthielt, verwendet.

5.2.5.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde als Auftragsarbeit von den Firmen MWG (Ebersberg), TopLab (Martinsried) und Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Sequenzierungsergebnisse wurden grundsätzlich in unbearbeiteter Form als Chromatogramm- und Textdatei auf elektronischem Wege (via E-Mail) erhalten.

5.2.6 Aufreinigung von DNA mittels Adsorptionschromatographie

Nukleinsäuren adsorbieren in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze an Silicagel-Oberflächen. Diese Bindung ist pH-abhängig, wobei bei pH-Werten von unter 7,5 die Bindungsrate 95 % erreicht. Die Abhängigkeit der Adsorption von chaotropen Salzen wird bei den im Folgenden beschriebenen Aufreinigungsverfahren ausgenutzt. Man läßt die DNA unter geeigneten Bedingungen binden und wäscht Verunreinigungen aus. Danach wird die Nukleinsäure mit Wasser oder einem leicht basischen Puffer mit geringer Salzkonzentration eluiert.

5.2.6.1 QIAquick® Gel Extraction-Kit

Dieses Verfahren wurde eingesetzt, wenn DNA-Moleküle vor einer Reaktion wie einer Ligation nicht nur von störenden Reaktionsbestandteilen befreit werden sollen, sondern zudem DNA-Moleküle einer definierten Länge von anderer DNA getrennt werden sollen. Dies ist z. B. nach einer enzymatischen Reaktion wie einer PCR oder einem Restriktionsverdau der Fall, wo Matrize und Nebenprodukte der PCR bzw. im Verdau herausgeschnittene Sequenzen mit anschließenden Reaktionen interferieren würden.

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der *QIAquick® Gel Extraction-Kit* gemäß den Herstellerangaben verwendet.

5.2.6.2 QIAquick® Nucleotide Removal-Kit

Dieses Verfahren wird angewendet, wenn Nukleinsäuren von verunreinigenden Substanzen oder Reaktionsprodukten getrennt werden sollen, z. B. nach einem Restriktionsverdau.

Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren wurde der *QIAquick® Nucleotide Removal-Kit* gemäß den Herstellerangaben verwendet. Dieser Kit erlaubt die Aufreinigung von doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 40 bp bis 10 kb und von Oligonukleotiden mit 17-40 b.

5.2.6.3 QIAquick® PCR Purification-Kit

Zur Aufreinigung von DNA-Molekülen wie beispielsweise PCR-Produkten wurde, wenn Primer und andere kleine DNA-Fragmente entfernt werden sollten, der QIAquick® PCR Purification-Kit gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

5.2.7 Radioaktive Hybridisierung

5.2.7.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mittels *random priming*

Die zur Hybridisierung der BAC-Bibliotheks-Membranen eingesetzten Sonden wurden nach RT-PCR kloniert und sequenziert. Anschließend wurde die Insertion mit geeigneten Enzymen ausgeschnitten und mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion gereinigt. Die radioaktive Markierung der so hergestellten doppelsträngigen, linearen DNA-Fragmente wurde mit dem *random primers DNA labeling*-System (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend von diesen wurden allerdings 30-50 ng Matrizen-DNA (statt der vom Hersteller angegebenen 25 ng) pro Markierungsansatz eingesetzt.

5.2.7.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit Terminaler desoxy-nucleotidyl-Transferase

Zum Nachweis der Exons 1 und 4 von *Dyrk1A* wurde eine Hybridisierung von BAC-DNA nach *Southern Blot* mit Oligonukleotiden, die mit der Terminalen desoxynucleotidyl-Transferase (TdT; Invitrogen) mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markiert worden waren, durchgeführt.

Es wurde folgende Markierungsreaktion angesetzt:

H ₂ O	6 μl
5x TdT-Puffer	4 μl
CoCl ₂ (5 mM)	3 μl
TdT (25 U/ μl)	2 μl
Oligonukleotid (50 ng/ μl)	2 μl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	3 μl

Der Ansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert, anschließend das Enzym durch Zugabe von 1 μl EDTA (0,5 M) und Inkubation bei 70 °C für 15 min inaktiviert. Nach einer Reinigung des markierten Oligonukleotids per Präzipitation mit 10 μl Ammoniumacetat (7 M), 70 μl Ethanol (100 %) und 1 μl Glycogen (10 mg/ml) bei -20 °C und anschließender Suspension des

Pellets in 100 µl H₂O erfolgte eine Denaturierung für 5 min bei 95 °C. Die so präparierte Oligonukleotid-Sonde wurde nun zur Hybridisierung eingesetzt (s. 5.2.7.4).

5.2.7.3 Transfer von DNA auf Nylon-Membranen

Der Transfer von BAC-DNA auf Nylon-Membranen erfolgte nach der ursprünglich von Southern (Southern, 1975) beschriebenen Methode. Vor dem Transfer wurde die DNA im Gel (nach Pulsfeld-Gelelektrophorese) für 15 min in 0,25 N HCl depuriniert und damit fragmentiert, um einen schnelleren und effizienteren Transfer auch großer DNA-Moleküle zu erreichen. Anschließend wurden die Denaturierung unter alkalischen Bedingungen, die Neutralisation und der Transfer nach dem Herstellerprotokoll der benutzten Membranen (Hybond-N⁺, Amersham) durchgeführt.

5.2.7.4 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden

Nach Auftrennung der BAC-DNA per Pulsfeld-Gelelektrophorese und Transfer auf positiv geladene Nylon-Membranen (Hybond-N⁺) erfolgte eine Prähybridisierung (mit Hybridisierungspuffer) für 1 h bei 42 °C in Hybridisierungsflaschen im Rotationsofen. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer gewechselt und das markierte Oligonukleotid (s. 5.2.7.2) wurde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C ü. N. Nach Entfernung des Hybridisierungspuffers wurden die Membranen in mehreren Schritten gewaschen:

- kurz in 2x SSC / 1 % SDS bei Raumtemperatur (RT)
- 10 min in 2x SSC / 1 % SDS bei 42 °C

Anschließend wurden die Membranen von den Hybridisierungsröhren in eine Schale überführt und diese in ein Wasserbad transferiert.

- 10 min in 1x SSC / 1 % SDS bei 42 °C
- 8 min in 0,1x SSC / 1 % SDS bei 42 °C
- kurz in 2x SSC / 1 % SDS bei RT

Die Membranen wurden mit einem geringen Volumen des letzten Waschpuffers in Folie eingeschweißt und zur Autoradiographie mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie eingelegt. Die Exposition erfolgte für 4-24 h bei -80 °C.

5.2.8 Nichtradioaktive Hybridisierung

Zum Nachweis der erfolgreichen Modifikation von BAC-Klonen mit der Rekombinationskassette 1 wurde eine nichtradioaktive Hybridisierungsmethode eingesetzt. Diese basiert auf dem von Roche (vormals Boehringer Mannheim) entwickelten Digoxigenin-(DIG-)System und wurde von Engler-Blum et al. (Engler-Blum *et al.*, 1993) zur Erhöhung der Sensitivität und zur Reduzierung des Signalhintergrundes optimiert. Die Markierung der Sonde (*cos*-Sonde, s. Abbildung 6-10) mit DIG erfolgte per PCR mit den Primern *cos*-Fw und *cos*-Rev nach dem Protokoll von Roche, ebenso die Bestimmung der effektiven Sondenkonzentration. Die anschließende Prähybridisierung, die Hybridisierung ü. N. bei 65 °C und die darauffolgenden Wasch- und Detektionsschritte wurden nach dem optimierten Protokoll von Engler-Blum *et al.* durchgeführt.

5.2.9 *In situ*-Hybridisierung

5.2.9.1 Herstellung von Ribonukleotidsonden mittels *in vitro*-Transkription

In dieser Arbeit wurden mit ^{35}S und mit Digoxigenin markierte Ribonukleotidsonden eingesetzt. Diese wurden per *in vitro*-Transkription mit einem entsprechend markierten Nukleotid hergestellt.

Markierung von Ribosonden mit ^{35}S -UTP

Zur radioaktiven Markierung von Ribosonden wurde [α -thio- ^{35}S]-UTP verwendet.

In folgendem 30 μl -Ansatz wurde die *in vitro*-Transkription durchgeführt:

linearisierte Matrizen-DNA (1,5 μg)	je nach Konzentration
10x Transkriptionspuffer	3 μl
ATP/CTP/GTP, je 10 mM	3 μl
0,5 M DTT	1 μl
RNasin (40 U/ μl)	1 μl
[α -thio- ^{35}S]-UTP	10 μl
T3- bzw. T7-Polymerase (20 U/ μl)	1 μl
DEPC-H ₂ O	ad 30 μl

Der Ansatz wurde 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 μl RNase-freie DNase I zugegeben und die Matrizen-DNA für 15 min bei 37°C verdaut. Danach wurden 200 μl tRNA (0,5 mg/ml) und 250 μl Ammoniumacetat (4 M) zugegeben und die RNA mit 1 ml 100 %

Ethanol für 5 min auf Eis gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 7 min bei 13 000 x g wurde das Pellet in 200 µl DEPC-H₂O gelöst, mit 200 µl 4 M Ammoniumacetat versetzt und die RNA erneut mit 1 ml Ethanol (100 %) für 5 min auf Eis gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 7 min bei 13 000 x g wurde das Pellet nach kurzem Lufttrocknen in 0,1 M DTT gelöst. Anschließend wurde die Sonde in 100 µl Hybridisierungsmix verdünnt.

Die Aktivität und damit die Qualität der Sonde wurde durch Messung in einem Szintillationsmesser bestimmt. Dafür wurden 2 µl der im Hybridisierungsmix verdünnten Sonde mit 2 ml wasserlöslicher Szintillationsflüssigkeit gemischt. Die Messwerte lagen im Bereich zwischen $1 \cdot 10^6$ und $4 \cdot 10^6$ cpm / 2 µl.

Markierung von Ribosonden mit Digoxigenin

Die Markierung von Ribosonden mit Digoxigenin erfolgte mit Digoxigenin-11-uridin-5'-triphosphat (DIG-11-UTP). In folgendem 50 µl-Ansatz wurde die *in vitro*-Transkription durchgeführt:

Linearisierte Matrizen-DNA (1,5 µg)	je nach Konzentration
Transkriptionspuffer, 10x	5 µl
DIG RNA labeling mix	5 µl
RNasin (40 U/µl)	2 µl
T3- bzw. T7-Polymerase (20 U/µl)	1 µl
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl

Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C wurden dem Ansatz 0,5 µl entnommen und zur Kontrolle von Quantität und Größe per Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Dem restlichen Ansatz wurden 2 µl RNase-freie DNase I zugesetzt und für weitere 15 min bei 37°C die Matrize-DNA verdaut. Anschließend wurden dem Ansatz 5 µl Ammoniumacetat (5 M) zugegeben und die RNA mit 50 µl 100%igem Isopropanol für 30 min bei -20 °C gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 13.000 x g und 4 °C wurde das Pellet in 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals für 5 min bei 13 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde für 5-10 min bei RT luftgetrocknet, in 20 µl DEPC-H₂O gelöst und zur weiteren Lagerung bei -20 °C zu einer gewünschten Konzentration mit Hybridisierungsmix verdünnt. Um die spezifische Aktivität der Sonde zu überprüfen, wurde diese in verschiedenen Konzentrationen auf vorgefertigte Teststreifen (Roche, Mannheim) aufgetragen, die anschließend nach den Angaben des Herstellers entwickelt und ausgewertet wurden.

5.2.9.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Die entnommenen Gehirne wurden sofort nach der Präparation auf eine Rasierklinge transferiert, die auf Trockeneis gelegt wurde. Das so gefrorene Gewebe wurde in Aluminiumfolie gewickelt und konnte bei -80 °C für längere Zeit gelagert werden.

Vor dem Schneiden wurden die gefrorenen Gehirne auf einen metallenen Präparatehalter mit Hilfe von Einbettmedium befestigt. Die Gehirne wurden in einem Kryostat bei -14 °C bis -20 °C in einer Dicke von $16\text{ }\mu\text{m}$ geschnitten und nach dem Aufziehen auf Objektträger sofort auf einer Wärmeplatte bei ca. 40 °C getrocknet. Die so hergestellten Schnitte wurden in Plastikboxen bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

5.2.9.3 Radioaktive *in situ*-Hybridisierung mit ^{35}S -markierten Ribosonden

Prähybridisierungsbehandlung und Hybridisierung

Vor Beginn der Behandlung wurden die Schnitte für ca. 30 min auf RT erwärmt. Anschließend wurden die Präparate für 10 min in eiskaltem PFA (Paraformaldehyd, 4 % in PBS) fixiert und dreimal für je 5 min in PBS gewaschen. Es folgte eine 10minütige Acetylierung unter ständigem Rühren mit Essigsäureanhydrid (0,25 M; gelöst in 0,1 M Triethanolamin-HCl, pH 8,0). Danach wurden die Objektträger zweimal in 2x SSC für je 5 min gewaschen und in einer ansteigenden Ethanolreihe dehydriert (60 %, 75 %, 95 % und 100 %). Letztendlich erfolgte eine 5minütige Behandlung mit Chloroform, welches mit 95 % und 100 % Ethanol wieder ausgewaschen wurde.

Die staubfrei getrockneten Objektträger wurden mit $90\text{ }\mu\text{l}$ Hybridisierungsmix, welcher $100.000\text{ cpm}/\mu\text{l}$ der ^{35}S -markierten Sonde enthielt, bedeckt und mit einem Deckgläschen belegt. Die so behandelten Objektträger wurden in einer Kammer, deren Boden mit einer Lösung aus Formamid (50 %) und SSC (2x) in H_2O bedeckt war, ü. N. bei 65 °C inkubiert.

Hybridisierungsnachbehandlung

Am darauffolgenden Tage wurden die Deckgläschen vorsichtig von den Objektträgern getrennt und diese viermal für je 5 min bei RT in 4x SSC gewaschen. Für 20-30 min erfolgte eine Behandlung mit $20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A (nicht hitzeinaktiviert) in NTE-Puffer bei 37 °C . Im Anschluß wurde zweimal in 2x SSC / 1 mM DTT für je 5 min bei RT, einmal in 1x SSC / 1 mM DTT für 10 min bei RT und einmal in 0,5x SSC / 1 mM DTT für weitere 10 min bei RT gewaschen. Hochstringentes Waschen wurde zweimal in 0,1x SSC / 1 mM DTT für je 30 min bei 65 °C durchgeführt. Abschließend wurde noch zweimal in 0,1x SSC für je 10 min bei RT

gewaschen. Letztendlich wurden die Schnitte in einer ansteigende Ethanolreihe dehydriert (30 %, 50 %, 70 %, 95 % und zweimal 100 %), für 10 s in wässriger Toluidinblau-Lösung (0,1 %) gefärbt, zweimal für 10 s in Leitungswasser gewaschen, für 45 s in 70%igem Ethanol unter Zugabe von einem Tropfen Essigsäure pro 100 ml entfärbt und für 45 s in 100%igem Ethanol gespült. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden die Präparate mit Histofluid eingedeckt.

5.2.9.4 *In situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Ribosonden

Prähybridisierungsbehandlung und Hybridisierung

Vor Beginn der Behandlung wurden die Schnitte auf RT erwärmt und ca. 30 min getrocknet. Anschließend wurden die Präparate für 20 min in eiskaltem PFA (4 % in PBS) fixiert und zweimal für je 5 min in PBS gewaschen. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 15 min in H₂O₂, 1 % in 100 % Methanol, behandelt und anschließend zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Auf eine 8minütige Behandlung mit HCl (0,2 M) folgte zweimaliges Spülen mit 1x PBS für 5 min. Weiterhin wurden die Schnitte einer 10minütigen Proteinase-K-Behandlung (20 µg/ml in 50 mM Tris-HCl und 5 mM EDTA, pH 8,0) unterzogen. Nach einmaligen Waschen in PBS für 5 min wurde nochmals in PFA (4 % in PBS) fixiert. Anschließend wurde für 10 min unter ständigem Rühren acetyliert und für je 5 min mit PBS und NaCl (0,9 %) gewaschen. Abschließend wurde in einer ansteigenden Ethanolreihe dehydriert (30 %, 50 %, 70 %, 95 % und 100 %). Die staubfrei getrockneten Objektträger wurden mit 90 µl Hybridisierungsmix, welcher 200 ng/µl DIG-markierter Sonde enthielt, bedeckt und mit einem Deckgläschen belegt. Die so behandelten Objektträger wurden in einer Kammer, deren Boden mit einer Lösung aus Formamid (50 %) und SSC (2x) in H₂O bedeckt war, ü. N. bei 65 °C inkubiert.

Hybridisierungsnachbehandlung

Am darauffolgenden Tage wurden die Deckgläschen vorsichtig von den Objektträgern getrennt. Es folgten vier hochstringente Waschungen (1.: 5x SSC / 0,05 % Tween 20; 2.: 50 % Formamid / 2x SSC / 0,05 % Tween 20; 3.: 50 % Formamid / 1x SSC / 0,05 % Tween 20; 4.: 0,1x SSC / 0,05 % Tween 20) für je 30 min bei 62 °C. Alle weiteren Schritte wurden bei 30 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 5 min in NTE / Tween 20 (0,05 %) gewaschen.

Für die Detektion der DIG-markierten Sonde wurden die Präparate zuerst – zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen – für 1 h in 4 % hitzeinaktiviertem

Lammserum in TNT-Puffer inkubiert und danach dreimal für 5 min in TNT-Puffer gewaschen. An eine 30minütige Inkubation in Blockierungspuffer (im TSA-Kit enthalten) schloß sich die Antikörper-Bindung an. Dazu wurden die Schnitte für 1,5 h mit dem 1:1200 in Blockierungspuffer verdünnten Anti-Digoxigenin (F_{ab})-POD-Antikörperfragment inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TNT-Puffer entfernt. Anschließend erfolgte die 12minütige Inkubation mit dem 1:50 in Amplifikationspuffer (im TSA-Kit enthalten) verdünnten Biotin-markierten Tyramid (im Dunkeln). Nachdem einmal für 5 min mit Waschpuffer gespült worden war, folgte eine einstündige Inkubation mit dem 1:750 in Waschpuffer (mit 1 % Blockierungsreagens) verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Abschließend wurde nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 5 min die Farbreaktion mit DAB nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 15 min wurde die Färbung durch mehrere Waschschrte in H_2O gestoppt. Letztendlich wurden die Schnitte in einer ansteigenden Ethanolreihe dehydriert (30 %, 50 %, 70 %, 95 % und zweimal 100 %) und eingedeckt.

5.2.10 Spezielle Methoden für Arbeiten mit BACs

Generell wurde bei der Arbeit mit BAC-DNA die mechanische Belastung der DNA durch Scherkräfte, die beim Schütteln von Lösungen, Vortexen, Pipettieren etc. entstehen, so gering wie möglich gehalten, um keine Einzel- oder Doppelstrangbrüche in die BAC-DNA einzufügen. So wurde notwendiges Mischen durch vorsichtiges Invertieren vorgenommen und BAC-DNA nicht durch Pipettieren in Lösung gebracht.

5.2.10.1 Absuchen der Bibliothek nach BAC-Klonen

Zur Identifizierung von *Dyrk1A*-BAC-Klonen wurde die BAC-Bibliothek RPCI-23 von Research Genetics bezogen. Die 170 643 Klone der Bibliothek sind im Duplikat in einem bestimmten Muter auf sieben Membranen aufgebracht und für die Hybridisierung vorbereitet. Die Nummer der Membran, die Position der beiden Orte auf der Membran, an denen ein Klon aufgebracht wurde, und die relative Position dieser beiden Punkte zueinander definieren die Adresse eines Klons. Anhand dieser Adresse können Klone in Form von transformierten DH10B-Bakterien von Research Genetics bestellt werden. Alle 7 Membranen wurden parallel mit Sonden für *Dyrk1A* und drei weitere Gene (*CB1*, *GAD65* und *CCK*) hybridisiert.

Markierung der Sonden

Die Membranen wurden mit per *random priming* markierten DNA-Sonden (s. 5.2.7.1) hybridisiert. Als *Dyrk1A*-Sonde wurden die aufgereinigte Insertion des Klons J.8 (entspricht dem PCR-Produkt *Dyrk1A* JS.11/JS.12; s. Abbildung 6-1) und drei weitere Sonden für *CB1*, *GAD65* und *CCK* (hier nicht weiter beschrieben) verwendet. Außerdem wurde eine vom Hersteller mitgelieferte DNA markiert und als Kontrolle eingesetzt (s. u.). Die Aktivitäten der eingesetzten Sonden betragen 50 000-60 000 ips (Impulse pro Sekunde).

Hybridisierung der Membranen

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte entsprechend der Empfehlung des Lieferanten der BAC-Bibliotheks-Membranen (Research Genetics) wie in Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001) beschrieben. Dabei wurden alle 5 nach der *random priming*-Methode markierten Sonden (s. 5.2.7.1) gleichzeitig eingesetzt. Die Signale der Klone, die mit den eingesetzten Sonden hybridisierten, wurden per Autoradiographie mit einem Film je Membran detektiert. Anschließend wurden auf den Filmen die Adressen der positiven Klone bestimmt. Diese konnten festgelegt werden anhand der Signale der Positivkontrolle, die an den Rändern der Membranen die Zeilen und Spalten markieren, in denen die BAC-Klone aufgetragen sind. Dabei wurden nur solche Klone als positiv betrachtet, die ein doppeltes Signal für die im Duplikat aufgebrachten Klone entsprechend der 12 möglichen Muster, in denen die BAC-Klone auf den Membranen aufgebracht sind, lieferten. Eine weitere Information für die Klon-Adresse gibt dieses Muster, d. h. die relative Lage der beiden Signalpunkte zueinander. Aus der Nummer der Membran, der Zeile, der Spalte und dem Muster der Signale wurde die Klon-Adresse bestimmt. Anhand der ermittelten Adressen konnten die positiven Klone in Form von DH10B-Bakterien-Kulturen in Agar von Research Genetics gekauft werden.

5.2.10.2 Identifizierung von BACs durch PCR-Amplifikation aus Bakterien

Nach dem Ausstreichen der von Research Genetics bezogenen BAC-Bakterien-Klone auf LB-Agar-Platten mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) wurden je zwei Kolonien per PCR untersucht, um diejenigen Klone zu identifizieren, die das *Dyrk1A*-Gen als Insertion tragen.

Mit einer 10 µl-Pipettenspitze wurde eine kleine Menge, entsprechend ca. 0,1-0,2 µl, der Kolonie in 20 µl H₂O suspendiert. Diese Suspension wurde 10 min bei 95 °C erhitzt, um die Bakterien zu lysieren. Anschließend wurde die so freigesetzte BAC-DNA als Matrize in einer PCR eingesetzt.

5.2.10.3 Isolierung von BAC-DNA aus *E. coli*

Isolierung von BAC-DNA im kleinen Maßstab

BAC-DNA wurde im kleinen Maßstab mit dem *PSI CLONE BAC DNA Mini isolation*-Kit (emp Biotech, Berlin) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Isolierung von BAC-DNA im mittleren Maßstab

Zur Isolierung von bis zu 30 µg BAC-DNA, beispielsweise zur Analyse per Restriktionsverdau und *Southern Blot*, wurde eine Variante des *QIAfilter™ Plasmid Midi-Kits* verwendet. Der Kit wurde nach Herstellerangaben angewandt, allerdings wurden je 10 ml der mitgelieferten Puffer P1, P2 und P3 eingesetzt und der Elutionspuffer QF unmittelbar vor der Anwendung auf 65 °C erwärmt.

Isolierung von hochreiner BAC-DNA für die Sequenzierung

Für die Aufreinigung von bis zu 50 µg hochreiner BAC-DNA, die frei ist von genomischer Bakterien-DNA und von BAC-DNA mit Einzel- oder Doppelstrangbrüchen, wurde der *Qiagen® Large-Construct*-Kit nach den Herstellerangaben verwendet. Die Prozedur beinhaltet einen Inkubationsschritt mit einer ATP-abhängigen Exonuclease. Diese entfernt sowohl fragmentierte genomische DNA als auch beschädigte BAC-DNA, die nicht mehr zirkulär ist und dementsprechend freie Enden aufweist, die von der Exonuclease angegriffen werden können. Über Herkunft, Identität und spezifische Eigenschaften dieser Exonuclease macht der Hersteller keine Angaben.

Sequenzierung von BAC-DNA

Die Sequenzierung von BACs wurde als Auftragsarbeit von den Firmen TopLab (Martinsried) und SeqLab (Göttingen) entweder nach eigenen Protokollen (SeqLab) oder nach einem vom Hersteller der BAC-Bibliothek empfohlenen (<http://www.chori.org/bacpac/cyclesere.htm>) durchgeführt (TopLab).

5.2.10.4 λ -Terminase-Verdau

Linearisierung von Plasmiden mit λ -Terminase

Für den Verdau des Plasmids J.76 (pBS-Rekombinationskassette 1) und der BAC-Klone J.81.4 und J.81.5 wurden λ -Terminase-Präparationen der Firmen Epicentre und TaKaRa eingesetzt. Zum Vergleich der Enzympräparationen und zur Optimierung der Bedingungen wurden u. a. die folgenden Ansätze für den Verdau eines Plasmids eingesetzt:

Hersteller der λ -Terminase	Epicentre	TaKaRa	TaKaRa (+ATP)
H ₂ O	39 μ l	19 μ l	17,75 μ l
Puffer	5 μ l (10x-Puffer)	5 μ l (5x-Puffer)	5 μ l (5x-Puffer)
ATP (10 mM)	5 μ l	0	1,25 μ l
DNA (J.76; 1 μ g/ μ l)	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
λ -Terminase	0,5 μ l (1 U)	0,5 μ l (2 U)	0,5 μ l (2 U)
Gesamtvolumen	50 μ l	25 μ l	25 μ l

Der Verdau erfolgte für 3 h 15 min bei 30 °C. Anschließend wurde die verdaute DNA per Gelelektrophorese analysiert.

Linearisierung von BACs mit λ -Terminase

Zur Linearisierung von BACs wurde nach Optimierung der Bedingungen folgender Ansatz gewählt:

H ₂ O	2 μ l
Puffer	7 μ l
DNA (J.81.5; 125 ng/ μ l)	24 μ l (3 μ g)
λ -Terminase (TaKaRa)	2 μ l (8 U)
Gesamtvolumen	35 μ l

Der Verdau erfolgte für 3 h bei 30 °C. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 70 °C inaktiviert. Die BAC-DNA wurde zusätzlich mit *Not*I verdaut, um den Verdau des BAC-Vektors – der durch *Not*I-Verdau von der Insertion getrennt wird – durch die λ -Terminase im Gel nachweisen zu können.

Es wurden zum λ -Terminase-Ansatz hinzugegeben:

H ₂ O	26,5 μ l
Puffer 3 (NEB)	4 μ l
BSA (10 mg/ml)	7,5 μ l
<i>Not</i> I (NEB; 50 U/ μ l)	2 μ l

Der Ansatz wurde 4 h bei 37 °C inkubiert, dann mit 5x Ladepuffer versetzt, für 15 min auf 70 °C erhitzt, um die kohäsiven Enden, die durch den λ -Terminase-Verdau an der *cos*-Stelle entstehen, zu trennen, und per Pulsfeld-Gelelektrophorese analysiert.

5.2.10.5 Analyse von BAC-DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

BAC-DNA wurde, wenn die erwarteten Fragmente wie beispielsweise nach Verdau mit *Not* I größer als 40 kb waren, mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) mit dem Bio-Rad *CHEF-Mapper*[®] XA aufgetrennt. Der eingesetzte Laufpuffer war 0,5x TBE (ohne Ethidiumbromid), das Puffervolumen betrug ca. 2,5 l.

Vor Beginn einer Elektrophorese wurde frischer Puffer in die Elektrophoresekammer eingefüllt, die Umwälzpumpe eingeschaltet und der Laufpuffer auf 14 °C abgekühlt. Anschließend wurde eine Suspension von 120 ml 0,5x TBE mit 1 % (w/v) SeaKem-GTG-Agarose erhitzt und die Agarose dadurch gelöst. 100 ml von dieser Lösung wurden nach Abkühlung auf 50-60 °C in den vorbereiteten Gießstand des *CHEF-Mapper*[®] XA gegossen. Es wurde ein Kamm für die gewünschte Anzahl an Taschen eingesetzt. Der Rest der Agaroselösung wurde in einem Wasserbad (60 °C) warmgehalten. Nach Erstarren des Gels und Entfernen des Kamms wurden dünne Scheiben (ca. 0,5-1 mm) der PFGE-Längenstandards (λ -Leiter und *MidRange II*-Marker) an die Vorderseite einer entsprechenden Anzahl von Geldaschen angeheftet. Sodann wurden diese Taschen mit einer Pasteur-Pipette mit der aufbewahrten flüssigen Agarose aufgefüllt. Nachdem auch diese erkaltet war, wurde das Gel in der Elektrophoresekammer positioniert und 30 min mit dem Laufpuffer äquilibriert. Nun erfolgte – bei ausgeschalteter Zirkulation des Laufpuffers – die Applikation der Proben in das in der Kammer befindliche Gel. Die anschließende Elektrophorese unter Zirkulation des auf 14 °C temperierten Laufpuffers wurde nach Einstellung eines aufzulösenden Bereiches von 10 kb bis 300 kb und der weiteren erforderlichen Parameter (Gelkonzentration, Puffer, Pufferkonzentration, Feldstärke) mit dem Programm *Auto algorithm* des *CHEF-Mapper*[®] XA durchgeführt; in dieser Einstellung wählt das Gerät die weiteren Parameter wie die Umschaltzeiten für die beiden wechselnden elektrischen Felder selbst. Die Elektrophorese dauerte unter diesen Bedingungen 20 h 18 min. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel in 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid in Laufpuffer für 30 min angefärbt und unter dem UV-Leuchtschirm ausgewertet.

5.3 Methoden für die Arbeit mit *Saccharomyces cerevisiae*

Die eingesetzten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme Y187 und AH109 wurden von der Firma Clontech erworben. Die Kultur der Hefen und alle weiteren Arbeiten wurden – soweit hier nicht anders angegeben – nach den mitgelieferten detaillierten Protokollen durchgeführt.

5.3.1 Kultur von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefen wurden stets bei einer Temperatur von 30 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden mit 220-250 U/min geschüttelt. Kulturen auf Agar-Platten wurden bei 30 °C in einem Schrank inkubiert, in dem, um ein Austrocknen der Platten zu vermeiden, zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit mehrere mit H₂O gefüllte Bechergläser standen.

5.3.2 Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA

Die Transformation der Hefen wurde unter Verwendung von Lithiumacetat per Hitzeschock nach der Anleitung von Clontech, die auf einem ursprünglich von Ito *et al.* (Ito *et al.*, 1983) beschriebenen Protokoll basiert, durchgeführt. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf geeignete Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert, um erfolgreich transformierte Klone zu selektieren.

5.3.3 Verpaarung von Hefen zum Absuchen der prätransformierten cDNA-Bibliothek

Die Verpaarung des Hefe-Klons Y.4 (AH109[J.73 pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41]), der die Fusion von GAL4-DNA-BD und der Dyrk1A-Kinase-Domäne exprimiert, mit der in Y187 prätransformierten Maus-Gehirn-cDNA-Bibliothek im Vektor pACT2 wurde nach dem vom Hersteller (Clontech) des *MATCHMAKER System 3*, dem alle benutzten Komponenten entstammten, mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Die Selektion von Interaktoren erfolgte mit hoher Stringenz auf 13cm-SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal-Agarplatten und parallel mit mittlerer Stringenz auf 25cm-SD/-H/-L/-W-Platten. Die Platten wurden 14 Tage bei 30 °C inkubiert.

5.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Die Isolierung von Plasmiden aus Hefekulturen erfolgte nach einem Protokoll der Firma Qiagen, das auf dem für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* mit dem *QIAprep[®] Spin Miniprep*-Kit basiert. Es wurden 2 ml geeignetes Selektionsmedium mit einer Kolonie beimpft und 16-24 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert (in Einzelfällen auch länger, wenn noch keine deutliche Trübung der Kultur erkennbar war). Die Zellen der Kultur wurden anschließend abzentrifugiert (5 min bei 5000 x g) und in 250 µl Puffer P1 (im Kit enthalten) resuspendiert. Die Suspension wurde in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und zum Aufschluß der Zellen 2 min mit je 50-100 µl Glaskügelchen mit dem Vortex bei maximaler Geschwindigkeit gemischt. Der Ansatz wurde einige Minuten stehengelassen, bis die Glaskügelchen sich am Boden absetzen. Der Überstand wurde nach dem Protokoll des Herstellers, das von hier an dem für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* entspricht, weiterverarbeitet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 25 µl Elutionspuffer. Für die anschließende Transformation von *E. coli* (DH5α) mit den aus den Hefe-Klonen aufgereinigten Plasmiden wurden 2-3 µl der so hergestellten DNA-Lösung eingesetzt.

5.4 Arbeiten mit Säuger-Zelllinien und –Primärkulturen

Routinearbeiten der Zellkultur wurden nach den in Spector *et al.* (Spector *et al.*, 1998) beschriebenen Methoden durchgeführt.

5.4.1 Vorbehandlung von Deckgläschen

Vor der Transfektion wurden sowohl Zelllinien als auch Primärkulturen auf Deckgläschen mit 12 mm Durchmesser kultiviert. So konnten die Zellen nach der Transfektion fixiert und Dauerpräparate hergestellt werden.

Die Deckgläschen wurden zuvor folgendermaßen behandelt:

Behandlung	Dauer
Salpetersäure, konz.	24 h schütteln
Leitungswasser	12 h schütteln
H ₂ O	12 h schütteln
Ethanol, 70 %	beliebig
Aceton	kurzes Eintauchen
Ethanol, 100 %	kurzes Eintauchen

Die Deckgläschen wurden nach dem Eintauchen in 100 % Ethanol abgeflammt und einzeln in die Kammern einer 24-Kammer-Kulturschale gegeben. Danach wurden sie für mindestens 1 h mit Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet. Anschließend wurden die Kulturschalen inklusive der Deckgläschen einmal mit H₂O gewaschen.

5.4.2 Kultivierung von Säuger-Zelllinien

5.4.2.1 Kultur von HT22-Zellen

Bei der HT22-Zelllinie handelt es sich um einen Subklon der Zelllinie HT4. Diese stammt von einer hippocampalen Neuroblastom-Zelllinie aus der Maus ab, die mit einem Retrovirus transformiert wurde, der eine temperatursensitive Mutante des *SV40 large T antigen* trägt (Morimoto & Koshland, Jr., 1990). Diese Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle-Medium* (DMEM), supplementiert mit 0,5 mM L-Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum, auf 100 mm-Zellkulturschalen in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und wurden in der Regel jeden zweiten bis dritten Tag in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 subkultiviert.

5.4.2.2 Kultur von HEK293-Zellen

Die Zelllinie HEK293 wurde durch Transformation primärer embryonaler Nierenzellen des Menschen mit Adenovirus-DNA generiert (Graham *et al.*, 1977). HEK293-Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle-Medium*, supplementiert mit 2 mM L-Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum, auf 100 mm-Zellkulturschalen in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂

kultiviert und wurden in der Regel jeden zweiten bis dritten Tag in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 subkultiviert.

5.4.3 Transfektion von Zelllinien und Primärkulturen

Zur Transfektion von Säuger-Zellen wurde grundsätzlich Endotoxin-(Lipopolysaccharid-)freie Plasmid-DNA, präpariert mit dem *EndoFree™ Plasmid Maxi-Kit* (s. 5.2.1.3), eingesetzt.

5.4.3.1 Transfektion von HT22-Zellen mit LIPOFECTAMINE™ 2000

HT22-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für hrGFP und für hrGFP-Dyrk1A kodieren, um die Eigenschaften des hrGFP-Dyrk1A-Fusionsproteins zu untersuchen.

HT22-Zellen wurden am Tage vor der Transfektion in einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Kammer auf Deckgläschen in 24-Kammer-Kulturschalen ausgesät. Zur Transfektion wurde das kommerziell erhältliche Transfektionsreagens LIPOFECTAMINE™ 2000 (Invitrogen), ein kationisches Lipid, nach Herstellerangaben eingesetzt. Folgende Parameter sind im Herstellerprotokoll nicht spezifiziert und wurden nach Optimierung wie folgt gewählt: Pro Ansatz wurde 1 µg DNA in Optimum-Medium (Invitrogen) verdünnt, ebenso in einem getrennten Ansatz 1 µl LIPOFECTAMINE™ 2000. Diese beiden Lösungen wurden nach Inkubation für 5 min (RT) miteinander gemischt, das Gemisch 20 min inkubiert (RT) und dann auf die Zellen pipettiert. Nach Transfektion von Expressionsplasmiden, die für ein EGFP- oder hrGFP-Fusionsprotein kodieren, wurden die Zellen am darauffolgenden Tage (nach 20 -24 h) mit PBS gewaschen, mit kalter PFA-Lösung (4 % in PBS) für 10 min fixiert, erneut mit PBS gewaschen, mit DAPI (5 µg/ml in PBS) zur Markierung der Zellkerne angefärbt und nach nochmaligem Waschen in PBS mit dem wässrigen Eindeckmedium Protaqstura, welches die fluoreszierenden Proteine vor dem Ausbleichen schützt, auf Objektträger eingedeckt.

5.4.3.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit LIPOFECTAMINE™ 2000

Die Transfektion von HEK-Zellen mit LIPOFECTAMINE™ 2000 mit den Plasmiden, die für Fusionsproteine von Dyrk1A und Arip4 mit EGFP und seinen Varianten kodieren, erfolgte nach demselben Protokoll wie die von HT22-Zellen; allerdings wurden die Zellen erst am 2. Tage nach der Aussaat transfiziert. Die Zellen wurden ebenfalls eingedeckt und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop und mit dem konfokalen *Laser scanning-*Mikroskop untersucht.

5.4.3.3 Transfektion von HEK293-Zellen per Elektroporation

Zur Koimmunpräzipitation wurden anfangs per Elektroporation transfizierte HEK293-Zellen eingesetzt. Da die Transfektionseffizienz mit dieser Methode aber nicht reproduzierbar über 50 % lag und die Zellen oft nach der Transfektion nicht mehr adhärent wuchsen, wurde zur Calciumphosphat-vermittelten Transfektion (s. u.) gewechselt.

Die Zellen wurden vor der Transfektion so auf 10cm-Schalen ausgesät, daß sie am Tage der Transfektion eine Dichte von 80 % erreichten. Pro Transfektionsansatz wurden die Zellen einer Schale nach Waschen mit PBS trypsinisiert, erneut gewaschen und in Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand), die schon die zu transfizierende Plasmid-DNA enthielt, überführt. Die Elektroporation erfolgte im *Gene Pulser II* (Bio-Rad) bei folgenden Bedingungen:

$$U = 224 \text{ V}$$

$$C = 750 \text{ } \mu\text{F}$$

Die Zeitkonstante der Entladung betrug in der Regel 25-30 ms.

Die Zellen wurden sofort anschließend in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt und auf eine 10cm-Schale ausgesät. Nach Inkubation ü. N. im Brutschrank (5 % CO₂) wurden die Zellen lysiert und die Lysate zur Koimmunpräzipitation eingesetzt.

5.4.3.4 Transfektion von HEK293-Zellen mit Calciumphosphat

Die Calciumphosphat-vermittelte Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte im wesentlichen nach einem Protokoll von Chen und Okayama (Chen & Okayama, 1987) zur Expression der mittels Koimmunpräzipitation untersuchten Fusionsproteine. Diese Methode wurde statt der Elektroporation eingesetzt, da die mit Calciumphosphat erreichte Transfektionseffizienz von ca. 90 % höher war als nach Elektroporation.

Für jeden Transfektionsansatz wurden $3,75 \cdot 10^6$ Zellen in 10 ml Kulturmedium auf eine 10cm-Platte ausgesät und für 12 h bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Jeweils 20 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA (bei Kotransfektionen insgesamt 20 µg) wurden mit H₂O (Ampuwa®) auf ein Volumen von 450 µl verdünnt und mit 50 µl CaCl₂-Lösung (2,5 M) gemischt. Dieser DNA-CaCl₂-Lösung wurden 500 µl BBS (2x) zugesetzt; der Ansatz wurde nach Mischen mit dem Vortex (für 2-3 s) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach tropfenweise in das Medium der zu transfizierenden Zellkultur gegeben. Die Zellen wurden daraufhin in einen Brutschrank mit 3 % CO₂ gestellt. Nach ca. 24 h wurde das Medium der Zellen gewechselt. Am zweiten Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate zur Immunpräzipitation eingesetzt.

5.4.3.5 Transfektion von Primärkultur-Zellen mit Effectene®

Hippocampale neuronale Primärkulturen 16 Tage alter Rattenembryonen wurden von Dr. Nadhim Bayatti (MPI für Psychiatrie) zur Verfügung gestellt.

Es wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Kammer einer 24-Kammer-Zellkulturschale auf Poly-D-Lysin-beschichteten (s. o.) Deckgläschen in MEM mit 10 % Pferdeserum ausgesät und für 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden am zweiten Tage nach der Aussaat – nach dem Erneuern bzw. Wechsel des Mediums (s. u.) – mit Effectene®, einem von Qiagen kommerziell erhältlichen Transfektionsreagens, mit Plasmiden, die für EGFP-Fusionsproteine kodieren, transfiziert. Dabei wurden weitgehend die Herstellerangaben für die Transfektion hippocampaler Primärkulturen befolgt, d. h. es wurden 0,5 µg DNA mit 1,6 µl *Enhancer* (Qiagen; mit Effectene® mitgeliefert) und 2 µl Effectene® transfiziert; allerdings erfolgte die Transfektion in der Regel in MEM mit 10 % Pferdeserum. Alternativ wurde auch serumfreies Medium (Neurobasal mit B27-Supplement; Brewer *et al.*, 1993) eingesetzt. 12 h nach der Transfektion wurde das Medium erneuert. Nach 20-24 h wurden die Zellen fixiert, mit DAPI gefärbt und eingedeckt wie für HT22-Zellen unter 5.4.3.1 beschrieben.

5.5 Arbeiten mit Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Paare von Fusionsproteinen aus HEK-Zellen koimmunpräzipitiert. Dabei wurde eines der beiden Fusionsproteine mit einem an eine Matrix gebundenen Antikörper präzipitiert, dann das zweite Fusionsprotein in dem Präzipitat per Immundetektion nach elektrophoretischer Auftrennung und *Western Blot* nachgewiesen.

Außerdem wurde Dyrk1A per *Western Blot* in Lysaten von Gehirnen und Zelllinien nachgewiesen.

5.5.1 Koimmunpräzipitation

Die Immunpräzipitation von FLAG-Fusionsproteinen erfolgte mit dem *Anti-FLAG-M2 Affinity Gel* (Sigma). Pro Ansatz wurden die Zellen von einer 10cm-Schale nach Transfektion verwendet. Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen und 30 min bis 1 h in 200 µl kaltem Lysepuffer auf Eis lysiert. 20 µl, entsprechend ungefähr 5 % des gesamten Lysates, wurden abgenommen und eingefroren (-20 °C); der Rest des Lysates wurde für die Koimmunpräzipitation eingesetzt. Die weitere Prozedur folgte dem Protokoll des Herstellers des *Anti-FLAG-M2 Affinity Gel* (Sigma). Nach Durchführung der Koimmunpräzipitation (ü. N.

bei 4 °C) und Waschen des Gels wurden die präzipitierten Proteine für 3 min bei 95 °C in SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und zusammen mit der Hälfte des vorher eingefrorenen unbehandelten Lysates (entsprechend ca. 2,5 % des gesamten Zellysates, s. o.) per SDS-PAGE, *Western Blot* und Immundetektion analysiert.

5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) wurde nach der in Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001) und Harlow & Lane (Harlow & Lane, 1999) beschriebenen Methode durchgeführt. Eingesetzt wurden durchweg 7,5%ige Trenngele; die Elektrophorese erfolgte in der Regel für 2 h bei 80 V.

5.5.3 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (*Western Blot*)

Nach der Auftrennung im Polyacrylamid-Gel wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P) transferiert. Dies geschah nach dem Protokoll des Herstellers der Membran (Millipore). Der Transfer erfolgte für 4-6 h bei 45 V in einem *Tank-Blot*-System (Bio-Rad). Anschließend wurden die Membranen zur Fixierung der Proteine nach Immersion in Methanol (15 s) für 15 min getrocknet, dann in Methanol (15 s) und H₂O (2 min) rehydriert und für die Immundetektion der Proteine eingesetzt.

5.5.4 Immundetektion von Proteinen nach dem *Western Blot*

Die Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen erfolgte nach der in Harlow & Lane beschriebenen Methode (Harlow & Lane, 1999); für die hier durchgeführten Immundetektionen wurde allerdings TBST als Waschpuffer verwendet. Die Membranen wurden zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen 1 h in Blockierpuffer (TBST mit 5 % Magermilchpulver) inkubiert, anschließend ü. N. bei 4 °C mit dem Primärantikörper in Blockierpuffer. Am nächsten Tage wurden die Membranen dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in Blockierpuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min) wurde die Detektion per Chemilumineszenz mit dem ECL-Kit (Amersham) durchgeführt.

5.5.5 Entfernung von gebundenen Antikörpern (*Stripping*)

Zur erneuten Detektion von Proteinen mit einem anderen Antikörper auf schon benutzten PVDF-Membranen wurden die Antikörper der ersten Detektion entfernt: Die Membranen wurden für 30 min bei 70 °C in *stripping*-Lösung (100 mM β -Mercaptoethanol; 62,5 mM Tris [pH 6,8]; 2 % SDS) in Glasküvetten inkubiert. Währenddessen wurden die Küvetten mehrmals geschwenkt. Anschließend wurden die Membranen dreimal in TBS gewaschen und zur erneuten Immundetektion eingesetzt.

5.5.6 Immunhistochemie

Zur Detektion von Dyrk1A mittels Immunhistochemie wurden sagittale und coronale 8 μ m-Schnitte von perfusionsfixierten Maus-Gehirnen (mit 4 % PFA in PBS fixiert) angefertigt.

Zur immunhistochemischen Detektion von Dyrk1A mit dem monoklonalen anti-Dyrk1A-Antikörper (aus der Maus) von BD Transduction Laboratories wurde der *Vector[®] M.O.M.[™] Immunodetection Kit* eingesetzt. Dieser Kit erlaubt die Detektion von Antigenen in Geweben der Maus mit Antikörpern, die in der Maus generiert wurden, ohne starke Hintergrundfärbung.

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Der Kit wurde entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt, allerdings erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper (1:25 verdünnt in der mitgelieferten Proteinlösung Nr. 1) ü. N. bei 4 °C. Nach Beendigung der Prozedur wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und in Xylol dehydriert und mit DPX eingedeckt.

6 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, zu einer Klärung der Funktion von Dyrk1A im Gehirn der Säuger beizutragen. Um dieses zu erreichen, wurden drei parallele, sich ergänzende Wege eingeschlagen:

- erstens die Untersuchung von Expression und Lokalisation von Dyrk1A im Gehirn der adulten Maus, beschrieben unter 6.1,
- zweitens die Generierung einer transgenen Mauslinie, die *Dyrk1A* konditional überexprimiert, dargestellt im Abschnitt 6.2 und
- drittens die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, die mit Dyrk1A interagieren (siehe 6.3).

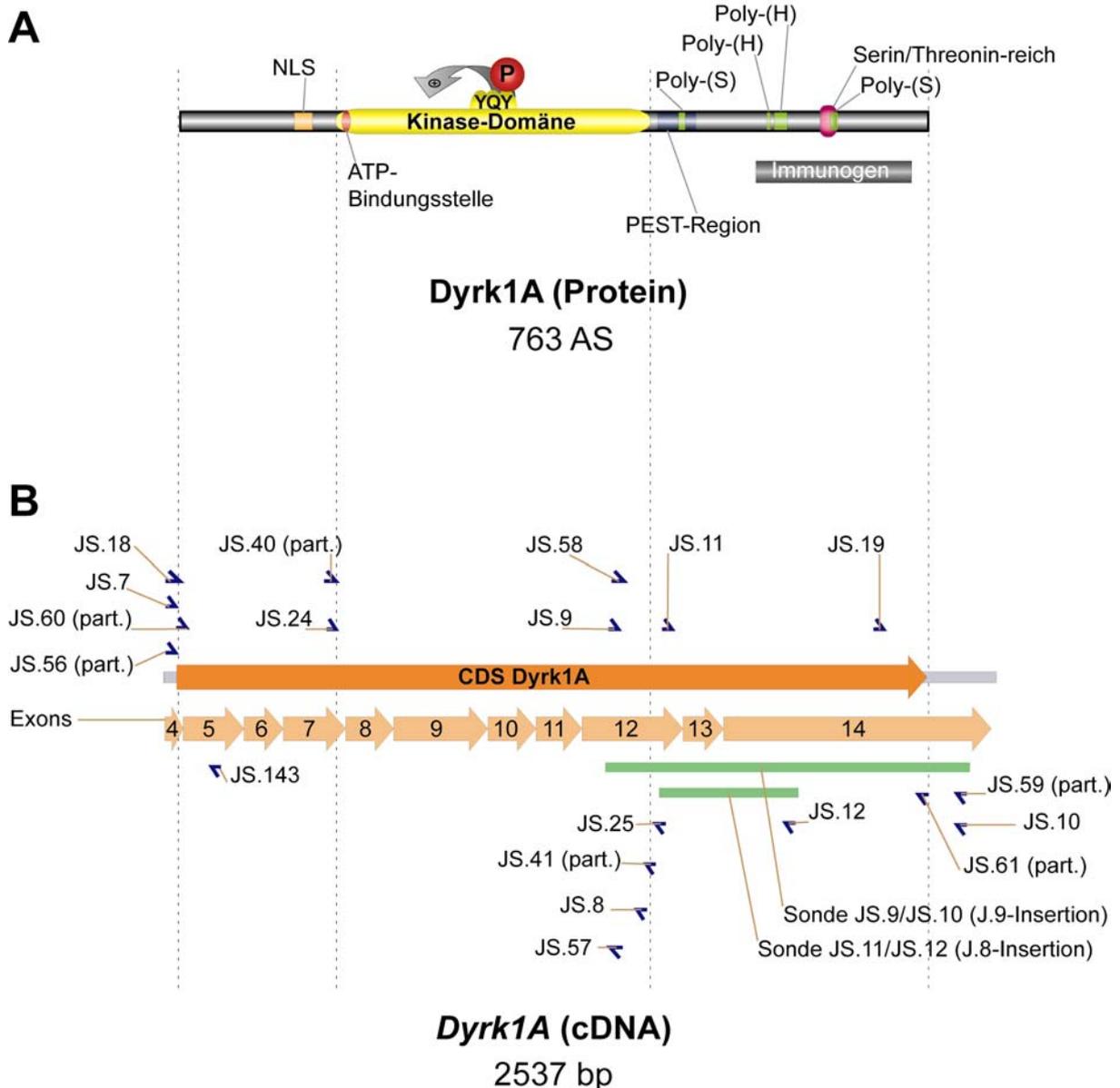


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung von Dyrk1A-Protein (A) und Dyrk1A-cDNA (B)

Eingezeichnet sind die Domänen des Proteins (A; nach Kentrup *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1996) und das zur Generierung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten monoklonalen anti-Dyrk1A-Antikörpers (s. Abschnitt 6.1.2) von BD Transduction Laboratories verwendete Immunogen; weiterhin in der cDNA (B) die hier verwendeten Primer⁶ (blaue Pfeile) und Sonden⁷ (grüne Balken) sowie die 11 kodierenden Exons (s. auch Abschnitt 6.2.1). NLS: Nukleäre Lokalisationssequenz; YQY: regulatorische Schleife; P: Phosphat-Gruppe; \oplus : Regulation der Aktivität durch den Phosphorylierungszustand der regulatorischen Schleife; poly-(H): poly-Histidin-Sequenz; poly-(S): poly-Serin-Sequenz; CDS: proteinkodierende Sequenz; part.: Primer entspricht nur partiell der Dyrk1A-cDNA.

⁶ Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden in der Regel mit dem Kürzel JS und einer Nummer bezeichnet.

⁷ In dieser Arbeit generierte (oder identifizierte) Klone wurden mit dem Buchstaben J und einer Nummer bezeichnet.

6.1 Analyse der Expression und Lokalisation von Dyrk1A

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur wenige Daten über die Expression von *Dyrk1A* und die Lokalisation des entsprechenden Proteins im Gehirn der adulten Maus vor (Guimera *et al.*, 1996; Rahmani *et al.*, 1998; Bartsch *et al.*, 1998). Da eine genaue Kenntnis hiervon aber für die funktionelle Analyse von Dyrk1A unverzichtbar ist und insbesondere auch im Rahmen der beiden anderen Projekte dieser Arbeit – der Generierung von transgenen Mäusen und der Identifizierung von Dyrk1A-Interaktoren – essentiell ist, wurden die Expression von *Dyrk1A* und die Lokalisation des Proteins mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie untersucht. Ein Teil dieser Experimente wurde als vergleichende Analyse der Expression von *Dyrk1A* und der Dyrk1A-Interaktoren *Sept4* und *Arip4* mittels *in situ*-Hybridisierung durchgeführt und ist in einem gesonderten Kapitel beschrieben (s. Abschnitt 6.3.4).

6.1.1 Untersuchungen zur Expression von *Dyrk1A* im Gehirn der adulten Maus mittels *in situ*-Hybridisierung

Die Expression von *Dyrk1A* im Gehirn der adulten Maus wurde mit nichtradioaktiver *in situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-(DIG-)markierten Sonde (JS.9/JS.10 [J.9-Insertion], s. Abbildung 6-1, Abschnitt 6.3.4) untersucht. Die Hybridisierung wurde an coronalen Gefrierschnitten von Gehirnen adulter Mäuse durchgeführt.

6.1.1.1 *Dyrk1A*-Expression in der Hippocampusformation und im Cerebellum

Die Analyse der *Dyrk1A*-Expression beschränkt sich an dieser Stelle auf zwei Gehirnregionen: Wegen der wichtigen Funktionen von Hippocampusformation und Cerebellum in unterschiedlichen Lern- und Gedächtnisprozessen war die Expression von *Dyrk1A* hier von besonderem Interesse. Außerdem wurden in beiden Regionen bei Down-Syndrom-Patienten neuromorphologische Anomalien beschrieben, die wahrscheinlich im Zusammenhang mit neurologischen Störungen, die bei dieser Krankheit auftreten, stehen (s. Abschnitt 2.1).

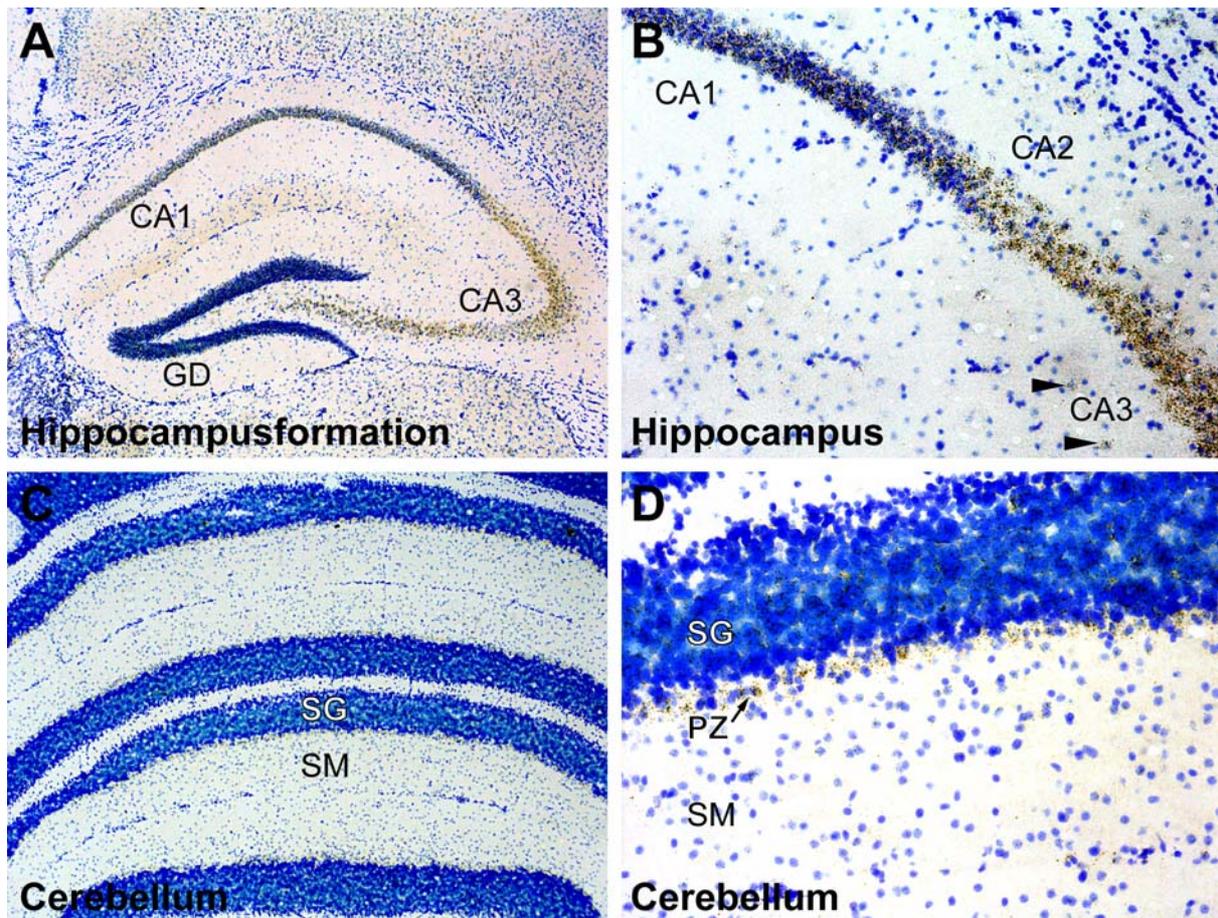


Abbildung 6-2: Expressionsanalyse von *Dyrk1A* in der Hippocampusformation und im Cerebellum mittels *in situ*-Hybridisierung

In situ-Hybridisierung mit der DIG-markierten *Dyrk1A*-spezifischen Sonde JS.9/JS.10 (J.9-Insertion; s. Abbildung 6-1) an Gefrierschnitten von Gehirnen adulter Mäuse. A, B: Hippocampusformation, C, D: Cerebellum; A, C: Übersichten; B und D zeigen jeweils Details aus A und C. Die *Dyrk1A*-mRNA (brauner Niederschlag) konnte im Hippocampus in den Pyramidenzellen aller Felder des Cornu Ammonis (CA1-CA3) nachgewiesen werden (A und B), in Interneuronen des Stratum radiatum (Pfeilspitzen in B) und in den Körnerzellen des Gyrus dentatus (GD). Im Cerebellum fanden sich in allen Schichten *Dyrk1A*-positive Zellen, im Stratum moleculare (SM) waren die Signale allerdings sehr schwach und traten nur in einzelnen Zellen auf. SG: Stratum granulosum; PZ: Purkinje-Zellschicht. Der Pfeil in D markiert eine *Dyrk1A*-positive Purkinje-Zelle. In Regionen mit hoher Zelldichte (CA1, GD, SG) werden die Signale teilweise durch die Anfärbung der Zellkerne mit Toluidinblau verdeckt.

Im Hippocampus wird *Dyrk1A*, wie in Abbildung 6-2 A und B zu sehen ist, in den Pyramidenzellen der Regionen CA1, CA2 und CA3 exprimiert. Außerdem wurden einige schwache Signale in den Zellen der anderen Schichten wie beispielsweise dem Stratum radiatum (siehe Abbildung 6-2 B, Pfeilspitzen) gefunden; hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Interneurone, die die *Dyrk1A*-mRNA in geringem Maße enthalten. Weiterhin wurden deutliche Signale in den Körnerzellen des Gyrus dentatus detektiert (s. Abbildung 6-2 A).

Im Cerebellum sind die Signale nur in der höheren Vergrößerung zu sehen (Abbildung 6-2 D). Hier wird deutlich, daß *Dyrk1A* in den Purkinje-Zellen und in den Körnerzellen des

Stratum granulosum exprimiert wird. Schwache Signale waren im Stratum moleculare nachweisbar.

6.1.2 Analyse der Lokalisation von Dyrk1A im Gehirn der adulten Maus mittels Immunhistochemie

Zur Analyse der Synthese und Lokalisation des Proteins Dyrk1A wurde dieses immunhistochemisch in sagittalen und coronalen Paraffinschnitten von Gehirnen adulter Mäuse (Stamm C57BL/6N) detektiert. Es wurde ein monoklonaler anti-Dyrk1A-Antikörper aus der Maus von der Firma BD Transduction Laboratories eingesetzt. Dieser ist gegen die Aminosäuren 588 bis 746 des Dyrk1A-Proteins der Ratte (Sequenz nach Kentrup *et al.*, 1996) gerichtet. Dies entspricht etwa dem C-terminalen Viertel. Da in dieser Domäne keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen inklusive der anderen Kinasen der Dyrk-Familie bestehen – eine *BLAST*-Suche mit dieser Sequenz lieferte nur Dyrk1A als Treffer –, kann eine Kreuzreaktivität nahezu ausgeschlossen werden. In *Western Blot*-Experimenten an Gehirn-Lysaten adulter Mäuse lieferte dieser Antikörper ausschließlich eine Bande an der erwarteten Position (entsprechend 86 kDa; Resultate nicht gezeigt).

Mit immunhistochemischen Färbungen wurden in nahezu allen Hirnregionen Dyrk1A-Signale gefunden: in Neocortex, Hippocampusformation, Bulbus olfactorius, Striatum, Thalamus, Cerebellum, Pons, Mesencephalon und Myelencephalon (s. Tabelle 6-1).

6.1.2.1 Die intrazelluläre Lokalisation von Dyrk1A in ausgewählten Gehirnregionen

Besonderes Interesse wurde der intrazellulären Lokalisation von Dyrk1A zuteil, insbesondere in jenen Gehirnregionen, die wichtige Rollen in kognitiven Prozessen spielen, wie z. B. der Neocortex und die Hippocampusformation, außerdem im Cerebellum wegen seiner Bedeutung für das motorische System und motorisches Lernen sowie im Pons (s. Abbildung 6-3). In diesen Arealen war eine deutliche Immunreaktivität nachweisbar. Dabei wiesen die großen Pyramidenzellen in der Lamina V des Neocortex mittelstarke zytoplasmatische und starke nukleäre Signale auf; auch die apikalen Dendriten dieser Zellen waren markiert. Ähnlich stellten sich die Signale der Pyramidenzellen in der CA3-Region des Hippocampus dar. Hier, in der CA3-Region, war allerdings zu beobachten, daß das Verhältnis von zytoplasmatischer zu nukleärer Immunreaktivität von Zelle zu Zelle unterschiedlich ist; der nukleäre Anteil überwog dabei in der Regel. Die Dendriten der CA3-Pyramidenzellen wiesen eine schwache Immunreaktivität auf. In großen Neuronen der pontinen Nuclei dagegen zeigten sich ausschließlich zytoplasmatische Signale von mittlerer Intensität, der Zellkern

war frei von Dyrk1A-Immunreaktivität. Im cerebellären Cortex wiederum wurde Dyrk1A in unterschiedlichen Lokalisationen gefunden: in einigen Purkinje-Zellen ausschließlich zytoplasmatisch, in einigen zytoplasmatisch und nukleär; allerdings war im Gegensatz zu den Pyramidenzellen in Neocortex und Hippocampus das nukleäre Signal nur von mittlerer Stärke, ebenso wie die zytoplasmatischen Signale der Purkinje-Zellen. Auffällig war hier, daß nicht alle Purkinje-Zellen für Dyrk1A positiv waren. Außerdem fand sich im Kleinhirn noch Dyrk1A-Immunreaktivität im Zytoplasma von Korbzellen und Sternzellen im Stratum moleculare.

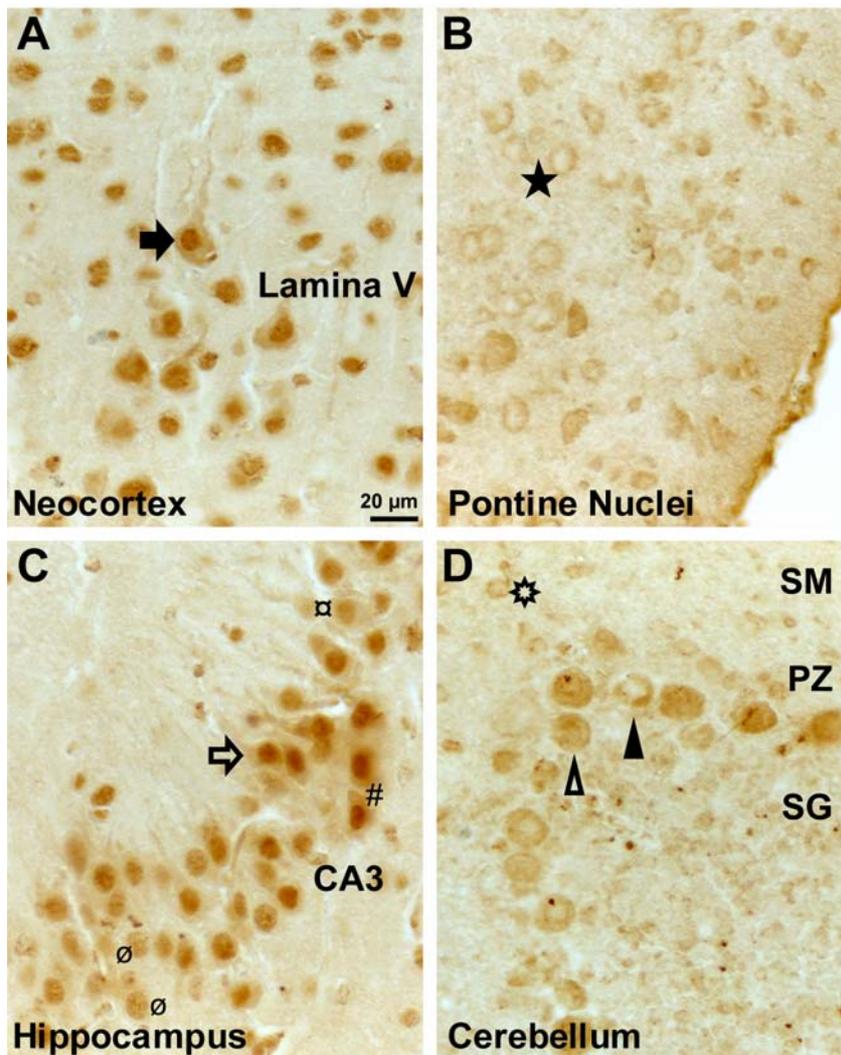


Abbildung 6-3: Analyse der Lokalisation von Dyrk1A im Gehirn der adulten Maus mittels Immunhistochemie

Die Abbildung zeigt die immunhistochemische Markierung von Dyrk1A in vier ausgewählten Regionen mit einem monoklonalen anti-Dyrk1A-Antikörper (BD Transduction Laboratories) an sagittalen Paraffinschnitten. Deutlich zu sehen sind starke nukleäre und schwächere zytoplasmatische und dendritische Signale in den Pyramidenzellen von Neocortex (A; gefüllter Pfeil in Lamina V) und Hippocampus (C; offener Pfeil). In der hippocampalen Region CA3 sind unterschiedliche Kern-Zytoplasma-Relationen zu beobachten: #: starkes Signal in Kern u. mittleres im Zytoplasma; α: mittlere Signale, im Kern nur geringfügig über Zytoplasma-Niveau; ∅: Dyrk1A ausschließlich im Kern. Dagegen ist in den Neuronen der pontinen Nuclei (B) ausschließlich das Zytoplasma markiert (gefüllter Stern); in den cerebellären Purkinje-Zellen (D; PZ) ist Dyrk1A teils nur zytoplasmatisch (gefüllte Pfeilspitze), teils auch nukleär (offene Pfeilspitze) lokalisiert, in den Neuronen des Stratum moleculare (SM) nur zytoplasmatisch (offener Stern). Die Körnerzellen des Stratum granulosum (SG) zeigen ebenfalls Signale. In Purkinje-Zellen und in Körnerzellen wurden teilweise nukleäre oder perinukleäre Aggregate angetroffen (D). Der Größenstandard in A gilt für A bis D.

Region		Zellkern	Zytoplasma
Hippocampus	CA1-CA3 (Pyramidenzellen)	++ + (+)} unterschiedliche Populationen	(+)
	Interneurone	+	(+)
	Hilus	+ ++	-
Gyrus dentatus (S. granulosum)		+	-
Corpus callosum (Oligodendrocyten)		+	-
Neocortex, alle Laminae		++ (die Mehrheit der Neurone; teilweise nukleäre Aggregate) - (wenige Zellen)	(+)
Ependym		++	+
Plexus choroideus		++ (teilweise Aggregate)	(+)
Corpus striatum		++	-
Bulbus olfactorius		+	-
Thalamische Nuclei		+	-
Substantia nigra		- } unterschiedliche Populationen + }	+ +
Pontine Nuclei		-	+
Ventrolaterale tegmentale Area		-	+
Periolivare Nuclei		-	+
Nucleus facialis		-	+
Reticuläre Nuclei		-	+
Vestibuläre Nuclei		-	+
Cerebelläre Nuclei		-	+
Colliculus inferior		+ } unterschiedliche Populationen - }	- +
Colliculus superior		+	-
Cerebellärer Cortex	Körnerzellen	(+) (teilweise Aggregate)	(+)
	Purkinje-Zellen	+ } (teilweise Aggregate) - } unterschiedliche Populationen	+ +
	Korb- u. Sternzellen	- (teilweise Aggregate)	+

Tabelle 6-1: Zusammenfassung der Dyrk1A-Immunreaktivität im Gehirn der adulten Maus

-: kein Signal; (+): schwaches, +: deutliches, ++: starkes Signal; in einigen Arealen wurden nukleäre oder perinukleäre Aggregate beobachtet, s. auch Abbildung 6-3. S: Stratum

6.2 Herstellung von BAC-Konstrukten zur Generierung von *Dyrk1A*-transgenen Mäusen

In dieser Arbeit sollte eine Mauslinie etabliert werden, die *Dyrk1A* konditional, d. h. orts- und zeitspezifisch, überexprimiert. Diese Überexpression sollte in bezug auf ihre Höhe der im Down-Syndrom entsprechen. Um diese Ziele zu erreichen, wurde die Strategie gewählt, eine transgene Mauslinie mit einem bakteriellen artifiziiellen Chromosom (BAC, *bacterial artificial chromosome*), welches den *Dyrk1A*-Locus inklusive aller regulatorischen Elemente enthalten sollte, zu generieren und das *Dyrk1A*-Gen des BAC derart zu modifizieren, daß es gezielt aktiviert werden kann. Dafür sollte das Gen auf dem BAC durch Insertion von Polyadenylierungssignalen reversibel inaktiviert werden. Die Reversibilität der Inaktivierung sollte durch Flankierung der Polyadenylierungssignale mit *loxP*-Stellen sichergestellt werden, so daß nach Kreuzung einer ersten Mauslinie, die das BAC mit dem inaktivierten *Dyrk1A*-Gen enthält, mit einer zweiten, die das Enzym Cre-Rekombinase orts- und zeitspezifisch exprimiert, die inaktivierende Sequenz herausgeschnitten wird und die dritte Kopie des *Dyrk1A*-Gens exprimiert werden kann (s. Abbildung 6-15).

6.2.1 Identifizierung und Charakterisierung von *Dyrk1A*-BAC-Klonen

Zur Generierung von transgenen Mäusen mit einem *Dyrk1A*-BAC wurden BAC-Klone aus der kommerziell erhältlichen BAC-Bibliothek RPCI-23 (Osoegawa *et al.*, 2000) isoliert. Diese Bibliothek wurde ausgewählt, da sie mit ihrer durchschnittlichen Insertionsgröße von 197 kb geeignet ist, um einen BAC-Klon mit dem gesamten *Dyrk1A*-Locus – der sich über mehr als 150 kb erstreckt – zu isolieren. Die Bibliothek enthält genomische DNA von weiblichen Mäusen des Stammes C57BL/6J, die nach partiellem Restriktionsverdau der DNA mit dem Enzym *Eco* RI und paralleler Methylierung mit *Eco* RI-Methylase sowie anschließender Isolierung großer Produkte in den Vektor pBACe3.6 (Frogen *et al.*, 1999) ligiert und dann in *E. coli* des Stammes DH10B transformiert wurde (Osoegawa *et al.*, 1998).

Als Ansatzpunkt zur Isolierung eines *Dyrk1A*-BAC-Klons lagen zu Beginn dieser Arbeit folgende Daten vor: Die Sequenz des *Dyrk1A*-Gens der Maus war nicht bekannt, wohl aber die der cDNA (Song *et al.*, 1996). Außerdem war die Sequenz der Region des humanen Chromosoms 21, in der das *DYRK1A*-Gen liegt, im Internet erhältlich (http://www-alis.tokyo.jst.go.jp/HGS/team_KS/21q22.2/map.html). Die Exon-Intron-Struktur des humanen *DYRK1A*-Gens wurde kurz nach Beginn dieser Arbeit publiziert (Guimera *et al.*, 1999), so

daß anhand dieser Daten auch die Struktur des *Dyrk1A*-Gens der Maus – allerdings nur für die 11 kodierenden Exons – abgeleitet werden konnte (s. Abbildung 6-8).

6.2.1.1 Identifizierung von BAC-Klonen mittels Hybridisierung der Bibliotheks-Membranen

Es wurden von der Firma Research Genetics Membranen bezogen, auf denen die 180 396 Klone der Bibliothek RPCI-23 jeweils doppelt aufgetragen sind. Diese repräsentieren das Mausgenom 11,2fach. Die BAC-Bakterien-Klone auf den Membranen befinden sich in einem Zustand nach alkalischer Lyse und Fixierung, so daß die DNA frei zugänglich und direkt für die Hybridisierung einsetzbar ist.

Die sieben Membranen wurden mit einer radioaktiv markierten *Dyrk1A*-spezifischen Sonde (JS.11/JS.12) hybridisiert. Als Sonde wurde ein 395 bp langer Bereich aus der *Dyrk1A*-cDNA (Basen 1524-1918 der von Song *et al.* publizierten Sequenz [Song *et al.*, 1996; U58497.1], s. Abbildung 6-1) der Maus ausgewählt, der für einen Teil des C-Terminus kodiert, welcher keine Ähnlichkeit zu anderen verwandten Kinasen zeigt. Die längste mit einem anderen Gen der Maus (*IMAGE*-Klon 5323742) identische Sequenz innerhalb der Sonde umfaßt 20 bp. Das *Dyrk1A*-cDNA-Fragment wurde mit den Primern JS.11 und JS.12 in einer RT-PCR⁸ amplifiziert und anschließend kloniert, so daß das resultierende Plasmid J.8 (pCR[®]II-Dyrk1A JS.11/JS.12) als Matrize für die Synthese und Markierung der Sonde mit ³²P-dCTP eingesetzt werden konnte. Nach Hybridisierung der Membranen und Detektion der Signale per Autoradiographie konnten 58 positive Klone für *Dyrk1A* und drei weitere Gene (CB1 [Cannabinoid-Rezeptor 1], GAD67 [*glutamic acid decarboxylase of 67 kDa*, Glutamat-Decarboxylase von 67 kDa] und CCK [*Cholecystokinin*, Cholezystokinin]), nach denen im Zusammenhang mit anderen Projekten in der Arbeitsgruppe parallel gesucht wurde, identifiziert werden. Dabei wurden nur solche Klone als positiv gewertet, die ein deutliches Signal in Form von zwei Punkten lieferten. Anhand der Lokalisation der Signale auf den Membranen und der Lage der beiden Punkte zueinander wurden die Klon-Adressen bestimmt. Anschließend wurden 33 Klone (von den Membranen 1 bis 4) von Research Genetics in Form von Bakterienkulturen in Agar erworben.

⁸ RT-PCR: *Reverse transcription-polymerase chain reaction*, Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

6.2.1.2 Identifizierung der BAC-Klone mittels PCR

Die von Research Genetics anhand der Ergebnisse der Hybridisierung (s. 6.2.1.1) bestellten BAC-Bakterien wurden auf Agar-Platten ausgestrichen. Von jedem BAC-Klon wurden zwei Kolonien untersucht, um sicherzustellen, daß die untersuchten Bakterien einen Klon bilden. Um die Ergebnisse der Hybridisierung zu verifizieren und außerdem eine Zuordnung der 33 erhaltenen BAC-Klone zu den vier untersuchten Genen zu ermöglichen, wurde eine zweite Runde der Identifizierung mittels PCR⁹ durchgeführt. Dafür wurden Oligonukleotide ausgewählt, die in Exon 12 von *Dyrk1A* binden (JS.9/JS.8; s. Abbildung 6-1) und ein Produkt von 106 bp amplifizieren. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß fünf Klone diesen Abschnitt des *Dyrk1A*-Gens enthalten (siehe Abbildung 6-4, Tabelle 6-2).

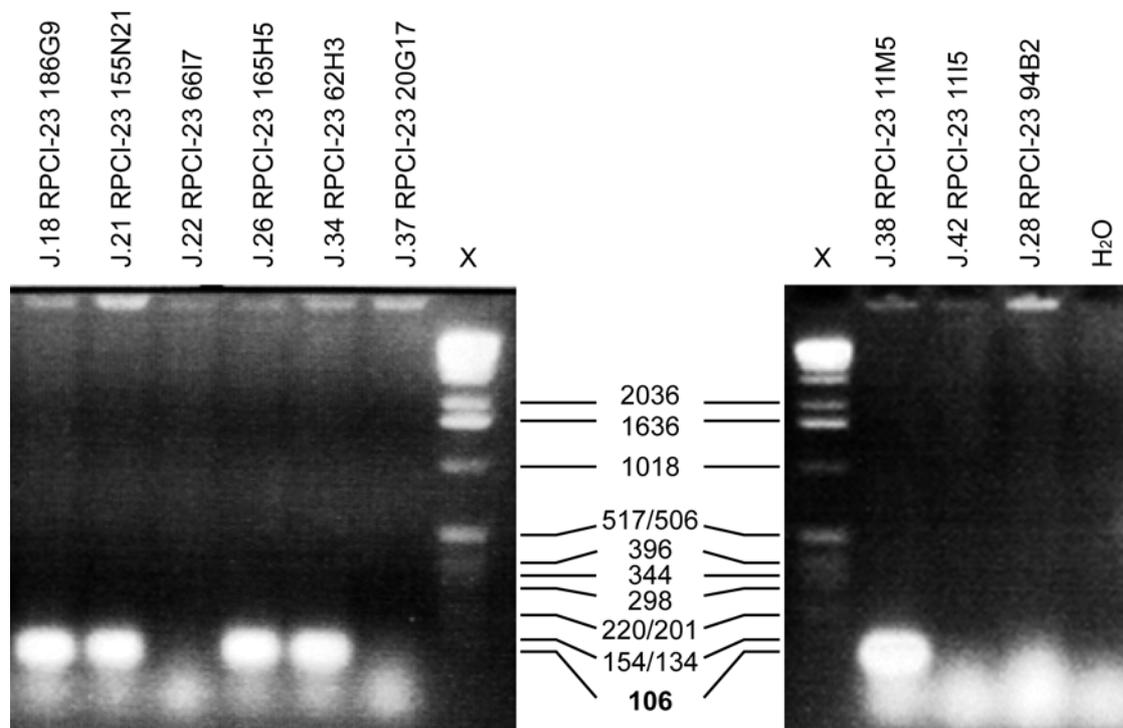


Abbildung 6-4: PCR zur Identifizierung von *Dyrk1A*-BAC-Klonen

Die PCR (Primer JS.9/JS.8; s. Abbildung 6-1) wurde mit BAC-DNA (aus BAC-Bakterien-Suspensionen nach deren Lyse) als Matrize durchgeführt, und zwar von *Dyrk1A*-Klonen (J.18, J.21, J.26, J.34 und J.38) und von Kontroll-Klonen, die nicht *Dyrk1A* enthalten (J.22, J.37, J.42 und J.28). Die *Dyrk1A*-positiven Klone lieferten ein PCR-Produkt von 106 bp, welches einen Teil von Exon 12 darstellt. X: Längenstandard Marker X

Nachdem Guimera *et al.* 1999 die Exon-Intron-Struktur des humanen *DYRK1A*-Gens publiziert hatten, konnten Oligonukleotide ausgewählt werden, die spezifisch bestimmte Exons von *Dyrk1A* amplifizieren. So wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden JS.19 und JS.10 zum Nachweis von Exon 14, welches das 3'-Ende der mRNA bildet, durchgeführt.

⁹ PCR: *Polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion

Auch in diesem Experiment wurden für die fünf bisher untersuchten Klone positive Resultate erzielt (s. Abbildung 6-5, Tabelle 6-2).

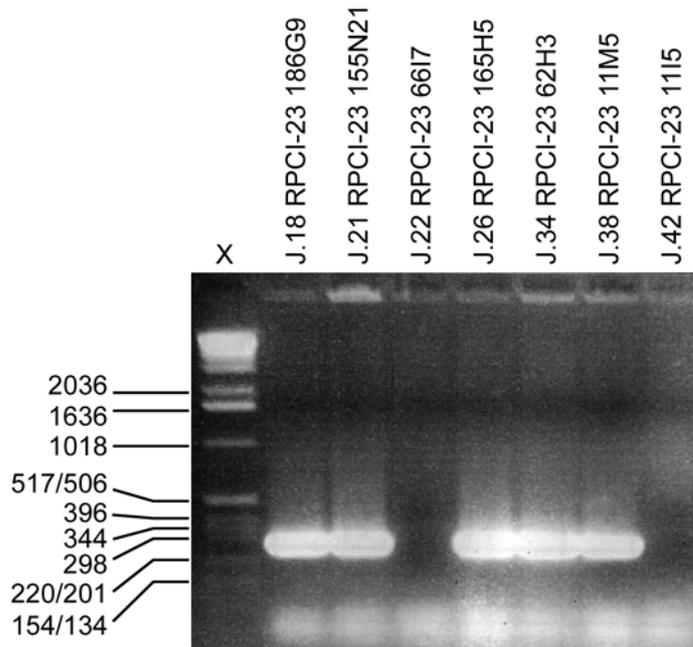


Abbildung 6-5: PCR zum Nachweis von Exon 14 von *Dyrk1A* in der Insertion der BAC-Klone

Die PCR mit den Primern JS.19/JS.10 wurde mit BAC-Bakterien-Suspensionen nach Lyse als Matrize durchgeführt, und zwar von *Dyrk1A*-Klonen und von Kontroll-Klonen, die nicht *Dyrk1A* enthalten. Ein Kontrollansatz mit H₂O anstelle einer Matrize lieferte keine Bande (nicht gezeigt). Fünf der untersuchten Klone liefern die erwartete Exon 14-spezifische Bande (273 bp). X: Längstenstandard Marker X

Klon-Adresse	Klon-Nr.	Not I-Banden (kb)	Insertions-Größe (kb)	Exon 1	Exon 4	Exon 12	Exon 14
RPCI-23 186G9	J.18	140, 42, 30	212	+	+	+	+
RPCI-23 155N21	J.21	150, 42, 23	215	+	+	+	+
RPCI-23 165H5	J.26	160, 42	202	+	+	+	+
RPCI-23 62H3	J.34	150	150	+	+	+	+
RPCI-23 11M5	J.38	190, 42, 7	239	+	+	+	+

Tabelle 6-2: Ergebnisse der Suche nach *Dyrk1A*-BAC-Klonen

Die Tabelle faßt einige Ergebnisse zur Charakterisierung der gefundenen *Dyrk1A*-BAC-Klone zusammen. Die Klon-Adresse ist die offizielle Bezeichnung von Research Genetics, die Klon-Nr. eine nur intern gebrauchte. Zu den Experimenten siehe Abbildung 6-4 (Exon 12), Abbildung 6-5 (Exon 14), Abbildung 6-6 (*Not* I-Verdau) und Abbildung 6-7 (Exons 1 und 4).

6.2.1.3 Charakterisierung der BAC-Klone: Restriktionsverdau und Southern Blot-Hybridisierungen

Zur weiteren Charakterisierung der BAC-Klone sollte ihre Größe festgestellt und eine Restriktionskartierung mit dem Enzym *Not* I, das im Vektor pBACe3.6 auf beiden Seiten der eingefügten DNA schneidet, vorgenommen werden. Dafür wurde BAC-DNA präpariert, diese nach Verdau mit *Not* I in einem Pulsfeld-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (Abbildung 6-6). Hier waren bei vier der fünf untersuchten Klone mehr als zwei Banden im Gel zu finden. Dies bedeutet, daß Schnittstellen von *Not* I auch im Bereich der Insertion liegen. Dieses Enzym ist also nicht geeignet, um den *Dyrk1A*-Locus aus dem jeweiligen Klon vom Vektor zu isolieren. Die aufsummierten Größen der BAC-Klone (ohne Vektorbereiche) sind in Tabelle 6-2 aufgelistet.

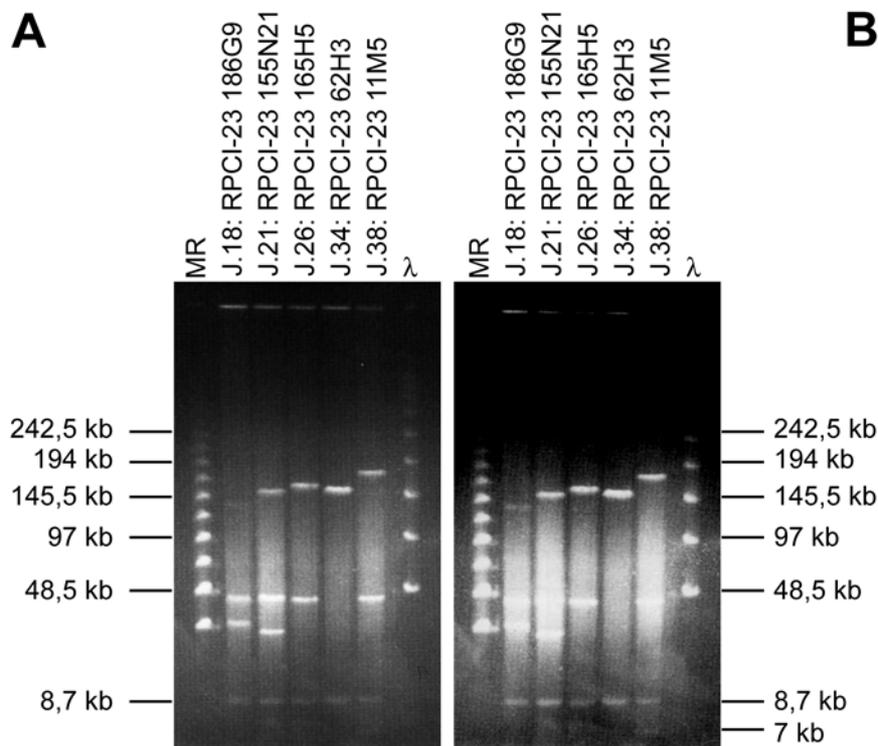


Abbildung 6-6: *Dyrk1A*-BAC-Klone nach *Not* I-Verdau

DNA von fünf *Dyrk1A*-BAC-Klonen wurde nach Aufreinigung mit *Not* I verdaut, in einem Pulsfeld-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Bande von 8734 bp (8,7 kb) repräsentiert den Vektor pBACe3.6, die langsamer laufenden Fragmente und eine Bande von ca. 7 kb im Falle von J.38 (B) stellen die Insertionen der BAC-Klone dar. Das Gel wurde mit zwei unterschiedlichen Belichtungszeiten (A: 0,5 s; B: 0,7 s) photographiert, um alle Banden sichtbar abzubilden. Längenstandards: λ -Leiter (λ) und *MidRange II*-PFG-Marker (MR)

Nach diesen Experimenten sollte bestätigt werden, daß auch die 5'-ständigen Exons sowie der Promotor und alle weiteren regulatorischen Elemente des *Dyrk1A*-Locus auf den BAC-Klonen enthalten sind. Deshalb wurde zuerst die Anwesenheit der Exons 4 und 1 überprüft. Exon 4 wurde ausgewählt, da es den Translationsinitiationsort, das Start-ATG, enthält. Außerdem war zu Beginn der Arbeit zumindest ein 45 bp langer Teil von Exon 4 der Maus

bekannt, der zwar aufgrund seiner geringen Größe keine Amplifikation per PCR zuließ, aber zur Auswahl eines Oligonukleotids von 30 b Länge (JS.18, s. Abbildung 6-1) für die Detektion mittels Hybridisierung (*Southern Blot*) ausreichte. Zur Detektion von Exon 1 wurde ein Oligonukleotid aus der entsprechenden humanen Sequenz ausgewählt (JS.17). Von allen fünf bisher untersuchten *Dyrk1A*-BAC-Klonen wurde DNA präpariert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym *Not* I verdaut, anschließend in einem Pulsfeld-Gel aufgetrennt (s. Abbildung 6-7 A), geblottet und mit den Sonden JS.17 (Exon 1, human) oder JS.18 (Exon 4, Maus) nach deren radioaktiver Markierung mit ³²P-dCTP mit terminaler Transferase hybridisiert. Wie aus Abbildung 6-7 B und C zu ersehen ist, konnte gezeigt werden, daß alle fünf Klone sowohl Exon 1 als auch Exon 4 enthalten. Beide Exons liegen innerhalb des jeweils größten Fragmentes nach *Not* I-Verdau (Klon J.38/11M5: 190 kb). Parallel wurde der größte der BAC-Klone, der Klon J.38 (RPCI-23 11M5), mit weiteren selten schneidenden Restriktionsendonukleasen verdaut, die alle im Vektor-Bereich von J.38 schneiden (*Asc* I, *Pme* I, *Sgr* A I, *Pi-Sce* I; s. Abbildung 6-13), um die Anwesenheit entsprechender Schnittstellen im BAC zu untersuchen. Nach Verdau mit dem Enzym *Asc* I konnte vom Klon J.38 nur eine Bande von ca. 240 kb – entsprechend der Summe der *Not* I-Fragmente – detektiert werden, d. h. es kommen außer den zwei bekannten (nur 189 bp voneinander entfernten) Schnittstellen im Vektor keine weiteren vor. Somit ist *Asc* I zur Linearisierung dieses Klons geeignet. Der Klon J.38 wurde wegen der größten Länge der Insertion für alle weiteren Experimente ausgewählt, da die Wahrscheinlichkeit für die Existenz des kompletten *Dyrk1A*-Locus inklusive aller regulatorischen Elemente in diesem Klon am höchsten war.

6.2.1.4 Charakterisierung der BAC-Klone: Sequenzierungen

Von Klon J.38 wurde hochreine DNA präpariert, um mit Hilfe einer Sequenzierung der Insertions-Enden eine abschließende Charakterisierung dieses Klons und des Bereiches der hier vorhandenen genomischen DNA der Maus vornehmen zu können. Die Sequenzierung wurde mit den Oligonukleotiden T7, gSP6.22 und pBACe3.6F, die alle im Bereich des Vektors binden, vorgenommen (s. Abbildung 6-8). Auf diese Weise konnten die Sequenzen der Enden der Insertion von genomischer DNA, die der Klon J.38 enthält, ermittelt werden. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm *BLAST* (Altschul *et al.*, 1997) mit bekannten Sequenzen in Datenbanken verglichen.

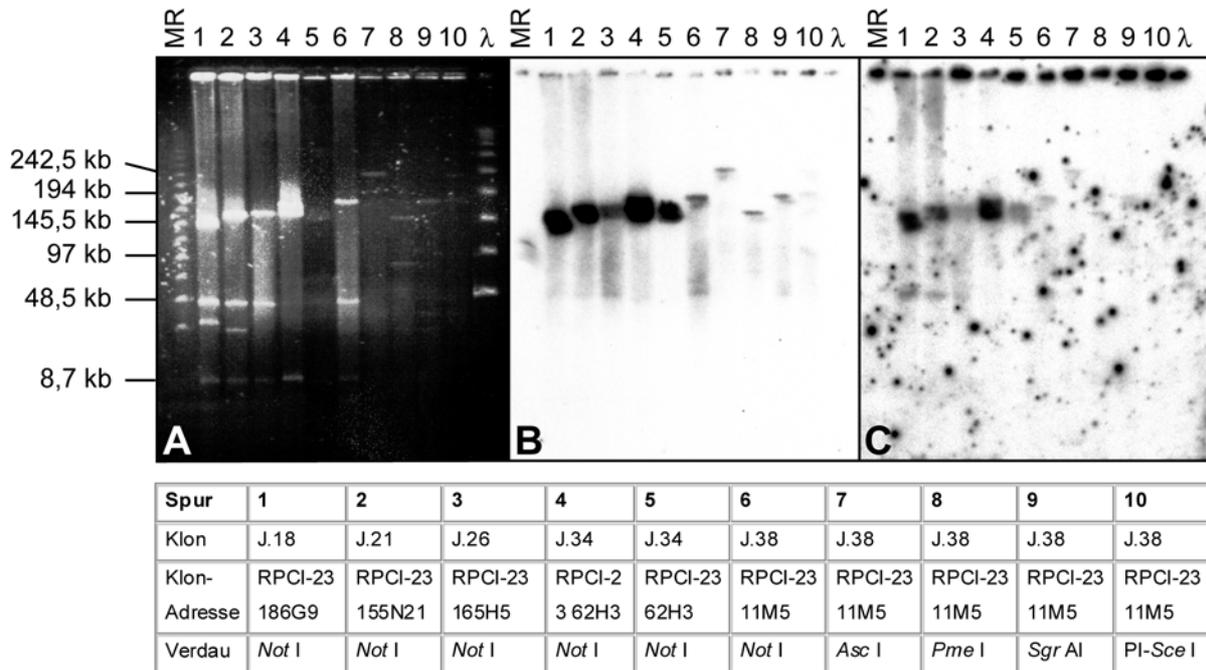


Abbildung 6-7: Pulsfeld-Gelelektrophorese und *Southern Blot* zum Nachweis der Exons 1 und 4 von *Dyrk1A* in den Insertionen der BAC-Klone

Die BAC-DNA der fünf identifizierten *Dyrk1A*-BAC-Klone wurde nach *Not* I-Verdau und Auftrennung in einem Pulsfeld-Gel (A) und Transfer auf eine Membran nacheinander mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden JS.18 (B; *Dyrk1A* Exon 4, Maus) und JS.17 (C; *Dyrk1A* Exon 1, human) hybridisiert. Deutlich ist das Signal der jeweils größten Bande (s. auch Tabelle 6-2) aller fünf Klone in beiden Hybridisierungen zu sehen. Dies zeigt die Anwesenheit beider Exons in den fünf BAC-Klonen. Außerdem ist das Ergebnis eines Verdauens des Klons J.38 mit verschiedenen Enzymen gezeigt, von denen alleine *Asc* I die BAC-Insertion nicht schneidet. Der Vektor der BAC-Klone wird von allen eingesetzten Enzymen geschnitten, s. Abbildung 6-13; Längenstandards: λ -Leiter (λ) und *MidRange II*-PFG-Marker (MR)

Dabei wurde in einem Teil des gSP6.22-Ergebnisses eine 98%ige Übereinstimmung mit einem Teilbereich des Exons 7 des *Girk2*-Gens (*Girk2: G protein-linked inwardly rectifying K⁺ channel 2* [Wei *et al.*, 1998]) der Maus festgestellt. Dieses Gen liegt auf dem Chromosom 16 direkt distal¹⁰ vom *Dyrk1A*-Gen, und zwar in antiparalleler Orientierung, wobei Exon 7 das dem *Dyrk1A*-Gen am nächsten gelegene Exon ist. Im Falle der beiden anderen Sequenzen wurde keine Übereinstimmung mit Datenbankeinträgen gefunden. Deshalb wurde, um weitere Informationen über den Klon J.38 zu erhalten, das 7kb-Fragment aus dem *Not* I-Verdau (s. Abbildung 6-6, Tabelle 6-2) in den Vektor pBluescript[®] II KS subkloniert und sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis dieses J.69 genannten Konstruktes (sequenziert mit dem Primer T3) lieferte in einer *BLAST*-Suche mehrere Treffer in unterschiedlichen Datenbankeinträgen in der Bande 21q22.2 auf dem humanen Chromosom 21. Der entsprechende Teilbereich aus dem Datenbankeintrag, der das beste Ergebnis mit der höchsten Übereinstimmung ergeben hatte, wurde wiederum in einer Chromosom-21-

¹⁰ distal: in Richtung zum Telomer hin

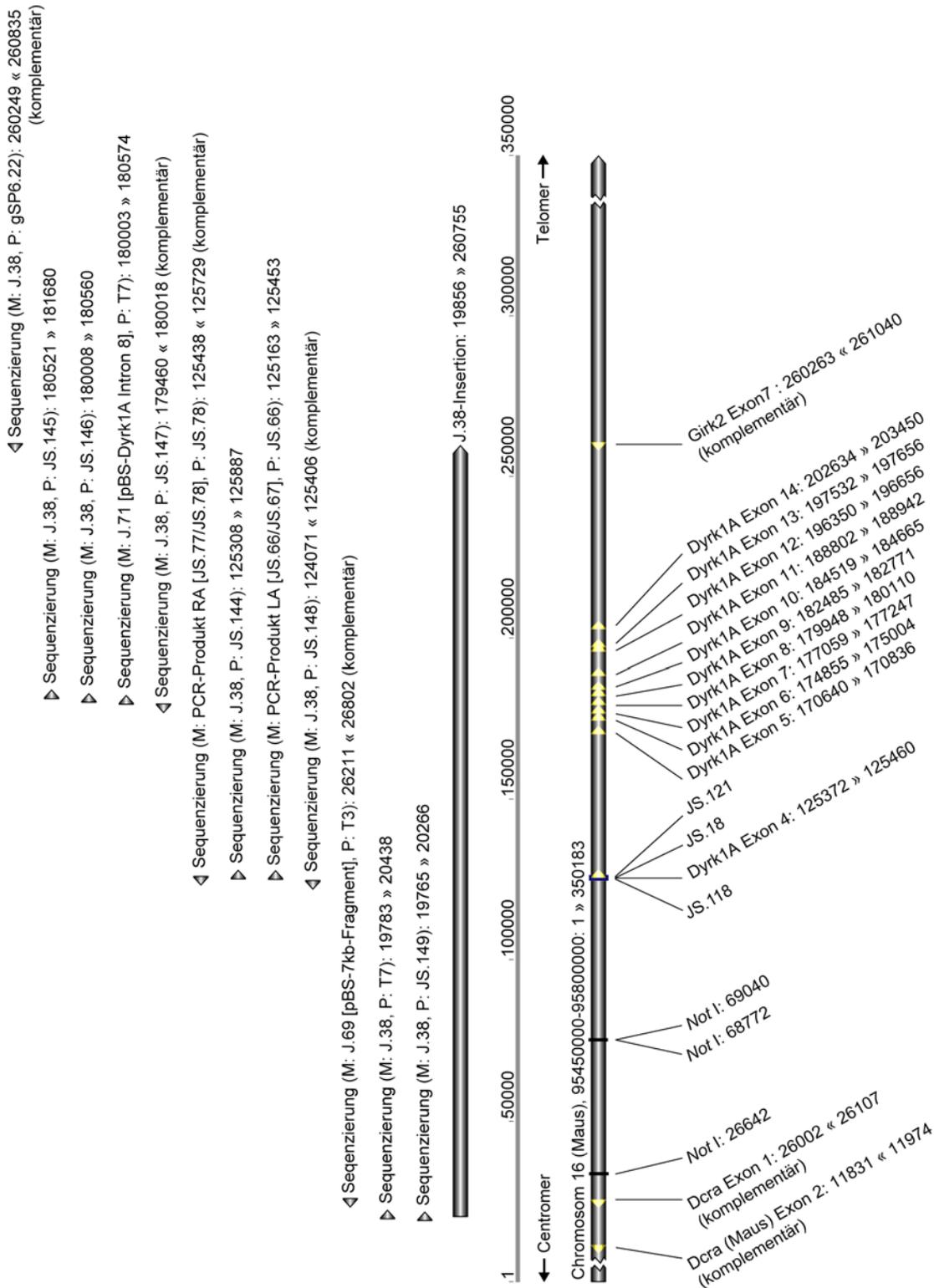
spezifischen *BLAST*-Suche (<http://seqmap21.genome.ad.jp>) eingesetzt, um diese Sequenz in Relation zu *DYRK1A* und den benachbarten Genen genauer lokalisieren zu können. Dabei konnte diese Sequenz ca. 100 bp distal von Exon 1 des *DCRA*-Gens (*DCRA: Down Syndrome Critical Region gene A* [Nakamura *et al.*, 1997]) gefunden werden. *DCRA* ist das dem *Dyrk1A* benachbarte Gen in proximaler¹¹ Richtung und liegt antiparallel zu *DYRK1A* (Hattori *et al.*, 2000). Aus der Orientierung des T3-Sequenzierungsergebnisses von J.69 folgt, daß die ca. 7 kb der Insertion dieses Klons sich in Richtung proximal erstrecken, d. h. daß der Beginn der J.38-Insertion ungefähr 7 kb proximal von Exon 1 von *Dcra* liegt (s. Abbildung 6-8). Anschließend wurde versucht, das gefundene Bandenmuster nach dem Verdau der BAC-Klone mit *Not*I (s. Tabelle 6-2) zu erklären: Aus den Ergebnissen der *Southern Blot*-Hybridisierungen (s. Abbildung 6-7) folgt, daß die Exons 1 und 4 Bestandteil eines im Falle von J.38 190 kb großen Fragmentes sind. Wie das Sequenzierungsergebnis des 7kb-Fragmentes (Klon J.69) gezeigt hat, liegt dieses proximal der *Dyrk1A*-Exons nahe dem *Dcra*-Gen. Dieses unter den Klonen variable kleine Fragment (30 kb bzw. 23 kb in J.18 und J.21) bildet somit wahrscheinlich das proximale Ende des *Dyrk1A*-Locus. Das mittlere Fragment von ungefähr 42 kb, das bei allen Klonen außer J.34 (RPCI-23 62H3) vorkommt, ist in der Länge nicht variabel und ist somit von den variablen Fragmenten eingeschlossen. Das größte – im Falle von J.38 190 kb lange – Fragment, ist dagegen wiederum variabel und liegt am weitesten distal; es bildet das 3'-Ende des Locus. Auf die genaue Lage der Schnittstellen ließen sich aus diesen bisherigen Experimenten allerdings keine Rückschlüsse ziehen. Eine in der von Song *et al.* publizierte mRNA-Sequenz beschriebene *Not*I-Schnittstelle in der 3'-nichtkodierenden Region (Song *et al.*, 1996) stellt – nach heutigem Kenntnisstand – offenbar einen Fehler dar, da sie, und genauso eine direkt benachbarte *Eco*RI-Schnittstelle, nicht in anderen für diesen Bereich publizierten Sequenzen vorkommt (Mural *et al.*, 2002; Waterston *et al.*, 2002).

In Kenntnis der inzwischen publizierten Sequenz des *Dyrk1A*-Locus der Maus, der bisher beschriebenen und weiterer im Verlaufe dieser Arbeit vorgenommener Sequenzierungen des BAC-Klons J.38 (Resultate nicht gezeigt) ließ sich die genaue Sequenz dieses Klons feststellen. Sowohl die Enden der Insertion als auch alle weiteren Sequenzdaten zeigten die erwartete Übereinstimmung mit der veröffentlichten Sequenz des Chromosoms 16 (Waterston *et al.*, 2002). In der Sequenz des Klons J.38 wurden auch die experimentell gefundenen *Not*I-Schnittstellen bzw. -Fragmente bestätigt (s. Abbildung 6-8).

¹¹ proximal: zum Centromer hin, nahe dem Centromer

Abbildung 6-8: Schematische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse des *Dyrk1A*-BAC-Klons J.38 sowie seiner Insertion und des Chromosoms 16 der Maus

Die Sequenzen sind in Form von grauen Pfeilen unter Angabe der jeweiligen Position im Alignment dargestellt. Sequenziert wurden der BAC-Klon J.38, die subklonierten Fragmente J.69 und J.71 sowie die PCR-Produkte LA und RA. Für die Ergebnisse der Sequenzierungen sind die verwendete Matrize (M) und der Primer (P) angegeben. Unterhalb des Chromosoms 16 sind die von der humanen Exon-Intron-Struktur abgeleiteten Exons von *Dyrk1A* sowie die der benachbarten Gene (gelb) aufgeführt, weiterhin die hier vorkommenden *Not I*-Stellen sowie die Primer JS.118 und JS.121. Die Exons 1 bis 3 konnten im *Dyrk1A*-Gen der Maus bisher nicht identifiziert werden. Die Darstellung ist annähernd maßstabsgetreu, die Pfeile der Sequenzierungsergebnisse sind im Verhältnis zu groß.



In der Summe zeigen die Experimente zur Charakterisierung des Klons J.38 (RPCI-23 11M5), daß dieser einen Bereich des Maus-Genoms mit dem *Dyrk1A*-Locus enthält, der sich vom Intron 1 des *Dcra*-Gens bis zum 3'-ständigen Exon (Exon 7) des *Girk2*-Gens erstreckt. Dies stellt den optimalen Bereich zur Generierung von *Dyrk1A*-transgenen Mäusen dar, da erstens mit hoher Wahrscheinlichkeit alle *Dyrk1A*-spezifischen regulatorischen Elemente enthalten sind, zweitens aber keine Bereiche anderer Gene vorkommen, welche die Aktivität des *Dyrk1A*-Gens auf dem BAC beeinflussen könnten.

6.2.2 Modifizierung eines BAC-Klons mittels GET-Rekombination

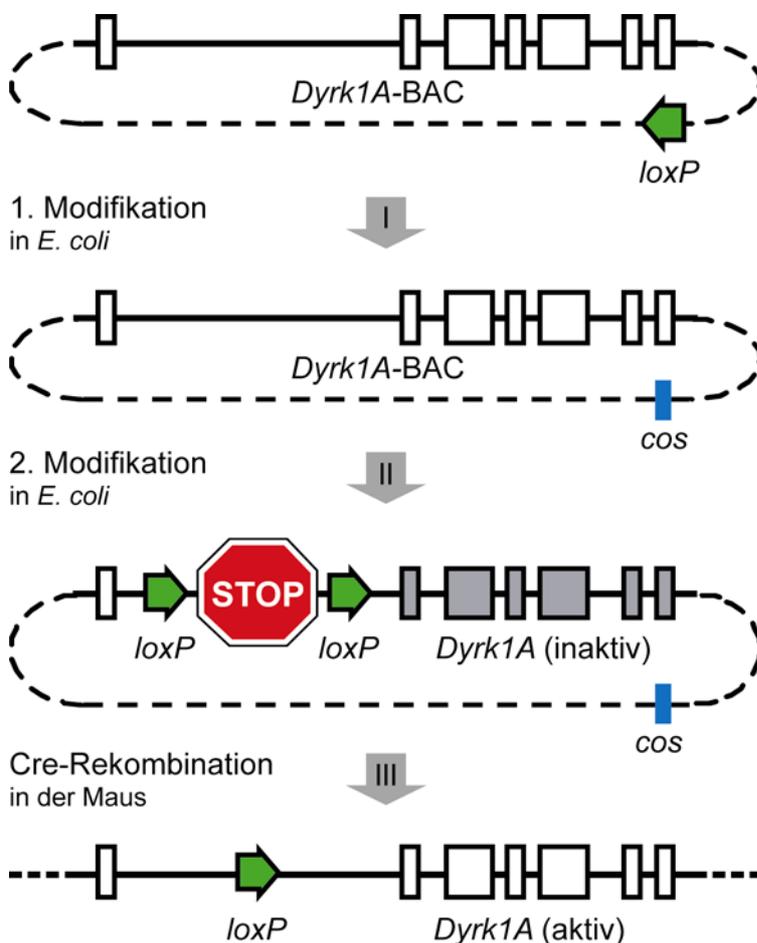


Abbildung 6-9: Strategie zur Modifizierung des *Dyrk1A*-BAC-Klons in zwei Schritten

Im ersten Modifikationsschritt (I) wird die *loxP*-Stelle im Vektorbereich entfernt und gleichzeitig eine *cos*-Stelle eingefügt. Diese Modifikation wird mittels homologer Rekombination in *E. coli* durchgeführt. Im zweiten Schritt (II) wird das *Dyrk1A*-Gen auf dem BAC – ebenfalls durch homologe Rekombination – so inaktiviert, daß es nach Generierung transgener Mäuse durch die Cre-Rekombinase orts- und zeitspezifisch wieder aktiviert werden kann (III).

Der isolierte und charakterisierte *Dyrk1A*-BAC-Klon J.38 sollte zur Generierung transgener Mäuse eingesetzt werden, die *Dyrk1A* konditional überexprimieren. Dafür sollte das Cre/*loxP*-System verwendet werden. Um dieses Ziel zu erreichen, war die Modifikation des

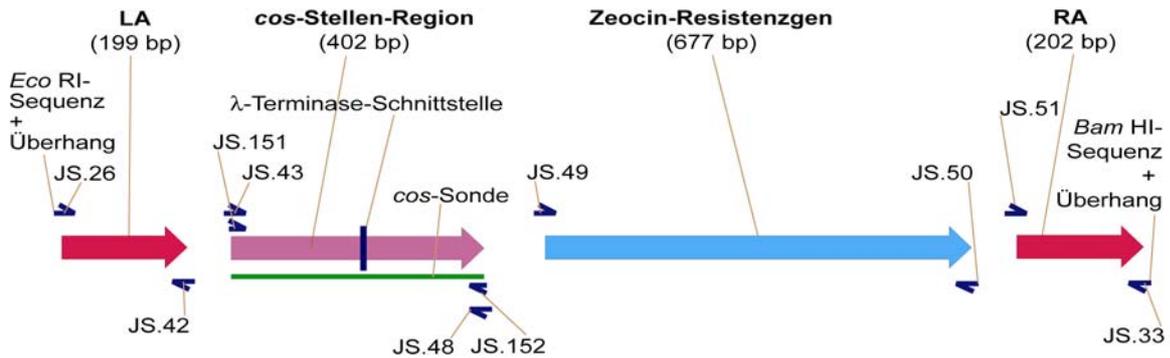
BAC-Klons in zwei Schritten notwendig: Im ersten Schritt sollte die *loxP*-Stelle im Vektorbereich von J.38 entfernt und gleichzeitig eine Schnittstelle zur Linearisierung des BAC und Isolierung der Insertion eingefügt werden. Die *loxP*-Stelle im Vektorbereich mußte entfernt werden, da sie ansonsten mit den im zweiten Schritt (s. u.) eingefügten *loxP*-Stellen rekombinieren könnte. Als Schnittstelle zur Linearisierung wurde die *cos*-Stelle aus dem λ -Phagen ausgewählt, die von dem Enzym λ -Terminase geschnitten wird (Feiss *et al.*, 1983a; Feiss *et al.*, 1983b). Im zweiten Modifikationsschritt sollte das *Dyrk1A*-Gen durch das Einfügen von Polyadenylierungssignalen zur vorzeitigen Beendigung der Transkription inaktiviert werden. Um die Inaktivierung reversibel zu gestalten, sollten diese Stop-Signale von *loxP*-Stellen flankiert werden. So kann – nach Generierung einer transgenen Mauslinie mit diesem Konstrukt und deren Kreuzung mit einer Cre-Rekombinase-exprimierenden Mauslinie – durch Cre-vermittelte Exzision das *Dyrk1A*-Gen des BAC wieder aktiviert und folglich *Dyrk1A* überexprimiert werden. Zur Modifikation des BAC wurde für beide Schritte die Methode der GET-Rekombination (Narayanan *et al.*, 1999) gewählt, eine Variante des *ET cloning* (Zhang *et al.*, 1998). Dabei wird ein DNA-Molekül wie z. B. ein BAC durch homologe Rekombination in *E. coli* gezielt verändert: Zuerst wird das Bakterium, welches das BAC enthält, mit einem Vektor transformiert, der für Red_{γ} , welches die Degradierung linearer DNA inhibiert, sowie für die Rekombinationsfaktoren RecE und RecI kodiert. Der Name der Methode leitet sich von diesen Proteinen ab. Anschließend wird das so in einen rekombinationskompetenten Zustand gebrachte Bakterium mit einer linearen DNA-Kassette mit zwei Homologiearmen, die den flankierenden Bereichen des zu modifizierenden Ortes des BAC entsprechen, transformiert. Die Kassette enthält des weiteren ein Resistenzgen für die anschließende Selektion rekombinierter Klone und eventuell noch weitere Elemente, die dem BAC hinzugefügt werden sollen.

6.2.2.1 Generierung einer Rekombinationskassette mittels überlappender PCR

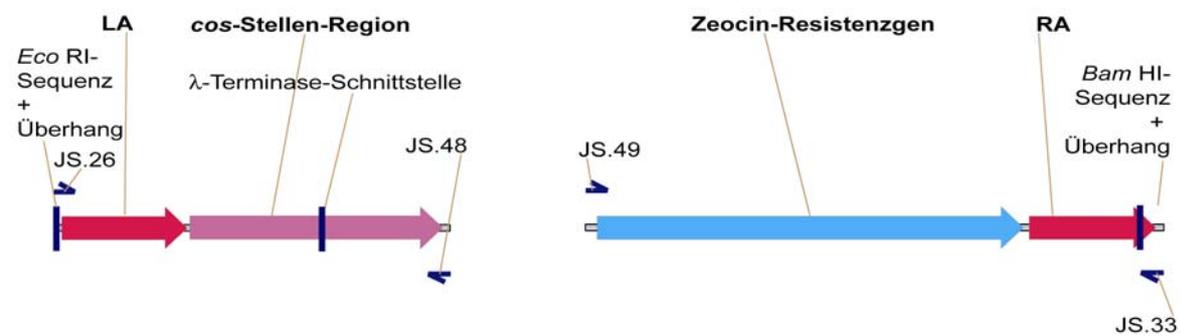
Die Rekombinationskassette für den ersten Modifikationsschritt des *Dyrk1A*-BAC-Klons J.38 sollte zwei je ca. 200 bp lange Homologiearme, die *cos*-Stelle aus dem λ -Phagen und ein Zeocin-Resistenzgen enthalten. Diese Kassette sollte mit dem BAC so rekombinieren, daß die *loxP*-Stelle im Vektorbereich ersetzt wird. Dementsprechend wurden als Homologiearme die die *loxP*-Sequenz flankierenden Bereiche des BAC-Vektors pBACe3.6 ausgewählt. Diese Homologiearme wurden dann mit spezifischen Oligonukleotid-Primern in einer PCR amplifiziert, wobei der BAC-Klon als Matrize eingesetzt wurde. Ebenso wurden spezifische Primer zur Amplifikation des Zeocin-Resistenzgens und der *cos*-Stelle ausgewählt. Die *cos*-Stelle wurde mittels PCR aus dem BAC-Vektor pBeloBAC11 (*GenBank* U51113) amplifiziert, das Zeocin-Resistenzgen aus dem Plasmid pCDNA4TM/TO/myc-His A (Invitrogen). Die

erzeugten Produkte und die jeweils benutzten Primer sind in Abbildung 6-10 schematisch dargestellt, zur Sequenz der Primer siehe Abschnitt 4.4. Es wurden alle Primer – mit Ausnahme der in der Kasette endständigen – so gestaltet, daß sie über einen Überhang von 12 Basen verfügen, der mit dem Gegenstrang des in der Kasette benachbarten Produktes hybridisieren kann. So können in einer ersten PCR alle vier Fragmente getrennt amplifiziert werden und dann jeweils zwei Produkte nach Aufreinigung in einem Gel und anschließender Gel-Extraktion in einer zweiten PCR-Runde miteinander fusioniert werden. Dieses Verfahren wird fortgesetzt, bis nach drei Runden alle vier Fragmente der Rekombinationskasette in einem linearen Produkt vereinigt erhalten werden. Die endständigen Primer JS.26 und JS.33 verfügen über Restriktionsenzym-Schnittstellen, die in die Kasette eingefügt werden sollten, um die Klonierung in einen Vektor zu erleichtern. Auf diese Weise konnte – wie in Abbildung 6-10 schematisch dargestellt – in drei PCR-Runden die Rekombinationskasette 1 generiert werden. Als Polymerase wurde das Enzymgemisch *Herculase*[™] (Stratagene) eingesetzt, welches aus den Enzymen *Pfu* (aus *Pyrococcus furiosus*) und *Taq* (aus *Thermus aquaticus*) und einem speziellen Puffersystem besteht. *Pfu* besitzt eine Korrekturleseaktivität; das *Herculase*-Gemisch zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate aus und liefert in der Regel große Mengen an Produkt.

1. PCR: Fragmente der Rekombinationskassette 1



2. PCR: 2 Fusionierte Fragmente



3. PCR: Komplette Kassette

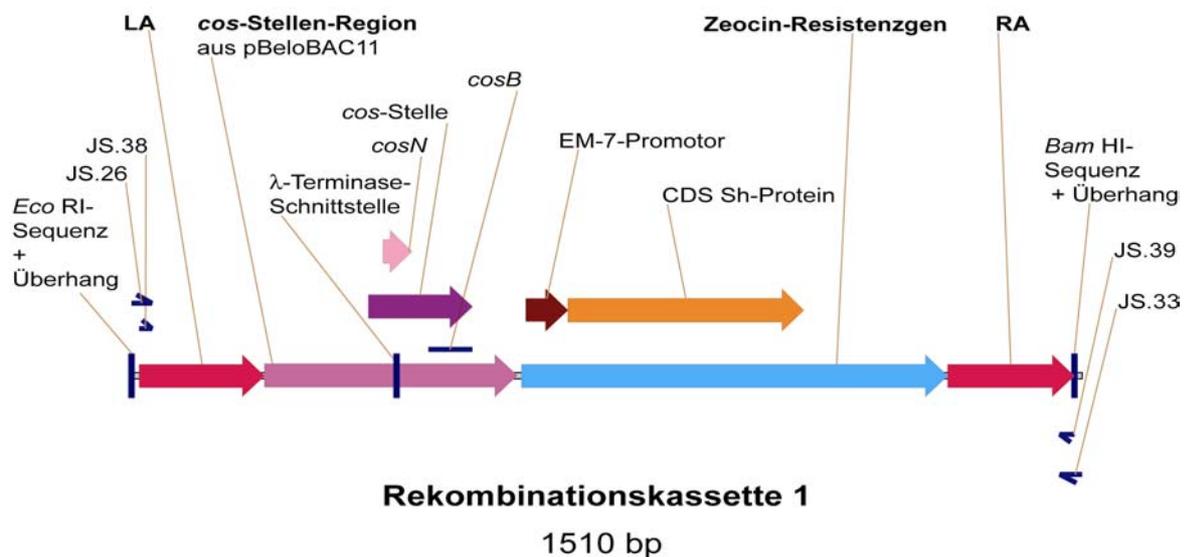


Abbildung 6-10: Generierung der Rekombinationskassette 1 mittels überlappender PCR

Die einzelnen Fragmente wurden in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen amplifiziert und fusioniert. Ober- und unterhalb der Produkte sind die in der jeweiligen Runde eingesetzten Primer angegeben. Weiterhin sind wichtige Elemente der Fragmente sowie die Primer zur Amplifikation der cos-Sonde, JS.151 und JS.152 (s. 6.2.2.3), unter 1. eingezeichnet. LA: linker Homologiearm; RA: rechter Homologiearm; CDS Sh-Protein: kodierende Sequenz *Streptoalloteichus hindustanus*-Bleomycin-Protein; cos-Stelle nach Miwa & Matsubara (Miwa & Matsubara, 1983), cosB und cosN nach Feiss *et al.* (Feiss *et al.*, 1983b).

Die Kasette wurde mittels Gelelektrophorese und Gel-Extraktion aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Bam* HI behandelt, erneut aufgereinigt und in den ebenfalls mit *Eco* RI und *Bam* HI verdauten Vektor pBluescript® II KS (Stratagene) ligiert. Das so generierte Plasmid wurde in *E. coli*-Bakterien, Stamm DH5 α , transformiert. Transformanden wurden auf einer Zeocin enthaltenden Agar-Platte (mit geringer Salzkonzentration, da das Zeocin anderenfalls inaktiviert wird) selektiert, um nur solche Klone zu erhalten, die ein funktionsfähiges Zeocin-Resistenzgen exprimieren. Ein solcher Klon (J.76 [pBS-Rekombinationskasette 1]) wurde nach Präparation der Plasmid-DNA ansequenziert. In den Sequenzierungsergebnissen wurden insgesamt 19 Abweichungen von der erwarteten Sequenz gefunden – die allerdings auch Fehler der Sequenzierung darstellen können, da nur einfach sequenziert wurde. Von den Abweichungen lag keine in der *cosN*-Stelle, in der die λ -Terminase schneidet, allerdings drei in der *cosB*-Stelle, in der das Enzym bindet. Um die Funktionsfähigkeit der *cos*-Stelle sicherzustellen, wurde das Plasmid J.76 einer Reihe von Testverdauen mit λ -Terminase-Präparationen von unterschiedlichen Anbietern und unter verschiedenen Bedingungen unterworfen. Dabei wurden auch Puffer mit AMP-PNP, einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon, eingesetzt, da es Hinweise darauf gibt, daß ATP bzw. dessen Hydrolyse die Spezifität des Enzyms herabsetzt (Higgins *et al.*, 1988). Es stellte sich heraus, daß die λ -Terminase der Firma TaKaRa in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer – der AMP-PNP enthält – am effizientesten und spezifischsten arbeitet. Der Klon J.76 wurde zumindest zu einem Teil von dieser λ -Terminase geschnitten (s. Abbildung 6-11). So konnte davon ausgegangen werden, daß der Klon über eine funktionsfähige *cos*-Stelle verfügt. Allerdings wurden nach Verdau und Gelelektrophorese auch weitere, nicht erwartungsgemäße Banden beobachtet: Eine dieser Banden entsprach der oberen Bande des unverdauten Plasmids. Ein weiteres Produkt wies in etwa das Doppelte der erwarteten Länge von 4435 bp auf. Anschließend wurde per PCR mit den Primern JS.38 und JS.39 und dem Plasmid J.76 als Matrize die endgültige Rekombinationskasette 1 amplifiziert, die keine Restriktionsenzym-Schnittstellen an den Enden mehr aufweist und so vollständig mit den Zielbereichen beiderseits der *loxP*-Stelle im Vektor pBACe3.6 identische Homologiearme besitzt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Gelelektrophorese und Gel-Extraktion aufgereinigt und mit *Dpn* I verdaut, um eine eventuelle Kontamination mit dem Matrizen-Plasmid J.76 zu eliminieren. *Dpn* I verdaut nur methylierte DNA und kann so das PCR-Produkt nicht angreifen, das Plasmid hingegen wird an 20 Stellen geschnitten. Nach dem *Dpn* I-Verdau wurde die Kasette wiederum aufgereinigt, zur Konzentrierung mit Ethanol gefällt und in einem geringen Volumen Wasser (5 μ l) aufgenommen. Die so vorbereitete Rekombinationskasette 1 wurde anschließend zur Modifikation des BAC-Klons J.38 mittels GET-Rekombination eingesetzt.

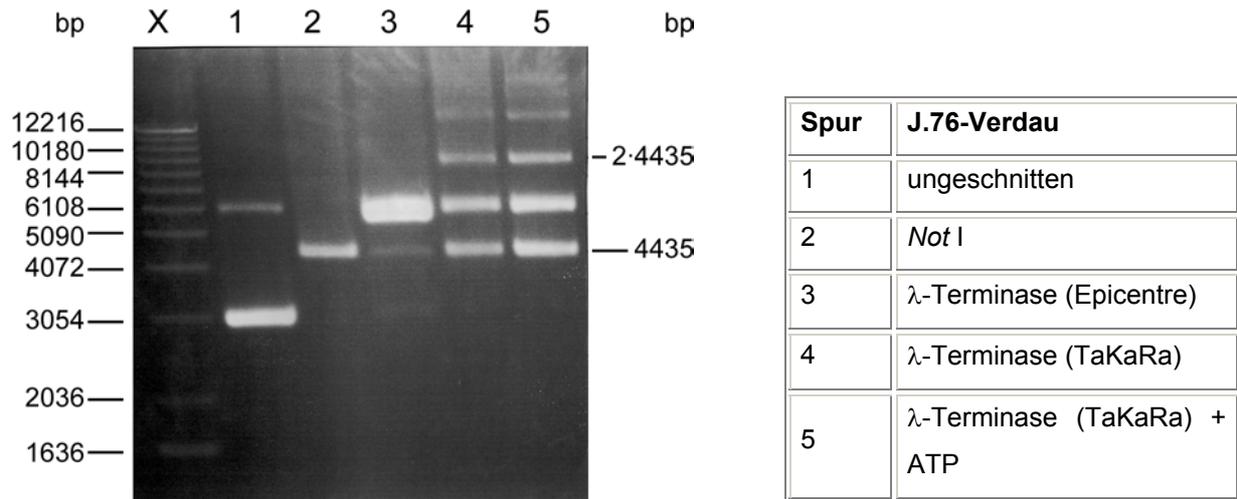


Abbildung 6-11: Verdau des Klons J.76 (pBS-Rekombinationskassette 1) mit λ -Terminase

Eingesetzt wurden zum Vergleich λ -Terminase-Präparationen von Epicentre und TaKaRa (ohne und mit ATP im Ansatz); außerdem wurde ungeschnittenes Plasmid und mit *Not I* linearisiertes aufgetragen. Die Analyse zeigt, daß der Verdau mit der λ -Terminase von TaKaRa zu einem Teil die gewünschte Bande des linearisierten Plasmids von 4435 bp liefert, zu einem Teil allerdings auch eine Bande von ca. 6 kb sowie weitere von ca. 9 kb (2·4435 bp) und mehr. X: Längenstandard Marker X

6.2.2.2 Modifikation des BAC-Klons J.38 mit der Rekombinationskassette 1

Wie unter 6.2.2 beschrieben sollte der BAC-Klon J.38 mittels homologer Rekombination in *E. coli* modifiziert werden. In Vorversuchen wurden zwei verschiedene Rekombinationssysteme getestet: erstens das *ET cloning* nach Zhang *et al.* unter Verwendung des Plasmids pBAD-ET γ , das für die Proteine RecE und RecT sowie Red γ kodiert (Zhang *et al.*, 1998). Die Expression von recE wird hier durch Arabinose induziert, die der beiden anderen Gene erfolgt konstitutiv. Zweitens wurde die GET-Rekombination nach Narayanan *et al.* getestet (Narayanan *et al.*, 1999), in diesem Falle wird das Plasmid pGETrec verwendet, das für dieselben Proteine kodiert wie pBAD-ET γ , allerdings werden alle drei Gene von einem Arabinose-induzierbaren Promotor reguliert. RecE und RecT sind in Wildtyp-*E. coli*-Stämmen an Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen beteiligt; RecE ist eine Exonuclease, RecT vermittelt die Hybridisierung von komplementären DNA-Strängen. Das Protein Red γ inhibiert die Degradation von linearen transformierten DNA-Molekülen in *E. coli*.

Für die homologe Rekombination mußte der BAC-Klon J.38 zunächst in einen rekombinationskompetenten Zustand versetzt werden. Dafür wurde der Klon mit je einem der beiden für die Rekombinationsmaschinerie kodierenden Plasmide transformiert (pBAD-ET γ bzw. pGETrec). Nach Kultivierung von Transformanden wurde zur Überprüfung der Integrität des BAC eine BAC-DNA-Präparation durchgeführt und das BAC nach Verdau mit den

Restriktionsenzymen *Not I* und *Eco RI* in konventioneller und Pulsfeld-Gelelektrophorese untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß mit pBAD-ET γ transformierte Subklone des BAC-Klons J.38 nur extrem langsam wuchsen und aus ihnen keine intakte BAC-DNA mehr präpariert werden konnte, während dies von pGETrec-Transformanden möglich war und die präparierte DNA das bekannte Bandenmuster nach *Eco RI*- bzw. *Not I*-Verdau zeigte (Resultate nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Experimente der GET-Rekombination der Vorzug gegeben.

Zur homologen Rekombination wurde so ein pGETrec-transformierter Subklon des BAC-Klons J.38 eingesetzt. Die GET-Rekombination wurde wie von Narayanan *et al.* beschrieben (Narayanan *et al.*, 1999) durchgeführt: Nach Kultivierung des BAC-Wirtes über Nacht in Flüssigkultur wurde Arabinose zum Kulturmedium gegeben, um die Synthese der Rekombinationsenzyme zu induzieren. Anschließend erfolgte die Präparation elektrokompenter Bakterien und die Transformation des BAC-Klons mit der linearen Rekombinationskassette (s. Abschnitt 6.2.2.1) per Elektroporation. Rekombinierte Klone wurden selektiert auf Agar-Platten mit Chloramphenicol, Zeocin und Glucose, welche das Arabinose-Operon reprimiert und somit die Synthese der Rekombinationsenzyme beendet. Auf diese Weise wurden 22 Zeocin-resistente Klone erhalten.

6.2.2.3 Nachweis der korrekten Insertion der Rekombinationskassette 1 und der Funktionsfähigkeit der *cos*-Stelle

Von 22 Zeocin-resistenten Klonen, die dem unter 6.2.2.2 beschriebenen GET-Rekombinations-Experiment entstammten, wurden fünf – mit J.81.1 bis J.81.5 benannt – näher untersucht. Von diesen wurde BAC-DNA präpariert und anschließend mit den Restriktionsenzymen *Eco RI* und *Not I* verdaut. Die verdaute DNA wurde in konventioneller und Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (Abbildung 6-12 A). Dabei zeigte sich, daß alle fünf Klone nach *Not I*-Verdau eine größere Vektor-Bande liefern als der Klon J.38 vor der Rekombination; diese hat mit ca. 10 kb die erwartete Länge (9784 bp) nach der Integration der Rekombinationskassette in den Vektor gegenüber 8,7 kb vor der Rekombination. Die übrigen Fragmente, welche die Insertion des BAC mit dem *Dyrk1A*-Locus repräsentieren, waren dagegen nicht verändert. Allerdings zeigen die Klone J.81.2, J.81.3 und J.81.4 zwei zusätzliche Banden von ca. 80 kb und 120 kb, deren Herkunft und Identität nicht geklärt wurde. Die Klone 81.1 bis 81.4 weisen außerdem noch eine zusätzliche Bande von ca. 11 kb auf. Es wurde nicht definitiv geklärt, ob es sich bei all diesen Banden um das Rekombinationsplasmid pGETrec in seiner superhelikalen Form handelt. Allerdings wurde in anderen Experimenten im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, daß das nicht linearisierte Plasmid pGETrec mehrere Banden zwischen ca. 4 kb und deutlich mehr als 12 kb (in der

konventionellen Gelelektrophorese nicht mehr aufzulösen) bildet. Außerdem konnte gezeigt werden, daß alle fünf Klone auch nach der Rekombination noch Ampicillin-resistent sind, obwohl initial nicht mit Ampicillin selektiert wurde. Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß sie das Plasmid pGETrec, welches ein Ampicillin-Resistenzgen aufweist, noch enthalten (Resultate nicht gezeigt).

Um zu beweisen, daß die Integration der Kasette in den Vektor und nicht in die Insertion stattfand, wurde die DNA der fünf untersuchten Klone nach Auftrennung im Pulsfeld-Gel und Transfer auf eine Membran nach dem *Southern Blot*-Verfahren hybridisiert. Als Sonde (*cos*-Sonde) wurde ein mit den Primern JS.151 und JS.152 (s. Abbildung 6-10) und dem Vektor pBeloBAC11 als Matrize hergestelltes PCR-Produkt verwendet. Die Sonde umfaßt also die komplette *cos*-Stelle, die auch in die Kasette eingefügt wurde und im BAC-Vektor integriert sein sollte. Wie aus Abbildung 6-12 zu erkennen ist, lieferte der *Not*I-Verdau aller fünf untersuchten Klone eine Bande von ca. 10 kb, die mit der *cos*-Stellen-spezifischen Sonde hybridisiert. Diese Bande entspricht dem vergrößerten BAC-Vektor. Erwartungsgemäß zeigte der nichtrekombinierte Klon J.38 keine Signale, ebensowenig die größeren Fragmente der rekombinierten Klone nach *Not*I-Verdau, die die Insertion repräsentieren. Der aus dem λ -Phagen bestehende Längenstandard hybridisierte erwartungsgemäß ebenfalls mit der *cos*-Sonde.

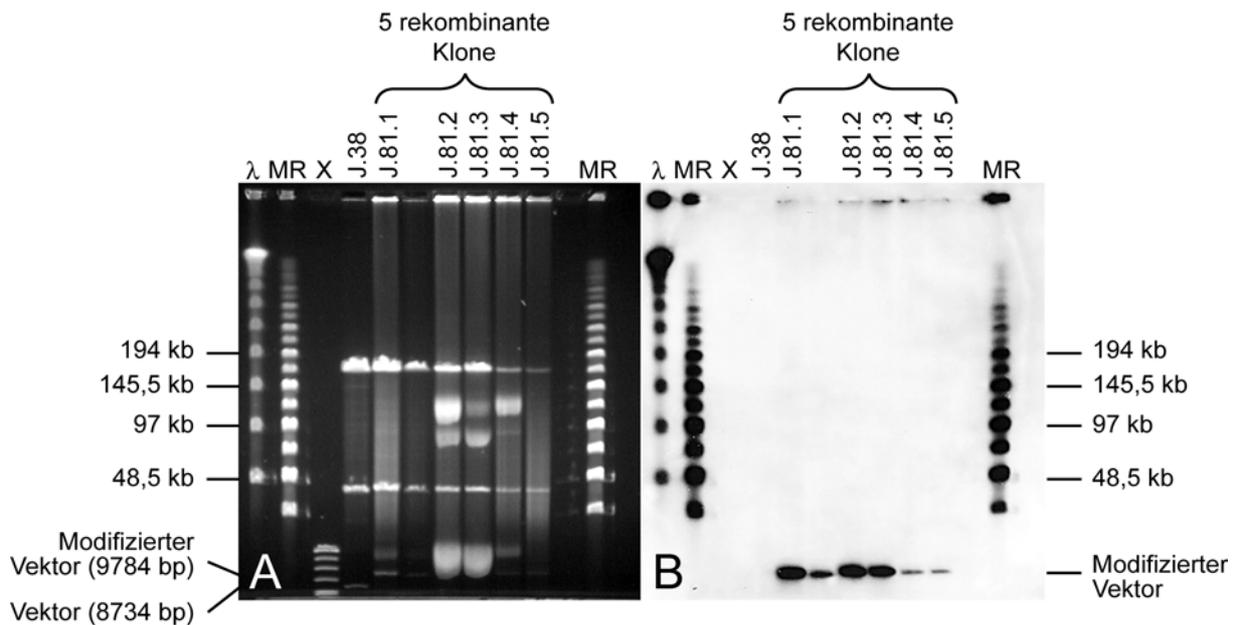


Abbildung 6-12: Analyse der BAC-Klone nach Modifikation mit der Rekombinationskassette 1

Fünf Klone (J.81.1-J.81.5) wurden nach GET-Rekombination mit der Rekombinationskassette 1 zusammen mit dem nicht modifizierten Ausgangsklon J.38 mit *Not*I verdaut, per Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt (A) und nach *Southern*-Transfer mit einer DIG-markierten *cos*-Stellen-spezifischen Sonde (s. Abbildung 6-10) hybridisiert (B). Es konnte bei allen fünf rekombinierten Klonen die Bande des modifizierten Vektors von 9784 bp sowohl im Ethidiumbromid-gefärbten Gel (A) als auch im *Southern Blot* mit der *cos*-Sonde (B) detektiert werden. Der Klon J.38 zeigt nur die Bande des nichtmodifizierten Vektors (8734 bp), die nicht durch die Sonde erkannt wird. Die Sonde hybridisiert auch mit den Längenstandards λ -Leiter (λ) und *MidRange II*-PFG-Marker (MR), da diese aus λ -DNA bestehen und ebenfalls *cos*-Stellen enthalten. X: DNA-Marker X

Anschließend sollte gezeigt werden, daß die Rekombinationskassette 1 nicht nur an der beabsichtigten Stelle integriert und so die vektoreigene *loxP*-Stelle ersetzt hat – wie in Abbildung 6-13 schematisch dargestellt –, auch ihre Funktionsfähigkeit sollte unter Beweis gestellt werden. Dafür wurde DNA von rekombinanten Klonen einem Verdau mit λ -Terminase unter den zuvor mit dem Plasmid J.76 optimierten Bedingungen unterzogen und nachfolgend mittels Gelelektrophorese analysiert. Wie aus Abbildung 6-14 ersichtlich ist, lieferten die Klone J.81.4 und J.81.5 nach Verdau mit λ -Terminase und *Not*I nicht mehr eine Vektor-Bande von 9784 bp, sondern nur noch eine von 7599 bp. Der zweite Teil des Vektors, der eine Bande von 2191 bp ergeben sollte, konnte nicht detektiert werden. Allerdings zeigte sich hier auch, daß Klon J.81.4 zwei weitere Banden unklarer Herkunft aufweist, und im Falle von Klon J.81.5 erschienen die beiden oberen Banden verändert gegenüber der nur mit *Not*I verdauten Kontrolle. Dies deutet auf eine unspezifische Exo- oder Endonuklease-Aktivität der λ -Terminase gegenüber der BAC-Insertion hin.

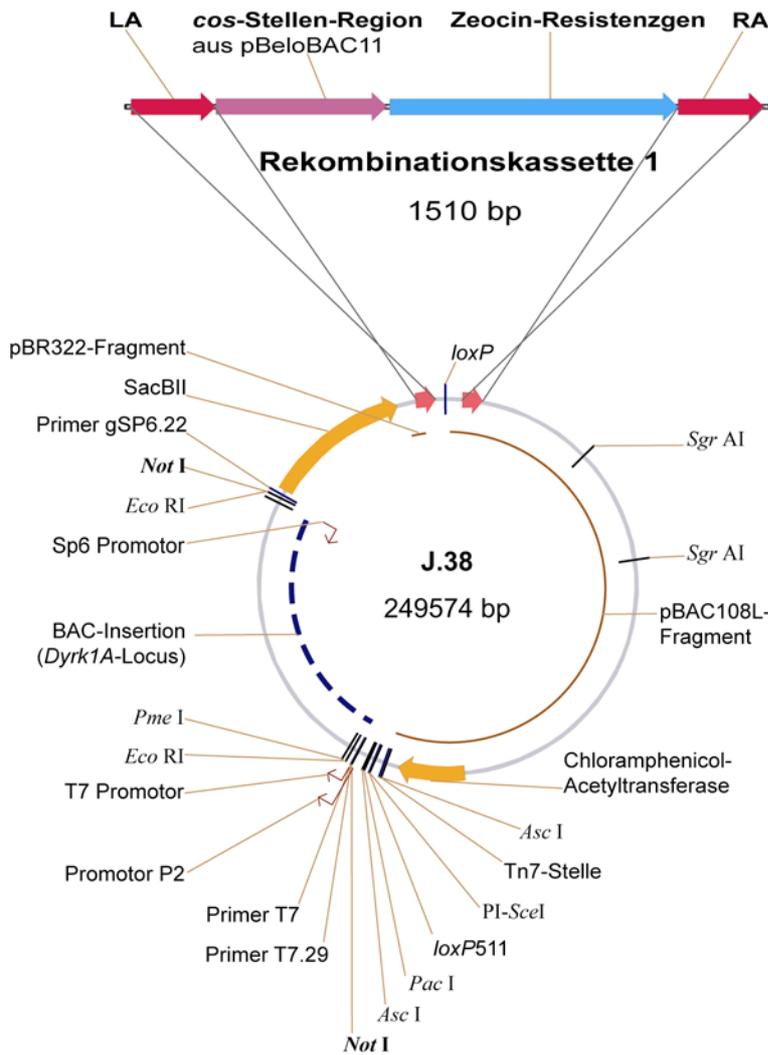
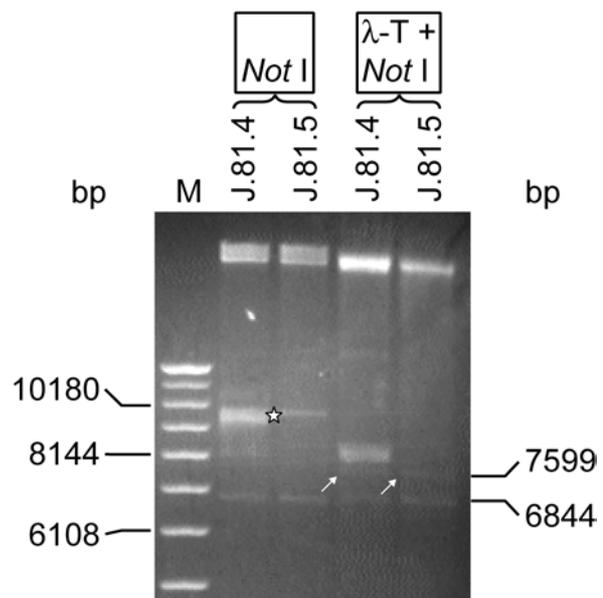


Abbildung 6-13: Schematische Darstellung der Modifikation des BAC-Klons J.38 mit der Rekombinationskassette 1 zur Klonierung von J.81

Die Kassette enthält eine Schnittstelle für die λ -Terminase (*cos*-Stelle). Durch *Not*I-Verdau des nicht modifizierten Klons J.38 wird der Vektor von 8734 bp abgetrennt. Der modifizierte BAC-Klon J.81 liefert nach *Not*I-Verdau eine Vektor-Bande von 9784 bp, nach *Not*I und λ -Terminase-Verdau Vektor-Fragmente von 7599 bp (wie in Abbildung 6-14 zu sehen ist) und 2191 bp. Die Insertion ist stark verkleinert dargestellt.

Abbildung 6-14: Nachweis der Funktionsfähigkeit der *cos*-Stelle der BAC-Klone

Die modifizierten BAC-Klone J.81.4 und J.81.5 liefern nach *Not*I-Verdau eine Vektor-Bande von 9784 bp (Stern), nach *Not*I- und λ -Terminase- (λ -T-)Verdau Vektor-Fragmente von 7599 bp (Pfeile) und 2191 bp (nicht zu detektieren). Die Bande von 6844 bp entstammt der Insertion der BAC-Klone. M: DNA-Marker X



6.2.3 Konstruktion und Generierung einer Rekombinationskassette zur Modifikation eines BAC-Klons für die konditionale Überexpression von Dyrk1A

Die unter 6.2.2.3 beschriebenen modifizierten BAC-Klone sollten als Zwischenprodukt zur weiteren Modifizierung durch eine zweite Rekombination dienen. Ziel war, das *Dyrk1A*-Gen auf dem BAC so zu inaktivieren, daß es durch Cre-vermittelte Rekombination wieder aktiviert werden kann. Sowohl der inaktive als auch der aktive Zustand sollten durch jeweils einen Marker nachweisbar sein. Dafür wurde die Rekombinationskassette 2 mit folgenden Elementen und Merkmalen konstruiert (s. Abbildung 6-15):

Zur Inaktivierung des *Dyrk1A*-Gens wurde eine Kombination aus Polyadenylierungssignalen aus der bovinen Wachstumshormon-mRNA (bGH: *bovine growth hormone*) und aus der *SV40-early*-mRNA ausgewählt. Vor die Sequenz aus zwei bGH-Polyadenylierungssignalen und einem aus *SV40* wurde eine *lac Z*-cDNA mit einem nukleären Lokalisationssignal (NLS) geschaltet, so daß der inaktive Zustand der *Dyrk1A*-Kopie des BAC über die von der *lac Z*-cDNA kodierte β -Galactosidase nachweisbar sein sollte. Dabei wird *lac Z* unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente des abgeschalteten *Dyrk1A*-Gens exprimiert. *Lac Z* und die Polyadenylierungssignale wurden gemeinsam von zwei *loxP*-Stellen flankiert. Die Homologiearme der Rekombinationskassette 2 wurden so ausgewählt, daß die Kassette Exon 4 von *Dyrk1A* ersetzt, dementsprechend liegt der linke Homologiearm (LA) in Intron 3, der rechte (RA) in Intron 4. Exon 4, welches für den N-Terminus von Dyrk1A kodiert, wurde ebenfalls in die Kassette eingebaut, allerdings fusioniert mit der cDNA eines Markerproteins. Als solches wurde hrGFP (*humanized renilla reniformis green fluorescent protein*) ausgewählt, ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) aus *Renilla reniformis*, das im Gegensatz zum analogen GFP aus *Aequora victoria* nach Angaben des Anbieters (Stratagene) keine Toxizität in Säugerzellen aufweist. So sollte die hrGFP-Fluoreszenz das vom BAC kodierte Dyrk1A-Protein markieren. Weiterhin wurde die Kassette mit einem von *FRT*-Sequenzen flankierten Tetracyclin-Resistenzgen ausgestattet, um die Selektion von rekombinierten BAC-Klonen zu ermöglichen. Die *FRT*-Sequenzen sollten die Entfernung des Resistenzgens im BAC-Wirt mit Hilfe des Enzyms Flp-Rekombinase ermöglichen.

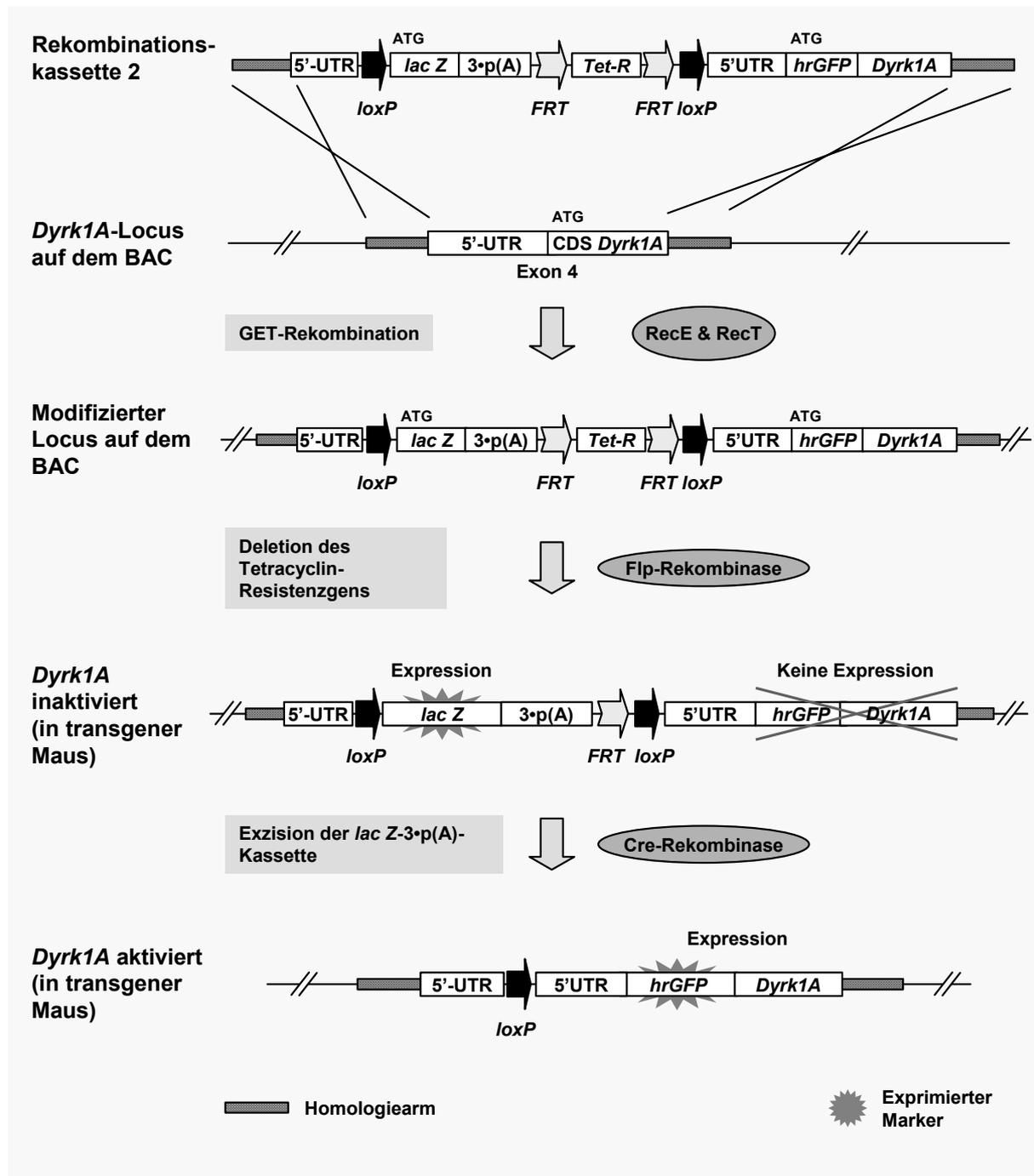


Abbildung 6-15: Strategie zur Einführung einer konditional aktiven dritten Kopie von *Dyrk1A* als BAC-Transgen

Eine Rekombinationskassette wird mittels GET-Rekombination in den *Dyrk1A*-Locus auf dem BAC eingefügt. Die Transkription des so veränderten Locus wird durch drei Polyadenylierungssignale (3•p[A]) gestoppt. Nach Entfernung des Resistenzgens wird das BAC zur Generierung transgener Mäuse eingesetzt. In diesem Zustand wird *lac Z* anstelle des *Dyrk1A* auf dem BAC exprimiert. Das *Dyrk1A*-Gen wird durch Cre-Rekombinase-vermittelte Exzision der *lac Z*-3•p(A)-Kassette aktiviert. Dies bewirkt, daß *hrGFP-Dyrk1A* exprimiert werden kann. 5'-UTR: 5'-nichtkodierende Region von *Dyrk1A*; *Tet-R*: Tetracyclin-Resistenzgen

Mit dieser Kassette sollte es möglich sein, wie in Abbildung 6-15 schematisch dargestellt, eine *Dyrk1A* konditional überexprimierende transgene Mauslinie zu etablieren. In den generierten Mäusen sollte sowohl das BAC in seinem inaktiven Zustand in *Dyrk1A*-

exprimierenden Zellen mittels der β -Galactosidase-Aktivität als auch die *Dyrk1A*-Überexpression nach Aktivierung der dritten Kopie durch die Fluoreszenz des hrGFP-*Dyrk1A*-Fusionsproteins nachzuweisen sein.

6.2.3.1 Klonierung der Rekombinationskassette 2 zur gezielten Aktivierung des *Dyrk1A*-Locus

Da die Sequenz des *Dyrk1A*-Locus der Maus und insbesondere die Sequenz der Introns zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt war, mußte – um die Homologiearme in Intron 3 und Intron 4 konstruieren und amplifizieren zu können – die Sequenz dieser Introns aufgeklärt werden. Deshalb wurden mehrere Sequenzierungsreaktionen durchgeführt: Es wurde der BAC-Klon J.38 direkt sequenziert mit Primern, die in Exon 4 oder dessen Nähe entweder den *sense*- (Primer JS.148) oder den *antisense*-Strang (JS.144) binden. Weiterhin wurden verschiedene Teilbereiche von J.38 subkloniert oder per PCR amplifiziert und sequenziert (s. Abbildung 6-8).

Auch diese Rekombinationskassette wurde mittels überlappender PCR (s. 6.2.2.1) in drei Runden hergestellt, allerdings wurden hier im Gegensatz zur Rekombinationskassette 1 zwei Zwischenprodukte kloniert und anschließend zur endgültigen Kassette fusioniert. Die sechs Fragmente der Rekombinationskassette 2, die zu ihrer Amplifikation benutzten Oligonukleotid-Primer sowie die eingesetzten Matrizen für die erste Runde der PCR sind in Tabelle 6-3 aufgelistet.

Fragment	Länge Fragment ohne Anhänge (bp)	Forward- Primer	Im Fw-Primer enthalten Anhänge	Reverse- Primer	Im Rev-Primer enthalten Anhänge	Gesamte Fragment- länge (bp)	Matrize
Linker Homologiearm (LA)	315	JS.66	<i>Not</i> I-Stelle	JS.67	<i>loxP</i> (partiell, invers komplementär)	362	BAC J.38
NLS- <i>lac</i> Z	3102	JS.68	<i>loxP</i> (partiell), ein C, Kozak- Sequenz	JS.69	Stop-Codon (invers komplementär)	3151	pHM4
3-p(A)	743	JS.70	Stop-Codon	JS.71a	<i>FRT</i> (partiell, invers komplementär)	811	pBS-3-p(A)
Tetracyclin- Resistenz (<i>Tet-R</i>)	1427	JS.82	<i>FRT</i> (partiell)	JS.83	<i>FRT</i> , <i>loxP</i> (partiell, invers komplementär)	1505	pBAD- ET γ Tet
hrGFP	717	JS.74	<i>FRT</i> (partiell), <i>loxP</i> , ein A, Kozak-Sequenz	JS.75	kodierende Sequenz f. 3 Glycin-Reste (invers komplementär)	783	pHRGFP-C
Rechter Homologiearm (RA)	323	JS.76	kodierende Sequenz für 3 Glycin-Reste	JS.77	<i>Not</i> I-Stelle (invers komplementär)	341	BAC J.38
Gesamte Kassette						6850 bp	

Tabelle 6-3: Bestandteile der Rekombinationskassette 2

Die Fragmente wurden mittels überlappender PCR in 3 aufeinanderfolgenden PCR-Runden und per Klonierung zweier Zwischenprodukte in einen Vektor zur Rekombinationskassette 2 (s. Abbildung 6-15) fusioniert. Angegeben sind für jedes Fragment beide Primer, die Länge des Fragmentes ohne durch die PCR angefügte Anhänge sowie die Länge des PCR-Produktes inklusive über die Primer angefügter Sequenzen, die in den Spalten „im Primer enthaltene Anhänge“ angeführt sind.

In einer ersten PCR wurden die Bestandteile der Rekombinationskassette 2 getrennt amplifiziert. Zur Verifikation der erhaltenen Sequenzdaten für die Introns 3 und 4 (s. o.) wurden den Homologiearmen entsprechende PCR-Produkte, die mit der Polymerase *Pfu Turbo* amplifiziert worden waren, sequenziert (s. Abbildung 6-8). In der zweiten Runde der PCR wurden jeweils zwei benachbarte Fragmente zu einem fusioniert. Die Fusion aus linkem Homologiearm und NLS-*lac* Z wurde dann in den Vektor pCR[®]II-TOPO ligiert, das so generierte Konstrukt wurde J.113 genannt. Die übrigen Fragmente wurden nach einer dritten PCR-Runde als Fusion 3-p(A)-TetR-hrGFP-RA in den Vektor pBluescript[®] II KS ligiert (J.112). Die Insertion aus J.113, die fusionierten Fragmente LA-NLS-*lac* Z, wurden in das Konstrukt J.112 eingefügt; so wurde das Konstrukt J.119 erhalten. Da diesem Konstrukt – aufgrund der ursprünglich nicht geplanten Klonierung und anschließenden Fusion der Zwischenprodukte – die *Not* I-Schnittstelle am 5'-Ende des linken Homologiearmes fehlte,

wurde in einer erneuten PCR mit den Primern JS.66 und JS.77 die gesamte Kasette nochmals amplifiziert, in den Vektor pBluescript® II KS ligiert und in *E. coli* transformiert. Die anschließende Selektion von Transformanten erfolgte mit Tetracyclin (Resistenzgen in der Kasette enthalten) und Ampicillin (Resistenz vom Vektor pBluescript® II KS kodiert), so daß nur solche Klone erhalten wurden, die ein funktionsfähiges Tetracyclin-Resistenzgen exprimieren. Das so erhaltene Konstrukt wurde J.137 (s. Abbildung 9-5) benannt. Nach Plasmid-DNA-Aufreinigung wurde per Sequenzierung die Korrektheit eines Klons von J.137 untersucht. Dabei wurden insbesondere die Enden der Rekombinationskasette mit den Homologiearmen sowie die Fusionsstellen der Fragmente mit Elementen wie *loxP*- und *FRT*-Stellen überprüft. Hier wurden keine Abweichungen von der erwarteten Sequenz gefunden. Die letztendliche Analyse der Rekombinationskasette 2 sollte nach Integration in den BAC-Klon J.38 stattfinden, indem das modifizierte BAC in eukaryotische Zellen transfiziert wird und die Expression des *lac Z*-Gens vor bzw. die Synthese des hrGFP-Dyrk1A-Fusionsproteins nach Cre-Rekombinase-induzierter Exzision untersucht wird.

Die Rekombinationskasette 2 wurde mit dem Restriktionsenzym *Not I* aus dem Plasmid J.137 ausgeschnitten und aufgereinigt, so daß sie zur GET-Rekombination eingesetzt werden konnte. Vom BAC-enthaltenden und durch die Anwesenheit von pGETrec rekombinationskompatiblen Klon J.81.5 (s. 6.2.2.3) wurden zur Transformation kompetente Zellen hergestellt und diese mit der Rekombinationskasette 2 per Elektroporation transformiert. Die Selektion der rekombinierten Klone erfolgte teils auf Tetracyclin, teils auf Tetracyclin und Chloramphenicol (Resistenzgen auf dem BAC-Vektor) enthaltenden Agar-Platten. Von 21 erhaltenen Tetracyclin-resistenten Klonen wurde eine BAC-DNA-Präparation durchgeführt (*PSI CLONE BAC DNA Mini isolation*-Kit). Die DNA wurde mit *Not I* verdaut und nach Auftrennung in einem Pulsfeld-Gel nach dem *Southern*-Verfahren mit einer hrGFP-spezifischen Sonde (JS.74/JS.75) hybridisiert, die per PCR mit den Primern JS.74 und JS.75 (s. Tabelle 6-3) mit Digoxigenin markiert worden war. Dabei konnte kein positiver Klon detektiert werden. Weiterhin wurden die Klone per PCR mit den Primer-Paaren JS.118 (*Dyrk1A* Intron 3; s. auch Abbildung 6-8) und JS.119 (*lac Z*) sowie JS.120 (hrGFP) und JS.121 (*Dyrk1A* Intron 4; s. auch Abbildung 6-8) analysiert. Rekombinante Klone – und nur solche – sollten mit diesen Primern ein Produkt amplifizieren lassen; es konnte aber in keinem Fall eines der erwarteten Produkte detektiert werden. Dagegen lieferten alle Klone mit den Primern JS.118/JS.121 das für den nicht rekombinierten Ausgangsklon J.81 erwartete Produkt. Diese Resultate ließen nur den Schluß zu, daß keine für die Rekombination positiven Klone erzielt wurden.

6.2.3.2 Expression und Analyse einer hrGFP-Dyrk1A-Fusion

Parallel zur Klonierung der Rekombinationskassette 2 wurde die generelle Eignung des hrGFP zur Markierung von Dyrk1A untersucht. Hierfür wurde unter Verwendung von phrGFP-C (Stratagene) und der *Dyrk1A*-cDNA ein Plasmid generiert, das für ein hrGFP-Dyrk1A-Fusionsprotein kodiert. Dieses Konstrukt J.142 wurde kloniert, indem die *hrGFP*-cDNA in einer PCR mit Primern, in die Restriktionsenzym-Schnittstellen eingefügt worden waren, amplifiziert und in das Konstrukt J.131 (pCMV¹²-FLAG¹³-Dyrk1A; s. unter 6.3.3) eingefügt wurde. Die FLAG-Sequenz von J.131 wurde dabei durch eine für hrGFP kodierende Sequenz ersetzt. Die Korrektheit des hergestellten Konstruktes J.142 (pCMV-hrGFP-Dyrk1A) wurde durch Sequenzierung der *hrGFP*-Insertion und der Fusionsstellen mit dem Vektor bzw. der *Dyrk1A*-cDNA mit den Primern T3 (bindet im Vektor pCMV-Tag2) und JS.143 (bindet in der *Dyrk1A*-cDNA, s. Abbildung 6-1) bestätigt. J.142 besitzt einen CMV-Promotor, der die Expression der *hrGFP-Dyrk1A*-Fusion in eukaryotischen Zellen ermöglicht. Nach Transfektion von HT22-Zellen, einer von hippocampalen Neuronen der Maus abstammenden Zelllinie, wurde die Expression von *hrGFP-Dyrk1A* per Fluoreszenzmikroskopie untersucht (s. Abbildung 6-16).

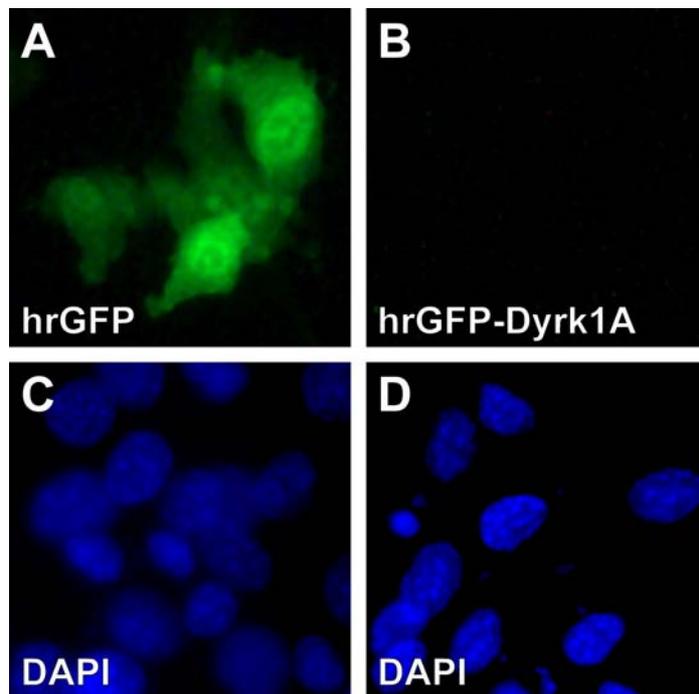


Abbildung 6-16: HT22-Zellen nach Transfektion mit hrGFP und hrGFP-Dyrk1A

HT22-Zellen wurden mit phrGFP-C (A) und pCMV-hrGFP-Dyrk1A (J.142; B) transfiziert und per Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zur Markierung der Zellkerne wurde eine Anfärbung mit DAPI vorgenommen (C korrespondierender Ausschnitt zu A; D zu B). Während in A eine Fluoreszenz in der gesamten Zelle zu beobachten ist, zeigten die Zellen in B keinerlei Signale.

Das Resultat dieser Experimente war, daß keine Fluoreszenz von hrGFP-Dyrk1A in den transfizierten Zellen beobachtet werden konnte. Dabei wurden keine weiteren Untersuchungen über die möglichen Gründe für dieses negative Resultat vorgenommen, so

¹² CMV: *Cytomegalovirus*, Zytomegalie-Virus

¹³ FLAG: Peptid-Epitop zum Nachweis von Proteinen mit Antikörpern (Hopp *et al.*, 1988)

daß nicht beurteilt werden kann, ob das Fusionsprotein überhaupt synthetisiert wird oder ob es in einer nicht fluoreszierenden Konformation vorliegt. Diese Ergebnisse zeigen, daß hrGFP nicht zur Markierung von Dyrk1A geeignet ist, da offenbar kein funktionsfähiges Fusionsprotein hergestellt werden kann. Aus diesem Grunde wurden die bis dahin erfolglosen Versuche zur Modifizierung des BAC-Klons J.81.5 mit der Rekombinationskassette 2, die für eine hrGFP-Dyrk1A-Fusion entsprechend der von J.142 kodiert, abgebrochen.

6.3 Identifizierung und Charakterisierung von Dyrk1A-Interaktoren

Um Hinweise auf die Funktion von Dyrk1A zu erhalten, sollten in dieser Arbeit Proteine identifiziert werden, die mit Dyrk1A interagieren. Anhand der bekannten Daten über solche potentiellen Interaktoren sollten sich auch Rückschlüsse auf die Funktion von Dyrk1A ziehen lassen. Weiterhin sollten gefundene physikalische Interaktionen in geeigneten experimentellen Systemen hinsichtlich ihrer physiologischen Relevanz und unter funktionellen Gesichtspunkten untersucht werden.

6.3.1 Identifizierung der Interaktoren in der *Yeast two-hybrid*-Suche

Als experimentelles System zur Suche nach physiologisch relevanten Interaktoren wurde die sogenannte *Yeast two-hybrid*-Suche (Hefe-zwei-Hybrid-Suche) ausgewählt. Das Verfahren der *Yeast two-hybrid*-Suche erschien besonders geeignet, da sich hiermit Protein-Protein-Interaktionen im Kern von Hefezellen, also in einer der *in vivo*-Situation von Dyrk1A relativ ähnlichen Umgebung, untersuchen lassen. Die Wahl fiel auf eine von der Firma *Clontech* vertriebene, *MATCHMAKER System 3* genannte Variante. In diesem System werden auxotrophe haploide Mutanten der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Die eingesetzten Stämme können unter selektiven Bedingungen nur dann wachsen, wenn bestimmte Reportergene exprimiert werden. Die Aktivität der Reportergene wird durch den Transkriptionsfaktor GAL4 reguliert, für den die eingesetzten Stämme allerdings defizient sind. Zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wird ein haploider Stamm – hier AH109 – vom Paarungstyp α (MAT α , *mating type* α) mit einem Plasmid transformiert, das für eine Fusion des zu untersuchenden Proteins mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4 (DNA-BD) kodiert. Ein anderer Stamm – hier Y187 – vom Paarungstyp α (MAT α , *mating type* α) wird dagegen mit einem Plasmid kodierend für ein Fusionsprotein aus der GAL4-Transaktivierungsdomäne (AD) und einem Protein, das einer cDNA-Bibliothek entstammt, transformiert. Die beiden haploiden Stämme werden miteinander verpaart, so daß die beiden Hybride in der resultierenden diploiden Zelle exprimiert werden. Nur wenn nun das zu untersuchende und das der Bibliothek entstammende Protein physikalisch miteinander interagieren, kommen die beiden Domänen von GAL4 in ausreichende Nähe zueinander, um einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor zu ergeben und so die Reportergene zu aktivieren (s. Abbildung 6-17). Unter selektiven

Bedingungen ist also das Überleben der Hefezellen von der Interaktion der beiden Hybride abhängig. Mittels Isolierung und Charakterisierung überlebender Klone nach einem Verpaarungsexperiment kann eine Bibliothek nach Proteinen abgesucht werden, die mit dem zu untersuchenden Protein interagieren.

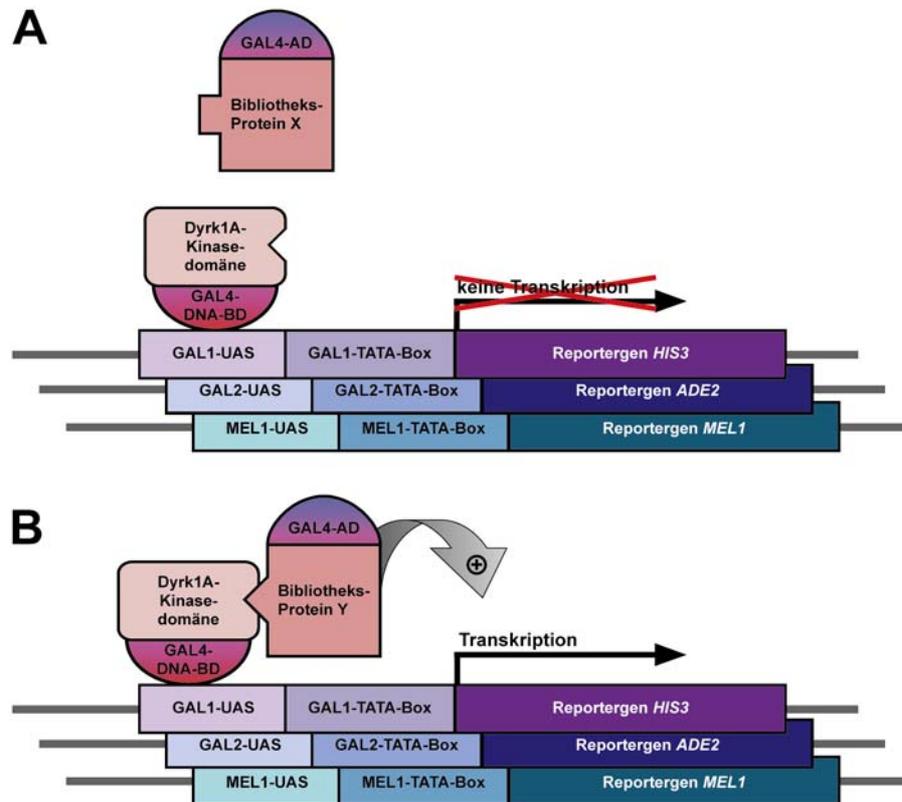


Abbildung 6-17: Das Prinzip des Yeast *two-hybrid*-Verfahrens

Die Kinase-Domäne von Dyrk1A wird in durch Verpaarung entstandenen diploiden Hefezellen als ein Hybrid mit der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 (GAL4-DNA-BD) synthetisiert, ein Protein aus der zu untersuchenden Bibliothek als Hybrid mit der Transaktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4-AD). Beide Hybride sind alleine nicht funktionsfähig (A). Durch Interaktion von Dyrk1A mit einem Bibliotheks-Protein Y wird ein aktiver Transkriptionsfaktor rekonstituiert. Dieser induziert die Expression der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1*, die jeweils unterschiedliche GAL4-responsive Promotoren besitzen (B). So kann ein Klon, der das interagierende Protein Y synthetisiert, unter Selektionsbedingungen wachsen. Die Selektion auf Expression von *HIS3* und *ADE2* erfolgt auf Agar-Platten mit Minimalmedium, welches kein Histidin bzw. Adenin enthält. *MEL1*-exprimierende Klone färben sich auf X- α -Gal-enthaltenden Platten blau an.

Das hier eingesetzte *MATCHMAKER System 3* bedient sich dreier Reportergene (*HIS3*, *ADE2*, *MEL1*), die in einem der beiden eingesetzten Hefe-Stämme, AH109, unter der Kontrolle dreier unterschiedlicher GAL4-responsiver Promotoren exprimiert werden. So können falsch positive Ergebnisse nach Herstellerangaben nahezu ausgeschlossen werden.

Als Köder im *Yeast two-hybrid*-Screen, d. h. als das mit der GAL4-DNA-BD fusionierte Protein, wurde die Kinase-Domäne von Dyrk1A eingesetzt, da in erster Linie Interesse daran bestand, Substrate, Aktivatoren und Inhibitoren von Dyrk1A zu identifizieren und nicht etwa solche Proteine, die z. B. mit dem nukleären Lokalisationssignal von Dyrk1A interagieren.

Auf Interaktoren untersucht wurde eine Maus-Gehirn-cDNA-Bibliothek von Clontech, die in den Vektor pACT2 in Hefe-Zellen des Stammes Y187 prätransformiert worden war. Die so transformierten Hefen exprimieren konstitutiv Hybride von GAL4-AD- und Bibliotheks-cDNA.

6.3.1.1 Generierung des Köder-Vektors

Um ein Köderplasmid für die *Yeast two-hybrid*-Suche zu erhalten, war es notwendig, die Kinase-Domäne von Dyrk1A in den Vektor pGBKT7 (Clontech) zu klonieren. Dieser Vektor ist für die konstitutive Expression von GAL4-DNA-BD-Hybriden geeignet. Dafür wurde zuerst ein Bereich der cDNA, der die für die Kinase-Domäne kodierende Region umfaßt, per RT-PCR mit den Primern JS.24/JS.25 und der Polymerase *Pfu* amplifiziert und in den Vektor pBluescript® II KS kloniert. Nach der Sequenzierung eines Klons dieses Konstruktes (J.68) wurde eine erneute PCR durchgeführt mit dem Plasmid J.68 als Matrize und den Primern JS.40/JS.41. Diese beinhalten eine *Eco* RI- bzw. eine *Bam* HI-Schnittstelle, so daß das mit diesen Enzymen verdaute und aufgereinigte PCR-Produkt in den auf dieselbe Weise behandelten Vektor pGBKT7 kloniert werden konnte. Dabei waren die Primer und die Schnittstellen so gestaltet, daß die Kinase-Domäne von Dyrk1A als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-BD exprimiert werden kann. Das so generierte Konstrukt (s. Abbildung 9-1) wurde J.73 (pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41) genannt und die korrekte Sequenz eines Klons durch Sequenzierung bestätigt.

6.3.1.2 Analyse von AH109[pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41]-Transformanden

Die auxotrophen Hefestämme AH109 (MAT α) und Y187 (MAT α), die im Verlaufe der weiteren Experimente benutzt werden sollten, wurden phänotypisiert, um sicherzustellen, daß sie für die verwendeten Reporter- und Markergene defizient sind, indem Zellen des jeweiligen Stammes auf den verschiedenen selektiven Minimalmedien (SD-[*synthetic dropout*-] Agar) ausgestrichen wurden und ihr Wachstum analysiert wurde (Tabelle 6-4). Die Resultate dieses Experiments bestätigten, daß AH109 und Y187 defizient für *ADE2*, *HIS3*, *LEU2* und *TRP1* sind.

Selektion (Agar)	SD/-A	SD/-H	SD/-L	SD/-W	SD/-U	YPDA	
Reportergen	ADE2	HIS3	LEU2	TRP1	URA3	/	
Stamm							SD/-A: Minimalmedium ohne Adenin SD/-H: Minimalmedium ohne Histidin SD/-L: Minimalmedium ohne Leucin SD/-W: Minimalmedium ohne Tryptophan SD/-U: Minimalmedium ohne Uracil YPDA: Vollmedium mit Adenin-Zusatz +: Wachstum; ++: starkes Wachstum; -: kein Wachstum /: keine Selektion
AH109	-	-	-	-	+	++	
Y187	-	-	-	-	+	++	

Tabelle 6-4: Phänotypisierung der eingesetzten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Es wurde das Wachstum der Stämme AH109 und Y187 auf unterschiedlichen Minimalmedien (s. rechte Spalte) untersucht, um zu verifizieren, daß die Reportergene im basalen Zustand (d. h. in den haploiden Zellen ohne transformierte Plasmide und ohne Interaktion zweier GAL4-Hybride) nicht exprimiert werden. Die Reportergene werden entweder nach Transformation von Plasmiden konstitutiv exprimiert (*LEU2*, *TRP1*) oder durch die Interaktion der GAL4-Hybride induziert (*ADE2*, *HIS3*). Die Expression dieser Gene erlaubt das Wachstum der auxotrophen Hefe-Stämme auf Agar-Platten mit Minimalmedien, denen bestimmte Aminosäuren oder Purin- bzw. Pyrimidinbasen fehlen. Die Reportergene kodieren jeweils für ein für die Synthese dieser Verbindungen benötigtes Enzym. Die Ergebnisse bestätigten die Herstellerangaben der Firma Clontech. Die Expression des dritten Reportergens *MEL1*, welches für eine α -Galactosidase kodiert, wurde hier nicht untersucht; es konnte allerdings an anderer Stelle bestätigt werden, das auch dieses Gen im basalen Zustand nicht exprimiert wird.

Das Plasmid J.73 (pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41) wurde in *Saccharomyces cerevisiae* vom Stamm AH109 transformiert. Nach der Transformation wurde das Wachstum unter Selektionsbedingungen getestet, um erstens die Anwesenheit des Köderplasmids zu zeigen, welches die Expression von *TRP1* erlaubt und damit das Wachstum auf Agar-Platten ohne Tryptophan (-W). Zweitens sollte die basale Expression der Reportergene ohne Expression der GAL4-AD untersucht werden. Die AH109[J.73]-Transformanden wuchsen auf SD/-W-Platten, nicht jedoch ohne Adenin (SD/-A). Auf Platten ohne Histidin (SD/-H) wuchsen nur sehr kleine Kolonien (< 1 mm). Dies deutet auf eine schwache *HIS3*-Expression auch ohne rekonstituiertes GAL4 hin, während *ADE2* nicht exprimiert ist. Sechs Transformanden (Klone Y.1 bis Y.6) wurden weiter untersucht und mit Klonen verglichen, die mit dem Plasmid pGBKT7 (ohne Dyrk1A-Kinase-Domäne) transformiert worden waren (Y.9 bis Y.12): Um die Bedingungen herauszufinden, unter denen keine basale His3p-Aktivität ohne GAL4-Rekonstituierung nachzuweisen ist, wurden die Klone auf Agar-Platten mit ansteigender Konzentration von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT), einem kompetitiven Inhibitor von His3p, ausgestrichen. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Klone Y.1 bis Y.6 ab einer Konzentration von 2,5 mM selbst nach acht Tagen keine Kolonien mehr bildeten und auch ohne 3-AT kein stärkeres Wachstum als Y.9 bis Y.12 zeigten, im Falle von Y.3 und Y.4 sogar überhaupt keines (s. Tabelle 6-5). Daraus und aus dem Befund, daß J.73-Transformanden nicht auf SD/-A-Platten wuchsen, läßt sich folgern, daß die Dyrk1A-Kinase-Domäne keinen Einfluß auf die basale Expression der Reportergene hat.

AH109 transformiert mit	J.73 (pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41)						J.74 (pGBKT7)			
Klon	Y.1	Y.2	Y.3	Y.4	Y.5	Y.6	Y.9	Y.10	Y.11	Y.12
SD/-H; [3-AT]/mM										
0	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 6-5: 3-AT-Test der Hefe-Klone zur Analyse der *HIS3*-Expression nach Transformation des Köderplasmids J.73 (pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41)

Analyse des Wachstums der mit J.73 und J.74 transformierten AH109-Klone auf SD/-H-Platten mit 3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazol) zur Überprüfung der basalen *HIS3*-Expression. Die Klone Y.3 und Y.4 zeigen selbst ohne 3-AT kein Wachstum auf SD/-H-Platten, die übrigen J.73-transformierten Klone wachsen ebenso wie die mit J.74 – dem Köderplasmid ohne Insertion – transformierten schon ab 2,5 mM 3-AT nicht mehr.

Anschließend wurde eine mögliche Toxizität des Köders ausgeschlossen, indem Flüssigkulturen der Klone Y.1 bis Y.12 in ihrer Wachstumsrate verglichen wurden, wobei im Falle der Köder-exprimierenden Klone nur eine geringe Wachstumsretardierung festgestellt wurde (Resultate nicht gezeigt). Die Anwesenheit des Köderplasmids wurde nach Präparation von Plasmid-DNA aus den Flüssigkulturen mittels einer PCR mit den Primern JS.24/JS.25 (s. Abbildung 6-1) in allen sechs untersuchten J.73-Transformanden (Y.1 bis Y.6) nachgewiesen (s. Abbildung 6-18).

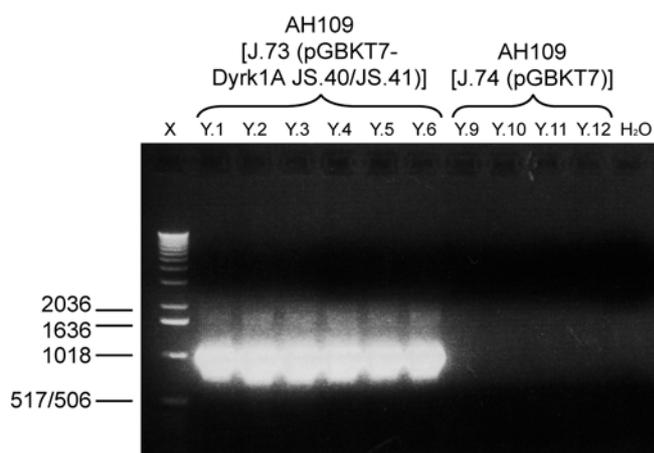


Abbildung 6-18: PCR zum Nachweis der Anwesenheit des Köderplasmids J.73 in den Hefe-Klonen

Gezeigt sind die Produkte einer PCR mit den für die Dyrk1A-Kinase-Domäne spezifischen Primern JS.24/JS.25 und Plasmid-DNA, präpariert aus Flüssigkulturen der angegebenen Klone, als Matrize. Alle mit dem Köderplasmid J.73 (pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41) transformierten Klone lieferten die erwartete Bande von 1025 bp; die mit dem Vektor J.74 (pGBKT7) transformierten Klone ergaben – ebenso wie die H₂O-Kontrolle – erwartungsgemäß kein Produkt.

Vor dem Einsatz im Verpaarungsexperiment im großen Maßstab zur Suche nach Dyrk1A-Interaktoren sollte eine mögliche Beeinflussung der Paarungseffizienz durch das GAL4-BD-Dyrk1A-Hybrid untersucht werden, was durch Verpaarung eines AH109[J.73]-Klons (Y.4) mit

dem MAT α -Stamm Y187[pTD1-1] (Clontech; exprimiert ein GAL4-AD-SV40-groß-T-Hybrid und den Marker *LEU2*) geschah. Als Kontrolle wurde ein Verpaarungsansatz von Y187[pTD1-1] mit AH109[pVA3-1] (Clontech; exprimiert ein GAL4-DNA-BD-p53-Hybrid und den Marker *TRP1*) eingesetzt. Für die beiden Kontroll-Hybride ist eine Interaktion in der Literatur beschrieben (Li & Fields, 1993; Iwabuchi *et al.*, 1993). Die resultierenden Diploiden wurden auf selektive Agar-Platten ausplattiert: SD/-L/-W zur Selektion von Diploiden, die beide Plasmide beinhalten und SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal zur Selektion von Diploiden mit aktivierten Reportergenen, die eine Interaktion der beiden Hybrid-Proteine anzeigen. Dabei wurde festgestellt, daß die Paarungseffizienz von AH109[J.73] mit Y187[pTD1-1] höher war als die von Y187[pTD1-1] mit AH109[pVA3-1]. Weiterhin wurden im ersten Falle (J.73) auf den SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal-Platten nur sehr kleine, weiße Kolonien gefunden, während im zweiten Falle (pVA3-1) die Kolonien groß und fast durchweg blau, also die Reportergene aktiv waren. Daraus ließ sich schließen, daß das GAL4-DNA-BD-Dyrk1A-Kinase-Domänen-Hybrid weder die Paarungseffizienz negativ beeinflußt noch die Expression der Reportergene in diploiden AH109/Y187-Zellen induziert.

6.3.1.3 *Yeast two-hybrid*-Suche nach Interaktoren

Im Anschluß an die oben beschriebenen Kontroll-Experimente, deren Resultate belegten, daß das eingesetzte Köderplasmid keine negativen Auswirkungen auf die basale Expression der Reportergene, das Wachstum der Hefen und die Paarungseffizienz hat, konnte das eigentliche Verpaarungsexperiment zur Suche nach Dyrk1A-Interaktoren begonnen werden. Dafür wurden als Paarungspartner der Klon Y.4 (AH109[J.73 pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41]) und eine in den Stamm Y187 prätransformierte Maus-Gehirn-cDNA-Bibliothek (im Vektor pACT2, welcher das *LEU2*-Gen enthält; Clontech) ausgewählt. Das Paarungsexperiment wurde entsprechend dem Protokoll der Firma Clontech durchgeführt. Die resultierenden diploiden Zellen wurden zur Selektion von Interaktoren mit hoher Stringenz auf 33 SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal-Platten (13 cm Durchmesser) und zur Selektion mit mittlerer Stringenz auf 25 SD/-H/-L/-W-Platten ausgebracht und 14 Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Kontrolle des Bibliothekstiters und der Paarungseffizienz wurden kleine Aliquots der Bibliothek in Y187 bzw. des Paarungsansatzes auf SD/-L bzw. auf SD/-L, SD/-W und SD/-L/-W ausplattiert und für einen Tag bzw. neun Tage inkubiert. Danach wurde ein Bibliothekstiter von $1,9 \cdot 10^8$ cfu/ml festgestellt, entsprechend $1,9 \cdot 10^8$ insgesamt eingesetzten Klonen, ferner eine Paarungseffizienz von 1,7 % und eine Gesamtzahl von $3,45 \cdot 10^6$ abgesuchten cDNA-Klonen.

Innerhalb der 14 Tage dauernden Inkubation traten mehrere hundert Kolonien auf den SD/-H/-L/-W-Platten und sechs Kolonien auf den SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal-Platten auf. In der Folge wurden nur diese letztgenannten sechs Klone – in der Reihenfolge ihres Auftretens

DI1 bis DI6 (für Dyrk1A-interagierendes Protein 1 bis 6) bezeichnet – weiter untersucht. Diese wurden zuerst erneut auf SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal-Platten ausgestrichen, um die Expression der Reportergene zu verifizieren. Dabei zeigten alle sechs Klone deutliches Wachstum und eine blaue Färbung, die eine α -Galactosidase-Aktivität infolge der Expression von *MEL1* anzeigt (s. auch 6.3.2, Abbildung 6-21).

Anschließend wurden die Hefe-Klone auf SD/-L/-W/X- α -Gal-Platten ausgestrichen, um für den möglichen Fall, daß ein Klon zwei verschiedene Plasmide aus der Bibliothek enthält, von denen eines für einen Dyrk1A-Interaktor kodiert, für eine Vereinzelung der Plasmide zu sorgen. Unter diesen Bedingungen erfolgt keine Selektion von Interaktoren – die Platten enthalten Adenin und Histidin, es erfolgt somit keine Selektion auf Expression von *ADE2* und *HIS3* –, sondern nur auf Klone, die das Köderplasmid mit dem Marker *TRP1* und ein Bibliotheksplasmid mit dem Marker *LEU2* enthalten. Die Interaktoren sind aber durch ihre Blaufärbung zu erkennen und können so ausgewählt werden. Die erhaltenen blauen Klone wurden erneut auf dieselbe Weise ausgestrichen. Die Kolonien von dieser zweiten SD/-L/-W/X- α -Gal-Platte wurden für die weiteren Experimente verwendet.

6.3.1.4 Analyse der gefundenen Klone durch Restriktionsverdau und Sequenzierung

Nach der Vereinzelung der Bibliotheksplasmide in den gefundenen positiven Klonen wurden Flüssigkulturen (SD/-H/-L/-W; mit Adenin, da so das Wachstum der Hefen deutlich schneller erfolgt; unter stringenten Bedingungen – ohne Adenin – wurde schon vorher selektiert) mit blauen Kolonien von der zweiten SD/-L/-W/X- α -Gal-Platte (s. o.) angeimpft und nach Inkubation über Nacht bei 30 °C die Plasmid-DNA aufgereinigt. Diese wurde per PCR und Restriktionsverdau untersucht. Die PCR wurde mit den Primern JS.54 pACT2-InsFw und JS.55 pACT2-InsRev, die im Bibliotheksvektor pACT2 binden, durchgeführt; die erhaltenen Produkte wurden nach Aufreinigung mit dem häufig schneidenden Restriktionsenzym *Alu I* verdaut. Die so generierten Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese analysiert (s. Abbildung 6-19). Es zeigte sich dabei, daß DI4 und DI5 dasselbe Bandenmuster liefern, was darauf hindeutet, daß diese Klone Fragmente der gleichen cDNA enthalten.

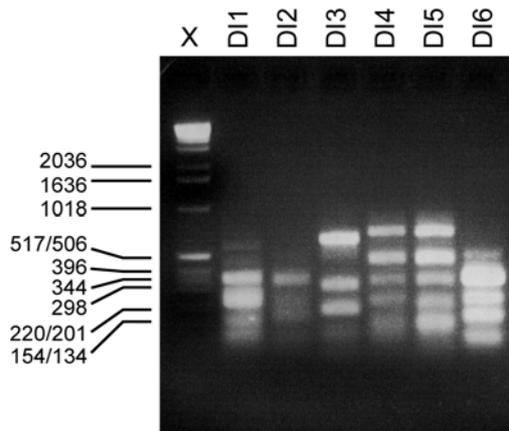


Abbildung 6-19: Charakterisierung der Insertionen der gefundenen Hefe-Klone mittels PCR und Restriktionsverdau mit *Alu* I

Gezeigt sind die Produkte einer PCR von aufgereinigten Bibliotheksplasmiden mit den Primern JS.54 pACT2-InsFw und JS.55 pACT2-InsRev, die beiderseits der Insertion im Vektor pACT2 binden, nach Verdau mit *Alu* I. Die Insertionen entsprechen den cDNA-Fragmenten der Dyrk1A-Interaktoren. Auffällig ist das gleiche Bandenmuster von D14 und D15. Diese Klone beinhalten Fragmente der gleichen cDNA.

Die aus den Hefe-Klonen aufgereinigte Plasmid-DNA, die das Köderplasmid und das jeweilige Bibliotheksplasmid enthält, wurde in *E. coli* transformiert. Dabei wurde ausgenutzt, daß die Plasmide des *MATCHMAKER* 3-Systems unterschiedliche prokaryotische Resistenzgene tragen: pGBKT7 – das Köderplasmid – kodiert für eine Kanamycin-Resistenz, wohingegen pACT2 – das Bibliotheksplasmid – ein Ampicillin-Resistenzgen beinhaltet. So konnten die mit den Bibliotheksplasmiden transformierten *E. coli*-Klone auf Ampicillin-Platten selektiert werden. Es wurde dann aus jeweils mindestens vier Transformanden pro ursprünglichem Hefe-Klon die Plasmid-DNA aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Xho*I verdaut. Diese Enzyme wurden auch bei der Klonierung der cDNA-Bibliothek in den Vektor pACT2 verwendet; so sollten auf diese Weise auch die Insertionen aus den Bibliotheksplasmiden herausgeschnitten werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die in Tabelle 6-6 angegebenen Fragmente detektiert.

Klon (Interaktor)	Hefe-Klon	PCR-Produkt(e)	<i>E. coli</i> -Klon	<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Fragmente
DI1	Y.13	1,8 kb	J.83 J.89 (ohne Hexb-Fragment)	0,3 kb + 1,5 kb (+ 8 kb [pACT2])
DI2	Y.14	1,5 kb; 1,9 kb	J.84	0,4 kb + 2 kb (+ 8 kb [pACT2])
DI3	Y.15	1,5 kb	J.85	0,35 kb + 1,1 kb (+ 8 kb [pACT2])
DI4	Y.16	2,9 kb	J.86	2,9 kb (+ 8 kb [pACT2])
DI5	Y.17	3,1 kb	J.87	3,1 kb (+ 8 kb [pACT2])
DI6	Y.18	1,5 kb	J.88	0,7 kb + 0,8 kb (+ 8 kb [pACT2])

Tabelle 6-6: Größe der cDNA-Insertionen der in der *Yeast two-hybrid*-Suche gefundenen Klone

Die Tabelle zeigt zu jedem Klon die Größe des PCR-Produktes nach Amplifikation der Insertion mit den Primern JS.54 pACT2-InsFw und JS.55 pACT2-InsRev sowie die Größen der *Eco* RI/*Xho* I-Fragmente nach Verdau der in *E. coli* transformierten Bibliotheksplasmide. Der Bibliotheksvektor pACT2 weist nach *Eco* RI/*Xho* I-Verdau eine Länge von 8108 bp auf.

Die DNA jeweils eines für einen der sechs ursprünglichen Hefe-Klone repräsentativen *E. coli*-Klons wurde mit dem Primer GAL4-AD sequenziert. Die Sequenzdaten zeigten, daß alle sechs Klone für ein Fusionsprotein von GAL4-AD und einem weiteren Protein kodieren und daß sich die beiden Anteile der Hybride (mit Ausnahme des Klons DI6, s. u.) im gleichen offenen Leseraster befinden. Die erhaltenen Sequenzen wurden in *BLAST*-Suchen mit Datenbankeinträgen verglichen. Dabei fanden sich die in Tabelle 6-7 gezeigten Einträge mit dem angegebenen Grad an Übereinstimmung.

Die Fragmente der jeweiligen cDNAs, die in den Bibliotheksplasmiden aus DI1 und DI6 enthalten sind, sind in Abbildung 6-20 gekennzeichnet. Die Sequenzierung bestätigte, daß DI4 und DI5 unterschiedliche Fragmente von der gleichen cDNA enthalten. DI2 kodiert für eine bisher nicht näher charakterisierte Variante eines Zelladhäsionsproteins, welche nach Vorhersagen, die *in silico* mit den Programmen *TmHMM* und *SPScan* (HUSAR, <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/>) erstellt wurden, vollständig extrazellulär lokalisiert ist (Resultate nicht gezeigt). Daher kommt das von DI2 kodierte Protein nicht als physiologisch relevanter Interaktionspartner einer nukleären oder zytoplasmatischen Kinase wie Dyrk1A in Betracht und wurde nicht weiter untersucht.

Klon	Name des kodierten Proteins	Datenbank-Referenz (cDNA)	Übereinstimmung der Sequenzierung mit der Referenz	Vorhergesagte Lokalisation des Proteins
DI1	<i>Mus musculus</i> septin 4 (Sept4)/Pnutl2/ARTS/H5 ¹	NM_011129.1	222/222 (100 %)	zytoplasmatisch (mitochondrial / nukleär) ²
DI1 3'-terminales Fragment (Sequenzierung pACT2-rev)	<i>Mus musculus</i> Hexosaminidase B (Hexb)	NM_010422.1	198/235 (84 %)	lysosomal
DI2	<i>Mus musculus</i> similar to neural cell adhesion protein BIG-2 precursor [<i>Rattus norvegicus</i>] (LOC213327)	XM_144939.1	229/230 (99 %)	extrazellulär ³
DI3	<i>Mus musculus</i> ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2	NM_023472.1	249/272 (91 %)	zytoplasmatisch, membranassoziiert
DI4	<i>Mus musculus</i> similar to hypothetical protein MGC45562 [<i>Homo sapiens</i>] (LOC268481)	XM_193650.1	238/238 (100 %)	zytoplasmatisch
DI5	<i>Mus musculus</i> similar to hypothetical protein MGC45562 [<i>Homo sapiens</i>] (LOC268481)	XM_193650.1	226/237 (95 %)	zytoplasmatisch
DI6	Arip4 (<i>androgen receptor interacting protein 4</i> ; <i>Mus musculus</i> similar to steroid receptor-interacting SNF2 domain protein [<i>Mus musculus</i>] (LOC270195))	XM_193101.1	240/240 (100 %)	nukleär

Tabelle 6-7: Positive Klone aus der Yeast two-hybrid-Suche

Die per Sequenzierung mit dem Primer GAL4-AD (und pACT2-rev bei DI1) erhaltenen Sequenzen der Dyrk1A-Interaktor-(DI-)Insertionen wurden mittels *BLAST*-Suche mit Datenbankeinträgen verglichen. Der jeweils erste Treffer, also der mit dem höchsten Grad an Übereinstimmung, ist hier angegeben. ¹ Für die Septine der Säuger wurde kürzlich eine einheitliche Nomenklatur vorgeschlagen (Macara *et al.*, 2002), nach der der Name *Sept4* (Gen) bzw. Sept4 (Protein) verwendet werden soll. ² Die humane SEPT4-Isoform ARTS (SEPT4_v5; AF176379_1) kommt in Mitochondrien und im Nukleus vor (Larisch *et al.*, 2000). ³ Grund des Ausschlusses von der weiteren Analyse

Das GAL4-AD-Sequenzierungsergebnis von DI6 deutete darauf hin, daß sich das *Arip4*- (*androgen receptor-interacting protein 4*-)Fragment nicht im selben Leseraster wie die GAL4-AD befindet; es fehlte eine Base am Beginn der Insertion zu einer Translation des Arip4-Fragmentes im selben Leseraster wie dem der GAL4-AD. So würde nicht ein Fragment von Arip4 als Fusion mit der GAL4-AD translatiert, sondern ein anderes, unbekanntes Protein. Dieses Ergebnis wurde durch Sequenzierung in umgekehrter Orientierung mit dem Primer JS.150 bestätigt. Dennoch wurde im Verlaufe der weiteren Experimente davon ausgegangen, daß das Arip4-Fragment im Klon DI6 exprimiert und translatiert wird sowie mit Dyrk1A interagiert. Dies wurde später rückwirkend durch den Nachweis der Interaktion zwischen Dyrk1A und Arip4 in Säugerzellen bestätigt (s. Abschnitt 6.3.3). Deshalb ist davon auszugehen, daß diese Sequenzierungsergebnisse doch einen Fehler aufweisen. Die Sequenzierung der DI6-Insertion nach Umklonierung in den Vektor pBluescript® II KS (J.104) vom rückwärtigen – also dem 3'-Ende der mRNA entsprechenden – Ende her mit dem Primer T3 zeigte, daß DI6 für die Aminosäuren 1078-1466 von Arip4 (Arip4¹⁰⁷⁸⁻¹⁴⁶⁶) kodiert.

An das der *Septin 4*-(*Sept4*-)cDNA entsprechende Fragment des Klons DI1 (in Abbildung 6-20 gekennzeichnet) schließt sich eine Sequenz an, die nicht in der von Kato *et al.* (Kato, 1990) publizierten *Sept4*-cDNA (NM_011129.1) vorkommt. Das GAL4-Sept4-Fusionsprotein bricht nach 9 bp bzw. 3 Aminosäureresten an einem Stop-Codon innerhalb dieser Sequenz ab. Eine erneute Analyse zu einem späteren Zeitpunkt im Verlaufe dieser Arbeit ergab, daß die vorher unbekannte Sequenz in DI1 einer Variante von *Sept4* entspricht, von der ein 3'-terminaler Teil inzwischen als *IMAGE*-Klon 4487075 (BC037673.1, *Mus musculus*, *peanut-like 2*-ähnlich) publiziert wurde. Dieser *IMAGE*-cDNA-Klon bestätigt, daß der Klon DI1 eine vollständig prozessierte mRNA repräsentiert, die in dieser Form in der Maus vorkommt. Die cDNA, die in DI1 vollständig enthalten ist, kodiert für eine *Sept4*-Variante, die den gegenüber der Variante 1 verkürzten N-Terminus der humanen SEPT4-Variante 2 (NP_536340) und einen eigenen deutlich kürzeren C-Terminus besitzt; sie verfügt über einen sogenannten *P-loop*, eine polybasische Region und zwei Dyrk1A-Substrat-Konsensussequenzen (s. Abbildung 6-20). Eine *in silico*-Analyse der Aminosäuresequenz mit dem Programm *TargetP V1.0* (Emanuelsson *et al.*, 2000) ergab, daß dieses Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit zytoplasmatisch lokalisiert ist. Die in DI1 translatierte *Sept4*-Variante ist den Aminosäuren 21-220 der Variante 1 (NP_035259.1; Kato, 1990) identisch und wird im folgenden als *Sept4_v7* (für *Septin 4*, Variante 7; Sequenz s. Abschnitt 9.2.1) bezeichnet.

Auch die Insertion von DI1 wurde vom rückwärtigen Ende her sequenziert. Dies geschah im Falle von DI1 (J.83) mit dem Primer pACT2rev. Dabei stellte sich heraus, daß der Klon DI1 Fragmente von zwei verschiedenen cDNAs enthält: Die 1,5kb-Bande im *Eco RI/Xho I*-Verdau (s. Tabelle 6-6) entspricht dem beschriebenen Fragment der *Sept4*-

cDNA, das kleinere Fragment von 300 bp repräsentiert einen Teil der cDNA der Hexosaminidase B (Hexb), der an die Poly-A-Sequenz der *Sept4*-cDNA angeheftet ist. Translatiert werden sollte allerdings nur ein Hybrid von GAL4-AD und *Sept4*, da schon in der *Sept4*-Sequenz ein Stop-Codon auftritt. Das *Sept4*-Fragment aus DI1 wurde in den Vektor pGADT7 kloniert, um untersuchen zu können, welchen Einfluß die Hexosaminidase-B-Insertion auf die Interaktion zwischen dem *Sept4*-Fragment und Dyrk1A hat. Das so erhaltene Konstrukt J.89 wurde mittels Kotransformation in Hefe untersucht (s. 6.3.2). Der Vektor pGADT7 ist ebenso wie pACT2 ein Hefe-Expressionsvektor für GAL4-AD-Fusionsproteine.

Abbildung 6-20 (folgende Seite): Schematische Darstellung der in den Hefe-Klonen DI1 und DI6 gefundenen cDNA-Fragmente und der entsprechenden Proteine

Dargestellt sind die cDNAs der später bestätigten Interaktoren *Sept4* (A) und *Arip4* (C) sowie die entsprechenden Proteine (B und D). Eingezeichnet sind hier verwendete Primer (mit JS bezeichnet), Restriktionsenzym-Schnittstellen und *IMAGE*-Klone sowie die in den Hefe-Klonen DI1 bzw. DI6 gefundenen Fragmente der cDNAs (A und C). Die gesamte *Sept4-v1*-cDNA wurde aus dem *IMAGE*-Klon J.124, dem PCR-Produkt JS.95/JS.96 und der DI1-Insertion kloniert, die *Arip4*-cDNA aus den PCR-Produkten JS.106/JS.100 und JS.133/JS.134 (*Arip4*) sowie dem *IMAGE*-Klon J.127 (s. auch Abbildung 6-23). CDS: proteinkodierende Sequenz; einfach vorkommende Restriktionsenzym-Schnittstellen sind in rot beschriftet. Das *Sept4*-Protein (B) ist in den Varianten 1 (NP_035259.1) und 7 (in dieser Arbeit identifiziert) dargestellt. In den Darstellungen der Proteine (B und D) sind charakteristische Domänen gekennzeichnet. Die CDC-Protein-Domäne ist für die Septine typisch. Die AR-(Androgen-Rezeptor-)interagierende Domäne wurde von Rouleau *et al.* in einer *Yeast two-hybrid*-Suche mit dem AR als Köder identifiziert (Rouleau *et al.*, 2002). LXXLL-Motiv: *nuclear receptor box* (mögliche Interaktionsdomäne mit Steroidhormon-Rezeptor); Sumoylierungsstelle: Konsensussequenz für die Anheftung von Sumo (*small ubiquitin like modifier*); *Sept4_v1*-Domänen (B) nach Kato *et al.* (Kato, 1990); *Arip4*-Domänen (D) nach Rouleau *et al.* (Rouleau *et al.*, 2002). Die Dyrk1A-Phosphorylierungsstellen (s. auch Tabelle 7-1) wurden in dieser Arbeit anhand der von Himpel *et al.* (Himpel *et al.*, 2000) vorgeschlagenen Dyrk1A-Substrat-Konsensussequenz identifiziert.

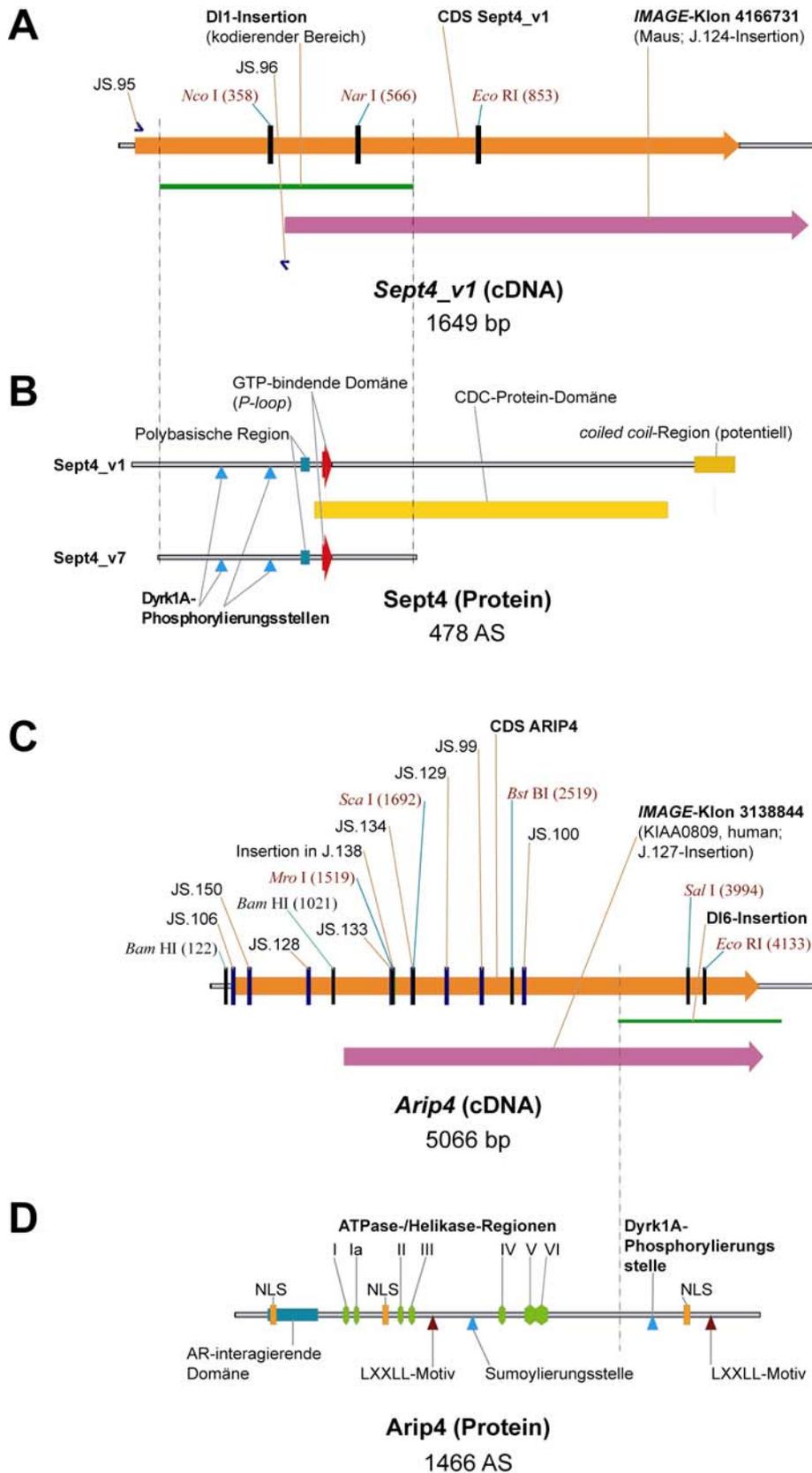


Abbildung 6-20: Schematische Darstellung der in den Hefe-Klonen DI1 und DI6 gefundenen cDNA-Fragmente und der entsprechenden Proteine

6.3.2 Bestätigung der Interaktion in Hefezellen und Analyse der Spezifität der gefundenen Interaktoren

Zur Bestätigung der gefundenen Interaktionen und zum Ausschluß von falsch positiven Klonen, die auch ohne physikalische Interaktion mit der Dyrk1A-Kinase-Domäne die Reportergene aktivieren, wurden weitere Experimente in *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Dabei wurde (i) die Interaktion der gefundenen Interaktionspartner nicht nur mit der Kinase-Domäne von Dyrk1A, sondern auch mit dem gesamten Protein untersucht, (ii) eine Aktivierung der Reportergene ohne Anwesenheit von Dyrk1A getestet, (iii) der Einfluß des Hexosaminidase-B-(Hexb-)Fragmentes im Klon DI1 auf die Interaktion mit Dyrk1A analysiert.

6.3.2.1 Klonierung der gesamten proteinkodierenden *Dyrk1A*-cDNA

Um eine Interaktion nicht nur mit der Kinase-Domäne von Dyrk1A, sondern auch mit dem gesamten Protein zeigen zu können, mußte die gesamte *Dyrk1A*-cDNA der Maus kloniert werden. Deren Sequenz war von Song *et al.* publiziert worden (U58497.1; Song *et al.*, 1996), so daß eine Klonierung mittels RT-PCR mit für *Dyrk1A* spezifischen Primern möglich war. In mehreren Schritten wurden so zuerst Fragmente der cDNA mit den Primern JS.7/JS.8 und JS.9/JS.10 amplifiziert (zu den Bindungsstellen der Primer s. Abbildung 6-1) und kloniert (Klon J.5 pCR[®]II-Dyrk1A JS.7/JS.8 bzw. J.9 pBS-Dyrk1A JS.9/JS.10), diese dann zur gesamten Sequenz per überlappender PCR (zum Prinzip s. 6.2.2.1) mit den Primern JS.56/JS.57 und JS.58/JS.59 zusammengefügt, in den Vektor pBluescript[®] II KS kloniert (Klon J.82) und anschließend in den Vektor pGBKT7 transferiert. Das so erzeugte Konstrukt J.96 (pGBKT7-Dyrk1A JS.60/JS.61; s. Abbildung 9-2) wurde komplett sequenziert, um die Korrektheit des PCR-Amplifikates und der Fusion mit der für die GAL4-DNA-BD kodierenden Sequenz zu bestätigen.

6.3.2.2 Kotransformation von Hefe-Zellen zur Bestätigung und zur Untersuchung der Spezifität der gefundenen Interaktionen

Anschließend wurden *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen vom Stamm AH109 mit verschiedenen Kombinationen von Plasmiden transformiert (s. Tabelle 6-8): mit jeweils einem der GAL4-AD-Interaktor-Hybride im Vektor pACT2 aus den Klonen DI1 bis DI6, die zwischenzeitlich in *E. coli* transformiert worden waren bzw. mit dem Konstrukt J.89 (pGADT7-DI1 [ohne *Hexosaminidase-B*-Fragment]) und mit einer von mehreren GAL4-DNA-BD-Fusionen im Vektor pGBKT7. Dabei dienten Konstrukte, die für ein GAL4-DNA-BD-

Lamin C-Hybrid bzw. nur für die GAL4-DNA-BD kodieren, als Negativkontrollen, die zusammen mit für Dyrk1A spezifischen Interaktoren die Reportergene nicht aktivieren sollten. Die Transformanden wurden auf SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal-Platten ausgebracht, um eine Aktivierung der Reportergene nachweisen zu können, und auf SD/-L/-W-Platten, um die erfolgreiche Kotransformation nachzuweisen. Nach einer Inkubationsdauer von einigen Tagen wurden das Wachstum der Kolonien und deren Blaufärbung als Maß für die Aktivierung der Reportergene herangezogen. Anschließend wurden die Transformanden (von SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal-Platten, soweit hier Kolonien vorhanden waren, ansonsten von SD/-L/-W-Platten) erneut auf SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal-Platten ausgestrichen, wie in Abbildung 6-21 exemplarisch für DI1 und DI6 dargestellt. Die Resultate der gesamten Kotransformationsexperimente sind im einzelnen in Tabelle 6-8 dargestellt.

Aktivierung der Reportergene nach Kotransformation von AH109 mit:					
GAL4-DNA-BD-Hybrid:	pGBKT7-Dyrk1A JS.60/JS.61 (J.96) ¹	pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41 (J.73) ²	pGBKT7- Lamin	pGBKT7	Ø
GAL4-AD-Hybrid:					
pACT2-DI1-Hexb (J.83)	++	++	-	-	-
pGADT7-DI1 (J.89, ohne Hexb-Fragment)	+	++	-	-	-
pACT2-DI3 (J.85)	+	++	+*	++*	-
pACT2-DI5 (J.87)	++	+	+*	+*	-
pACT2-DI6 (J.88)	+	++	-	-	-

Tabelle 6-8: Kontrolltransformationen in Hefe zur Bestätigung der Interaktionen und Analyse der Spezifität der Interaktoren

Analyse der Expression der Reportergene durch Test auf Wachstum auf SD/-A/-H/-L/-W/X- α -Gal-Platten und Blaufärbung der Kolonien nach Transformation mit den angegebenen Plasmiden; die erfolgreiche Transformation wurde in allen Fällen durch paralleles Ausplattieren auf SD/-L/-W-Platten nachgewiesen. +: Wachstum; ++: starkes Wachstum; -: kein Wachstum; *: Grund des Ausschlusses dieser Klone bzw. Interaktoren von der weiteren Analyse; ¹ kodiert für GAL4-DNA-BD-Dyrk1A (vollständiges Protein); ² kodiert für GAL4-DNA-BD-Dyrk1A-Kinase-Domäne; Hexb: Hexosaminidase B

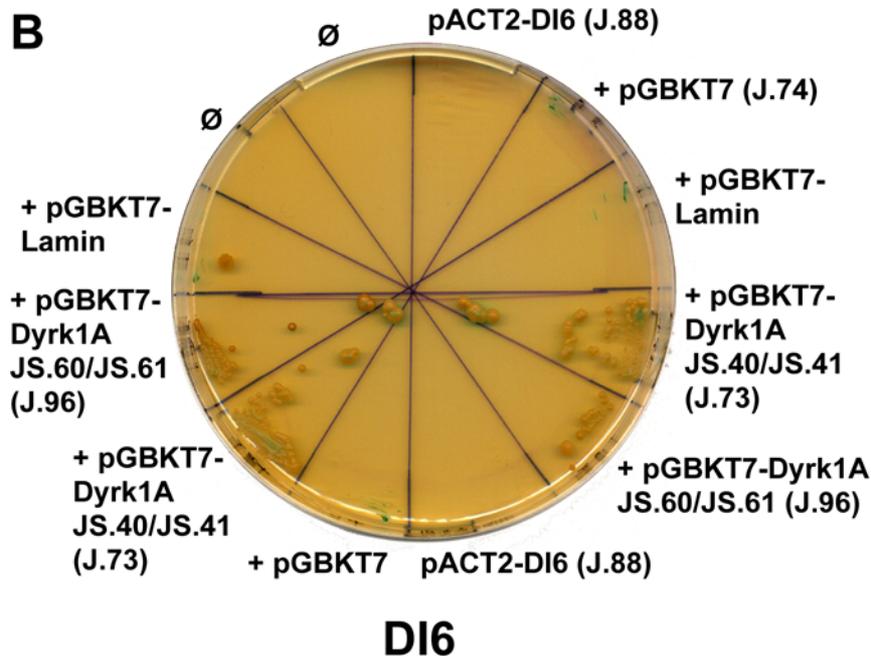
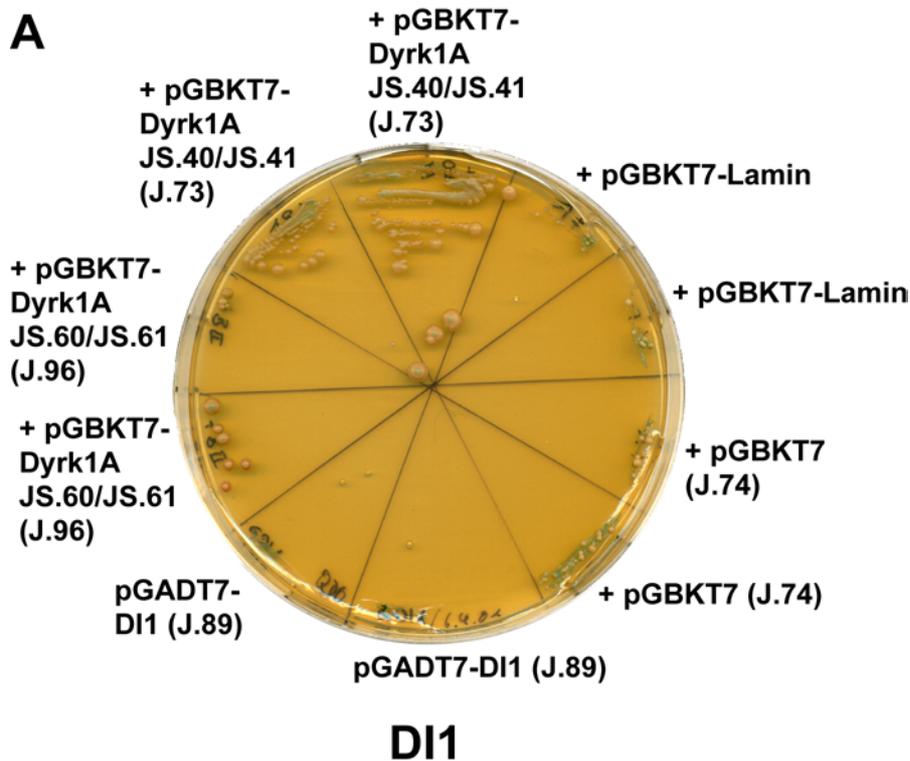


Abbildung 6-21: Analyse der in der Yeast two-Hybrid-Suche gefundenen Klone DI1 und DI6 mittels Kotransformation in Hefe

Untersuchung der Expression der Reportergene per Wachstums-Test auf SD/-A/-H/-L/-W-Platten und Test auf Blaufärbung mit X- α -Gal nach Kotransformation des Bibliotheksplasmids aus DI6 bzw. der in pGADT7 unklonierten DI1-*Sept4_v7*-Insertion (J.89) mit unterschiedlichen pGBKT7-Varianten. Diese kodieren für die GAL4-DNA-BD alleine (pGBKT7), für ein Fusionsprotein mit Lamin C (pGBKT7-Lamin), für ein Fusionsprotein mit der Dyrk1A-Kinase-Domäne (pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41 [J.73]) und für ein Fusionsprotein mit dem vollständigen Dyrk1A-Protein (pGBKT7-Dyrk1A JS.60/JS.61 [J.96]). Wachstum und Blaufärbung der Kolonien, d. h. Aktivierung der Reportergene, waren nur nach Kotransformation mit J.73 und J.96 zu beobachten. ∅: leer

In der Summe zeigte sich folgendes Bild: DI1 interagiert sowohl mit der Kinase-Domäne von Dyrk1A alleine als auch mit dem kompletten Protein. Dabei hat die Anwesenheit des *Hexb*-Fragmentes nur einen geringen steigernden Effekt auf die Interaktion mit dem kompletten Protein. Dieser Effekt wurde allerdings nicht systematisch untersucht. Im Falle von DI6 wurde ebenfalls eine Interaktion mit der Kinase-Domäne alleine und dem kompletten Protein gefunden; letztere war geringfügig schwächer. Sowohl DI1 als auch DI6 führten nach Kotransformation mit den Kontrollvektoren, die für ein GAL4-DNA-BD-Lamin C-Hybrid bzw. nur die GAL4-DNA-BD alleine kodieren, nicht zu einer Aktivierung der Reportergene. Dagegen aktivieren DI3 und DI5 die Reportergene sowohl mit als auch ohne Dyrk1A, was darauf hindeutet, daß in diesen beiden Fällen keine spezifische Interaktion mit Dyrk1A stattfindet, sondern eine Aktivierung der Reporter durch das DI3- bzw. DI5-GAL4-AD-Hybrid alleine. Aufgrund der Tatsache, daß DI4 und DI5 Fragmente derselben cDNA beinhalten, wurde davon ausgegangen, daß die für DI5 erzielten Ergebnisse auch für DI4 gelten. So wurden DI3, DI4 und DI5 als falsch positive Klone gewertet und in der Folge von den weiteren Analysen ausgeschlossen, während DI1 und DI6 als positive Interaktoren – zumindest in Hefe-Zellen – bestätigt wurden.

6.3.3 Interaktion von Dyrk1A mit Sept4, Sept5 und Arip4 in Säugerzellen

In einer *Yeast two-hybrid*-Suche gefundene Interaktionen sollten grundsätzlich, um sie zu verifizieren und Aussagen über ihre biologische Relevanz treffen zu können, in verschiedenen, vom Hefe-System möglichst unabhängigen Experimenten weiter untersucht und bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Interaktionen in Säugerzellen mit Hilfe der Koimmunpräzipitation verifiziert werden. Dieses Verfahren eignet sich zum biochemischen Nachweis von physikalischen Protein-Protein-Interaktionen, wobei die Proteine aus Geweben oder Zellen stammen können. In Ermangelung von Antikörpern gegen die Interaktoren DI1/Sept4 und DI6/Arip4 wurde folgendes experimentelles System gewählt: Die Interaktoren und Dyrk1A wurden durch Klonierung ihrer cDNAs in geeignete eukaryotische Expressionsvektoren mit verschiedenen Epitopen fusioniert, die sich mit Antikörpern sowohl präzipitieren als auch in einem *Western Blot* nachweisen lassen. Die erzeugten Konstrukte wurden dann in Zelllinien transfiziert und die überexprimierten Interaktionspartner gefällt und untersucht. Zusätzlich zu den in der *Yeast two-hybrid*-Suche gefundenen Interaktoren Arip4 und Sept4 wurde in diesen Experimenten auch das dem Sept4 nahe verwandte Septin 5 (Sept5/Pnutl1/CDCrel-1) untersucht. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der beiden Proteine – die Aminosäuresequenzen sind zu 59 % identisch – wurde hier postuliert, daß nicht nur Sept4, sondern auch Sept5 mit Dyrk1A interagiert. In der in DI1

als Fusion mit GAL4-AD synthetisierten Variante Sept4_v7 sind 51 % der Aminosäuren zu Sept5 identisch, 55 % ähnlich.

6.3.3.1 Klonierung von *Dyrk1A*, *Sept4*, *Sept5* und *Arip4* in eukaryotische FLAG- und EGFP-Fusions-Expressionsvektoren

Für erste Experimente in Säugerzellen wurden die Insertionen der Bibliotheksplasmide aus DI1 und DI6 in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-Tag2 (Stratagene) transferiert. Dieser Vektor kodiert für ein FLAG-Peptid, welches mit dem N-Terminus eines Proteins, dessen cDNA in den Vektor kloniert wurde, fusioniert wird. Das FLAG-Peptid (Hopp *et al.*, 1988) läßt sich mit spezifischen Antikörpern nachweisen. Die hergestellten Konstrukte J.99 (pCMV-Tag2C-DI1) und J.102 (pCMV-Tag2B-DI6) kodieren für die Fusionsproteine FLAG-Sept4_v7 bzw. FLAG-Arip4¹⁰⁷⁸⁻¹⁴⁶⁶. Allerdings wurden diese Proteine offenbar nicht synthetisiert, denn sie konnten im *Western Blot* nicht nachgewiesen werden, obwohl dies bei einer Kontrolle (pcDNA3-FLAG-PSD-95¹⁴) möglich war. Die Ursache hierfür wurde nicht näher untersucht, statt dessen wurden die gesamten proteinkodierenden cDNAs von *Sept4_v1* und *Arip4* in die Vektoren pCMV-Tag2 (s. o.) und pEGFP-C2 (kodiert für eine N-terminale Fusion mit EGFP) kloniert (s. Tabelle 6-9). Die *Sept4*-cDNA wurden unter Verwendung der Insertion des Bibliotheksklons DI1 (im Vektor pBluescript® II KS; Klon J.103) sowie eines gekauften *IMAGE*-Klons (*IMAGE*-Klon 4166731; s. Abbildung 6-20) und eines RT-PCR-Produktes (Primer JS.95/JS.96; s. Abbildung 6-20) aus dem Gehirn der Maus kloniert. Die vollständige *Sept4_v1*-cDNA wurde anschließend in die Vektoren pEGFP-C2 (J.129; s. Abbildung 9-3) und pCMV-Tag2 (J.132; s. Abbildung 9-4) transferiert. Zur Klonierung von *Arip4* siehe Abbildung 6-23. Auch die *Dyrk1A*-cDNA (*GenBank* U58497.1) wurde in die Vektoren pEGFP-C2 (J.98; s. Abbildung 9-3) und pCMV-Tag2 (J.131; s. Abbildung 9-4) kloniert. Die Korrektheit der klonierten Expressionskonstrukte wurde durch vollständige Sequenzierung der Insertionen bestätigt.

Die vollständige kodierende Sequenz von *Sept5* war zum damaligen Zeitpunkt nicht bekannt, deshalb wurde sie auf folgende Weise erstmalig kloniert: Dem bekannten und publizierten Teil (*GenBank* AF033350) fehlte der 5'-terminale Bereich, der für die mRNAs von Ratte und Mensch bekannt war. In einer Datenbanksuche wurde ein Maus-EST gefunden, der zum äußersten 5'-Terminus der Ratten-mRNA eine hohe Ähnlichkeit hatte. So wurden, um die vollständige Maus-cDNA zu amplifizieren, die beiden folgenden Primer eingesetzt: einer (JS.93) in diesem EST und der zweite (JS.81) in der 3'-nichtkodierenden Region der bekannten und bereits klonierten cDNA (s. Abbildung 6-22). So konnte die

¹⁴ PSD-95: Postsynaptic density protein of 95 kDa

gesamte cDNA in einer RT-PCR mit *Pfu Turbo* (Stratagene), einer Polymerase mit Korrekturleseaktivität, aus dem Gehirn der Maus amplifiziert und in den Vektor pCR[®]II-TOPO kloniert werden. Das so generierte Plasmid J.117 beinhaltet die komplette proteinkodierende cDNA und weist ein offenes Leseraster auf, das sich vom Anfang des EST bis zum 3'-terminalen Ende der bereits publizierten mRNA erstreckt. Dieses kodiert für ein Protein, das in seiner Größe dem Sept5 der Ratte (Toda *et al.*, 2000) entspricht und zum Sept4 der Maus eine hohe Ähnlichkeit aufweist (59 % identische, 65 % ähnliche Aminosäuren; schematische Darstellung s. Abbildung 6-22, Sequenz s. Abschnitt 9.2.2).

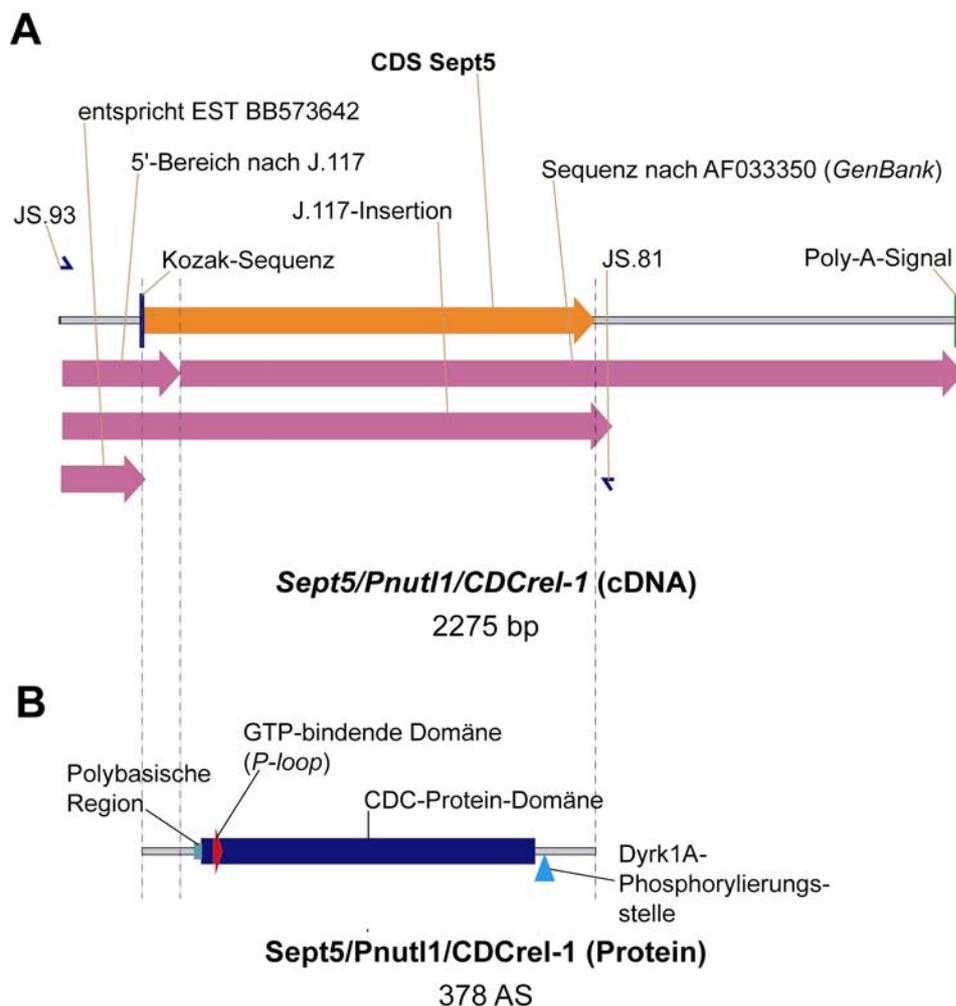


Abbildung 6-22: Die Sept5-cDNA und das entsprechende Protein

Schematische Darstellung der in dieser Arbeit erstmalig klonierten gesamten proteinkodierenden Sequenz der *Sept5*-cDNA (A) mit den zur Klonierung von pCR[®]II-TOPO-Sept5 (J.117) verwendeten Primern und den vorher bekannten Sequenzen. Ein Teil der cDNA, dem allerdings das 5'-Ende fehlt, war bereits publiziert (*GenBank* AF033350). Gezeigt ist außerdem das abgeleitete Protein (B) mit den für die Septine typischen Domänen und einer wahrscheinlichen Dyrk1A-Phosphorylierungsstelle (s. auch Tabelle 7-1), die in dieser Arbeit anhand der von Himpel *et al.* (Himpel *et al.*, 2000) vorgeschlagenen Dyrk1A-Substrat-Konsensussequenz identifiziert wurde.

Wie auch Sept4 zeichnet sich Sept5 durch eine GTP-bindende Domäne und eine für die Septine typische CDC-Protein-Domäne aus. Weiterhin konnte in der abgeleiteten Sept5-

Proteinsequenz eine mögliche Dyrk1A-Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Die *Sept5*-cDNA wurde ebenfalls in die Vektoren pEGFP-C2 (s. Abbildung 9-3) und pCMV-Tag2 (s. Abbildung 9-4) kloniert, um Sept5 mit EGFP bzw. dem FLAG-Peptid zu fusionieren (s. Tabelle 6-9).

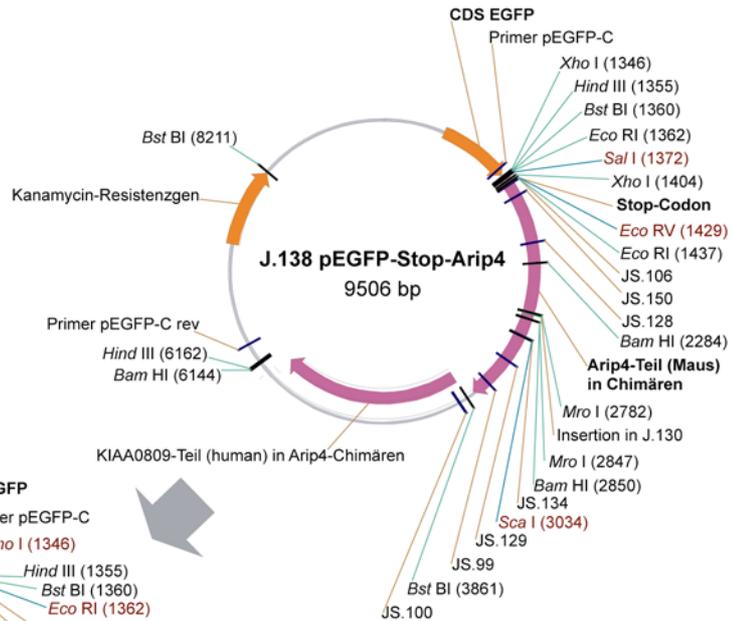
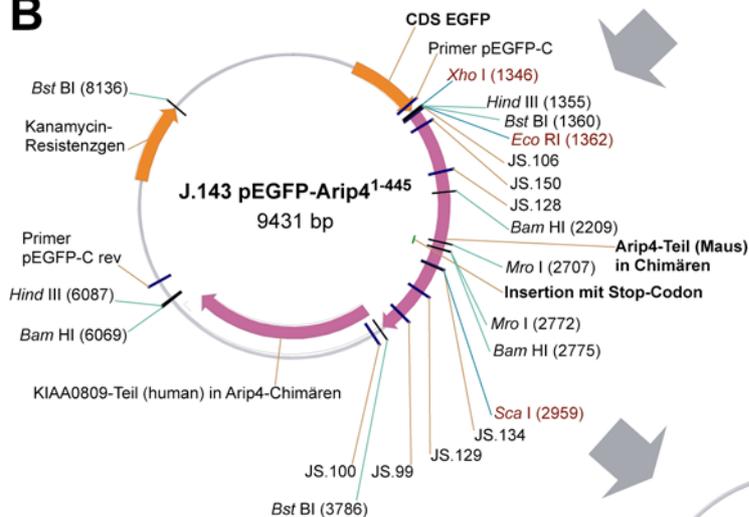
Protein / Peptid	Referenz	ohne Fusion		Fusion mit					
				FLAG-Peptid		EGFP		ECFP	EYFP
		Klon	M _{kDa}	Klon	M _{kDa}	Klon	M _{kDa}	Klon	Klon
FLAG	Hopp <i>et al.</i> , 1988	pCMV-Tag2	4,6	-	-	-	-	-	-
EGFP	AAB08058	pEGFP-C2	29,9	-	-	-	-	-	-
Dyrk1A	Q61214	J.82 ⁴	85,5	J.131	88,4	J.98 ⁵	113,4	J.152	J.153
Sept4_v1	NP_035259.1	J.128 ⁴	54,9	J.132 ⁵	57,5	J.129	84	-	-
Sept5	diese Arbeit ¹	J.117 ⁴	43,9	J.133	48,3	J.151	73,3	-	-
Arip4 / KIAA0809 ²	NP_109655 / BAA34529	-	162,5	J.150	165,2	J.149	191,3	J.154	J.155
PSD-95	NP_031890	-	80,5	pcDNA3-PSD-95-flag ³	81,5	-	-	-	-

Tabelle 6-9: Verwendete Expressionskonstrukte für Immunpräzipitationen und Fluoreszenzmikroskopie

Zusammenstellung der hier verwendeten Expressionskonstrukte von Dyrk1A, Sept4, Sept5, Arip4, und PSD-95; angegeben sind die translatierten Proteine mit Namen, Referenz und Molekulargewicht sowie die Nummer des entsprechenden Klons. ¹ Die vollständige proteinkodierende cDNA von *Sept5* der Maus wurde im Verlaufe dieser Arbeit erstmalig kloniert (s. o.). ² Das hier verwendete Arip4-Konstrukt kodiert für ein chimäres Protein, siehe auch Abbildung 6-23. ³ Dieses Konstrukt wurde von M. Engholm (MPI f. Psychiatrie, München) zur Verfügung gestellt. ⁴ keine Expressionskonstrukte; ⁵ Karten dieser Konstrukte siehe Abschnitt 9.1; -: nicht generiert

A

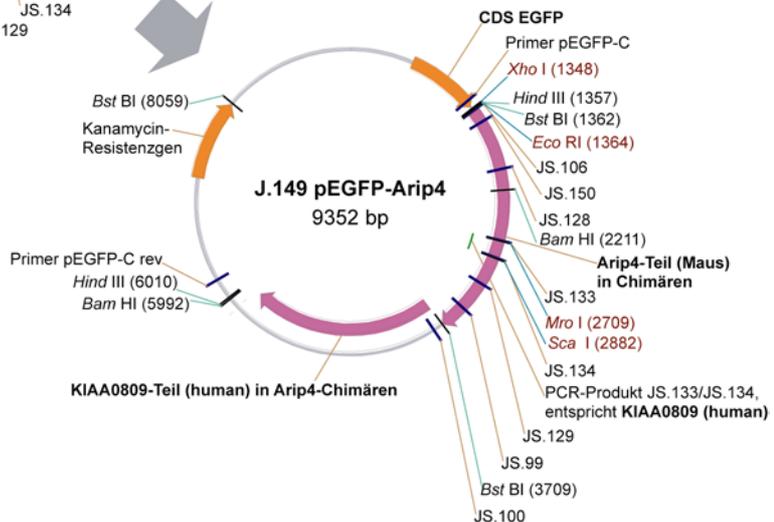
Klonierung von RT-PCR-Produkt Arip4-JS.106/JS.100 (Maus) und KIAA0809-IMAGE-Klon 3138844 (human) in den Vektor pEGFP-C2

**B**

Eco RI-Verdau zur Entfernung eines Stop-Codons zwischen EGFP- und Arip4-cDNA und Religation

C

Entfernung der Insertion aus dem RT-PCR-Produkt JS.100/JS.106 durch Subklonierung des PCR-Produktes KIAA0809 JS.133/JS.134 (human)

**Abbildung 6-23: Klonierung der vollständigen Arip4-cDNA in den Vektor pEGFP-C2**

Der Klon J.138 (A) wurde in Zusammenarbeit mit K. Baumgärtel kloniert. Die entsprechenden Schritte sind an anderer Stelle (Baumgärtel, 2002) näher dargestellt. J.138 weist ein Stop-Codon zwischen den kodierenden Sequenzen (CDS) von EGFP und Arip4 auf. Dieses wurde bei der Generierung von Klon J.143 entfernt. Außerdem kommt in J.138 – wie auch in J.143 – ein Bereich vor, der weitere Stop-Codons enthält (*Insertion mit Stop-Codon* in B) und aus einer mRNA stammt, die in der RT-PCR eines Teils der Arip4-mRNA mit JS.106/JS.100 amplifiziert wurde. Ob es sich hierbei um ein Intron oder ein alternatives Exon handelt, konnte nicht definitiv geklärt werden. Dieser Bereich wurde aus J.143 durch die Insertion eines neuen PCR-Produktes entfernt (C; Primer JS.133/JS.134, Matrize J.127 [s. Abbildung 6-20]) zwischen den Schnittstellen von Mro I (Position 2707 in J.143) und Sca I (2959). Der resultierende Klon J.149 kodiert für ein Fusionsprotein von EGFP und dem vollständigen Arip4 (Chimäre aus dem Arip4 der Maus [Rouleau *et al.*, 2002] und dem humanen Arip4-Orthologen KIAA0809 [Nagase *et al.*, 1998]; s. auch Tabelle 6-9).

6.3.3.2 Koimmunpräzipitation zum Nachweis der Interaktion zwischen Dyrk1A und Sept4, Sept5 sowie Arip4

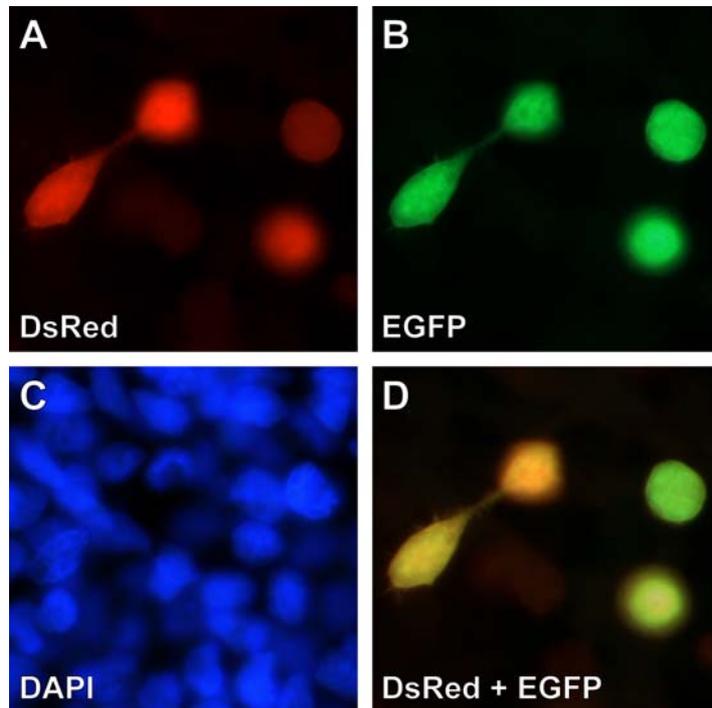


Abbildung 6-24: Ko-transfektion von HEK293-Zellen per Elektroporation

Gezeigt sind mit pDsRed2-C1 und pEGFP-C2 kotransfizierte HEK-Zellen (A bis D stellen denselben Ausschnitt dar), analysiert unter geeigneten Einstellungen für Anregung und Detektion des angegebenen Fluorochroms: in A DsRed, in B EGFP. Zur Identifizierung aller Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt (C). In D ist ein durch Überlagerung von A und B erzeugtes Bild gezeigt, auf dem die Ko-transfektion der gelblich erscheinenden Zellen mit pDsRed2-C1 und pEGFP-C2 deutlich wird. Es wurde ein Bereich mit einem geringen Anteil an transfizierten Zellen ausgewählt, um einzelne Zellen besser darstellen zu können.

Zur Koimmunpräzipitation wurden HEK293-Zellen mit den Expressionsplasmiden transfiziert, und zwar per Elektroporation oder unter Einsatz der Calciumphosphat-Methode. Es wurden dabei FLAG-fusioniertes Dyrk1A und EGFP-fusionierter Dyrk1A-Interaktor eingesetzt und umgekehrt. Die eingesetzten Konstrukte sind in Tabelle 6-9 aufgelistet. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Abschätzung des Anteils der Zellen ermittelt, die nach Transfektion mit einem EGFP-Konstrukt eine entsprechende Fluoreszenz zeigen. Die Effizienz lag bei den hier dokumentierten Experimenten zwischen 50 % (Elektroporation) und 90 % (Calciumphosphat-vermittelte Transfektion). Zum Beweis der Ko-transfektion durch Elektroporation wurde eine parallele Transfektion von Plasmiden zur Expression von DsRed und EGFP durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die transfizierten Zellen beide fluoreszierenden Proteine synthetisieren, also mit beiden Plasmiden kotransfiziert sind. 16 bis 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat zur Immunpräzipitation mit an Agarose gebundenem anti-FLAG-Antikörper eingesetzt. Kopräzipitierte Proteine wurden im *Western Blot* mit einem anti-GFP-Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle der Expression und der Lyse wurde ein kleines Aliquot (ca. 2,5 %) der unbehandelten Lysate in einem *Western Blot* mit anti-FLAG- und anti-GFP-Antikörpern untersucht sowie zur zusätzlichen Kontrolle der Präzipitation auch die präzipitierten FLAG-Fusionsproteine mit einem anti-FLAG-Antikörper. Repräsentative Ergebnisse der Immunpräzipitationen sind in den Abbildungen 6-25 und 6-26 dargestellt: Das in Abbildung 6-25 gezeigte Experiment beweist die Interaktion von FLAG-Dyrk1A und

EGFP-Sept4 sowie die von Dyrk1A und Arip4 (in den Kombinationen EGFP-Dyrk1A / FLAG-Arip4 und FLAG-Dyrk1A / EGFP-Arip4). Mit dem in Abbildung 6-26 dargestellten Experiment konnte die Interaktion von EGFP-Dyrk1A mit FLAG-Sept4, FLAG-Sept5 und FLAG-Arip4 nachgewiesen werden. Auch das FLAG-fusionierte PSD-95, welches als Kontrolle für die Expression der Fusionen und deren Detektion im *Western Blot* eingesetzt wurde, scheint in gewissem Maße mit Dyrk1A in einem Komplex vorzuliegen.

Die Resultate der Koimmunpräzipitationen untermauern, daß die in der *Yeast two-hybrid*-Suche gefundenen Dyrk1A-Interaktionspartner Sept4 (DI1) und Arip4 (DI6) echte Interaktoren sind, da sie sich zusammen mit Dyrk1A aus den Lysaten von transfizierten Säuger-Zelllinien präzipitieren lassen.

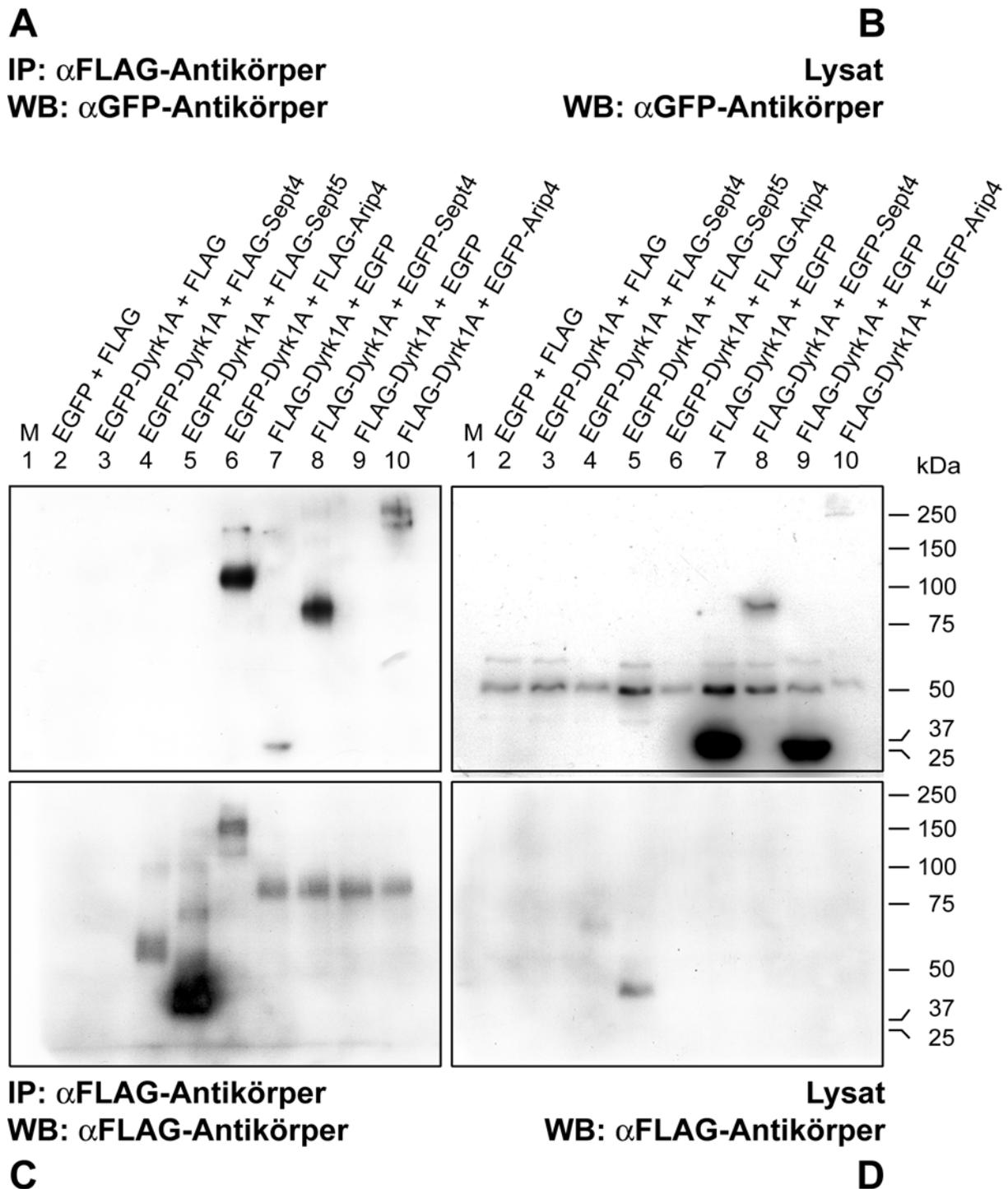


Abbildung 6-25: Koimmunpräzipitation von Dyrk1A, Sept4 und Arip4 nach Kotransfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit Konstrukten, die für die angegebenen Proteine kodieren, kotransfiziert. Nach ca. 16 h wurden die Zellen lysiert und die Proteinkomplexe mit einem anti-FLAG-Antikörper (M2, Sigma) präzipitiert. Unbehandeltes Lysat (ca. 2,5 %; B und D) und Immunpräzipitat (IP; A und C) wurden einem *Western Blot* (WB) unterzogen, um EGFP- (A und B) bzw. FLAG-Fusionsproteine (C und D) nachzuweisen. Die Anwesenheit von EGFP-Dyrk1A nach Präzipitation von FLAG-Arip4 (A, Spur 6) sowie die von EGFP-Arip4 nach Präzipitation von FLAG-Dyrk1A (A 10) zeigt die Interaktion von Dyrk1A und Arip4; ebenso wie die Präsenz von EGFP-Sept4 (A, Spur 8) im Immunpräzipitat mit FLAG-Dyrk1A die Interaktion von Dyrk1A und Sept4 zeigt. Zu den eingesetzten Plasmiden und Molekulargewichten der Proteine siehe Tabelle 6-9.

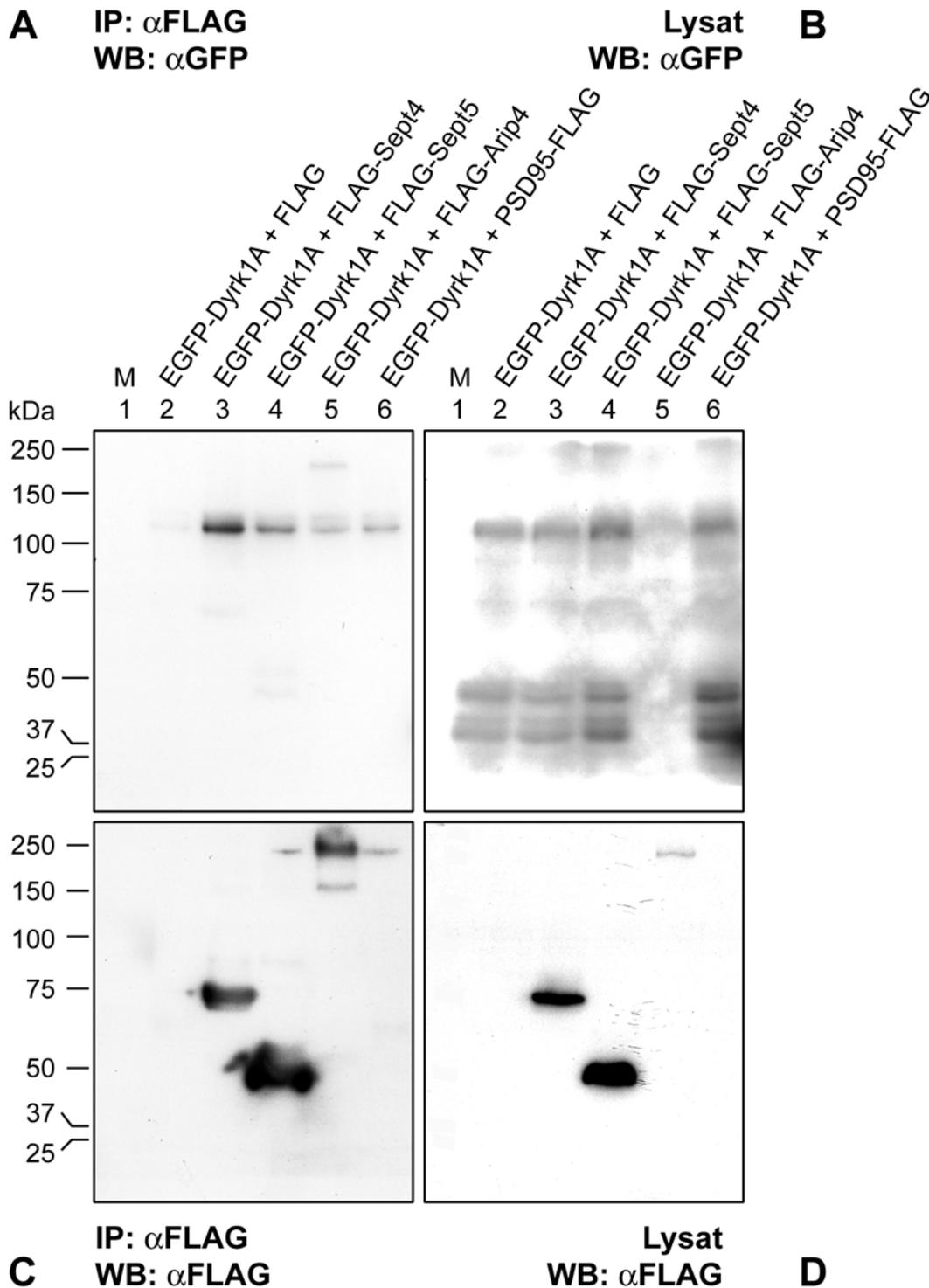


Abbildung 6-26: Koimmunpräzipitation von Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 nach Kotransfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit Konstrukten, die für die angegebenen Proteine kodieren, mit der Calciumphosphat-Methode kotransfiziert. Nach ca. 16 h wurden die Zellen lysiert und die Proteinkomplexe mit einem anti-FLAG-Antikörper (M2, Sigma) präzipitiert. Unbehandeltes Lysat (ca. 2,5 %; B und D) und Immunpräzipitat (IP; A und C) wurden einem *Western Blot* (WB) unterzogen, um EGFP- (A und B) bzw. FLAG-Fusionsproteine (C und D) nachzuweisen. Die Anwesenheit von EGFP-Dyrk1A nach Präzipitation der FLAG-Fusionsproteine (A, Spuren 3-5) beweist die Interaktion von Dyrk1A mit Sept4, Sept5 und Arip4. Auch PSD-95 scheint in geringem Maße mit Dyrk1A zu interagieren (A 6). Zu beachten ist die offenbar geringere Menge an Zellen und/oder Protein in Spur 5 (s. B 5). Zu den eingesetzten Plasmiden und Molekulargewichten der Proteine siehe Tabelle 6-9.

6.3.4 Vergleichende Analyse der Expression von *Dyrk1A*, *Sept4* und *Arip4* im Gehirn der Maus¹⁵

Um Aussagen über die physiologische Relevanz einer in einer *Yeast two-hybrid*-Suche gefundenen Protein-Protein-Interaktion treffen zu können, ist es notwendig, die Expressionsmuster der jeweiligen Gene zu kennen. Nur wenn die Gene zweier Interaktoren in einer Zelle koexprimiert und die Proteine kolokalisiert sind, kann die Interaktion als physiologisch relevant angesehen werden. Während über *Dyrk1A* (s. 6.1) und *Sept4* (Kinoshita *et al.*, 2000) in dieser Hinsicht wenige Daten erhältlich waren, sind über *Arip4* auf zellulärer Ebene keine Expressions- oder Lokalisationsdaten publiziert. Die Daten über die Expression von *Arip4* beschränken sich auf den Nachweis der *Arip4*-mRNA im Gesamthirn-Homogenat von Maus und Ratte mittels *Northern Blot*-Hybridisierung (Rouleau *et al.*, 2002).

Die Expression von *Dyrk1A*, *Sept4* und *Arip4* wurde im Rahmen dieses Projektes mittels radioaktiver *in situ*-Hybridisierung an coronalen Gefrierschnitten von Gehirnen adulter Mäuse (C57BL/6N) untersucht. Dabei wurden jeweils aufeinanderfolgende Schnitte für *Dyrk1A* und *Sept4* bzw. *Arip4* verwendet, so daß die Expressionsmuster von *Dyrk1A* und dem jeweiligen Interaktor in möglichst ähnlichen Ebenen miteinander verglichen werden konnten. Während in den Experimenten alle Hirnregionen untersucht wurden, wird die Expression an dieser Stelle nur für einige ausgewählte Regionen exemplarisch beschrieben.

Es wurden für die *in situ*-Hybridisierungen folgende Sonden eingesetzt: Für *Dyrk1A* wurde die Sonde JS.9/JS.10 verwendet (s. Abbildung 6-1), ein in einer RT-PCR amplifiziertes und in den Vektor pBluescript® II KS kloniertes Fragment (Klon J.9, s. auch 6.3.2.1). Dieses Fragment besteht im Wesentlichen aus der für den C-Terminus kodierenden Region, in der keine nennenswerten Ähnlichkeiten zu anderen Genen bestehen. Für *Sept4* und *Arip4* wurden die Insertionen der Bibliotheksplasmide aus der *Yeast two-hybrid*-Suche in den Vektor pBluescript® II KS kloniert (Klone J.103 bzw. J.104, s. Tabelle 4-1). Die *Sept4*-Sonde (JS.103-Insertion) enthält zwar *Sept4_v7*-spezifische Bereiche, sollte aber aufgrund des ebenfalls enthaltenen 603 bp langen Bereiches, der in der *Sept4_v1*-cDNA und größtenteils auch in den weiteren Varianten vorkommt, auch die mRNAs dieser Varianten markieren.

¹⁵ Die *in situ*-Hybridisierungs-Experimente wurden teilweise von K. Baumgärtel im Rahmen einer Diplomarbeit (Baumgärtel, 2002) an der Ludwig-Maximilians-Universität München unter meiner Anleitung durchgeführt.

6.3.4.1 Expression von *Dyrk1A* und *Sept4* im Gehirn der Maus

Die bisher publizierten Daten zur Expression von *Dyrk1A* und *Sept4* lassen keine Koexpression dieser beiden Gene vermuten: Rahmani *et al.* zeigten die Expression von *Dyrk1A* – immunhistochemisch auf Proteinebene nachgewiesen – vornehmlich in Neuronen verschiedener Gehirnareale (Rahmani *et al.*, 1998), Kinoshita *et al.* beschrieben eine *Sept4*-Immunreaktivität in Astrocyten (Kinoshita *et al.*, 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen von *Dyrk1A* und *Sept4* zeigten, teils in Übereinstimmung, teils im Widerspruch dazu, folgende Ergebnisse (s. Abbildung 6-27): Im cerebellären Cortex wurden beide Gene weitverbreitet exprimiert gefunden, sie ließen sich in allen Schichten nachweisen (Abbildung 6-27 I bis L): Die Körnerzellen des Stratum granulosum wiesen sowohl für *Dyrk1A* als auch für *Sept4* Signale mittlerer Intensität auf. In den Purkinje-Zellen dagegen waren starke *Dyrk1A*-Signale und *Sept4*-Signale mittlerer Intensität anzutreffen. Die Größe der Purkinje-Zellen ließ es zu, eine Zelle auf zwei benachbarten Schnitten zu betrachten. So konnte festgestellt werden, daß hier beide Gene, *Dyrk1A* und *Sept4*, innerhalb derselben Zellen exprimiert werden. *Sept4* wird besonders stark im inneren Drittel des Stratum moleculare, direkt angrenzend an die Purkinje-Zellschicht, exprimiert; wahrscheinlich werden diese Signale durch die hier vorkommenden Korbzellen hervorgerufen. *Dyrk1A* ist hier nur mit mittlerer Intensität nachzuweisen, ebenso wie beide Gene im äußeren Bereich der Molekularschicht, wo die Sternzellen liegen.

In der Hippocampusformation (Abbildung 6-27 A bis H) sind *Dyrk1A* und *Sept4* ebenfalls weitverbreitet exprimiert. In den hippocampalen Pyramidenzellen der Regionen CA1 bis CA3 und im Hilus wird *Dyrk1A* in nahezu allen Zellen stark exprimiert, *Sept4* dagegen nur schwach. Dabei wird auch *Sept4* in einer überaus großen Mehrzahl der Zellen exprimiert, so daß hier mit Sicherheit eine Koexpression mit *Dyrk1A* vorliegt. In den weiteren Schichten des Cornu Ammonis, nämlich in Stratum oriens, im Stratum radiatum und im Stratum lacunosum-moleculare, finden sich im Falle von *Dyrk1A* und *Sept4* einzelne positive Zellen, wobei nicht eindeutig festzustellen war, ob es sich jeweils um dieselben Zellen handelt. Lage und Morphologie dieser Zellen ließen darauf schließen, daß sie Interneurone darstellen. Einzelne *Sept4*-exprimierende Zellen wurden auch im Stratum moleculare des Gyrus dentatus und in dessen subgranulärer Zellschicht sowie im Stratum multiforme (im Hilus) gefunden. Einzelne anhand ihrer Morphologie identifizierte Astrocyten im Hilus zeigten keine *Sept4*-Expression. *Dyrk1A* wird im Stratum moleculare des Gyrus dentatus nicht exprimiert, dagegen wurde eine starke Expression in den Körnerzellen des Stratum granulosum gefunden. *Sept4* wird hier nicht exprimiert.

In den neocorticalen Arealen des Cortex cerebri (Abbildung 6-27 M bis T) wurde ebenfalls ein uneinheitliches Bild für die Expression von *Dyrk1A* und *Sept4* gefunden:

Dyrk1A wird in allen Schichten von nahezu allen Zellen exprimiert, dabei waren in Lamina II starke, in allen anderen Laminae mittelstarke Signale zu beobachten. Von *Sept4* dagegen waren in den Laminae I bis IV sowie in Lamina VI nur in ungefähr einem Drittel der Zellen Signale schwacher bis mittlerer Intensität zu detektieren. In Lamina V wurden in einer Mehrzahl der Zellen Signale mittlerer Intensität beobachtet. Bei diesen Zellen handelt es sich aufgrund ihrer Größe und Lage wahrscheinlich um Pyramidenzellen. Wegen des hohen Anteils der *Dyrk1A*-exprimierenden Zellen im Neocortex erscheint sicher, daß die meisten *Sept4*-exprimierenden Zellen hier beide Gene koexprimieren.

Beide Gene, *Dyrk1A* und *Sept4*, werden nicht nur in Neuronen, sondern offenbar auch in Gliazellen exprimiert, wie die Betrachtung von Oligodendrocyten des Corpus callosum zeigte. Hier wird *Dyrk1A* eher schwach, *Sept4* dagegen stark exprimiert (Resultate nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, daß *Sept4* keineswegs nur in Astrocyten exprimiert wird, sondern auch in einer Reihe von Neuronen unterschiedlicher Populationen und in Oligodendrocyten. Die Expressionsmuster von *Sept4* und *Dyrk1A* in den hier näher betrachteten Gehirnregionen Cerebellum, Hippocampusformation und Neocortex sind zwar nicht identisch, sie überlappen aber deutlich. Zumindest im Falle der cerebellären Purkinje-Zellen konnte eine Koexpression von *Sept4* und *Dyrk1A* auch innerhalb derselben Zellen nachgewiesen werden.

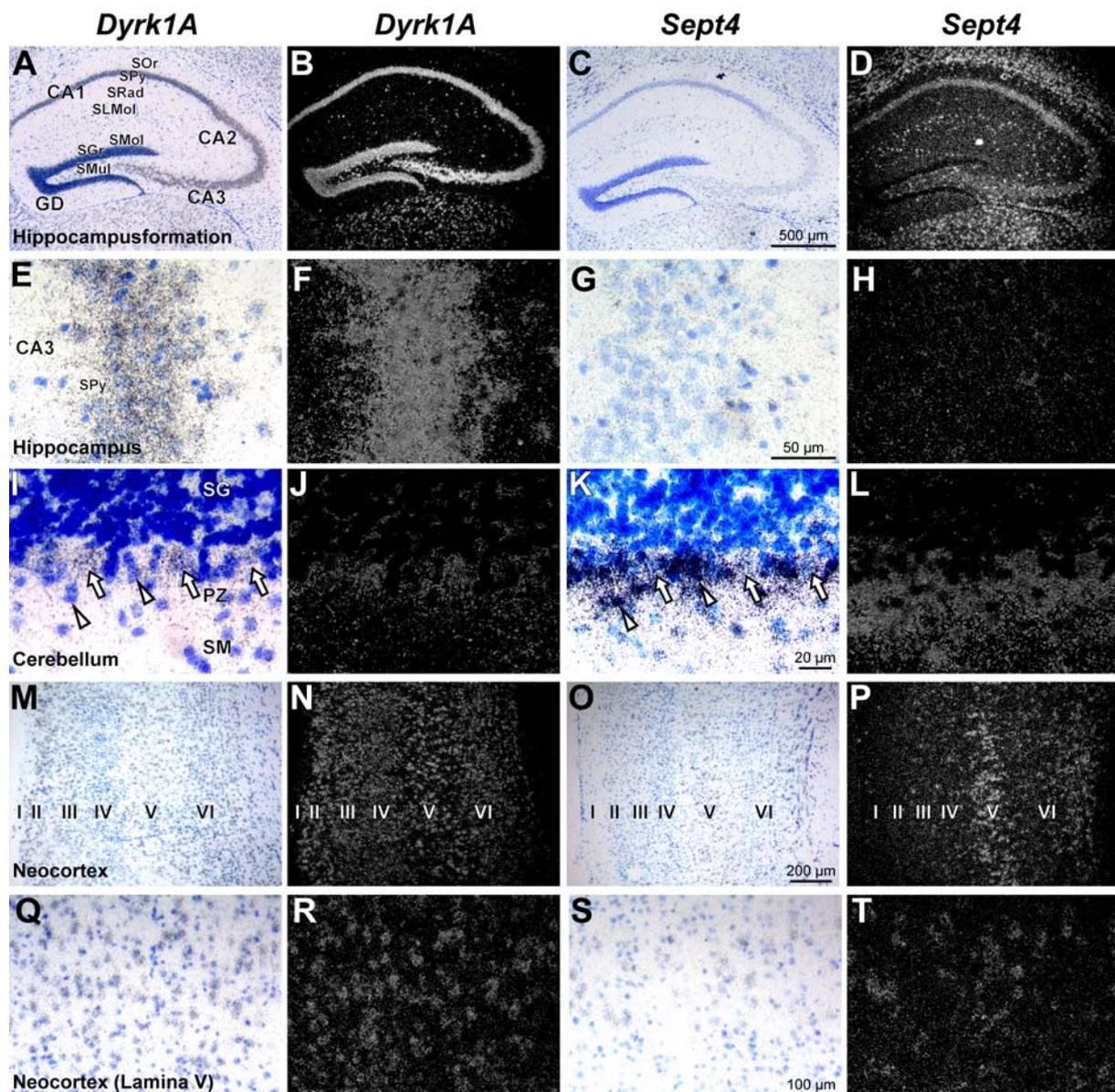


Abbildung 6-27: Expression von *Dyrk1A* und *Sept4* in ausgewählten Gehirnregionen

Dargestellt sind einige ausgewählte Gehirnregionen, in denen mittels *in situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Ribonukleotidsonden die mRNAs von *Dyrk1A* und *Sept4* detektiert werden konnten. Alle Ausschnitte wurden jeweils im Hell- und im Dunkelfeld photographiert. *Dyrk1A*- und *Sept4*-Expression wurden an aufeinanderfolgenden Schnitten untersucht. A bis D: Hippocampus und Gyrus dentatus (Hippocampusformation); E bis H: hippocampale Region CA3; I bis L: cerebellärer Cortex; M bis P: Neocortex; Q bis T: Neocortex, Lamina V. In allen gezeigten Arealen wurde eine zumindest teilweise Koexpression beider Gene gefunden. Am Vergleich der Purkinje-Zellen in I und K (Pfeile) wird deutlich, daß *Dyrk1A* und *Sept4* innerhalb derselben Zellen exprimiert sind, wenn auch die *Sept4*-Signale in den Korbzellen (Pfeilspitzen) hier deutlich stärker sind. Zellkerne wurden mit Toluidinblau angefärbt. Die Größenstandards in C, G, K, O und S gelten jeweils für die ganze Zeile. CA1-CA3: Regionen des Cornu Ammonis; GD: Gyrus dentatus; SOr: Stratum oriens; SPy: Stratum pyramidale; SRad: Stratum radiatum; SLMol: Stratum lacunosum-moleculare; SMol: Stratum moleculare; SGr: Stratum granulosum; SMul: Stratum multiforme; SG: Stratum granulosum; PZ: Purkinje-Zellschicht (Stratum ganglionare); SM: Stratum moleculare; I-VI: Laminae des Neocortex

6.3.4.2 Expression von *Dyrk1A* und *Arip4* im Gehirn der Maus

Die Expression von *Dyrk1A* und von *Arip4* wurde an Folgeschnitten derselben Gehirne untersucht, um die Expressionsmuster der beiden Gene miteinander vergleichen zu können. Dargestellt werden hier nur einige ausgewählte Regionen, in denen eine Koexpression gefunden wurde (s. Abbildung 6-28). In der Regel waren die Signale von *Arip4* deutlich schwächer als die von *Dyrk1A*.

Sowohl *Dyrk1A* als auch *Arip4* sind in verschiedenen Gebieten der Hippocampusformation (Abbildung 6-28 A bis H) exprimiert; so waren beide mRNAs in den weitaus meisten Pyramidenzellen in der Region CA3 zu finden (Abbildung 6-28 E bis H), so daß hier mit Sicherheit eine Koexpression vorliegt. In beiden Fällen findet man auch über einigen Interneuronen im Stratum radiatum und im Stratum laconosum-moleculare Signale (Abbildung 6-28 A bis D), wobei allerdings nicht eindeutig festzustellen war, ob es sich dabei um dieselben Zellen handelt. Auch im cerebellären Cortex (Abbildung 6-28 I bis L) wurde eine Koexpression in verschiedenen Schichten gefunden: in den Körnerzellen des Stratum granulosum, in den Purkinje-Zellen und in Zellen des Stratum moleculare, deren Identität nicht sicher geklärt wurde. Wahrscheinlich handelt es sich hier aber zumindest teilweise um Korb- und Sternzellen. Die Signale von *Arip4* im Stratum moleculare waren allerdings nur von sehr geringer Intensität. In den Bereichen des Cortex cerebri wurden sowohl *Dyrk1A* als auch *Arip4* weitverbreitet exprimiert gefunden: beide in einem großen Anteil der Neurone der verschiedenen Schichten des Neocortex (Abbildung 6-28 M bis T) und des piriformen Cortex (nicht gezeigt). Wie für die bisher beschriebenen Areale gilt auch hier, daß in der Regel keine eindeutige Zuordnung der Signale von *Dyrk1A* und *Arip4* zu denselben Zellen vorgenommen werden konnte. Allerdings sind beide in einem so hohen Anteil der Neurone in einem Areal wie z. B. dem Neocortex exprimiert, daß zumindest von einer deutlichen Überlappung der Expression ausgegangen werden kann.

Die hier beschriebenen Experimente zeigen die Koexpression von *Dyrk1A* und *Arip4* – auf mRNA-Ebene untersucht – in verschiedenen Gehirnregionen, unter anderem in den für kognitive Funktionen wichtigen Gehirnregionen Hippocampusformation und Neocortex.

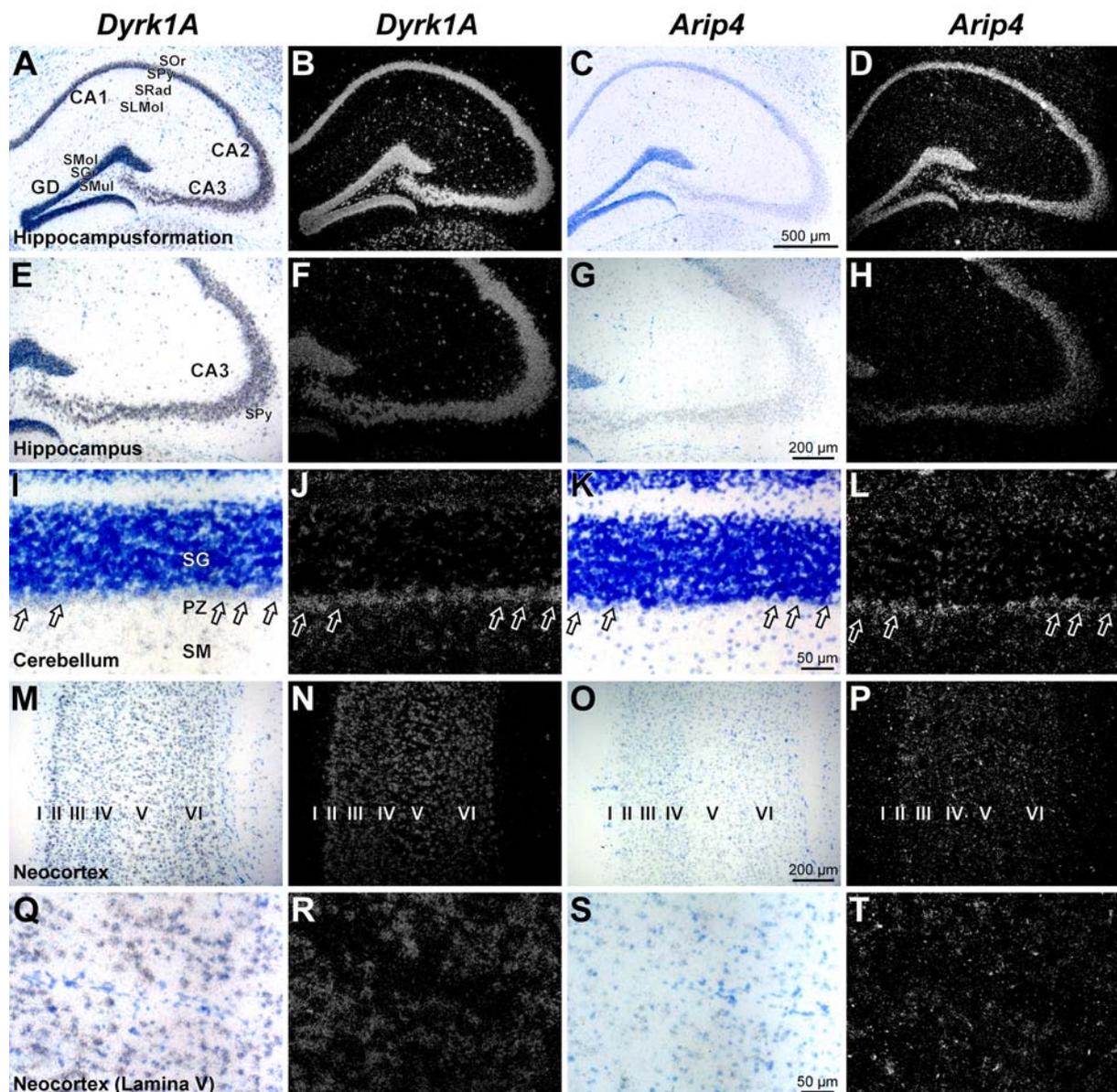


Abbildung 6-28: Expression von *Dyrk1A* und *Arip4* in ausgewählten Gehirnregionen

Darstellung einiger ausgewählter Gehirnregionen, in denen mittels *in situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Ribonukleotidsonden die mRNAs von *Dyrk1A* und *Arip4* detektiert werden konnten. Alle Ausschnitte wurden jeweils im Hell- und im Dunkelfeld photographiert. *Dyrk1A*- und *Arip4*-Expression wurden an aufeinanderfolgenden Schnitten untersucht. A bis D: Hippocampus und Gyrus dentatus (Hippocampusformation); E bis H: hippocampales Feld CA3; I bis L: cerebellärer Cortex; M bis P: Neocortex; Q bis T: Neocortex, Lamina V. In allen gezeigten Arealen wurde eine weitgehende Koexpression beider Gene gefunden. *Dyrk1A* und *Arip4* sind im Hippocampus (A bis H) in der Mehrzahl der Pyramidenzellen (Stratum pyramidale, SPy) exprimiert, ebenso in den Körnerzellen des Gyrus dentatus (SGr, Stratum granulosum). Eine Koexpression beider Gene innerhalb derselben Zellen lässt sich in den cerebellären Purkinje-Zellen (Pfeile in I bis L) feststellen. Im Neocortex sind *Dyrk1A* und *Arip4* weitverbreitet in allen sechs Laminae (I-VI) in einem großen Anteil der Zellen exprimiert. Zellkerne wurden mit Toluidinblau angefärbt. Die Größenstandards in C, G, K, O und S gelten jeweils für die ganze Zeile. CA1-CA3: Regionen des Cornu Ammonis; GD: Gyrus dentatus; SOr: Stratum oriens; SPy: Stratum pyramidale; SRad: Stratum radiatum; SLMol: Stratum lacunosum-moleculare; SMol: Stratum moleculare; SGr: Stratum granulosum; SMul: Stratum multiforme; SG: Stratum granulosum; PZ: Purkinje-Zellschicht (Stratum ganglionare); SM: Stratum moleculare; I-VI: Laminae des Neocortex

6.3.5 Vergleichende Analyse der Lokalisation von Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 in transfizierten Säugerzellen

Im Falle einer physiologisch relevanten Interaktion zwischen Dyrk1A und den gefundenen Interaktoren aus der *Yeast two-hybrid*-Suche sollten die Proteine nicht nur physikalisch interagieren und die Gene koexprimiert sein, sondern die Proteine müssen auch an demselben Ort innerhalb einer Zelle nachweisbar sein. Dies muß nicht notwendigerweise zu jedem Zeitpunkt und in jeder Zelle der Fall sein, sondern kann von äußeren Bedingungen und vom Zelltyp abhängen.

Der naheliegendste und auch aussagekräftigste Ansatz zur vergleichenden Untersuchung der Lokalisation der Proteine wäre der parallele Nachweis der endogenen Proteine Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 mit unterschiedlich markierten Antikörpern in einer Immunfluoreszenz. Dies war allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da für Arip4 und für die Septine Sept4 und -5 keine kommerziell erhältlichen Antikörper existieren. Für Dyrk1A werden Antikörper von verschiedenen Firmen angeboten, allerdings gelang es in einer Reihe von Experimenten mit unterschiedlichen Antikörpern (Exalpha [polyklonal]; BD Transduction Laboratories [monoklonal]; eigenes Antiserum, von Eurogentec hergestellt [polyklonal]) bisher nicht, das endogene Dyrk1A in Zelllinien mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen.

So wurde der folgende Weg eingeschlagen, um die Lokalisation der untersuchten Proteine zu analysieren: Es wurden Zellen der Linien HEK293 und HT22 sowie neuronale Primärkulturen vom Hippocampus der Ratte mit Plasmiden transfiziert, die für Fusionsproteine von Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 mit EGFP bzw. ECFP oder EYFP – EGFP-Varianten mit veränderten Anregungs- und Emissionsspektra – kodieren. Die transfizierten Zellen wurden anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die intrazelluläre Lokalisation der fluoreszierenden Fusionsproteine hin untersucht.

6.3.5.1 Lokalisation von Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 in hippocampalen neuronalen Primärkulturen¹⁶

Es wurden hippocampale Primärkulturen von Ratten-Embryonen (Tag E16) verwendet. Nach Präparation der Hippocampi und Aussaat der Zellen wurden die Kulturen zwei Tage in Kultur in serumhaltigem Medium belassen. Die Konstruktion und Klonierung der verwendeten Plasmide, die für die EGFP-Fusionsproteine kodieren, wurde bereits unter 6.3.3.1

¹⁶ Die hippocampalen Primärkulturen wurden von Dr. Nadhim Bayatti, MPI f. Psychiatrie, München, präpariert und zur Verfügung gestellt.

beschrieben. Die Primärkulturen wurden mit diesen Konstrukten unter Verwendung von Effectene[®], einem kommerziell erhältlichen Transfektionsreagens (Qiagen), transfiziert. Dabei wurden die Zellen von Tag 2 (unmittelbar vor der Transfektion) an entweder in serumhaltigem oder in serumfreiem Medium kultiviert. 16 bis 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen, fixiert, mit DAPI gefärbt und eingedeckt, so daß die Präparate zur Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop bereit waren.

Die angefertigten Präparate wurden sodann mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei wurden mit einer CCD-Kamera Bilder jeweils desselben Ausschnittes unter EGFP-Fluoreszenz-, DAPI-Fluoreszenz-, Phasenkontrast- sowie EGFP- und Phasenkontrasteinstellung zugleich angefertigt.

Untersucht wurden insbesondere Zellen mit neuronaler Morphologie; diese überwogen in ihrer Zahl bei weitem gegenüber vereinzelt auftretenden Zellen mit dem Erscheinungsbild von Astrocyten (s. Abbildung 6-29 im Vergleich zu Abbildung 6-30). Wie aus Abbildung 6-30 ersichtlich ist, zeigten die Septine Sept4 und Sept5 fusioniert mit EGFP eine zytoplasmatische Fluoreszenz in den neuronalen Primärkulturen. Beide Septine kamen sowohl im Zytoplasma als auch in den Neuriten in recht homogener Verteilung vor, der Nukleus war ausgespart. Im Gegensatz dazu standen Dyrk1A und Arip4: Beide lieferten in den Zellen mit neuronaler Morphologie ausschließlich nukleäre Signale; diese waren auffälligerweise nicht homogen im Zellkern verteilt, sondern in punktförmig erscheinenden nukleären Subkompartimenten konzentriert. Im übrigen Zellkern konnten Dyrk1A und Arip4 in geringerer Konzentration homogen verteilt detektiert werden. In einem der in diesen Kulturen seltenen Astrocyten – charakterisiert durch die längliche Form und den länglichen, nach DAPI-Färbung nur blaß fluoreszierenden Kern – wurde Dyrk1A mit ähnlicher Lokalisation in punktförmigen Aggregaten im Zellkern gefunden, allerdings zeigte sich hier ein Signal von sehr geringer Intensität – im Foto nicht erkennbar – auch im Zytoplasma (s. Abbildung 6-29). Das nicht fusionierte EGFP zeigte in allen Fällen eine homogene Verteilung in der gesamten Zelle inklusive des Kerns. Die Lokalisation und die Integrität des Zellkerns wurden in allen Fällen nach Anfärbung mit DAPI untersucht und gezeigt.

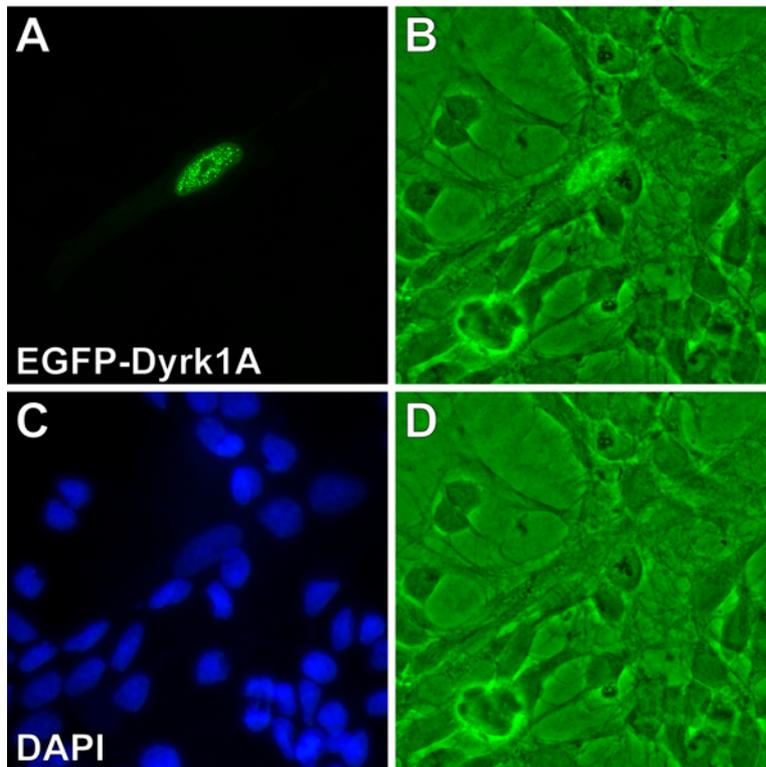


Abbildung 6-29: Astrocyt in hippocampaler Primärkultur nach Transfektion von EGFP-Dyrk1A

Gezeigt ist eine der wenigen in den neuronalen hippocampalen Primärkulturen auftretenden Zellen mit der Morphologie eines Astrocyten in Kultur, hier mit pEGFP-Dyrk1A (J.98) transfiziert. Deutlich erkennbar ist die Konzentration von EGFP-Dyrk1A in einem nukleären Subkompartiment mit körniger Struktur (A). Das Zytoplasma zeigt ebenfalls schwache Signale. Derselbe Ausschnitt wurde mit EGFP-Fluoreszenz- (A), Phasekontrast- und Fluoreszenz- (B), DAPI-Fluoreszenz- (C) und Phasekontrasteinstellungen (D) aufgenommen.

Aus diesen Resultaten läßt sich so der Schluß ziehen, daß Dyrk1A und Arip4 in neuronalen Primärkulturen nukleär lokalisiert und in einem punktförmig erscheinenden Subkompartiment konzentriert sind. Dabei überlappt ihre Lokalisation zumindest außerhalb dieser Aggregate. Hingegen kommen die beiden Septine Sept4 und Sept5 nicht im Zellkern, sondern im Zytoplasma und in den Neuriten vor.

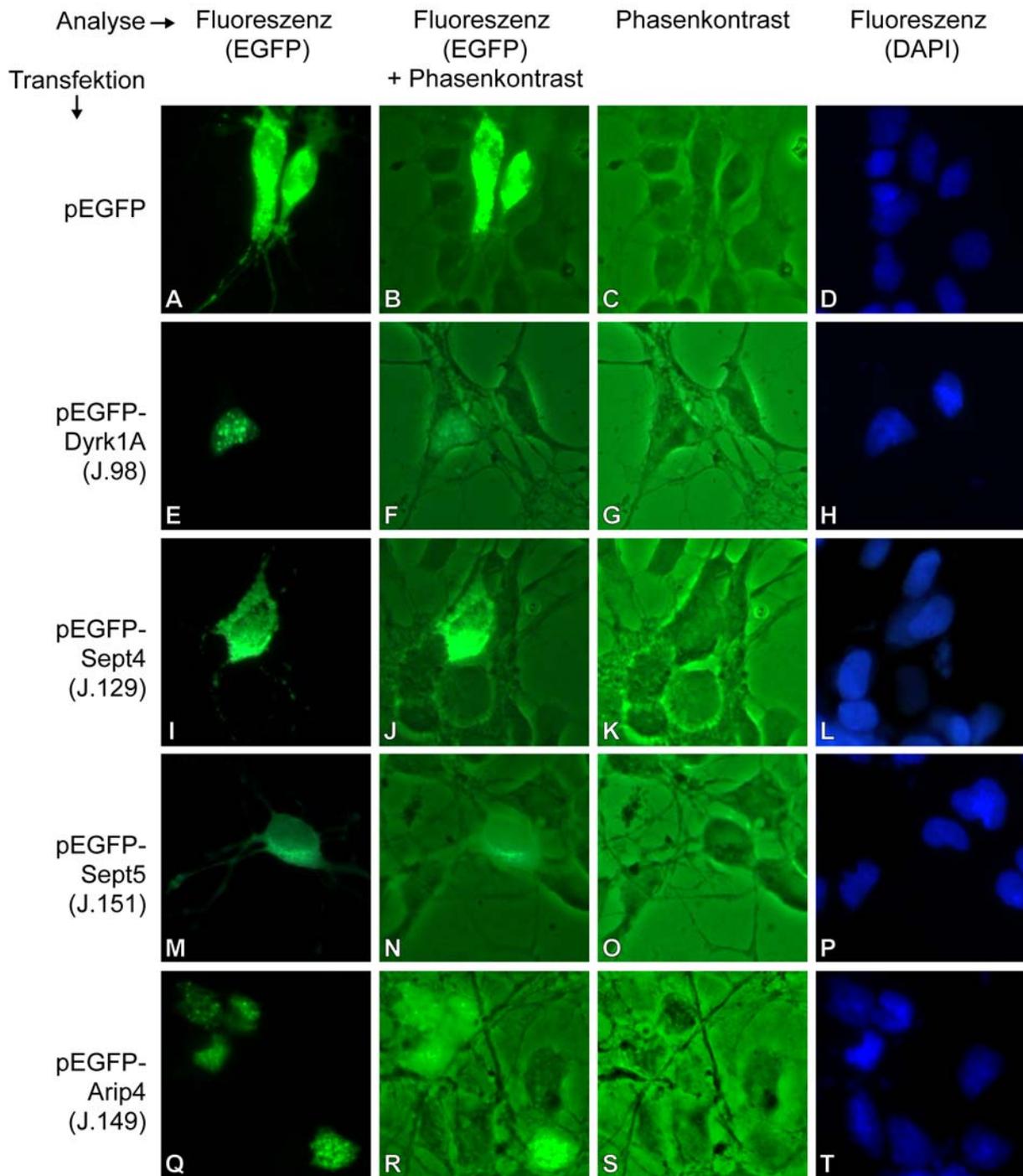


Abbildung 6-30: Hippocampale neuronale Primärkulturen nach Transfektion mit Konstrukten für die Expression von EGFP-Fusionsproteinen

Die Primärkulturen wurden am 3. Tag in Kultur mit Hilfe des Transfektionsreagens Effectene® (Qiagen) mit den Plasmiden pEGFP (A-D), pEGFP-Dyrk1A (J.98, E-H), pEGFP-Sept4 (J.129, I-L), pEGFP-Sept5 (J.151, M-P) und pEGFP-Arip4 (J.149, Q-T) transfiziert. 16 bis 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen, fixiert, mit DAPI gefärbt und eingedeckt. Die Betrachtung und Anfertigung von Photographien erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera mit geeigneten Einstellungen zur Fluoreszenz- und Phasenkontrastanalyse. Gezeigt werden für jedes Konstrukt korrespondierende Bilder desselben Ausschnittes der EGFP-Fluoreszenz (A, E, I, M, Q), zusammen mit Phasenkontrastanalyse (B, F, J, N, R), ausschließlich unter Phasenkontrasteinstellung (C, G, K, O, S) und der DAPI-Fluoreszenz (D, H, L, P, T). Der Vergleich der Signale der EGFP-Fusionsproteine mit denen der mit DAPI angefärbten Kerne zeigt die nukleäre Lokalisation von EGFP-Dyrk1A (E, vgl. H) und EGFP-Arip4 (Q, vgl. T) sowie die zytoplasmatische Lokalisation von Sept4 (I, vgl. L) und Sept5 (M, vgl. P).

6.3.5.2 Transfektion und konfokale Mikroskopie von Dyrk1A und Arip4 in HEK293-Zellen

Neben den Transfektionen der Primärkulturen wurden auch Zellen der Linie HEK293 mit EGFP-Dyrk1A und EGFP-Arip4 transfiziert (s. Abbildung 6-31). Hier ergab sich ein gegenüber den primären neuronalen Kulturen etwas anderes Bild: EGFP-Dyrk1A-Signale waren genauso wie in den Neuronen in einem punkt- oder kugelförmigen nukleären Subkompartiment zu beobachten. Dagegen wurde EGFP-Arip4 in unterschiedlichen Lokalisationen gefunden: In einigen Zellen wurden wiederum punktförmige Signale detektiert, in anderen Zellen hingegen erschienen die EGFP-Arip4-Signale länglich ausgedehnt. Von diesen längeren Strukturen waren pro Zellkern deutlich weniger zu beobachten als von den punktförmigen Aggregaten. Während davon auszugehen ist, daß die punktförmigen Signale im dreidimensionalen Raum des Zellkerns annähernd einer Kugelform entsprechen, ließen sich in dieser Hinsicht für die länglichen Aggregate aus den bisherigen Experimenten keine Schlüsse ziehen.

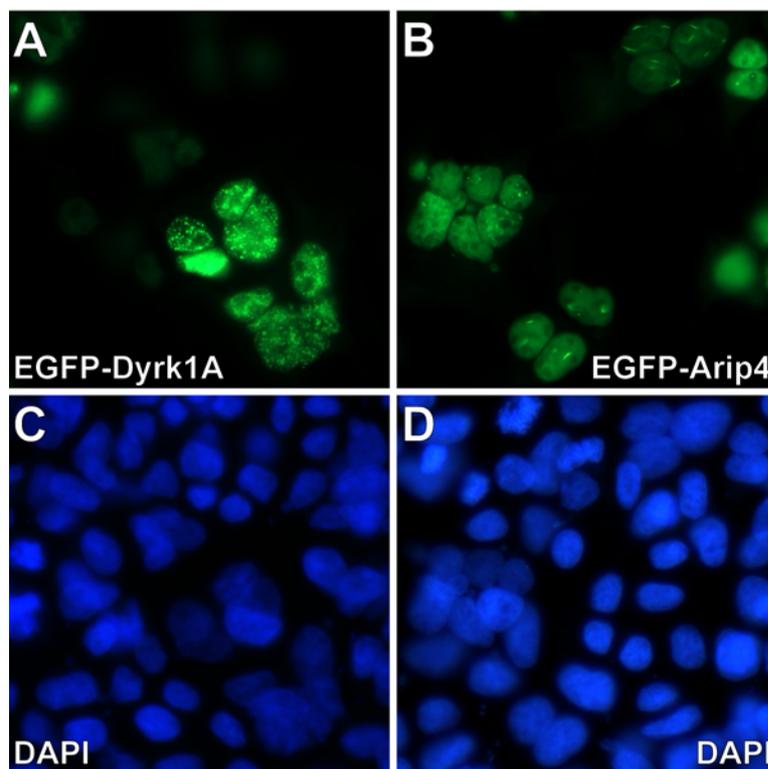


Abbildung 6-31: HEK293-Zellen nach Transfektion mit pEGFP-Dyrk1A und EGFP-Arip4

HEK293-Zellen wurden mit LIPOFECTAMINE™ 2000 mit den Plasmiden pEGFP-Dyrk1A (J.98, A) und pEGFP-Arip4 (J.149, B) transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen fixiert, mit DAPI gefärbt und eingedeckt. Die Analyse erfolgte mit einem (nicht konfokalen) Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtern für EGFP (A und B) bzw. DAPI (C [korrespondierendes Bild zu A] und D [zu B]). Der Vergleich der EGFP-Signale mit den DAPI-Kernfärbungen zeigt die nukleäre Lokalisation beider Proteine. Dyrk1A tritt in punktförmig erscheinenden Strukturen auf (A), während Arip4 sowohl in punktförmig erscheinenden als auch in länglichen Strukturen vorkommt (B).

Um die Kolo-kalisation von Dyrk1A und Arip4 sowie die dreidimensionale Struktur der Aggregate, in denen die beiden Proteine vorkommen, genauer zu untersuchen, wurde folgender Weg beschritten: Durch Umklonierung der cDNA von *Dyrk1A* (aus J.98) und der von *Arip4* (aus J.149) in die Vektoren pECFP-C1 und pEYFP-C1 wurden Konstrukte hergestellt, die für Fusionen beider Proteine mit ECFP und EYFP kodieren (s. Tabelle 6-9). Diese EGFP-Varianten zeichnen sich durch unterschiedliche, gegenüber EGFP verschobene

Anregungs- und Emissionsspektren aus. Dies erlaubt bei Verwendung eines Mikroskopes mit geeigneten Filtern eine für die jeweilige Variante spezifische Anregung und Detektion. Die erhaltenen Plasmide wurden in HEK293-Zellen transfiziert. Dabei wurde ECFP-Dyrk1A mit EYFP-Arip4 bzw. EYFP-Dyrk1A mit ECFP-Arip4 kotransfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit einem konfokalen *Laser scanning*-Mikroskop mit geeigneten Filtern für die Anregung und Detektion von ECFP und EYFP untersucht. Die erhaltenen Bilder wurden mit einem speziellen Computerprogramm (*Zeiss AIM*, Version 3.0) ausgewertet und gespeichert. Mit Hilfe des Programmes *Zeiss LSM Image Browser* wurden nach Anpassung der Falschfarbendarstellung übereinandergelagerte Bilder von ECFP-Dyrk1A und EYFP-Arip4 sowie von ECFP-Arip4 und EYFP-Dyrk1A hergestellt. Dabei wurde ECFP in rot und EYFP in grün dargestellt, da diese beiden Farben im Falle der Übereinanderlagerung von Signalen gelb ergeben, welches besonders gut zu erkennen und von den beiden Ausgangsfarben abzugrenzen ist. Auf eine Anfärbung der Zellkerne mit DAPI wurde in diesem Experiment bewußt verzichtet, da die Anregungs- und Emissionswellenlängen von DAPI denen von ECFP zu nahe sind, um die Signale der beiden differenzieren zu können.

Repräsentative Gruppen von Zellen, die mit ECFP-/EYFP-Dyrk1A und EYFP-/ECFP-Arip4 kotransfiziert und mit dem konfokalen Mikroskop betrachtet wurden, zeigt Abbildung 6-32: Deutlich ist die nukleäre Lokalisation aller vier Fusionsproteine zu erkennen, ebenso die nicht homogene Verteilung, sondern die Aggregation in nukleären Subkompartimenten (Bilder A-D). Auffällig ist hier, nach Kotransformation von Dyrk1A und Arip4, daß nicht nur Arip4 – wie schon in dem zuvor beschriebenen Experiment (s. Abbildung 6-31) gezeigt –, sondern auch Dyrk1A in mehreren unterschiedlichen Strukturen zu detektieren ist, einer punkt- oder kugelförmigen und einer länglichen; außerdem kommen beide Proteine auch in geringerer Konzentration in recht homogener Verteilung fast im gesamten Zellkern vor. Dabei herrschte in einem Zellkern in der Regel eine der Erscheinungsformen vor, die punktförmige und die längliche wurden nicht nebeneinander in einer Zelle angetroffen. Durch Übereinanderlagerung der Bilder von ECFP-Dyrk1A und EYFP-Arip4 bzw. ECFP-Arip4 und EYFP-Dyrk1A konnte klar die Kolo-kalisation der beiden Proteine in allen drei beobachteten Lokalisationen gezeigt werden: Sowohl in dem punktförmigen als auch in dem länglichen Subkompartiment und in recht homogener Verteilung im gesamten Zellkern ergaben sich gelbe Signale, die durch Übereinanderlagerung von roten und grünen Signalen am selben Ort entstehen (E und F). Allerdings ist hier auch zu erkennen, daß die beiden Proteine nicht vollständig kolokalisieren; einige Punkte zeigen nur rote oder nur grüne Signale.

Durch vergleichende Betrachtung von konfokalen Bildern aus zehn verschiedenen übereinanderliegenden Ebenen im Abstand von jeweils 0,49 µm auf der z-Achse mit dem Programm *Zeiss LSM Image Browser* konnte eine räumliche Analyse der beschriebenen

nukleären Strukturen vorgenommen werden. Diese zeigte, daß die in den Bildern punktförmig erscheinenden Aggregate tatsächlich annähernd eine Kugelform aufweisen. Die länglichen Strukturen winden sich dagegen schlangenartig durch den Zellkern; sie erschienen teilweise verzweigt, manchmal auch punktförmig, wenn sie quer zu ihrer Längsachse angeschnitten sind. Dies untermauert den Befund, daß diese länglichen Strukturen offenbar nicht zusammen mit den kugelförmigen Aggregaten von Dyrk1A/Arip4 in einem Kern vorkommen. Die verschiedenen Anschnitte, die in den einzelnen Ebenen zu sehen sind, weisen in der Regel in anderen Ebenen eine Verbindung untereinander auf. Die Identität beider Strukturen wurde bisher nicht geklärt.

Es konnte somit hier gezeigt werden, daß Dyrk1A und Arip4 in Form von Fusionsproteinen mit EGFP-Varianten in den Kernen von HEK293-Zellen zumindest teilweise kolokalisieren. Außerdem bewirkt eine Kotransfektion mit Arip4 in einer Subpopulation der Zellen eine Umverteilung von Dyrk1A in längliche, schlangenartige nukleäre Strukturen, in denen auch Arip4 vorkommt.

Abbildung 6-32 (folgende Seite): Nachweis der Kolokalisation von Dyrk1A und Arip4 mittels konfokaler Mikroskopie mit Dyrk1A und Arip4 kotransfizierter HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit LIPOFECTAMINE™ 2000 mit den Plasmiden J.152 pECFP-Dyrk1A (A) und J.155 pEYFP-Arip4 (C) bzw. J.154 pECFP-Arip4 (B) und J.153 pEYFP-Dyrk1A (D) kotransfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen fixiert und Präparate zur Mikroskopie hergestellt. Diese wurden mit einem konfokalen *Laser scanning*-Mikroskop (Zeiss LSM 510) analysiert. Die Abbildung zeigt jeweils untereinander Aufnahmen desselben Ausschnitts mit den geeigneten Einstellungen zur Detektion von ECFP (rot dargestellt, A und B) und EYFP (grün dargestellt, C und D) sowie die Übereinanderlagerung beider (E und F). In E und F sind sowohl rote und grüne Signale, die von jeweils einem der beiden Fusionsproteine stammen, als auch gelbe Signale, die eine Kolokalisation der Dyrk1A- und Arip4-Fusionsproteine anzeigen, erkennbar.

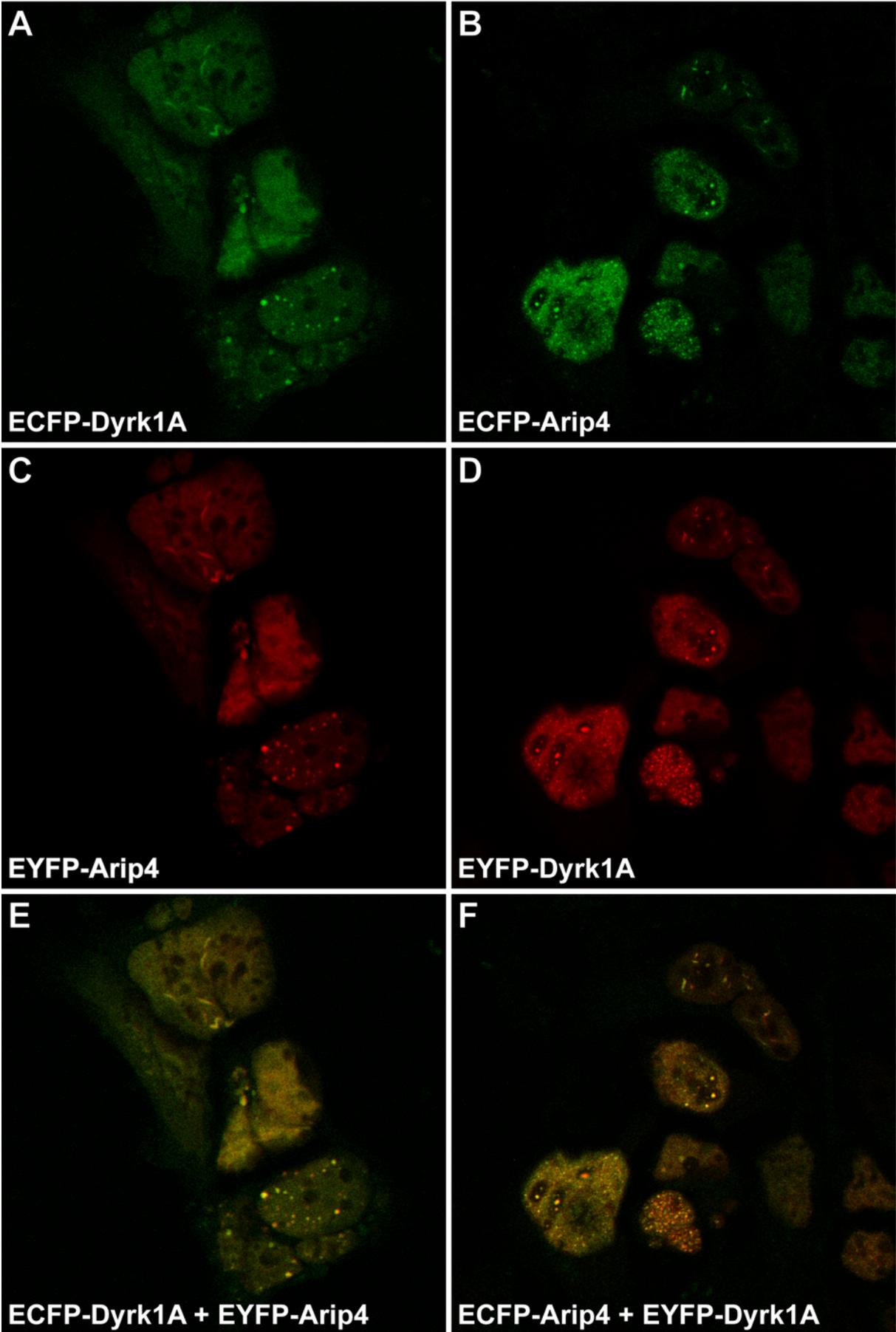


Abbildung 6-32: Konfokale Mikroskopie mit Dyrk1A und Arip4 kotransfizierter HEK293-Zellen

7 DISKUSSION

7.1 Expression und Lokalisation von Dyrk1A

7.1.1 Die Expression von *Dyrk1A* im Gehirn

Die Expression von *Dyrk1A* im Gehirn der adulten Maus konnte sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene in den meisten Regionen nachgewiesen werden (s. Tabelle 6-1). Da die Funktionen dieser Regionen sehr vielfältig sind, ist es kaum möglich, aus dem Expressionsmuster von *Dyrk1A* spezifische Hinweise auf seine Funktion abzuleiten. Deutlich wird jedoch, daß *Dyrk1A* keineswegs nur in der Entwicklung, sondern auch im adulten Organismus eine Rolle spielt, da sich auch im Gehirn adulter Mäuse mRNA und Protein nachweisen lassen – im Gegensatz zu den Befunden von Okui *et al.* zum Nachweis des *Dyrk1A*-Proteins in Homogenaten verschiedener Gehirnareale der Ratte. Diese zeigen eine starke Verminderung der *Dyrk1A*-Konzentration während der postnatalen Entwicklung (Okui *et al.*, 1999). Eine ähnlich abnehmende Konzentration in Gehirnhomogenaten während der postnatalen Entwicklung der Ratte wurde für eine Reihe nukleärer Proteine wie beispielsweise Histone nachgewiesen. Diese spiegelt wahrscheinlich eine Verringerung des Verhältnisses von nukleären Proteinen zur gesamten Proteinmenge infolge der abnehmenden Anzahl neuronaler Zellkerne wider (Daoud *et al.*, 1999).

In Regionen, denen kognitive Funktionen zugeschrieben werden, wie der Hippocampusformation und dem Neocortex, kommen sowohl die *Dyrk1A*-cDNA als auch das entsprechende Protein in einem hohen Anteil der Neurone vor. Auffällig ist hier, daß das *Dyrk1A*-Protein im Neocortex zwar in einer Vielzahl der Neurone vorkommt, daß aber immer auch Neurone gefunden werden, die nicht *Dyrk1A*-positiv sind. Dies deutet darauf hin, daß nur eine Subpopulation der neocorticalen Neurone *Dyrk1A* benötigt, daß *Dyrk1A* also keine generell für alle Neurone notwendige Funktion – ähnlich einem Haushaltsgen – ausübt.

Ebenso ist *Dyrk1A* als Protein in solchen Regionen, die motorische Funktionen ausüben, wie beispielsweise dem Cerebellum, dem Nucleus facialis, der Substantia nigra und dem Corpus striatum, in hohem Maße präsent. Auch hier, beispielsweise in der Purkinje-

Zellschicht des cerebellären Cortex, wurde Dyrk1A teilweise nur in einer Subpopulation der untersuchten Zellen nachgewiesen. Einige dieser Neurone sind deutlich Dyrk1A-positiv, andere hingegen Dyrk1A-negativ. Diese Gruppen könnten entweder neuronale Populationen mit unterschiedlichen Aufgaben repräsentieren oder aber auch Neurone derselben Population in unterschiedlichen Aktivitätszuständen. Allerdings ist über die Regulation des *Dyrk1A*-Gens und der Proteinbiosynthese von Dyrk1A, insbesondere durch neuronale Aktivität, nichts bekannt.

Die Expression von *Dyrk1A* scheint im Gehirn nicht auf Neurone beschränkt zu sein, da sowohl die mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung als auch das Protein immunhistochemisch in Oligodendrocyten im Corpus callosum nachgewiesen werden konnten. Dies wird bekräftigt durch die mittels *Northern Blot* erhobenen Resultate von Guimera *et al.* (Guimera *et al.*, 1999), die ebenfalls die *Dyrk1A*-mRNA im Corpus callosum nachweisen konnten. Da in ausdifferenzierten Neuronen der Vertebraten mRNA nicht axonal transportiert wird (Mohr & Richter), kann dieses Resultat nur durch eine Expression in den hier vorhandenen Gliazellen erklärt werden.

7.1.2 Intrazelluläre Lokalisation von Dyrk1A in Neuronen

Nach immunhistochemischer Markierung des Dyrk1A-Proteins wurde eine Analyse der intrazellulären Lokalisation des Proteins vorgenommen. Dabei wurde in Übereinstimmung mit den Daten von Rahmani *et al.* (Rahmani *et al.*, 1998) in einigen neuronalen Zelltypen eine nukleäre Immunreaktivität festgestellt, so beispielsweise in den Pyramidenzellen des Neocortex und des Hippocampus. In beiden Arealen wurde allerdings auch – mit geringerer Intensität – eine Markierung der Perikarya und teilweise der Dendriten beobachtet. In der hippocampalen CA3-Region war auffällig, daß die Relation der Dyrk1A-Konzentration zwischen Nukleus und Zytoplasma von Zelle zu Zelle unterschiedlich ist. Ein vergleichbares Bild zeigte sich in cerebellären Purkinje-Zellen; hier war allerdings die höhere Dyrk1A-Konzentration in der Regel im Zytoplasma vorhanden. In anderen Bereichen wie beispielsweise den pontinen Nuclei wurden ausschließlich zytoplasmatische Signale detektiert. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die intrazelluläre Lokalisation von Dyrk1A einer Regulation unterliegt, so daß Dyrk1A je nach Typ und Zustand des Neurons mehr im Zytoplasma oder im Zellkern vorliegt. Für diese Annahme sprechen auch die Resultate von Bartsch *et al.*, die darauf hindeuten, daß Dyrk1A nach Stimulierung von Neuronen durch elektrische Aktivität oder durch Faktoren wie NGF vermehrt in den Nukleus transloziert (Bartsch *et al.*, 1998). So könnte die unterschiedliche Dyrk1A-Lokalisation in Pyramiden- und Purkinje-Zellen verschiedene neuronale Aktivitätszustände repräsentieren.

7.2 BAC-Konstrukte zur Generierung *Dyrk1A* konditional überexprimierender transgener Mäuse

Um den Beitrag unterschiedlicher Regionen des Chromosoms 21 zum Phänotyp des Down-Syndroms und insbesondere die Bedeutung einer erhöhten Gendosis der Bande 21q22.2 für die mentalen Defizite feststellen zu können, wurden transgene Mäuse mit YACs (*Yeast artificial chromosomes*), die Regionen der humanen DSCR enthalten, hergestellt (Smith *et al.*, 1997; Smith & Rubin, 1997b). Da diese Mäuse die jeweiligen Bereiche von 21q22.2 in allen Geweben und in allen Entwicklungsstadien überexprimieren, lassen sich anhand der an ihnen erzielten Untersuchungsergebnisse nur bedingt Aussagen über die spezifischen Funktionen von *Dyrk1A* und weiteren Genen aus der kritischen Region im Säugerorganismus treffen. Da *Dyrk1A* sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Organismus exprimiert wird (Hämmerle *et al.*, 2002; Okui *et al.*, 1999; Rahmani *et al.*, 1998), kann nicht beurteilt werden, ob der beobachtete Phänotyp auf einem Entwicklungsdefekt oder auf einer infolge der erhöhten Gendosis veränderten Funktion im adulten Tier beruht. Weiterhin gilt hier, wie bei jeglicher Form der konstitutiven Überexpression oder Deletion von Genen, daß mögliche Effekte auf einen Phänotyp auch dadurch verdeckt werden, daß der Organismus vielfach durch eine Hoch- bzw. Herunterregulation anderer Gene mit ähnlicher oder entgegengesetzter Funktion reagiert und somit der beobachtete Phänotyp das Ende einer langen Kette von Kompensationsmechanismen darstellt (Silva & Giese, 1998). Weiter werden die an den YAC-transgenen Mäusen erzielten Ergebnisse von Smith *et al.* dadurch in Frage gestellt, daß das humane *DYRK1A* überexprimiert wurde. Auch wenn die kodierenden Sequenzen von *Dyrk1A* in Maus und Mensch sehr ähnlich sind, ist damit noch nicht gesichert, daß Expression, Regulation und Funktion identisch sind. Ebenso erfüllt die transgene *Dyrk1A* überexprimierende Mauslinie von Altafaj *et al.* die Anforderungen nicht, die an ein Modell zur Untersuchung der gendosisabhängigen Funktion von *Dyrk1A* gestellt werden müssen (Chrast *et al.*, 2000): In dieser Mauslinie werden 20 Kopien der *Dyrk1A*-cDNA unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors überexprimiert. Zudem läßt der verwendete *Metallothionin*-Promotor keine konditionale Expression zu, sondern nur eine niedrige Expression unter basalen Bedingungen und eine erhöhte Expression nach intraperitonealer Applikation von $ZnSO_4$ (Altafaj *et al.*, 2001). Wie die Analyse unterschiedlicher Mauslinien, die *Sim2* – ein ebenso wie *Dyrk1A* in der DSCR liegendes Homologes des *Drosophila*-Gens *single-minded* – überexprimieren, zeigt, führt die unphysiologisch starke Expression eines Transgens unter einem artifiziellen Promotor (Ema *et al.*, 1999) mit höherer Wahrscheinlichkeit zu auffälligen phänotypischen Eigenschaften als

nur eine zusätzliche Kopie des betreffenden Gens und eine 1,5fach erhöhte Expression (Chrast *et al.*, 2000). Ob der durch eine derart starke Überexpression erzielte Phänotyp aber die pathophysiologischen Auswirkungen einer dritten Kopie und damit einer um 50 % erhöhten Gendosis, wie sie bei Down-Syndrom auftritt, reflektiert, ist eher fraglich (Chrast *et al.*, 2000). Für MAP-Kinasen, denen die Dyrk-Kinasen nahe verwandt sind, wird angenommen, daß eine starke Überexpression zum Verlust der Substratspezifität führen kann (Chang & Karin, 2001), so daß die Funktionen einer stark überexprimierten Kinase eventuell andere sind als die im physiologischen Zustand.

Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit, *Dyrk1A*-überexprimierende transgene Mäuse herzustellen, in denen Höhe und Regulation der Expression der dritten Kopie des *Dyrk1A*-Gens – entsprechend der Situation bei der Trisomie 21 – dieselbe ist wie die der beiden endogenen Kopien im euploiden Zustand. Die Expression der zusätzlichen dritten Kopie von *Dyrk1A* sollte aber zeit- und gewebespezifisch aktivierbar erfolgen. So ist es möglich, die negativen Auswirkungen der Überexpression von *Dyrk1A* insbesondere auf kognitive Funktionen unbeeinflusst von Entwicklungsdefekten oder Defiziten beispielsweise in der Motorik, wie sie durch eine zeitlich bzw. räumlich unbegrenzte Überexpression verursacht werden könnten, zu untersuchen.

Zur Erfüllung dieser Anforderungen wurden zwei in den vergangenen Jahren zur Erzeugung von Mausmutanten etablierte Techniken miteinander kombiniert: erstens die Verwendung eines BAC (*bacterial artificial chromosome*) zur Generierung von transgenen Mäusen – hier mit dem *Dyrk1A*-Locus als Insertion, nach der Modifizierung mittels homologer Rekombination in *E. coli* (Yang *et al.*, 1997), um eine das *Dyrk1A*-Gen inaktivierende Sequenz in das BAC einzufügen; und zweitens das Cre/loxP-System (Kwan, 2002), um die dritte Kopie von *Dyrk1A* in transgenen Mäusen gezielt anschalten zu können.

Durch die Kombination dieser beiden Methoden lassen sich alle Anforderungen, die im Rahmen des beschriebenen Projektes zur Herstellung der transgenen Tiere gestellt wurden, erfüllen: Um eine den beiden endogenen Kopien entsprechende Expression des dritten Allels sicherzustellen, mußte das verwendete Transgen aus dem gesamten endogenen *Dyrk1A*-Locus inklusive aller regulatorischen Elemente bestehen. Aufgrund der Größe des *Dyrk1A*-Gens von ca. 150 kb mußten also BACs (oder alternativ YACs) verwendet werden, da nur diese solch große Insertionen tragen können. BACs erlauben außerdem die Modifikation ihrer Insertion in *E. coli* mittels homologer Rekombination. Die Größe der BAC-Insertion stellt sicher, daß nach der Herstellung von transgenen Tieren das jeweilige Gen mit den dazugehörigen regulatorischen Elementen integriert und seine Expression nicht vom Integrationsort abhängig ist, sondern nur von der Anzahl der Kopien, die in der Regel kleiner als fünf ist (Giraldo & Montoliu, 2001; Magdaleno & Curran, 1999).

7.2.1 Identifizierung und Charakterisierung eines geeigneten BAC-Klons

Um die geplanten *Dyrk1A* konditional überexprimierenden transgenen Mäuse mit einem modifizierten BAC generieren zu können, mußte zuerst ein geeigneter BAC-Klon erhalten werden, der das *Dyrk1A*-Gen der Maus enthält. So wurde ein Klon (J.38) isoliert und weiter charakterisiert: Nach dem Nachweis der Exons 12 und 14 per PCR und der Exons 1 und 4 im *Southern Blot* wurde der Klon J.38 teilweise sequenziert. Die Enden der Insertion liegen in den Bereichen der *Dyrk1A* benachbarten Gene auf dem Chromosom 16 der Maus, *Dcra* und *Girk2*. Es konnte damit gezeigt werden, daß dieser Klon den gesamten *Dyrk1A*-Locus enthält und keine weiteren Fragmente des Maus-Genoms; der Klon zeigt also keinen Chimärismus. Es kann mit höchster Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß alle regulatorischen Elemente, die die Expression von *Dyrk1A* kontrollieren, in der Insertion des Klons J.38 enthalten sind, auch wenn der Promotor und weitere Elemente, die die Expression von *Dyrk1A* in der Maus kontrollieren, bislang nicht charakterisiert sind. Das proximal von *Dyrk1A* gelegene Gen *Dcra* liegt in antiparalleler Orientierung zu *Dyrk1A*, so daß dessen Promotor, der im Klon J.38 enthalten ist, die Aktivität von *Dyrk1A* nicht beeinflussen sollte. Das distal gelegene Gen *Girk2*, dessen siebtes und letztes Exon in der Insertion von J.38 vorkommt, liegt ebenfalls in antiparalleler Orientierung. Der Promotor dieses Gens ist in J.38 nicht enthalten. Lediglich regulatorische Elemente in der Umgebung des *Dyrk1A*-Locus auf dem BAC wie *Enhancer* und *Locus control*-Regionen, deren Aktivität lage- und orientierungsunabhängig ist, werden *Dyrk1A* beeinflussen. Dies entspricht der Situation am endogenen *Dyrk1A*-Locus und damit dem Ziel dieser Arbeit. Inwieweit noch weitere Gene teilweise oder vollständig in der Insertion des isolierten BAC-Klons J.38 vorkommen, läßt sich nicht mit Sicherheit feststellen, da es über die Anzahl der Gene, die in der enthaltenen Region des Maus-Genoms vorkommen, widersprüchliche Angaben gibt. In der von Hattori *et al.* publizierten Sequenz und Genkarte des humanen Chromosoms 21 (Hattori *et al.*, 2000) und der entsprechenden Sequenz und Genkarte des Chromosoms 16 der Maus des *Mouse Genome Sequencing Consortium* (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/) sind für diesen Bereich keine weiteren Gene verzeichnet. In einer vergleichenden *in silico*-Analyse der humanen DSCR und der entsprechenden Region des Chromosoms 16 der Maus allerdings wurde für den der Insertion des Klons J.38 entsprechenden Bereich die Existenz von bis zu fünf weiteren Genen vorhergesagt (Toyoda *et al.*, 2002). Auch eine *in vitro*-Untersuchung von Dahmane *et al.* lieferte mehrere mögliche zusätzliche Gene in dieser Region (Dahmane *et al.*, 1998). Das einzige zweifelsfrei identifizierte proteinkodierende Gen in der Insertion des Klons J.38 ist jedoch *Dyrk1A*. Der BAC-Klon J.38 ist also optimal zur Generierung *Dyrk1A*-überexprimierender transgener Mäuse geeignet.

7.2.2 Modifizierung eines *Dyrk1A*-BAC-Klons mittels GET-Rekombination

7.2.2.1 Modifizierung des Klons J.38 mit der Rekombinationskassette 1

Die beabsichtigte weitere Verwendung des BAC-Klons J.38 machte es aus zwei Gründen notwendig, den Vektor dieses Klons vor der Generierung von transgenen Mäusen zu modifizieren: Erstens sollte eine geeignete Schnittstelle zur Linearisierung des BAC und zur Isolierung der Insertion vom Vektor eingefügt werden, zweitens mußte die im Vektor vorhandene *loxP*-Stelle deletiert werden. So wurde der Klon J.38 mittels GET-Rekombination (Narayanan *et al.*, 1999), einer modifizierten Variante des *ET cloning* (Zhang *et al.*, 1998), mit der Rekombinationskassette 1 modifiziert (s. Abschnitt 6.2.2). Diese Kassette enthält neben den Homologiearmen und einem Resistenzgen die *cos*-Stelle aus dem λ -Phagen. Vor dem Einsatz der Kassette zur Modifizierung des BAC-Klons J.38 wurde die Funktionsfähigkeit der Kassette nachgewiesen: Es konnte gezeigt werden, daß ein Plasmid, welches die Kassette enthält (J.76 [pBS-Rekombinationskassette 1]), von der λ -Terminase linearisiert wird (s. Abschnitt 6.2.2.1). Bei diesen Versuchen wurden allerdings auch weitere, nicht erwartungsgemäße Produkte detektiert. Eines davon stellt wahrscheinlich relaxierte Plasmid-DNA mit einem Einzelstrangbruch dar. Die weiteren Produkte, deren Länge ganzzahligen Vielfachen der erwarteten Länge entspricht, sind wahrscheinlich Oligomere des Plasmids J.76, die durch Hybridisierung der 12 b langen Überhänge nach λ -Terminase-Verdau der *cos*-Stelle entstehen. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden in der Folge alle mit der λ -Terminase verdauten Klone vor der Gelelektrophorese durch Erhitzen denaturiert. Nach der Modifizierung des BAC-Klons J.38 konnte in allen fünf untersuchten rekombinanten Klonen (J.81.1-J.81.5) die Integration der Kassette in den Vektor gezeigt werden. Außerdem wurde die Funktionsfähigkeit der *cos*-Stelle in zwei rekombinanten Klonen (J.81.4 und J.81.5) nachgewiesen (s. Abschnitt 6.2.2.3). Die Effizienz und Spezifität der λ -Terminase-Reaktion scheinen allerdings nicht sehr gut zu sein, so daß vor der Verwendung des BACs zur Generierung transgener Mäuse neben der kombinierten Anwendung von λ -Terminase und *Asc I*, die beide im Vektorbereich der BACs und nicht in der Insertion schneiden, und der Isolierung der Insertion von der so herausgeschnittenen Vektorregion eine bloße Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *Asc I* erwogen werden sollte. Die verbleibenden Vektorsequenzen sollten, da sie weit vom *Dyrk1A*-Gen auf dem BAC entfernt sind, keine Auswirkungen auf dessen Expression haben (Giraldo & Montoliu, 2001). Der Klon J.81.5 wurde zur weiteren Modifizierung verwendet.

7.2.2.2 Modifizierung des Klons J.81.5 mit der Rekombinationskassette 2

Zur Generierung *Dyrk1A* konditional überexprimierender Mäuse war es weiterhin notwendig, das *Dyrk1A*-Gen des BAC mittels homologer Rekombination in *E. coli* derart zu modifizieren, daß es unter Verwendung des Cre//*loxP*-Systems gezielt aktiviert werden kann. So wurde die unter 6.2.3 beschriebene Rekombinationskassette 2 konstruiert und kloniert, die von *loxP*-Stellen flankierte Polyadenylierungssignale aufweist. Die Kassette sollte mittels GET-Rekombination vor dem ersten kodierenden Exon (Exon 4) in das *Dyrk1A*-BAC eingefügt werden, so daß die Transkription vor dem Erreichen der für *Dyrk1A* kodierenden Sequenz beendet wird. Nach Herstellung von transgenen Mäusen mit diesem Konstrukt und Kreuzung dieser ersten Linie mit einer zweiten transgenen Mauslinie, in der die Cre-Rekombinase unter einem gewebs- oder zelltypspezifischen Promotor exprimiert wird, würden dann die Polyadenylierungssignale durch Cre-katalysierte Rekombination der beiden *loxP*-Stellen herausgeschnitten und so die dritte Kopie von *Dyrk1A* aktiviert. Durch Verwendung unterschiedlicher Cre-Rekombinase exprimierender Mäuse kann man bestimmen, zu welchem Zeitpunkt in der Entwicklung und in welchem Gewebe oder in welchem Zelltyp es zu einer Aktivierung der dritten Kopie des *Dyrk1A*-Gens kommen soll. Dabei war geplant, eine Überexpression in Gehirnregionen, die für Lern- und Gedächtnisvorgänge eine wichtige Rolle spielen, d. h. vor allem im Hippocampus, zu erreichen. Dafür sollten transgene Mäuse eingesetzt werden, welche die Cre-Rekombinase unter den regulatorischen Sequenzen von Genen wie *CaMKII α* (Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II α), das in Vorderhirn-Neuronen etwa ab der dritten postnatalen Woche aktiv ist, exprimieren (Tsien *et al.*, 1996).

Um das BAC in den transgenen Tieren sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand nachweisen zu können, wurden zwei Marker in die Rekombinationskassette 2 eingefügt: das für eine β -Galactosidase kodierende *lac Z*-Gen für den inaktiven Zustand und hrGFP (*humanized renilla green fluorescent protein*) als Fusion mit *Dyrk1A* als Marker für das aktive Gen bzw. das davon abgelesene Protein nach Cre-Rekombination. Das *lac Z*-Gen sollte es erlauben, diejenigen Zellen, in denen *Dyrk1A* physiologischerweise exprimiert ist, zu markieren, da *lac Z* gewissermaßen anstelle des *Dyrk1A* auf dem BAC exprimiert wird. Mit Hilfe des fluoreszierenden Proteins hrGFP sollte es dann nach Aktivierung der dritten Kopie möglich sein, *Dyrk1A*-überexprimierende Zellen beispielsweise in Primärkulturen oder in Gehirnschnitten zu identifizieren und gezielt zu Untersuchungen heranzuziehen. Außerdem wäre dieses Fusionsprotein hilfreich zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von *Dyrk1A*.

Es wurden eine Reihe von Maßnahmen getroffen, um zu gewährleisten, daß die Expression von *lac Z* bzw. *hrGFP-Dyrk1A* derjenigen des endogenen *Dyrk1A* entspricht: Der Integrationsort und der Aufbau der Rekombinationskassette 2 wurden so gestaltet, daß der *Splice*-Akzeptor und ein exonischer *Splice-Enhancer* (Blencowe, 2000) in Exon 4 von

Dyrk1A erhalten bleiben und nicht voneinander und vom Intron 3 getrennt werden. So sollte das Splicing sowohl in der inaktiven als auch in der aktiven Form des *Dyrk1A* auf dem BAC dem des endogenen *Dyrk1A* entsprechen. Weiterhin wurden einzelne Nukleotide in die Kasette eingefügt, um durch das direkte Zusammentreffen der verschiedenen Elemente wie beispielsweise *loxP* und Kozak-Sequenz entstehende Start-Codons zu unterbrechen und offene Leseraster zu verhindern, da selbst kurze offene Leseraster in der Nähe des eigentlichen Translationsinitiationsortes – hier desjenigen von Dyrk1A – eine Verminderung der Proteinbiosyntheserate zur Folge haben können (Übersicht über die zugrundeliegenden Mechanismen: Meijer & Thomas, 2002).

In einer Reihe von Versuchen zur Modifizierung des Klons J.81.5 konnten keine erwiesenermaßen rekombinanten Klone erhalten werden. Die Gründe dafür konnten nicht definitiv festgestellt werden; allerdings ist bekannt, daß die Effizienz des *ET cloning* und seiner Modifikationen – zu denen die GET-Rekombination gehört – mit zunehmender Länge der Rekombinationskasette abnimmt. Eine Ursache dafür könnte die Transformationseffizienz sein, die ebenfalls mit zunehmender Länge zu transformierender linearer DNA-Moleküle stark abnimmt. Da die Rekombinationskasette 2 mit 6850 bp im Vergleich zu anderen erfolgreich eingesetzten Kassetten sehr groß ist (Rekombinationskasette 1: 1510 bp), könnte dies eine Erklärung dafür sein, daß die Modifikation des BAC-Klons J.81.5 mit der Rekombinationskasette 2 bisher erfolglos war. Allerdings ist über Fälle berichtet worden, in denen auch mit großen Kassetten bis zu 6,7 kb eine Modifikation per *ET cloning* erfolgreich war (<http://www-db.embl-heidelberg.de/jss/servlet/de.embl.bk.wwwTools.GroupLeftEMBL/ExternalInfo/stewart/ETcloning-textonly.html>).

Parallel wurden Experimente mit einem Konstrukt, das für ein Fusionsprotein aus hrGFP und Dyrk1A kodiert, durchgeführt. Dieses Plasmid (J.142) enthält allerdings im Gegensatz zum BAC die *Dyrk1A*-cDNA und exprimiert die Fusion unter einem CMV-Promotor. Das hrGFP-Dyrk1A-Expressionsplasmid wurde in HT22-Zellen transfiziert. Im Gegensatz zu einem Kontrollplasmid, das nur für hrGFP kodiert, und einer EGFP-Dyrk1A-Fusion konnte keine Fluoreszenz des hrGFP-Dyrk1A-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Es wurden bislang keine weiteren Experimente vorgenommen, um zu untersuchen, ob das Fusionsprotein zwar synthetisiert wird, es infolge einer nicht fluoreszierenden Konformation aber nicht per Fluoreszenzmikroskopie detektierbar ist, oder ob es instabil ist. So kann nicht beurteilt werden, aus welchem Grunde keine Fluoreszenz des hrGFP-Fusionsproteins beobachtet werden konnte. Die fehlende Fluoreszenz und weitere Eigenschaften von hrGFP wie beispielsweise die Tendenz zur Dimerisierung (Ward & Cormier, 1979), die möglicherweise auch Auswirkungen auf die Aktivität des fusionierten Dyrk1A hat, lassen hrGFP als Protein zur Markierung von Dyrk1A ungeeignet erscheinen.

7.2.3 Ausblick

Um die geplante Generierung *Dyrk1A* konditional überexprimierender Mäuse abzuschließen, erscheint es notwendig, eine neue Rekombinationskassette zu konstruieren und mit dieser den BAC-Klon J.81.5 zu modifizieren. Diese neue Kassette sollte im Gegensatz zu der hier beschriebenen Rekombinationskassette 2 nicht für ein hrGFP-Fusionsprotein mit *Dyrk1A*, sondern beispielsweise für ein EGFP-Fusionsprotein kodieren, da gesichert ist, daß EGFP-*Dyrk1A* erstens in Zelllinien synthetisiert wird, zweitens mittels Fluoreszenzmikroskopie detektierbar (s. 6.3.5) und drittens katalytisch aktiv ist (Himpel *et al.*, 2001). Weiterhin erscheint es von Vorteil, die Größe der Kassette zu reduzieren, was durch den Einsatz eines anderen Markers für den inaktiven Zustand als *lacZ*, dessen cDNA 3,1 kb umfaßt, geschehen könnte. Eine Möglichkeit wäre hier ein anderes fluoreszierendes Protein als EGFP wie beispielsweise DsRed, ein 28 kDa großes, rot fluoreszierendes Protein aus einer Korallenart der Gattung *Discosoma*, dessen cDNA nur 0,75 kb groß ist (Baird *et al.*, 2000).

Die so generierten *Dyrk1A* konditional überexprimierenden Mäuse würden ein optimales System zur Analyse der Funktion von *Dyrk1A* *in vivo* darstellen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Cre-Rekombinase-exprimierender Mauslinien könnte man die Organe und Regionen, in denen *Dyrk1A* überexprimiert wird, auswählen und auch selektiv den Zeitpunkt der Aktivierung bestimmen. So sollte es möglich sein, Auswirkungen der *Dyrk1A*-Überexpression in der Ontogenese von akuten Effekten einer erhöhten Gendosis im adulten Organismus zu unterscheiden. Diese Differenzierung ist bei den bisher generierten Mausmodellen für das Down-Syndrom nicht berücksichtigt worden und auch in diesen Systemen nicht möglich, da hier in allen Entwicklungsstadien alle drei Allele der in drei Kopien vorhandenen Gene aktiv sind. Nur mit Modellen wie der hier geplanten transgenen Mauslinie wird es möglich sein, Gene zu identifizieren, welche die Funktionen des Gehirns in der postnatalen Entwicklung und im adulten Zustand negativ beeinflussen, wenn sie in drei Kopien vorkommen. Diese Stadien sind von besonderer Bedeutung, da hier bei der Trisomie 21 eine gezielte Beeinflussung der Gene oder ihrer Produkte durch noch zu entwickelnde Therapien prinzipiell möglich wäre.

7.3 Identifizierung und Charakterisierung von Dyrk1A-Interaktoren

7.3.1 Identifizierung von Dyrk1A-Interaktoren in der *Yeast two-hybrid*-Suche

Im Verlaufe der hier beschriebenen Arbeit wurde eine *Yeast two-hybrid*-Suche zur Identifizierung von Dyrk1A-Interaktoren durchgeführt. Grundlage dieser Experimente war die Notwendigkeit, die mit Dyrk1A physikalisch und funktionell interagierenden Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren, um aus deren Funktion Rückschlüsse über diejenige von Dyrk1A ziehen zu können (Oliver, 2000; Fields & Bartel, 1997).

Die *Yeast two-hybrid*-Suche wurde als System ausgewählt, da sie die Identifizierung von interagierenden Proteinen *in vivo*, d. h. hier im Zellkern der eingesetzten Hefen, erlaubt. Dies ist eine Umgebung, die der physiologischen von Dyrk1A relativ nahe kommt. Dementsprechend sollten mit höherer Wahrscheinlichkeit als in reinen *in vitro*-Systemen Interaktoren mit physiologischer Relevanz gefunden werden. Um gezielt nach Aktivatoren, Inhibitoren und Substraten von Dyrk1A zu suchen, wurde nur die Kinase-Domäne von Dyrk1A (s. Abbildung 6-1), fusioniert mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4 (GAL4-DNA-BD), als Köder eingesetzt. Abgesucht wurde eine cDNA-Bibliothek aus dem Gehirn der adulten Maus, um solche Interaktoren zu finden, die für Funktionen von Dyrk1A im Nervensystem von Bedeutung sind.

In der *Yeast two-hybrid*-Suche wurden sechs Klone, DI1 bis DI6, gefunden, die für fünf unterschiedliche mögliche Interaktoren kodieren (s. Abschnitt 6.3.1). Von diesen werden im Folgenden zwei, nämlich Sept4 (DI1) und Arip4 (DI6), deren spezifische Interaktion mit Dyrk1A nach weiteren Experimenten in der Hefe bewiesen wurde (s. 7.3.3), beschrieben, weiterhin das dem Sept4 nahe verwandte Sept5, dessen Interaktion mit Dyrk1A ebenso wie die von Sept4 und Arip4 in Koimmunpräzipitationen nachgewiesen werden konnte.

7.3.2 Die neu identifizierten Dyrk1A-interagierenden Proteine Sept4, Sept5 und Arip4: aktueller Kenntnisstand

7.3.2.1 Die GTPasen der Septin-Familie

Die Septine sind eine Familie von GTPasen, die erstmals bei der Untersuchung von temperatursensitiven Zellzyklus-Mutanten der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt wurden. Hefen mit Mutationen in den Genen *CDC3*, *CDC10*, *CDC11* und *CDC12* weisen einen Zellzyklusarrest sowie Defekte in Knospung und Zytokinese auf (Hartwell, 1971). Die Klonierung und Sequenzierung der mutierten *CDC*-Gene ergab, daß sie untereinander eine hohe Ähnlichkeit aufweisen und für eine neuartige Familie von GTPasen kodieren. Für ihre offenbar wichtige Rolle in der Zellteilung erhielten sie den Namen Septine (nach „*Septation*“ oder „*Separation*“). Die Septine der Hefen heterooligomerisieren zu Filamenten und spielen neben der Zytokinese auch in anderen Prozessen, wie der Auswahl von Knospungsstellen, der Sporulation und der Lokalisation von anderen Proteinen, wichtige Rollen (Übersichten in: Longtine *et al.*, 1996; Field & Kellogg, 1999; Gladfelter *et al.*, 2001).

Septine wurden in der Folge in den meisten Eukaryonten identifiziert, so in *Drosophila melanogaster* das Produkt des *peanut-(pnut-)* Gens. Das *pnut*-Protein ist während der Mitose in der Teilungsebene lokalisiert und für einen korrekten Ablauf der Zytokinese notwendig (Neufeld & Rubin, 1994). *Pnut*-Mutationen führen zu multinukleären Zellen, deren Form dem Gen den Namen *peanut (pnut)* gegeben hat.

Die Septine der Vertebraten

Auch in Vertebraten wurde am Beispiel des nahezu ubiquitär exprimierten Maus-Septins Nedd5 die Notwendigkeit von Septinen für die Zytokinese nachgewiesen (Kinoshita *et al.*, 1997). Außerdem wurden in Vertebraten weitere Septine beschrieben, darunter Sept4/Pnut2 (*peanut-like 2*)/H5/ARTS (*apoptosis-related protein in TGF- β signalling*)¹⁷ und Sept5/Pnut1 (*peanut-like 1*)/CDCrel-1 (*cell division cycle-related-1*). Deren Gene werden weitaus am stärksten in Gehirn und Herz exprimiert, schwache Expression ist auch in einigen anderen Geweben anzutreffen (Zieger *et al.*, 2000; Larisch *et al.*, 2000). Die starke Expression in diesen beiden größtenteils postmitotischen Geweben deutet auf eine Funktion von Sept4 und Sept5 außerhalb der Zytokinese hin.

¹⁷ Für die Septine der Säuger wurde kürzlich eine einheitliche Nomenklatur vorgeschlagen (Macara *et al.*, 2002), nach der die Namen *Sept4* und *Sept5* (Gene) bzw. Sept4 und Sept5 (Proteine) verwendet werden sollen.

Fast alle bisher bekannten Septine tragen in ihrer N-terminalen Hälfte ein sogenanntes *P-loop*-Motiv, welches für GTP/ATP-bindende Proteine charakteristisch ist (Cooper & Kiehart, 1996; Field & Kellogg, 1999), und eine sogenannte *coiled coil*-Domäne an ihrem C-Terminus. Aufgrund ihrer Sequenzeigenschaften wurden die Septine der Säuger in drei Gruppen eingeteilt, wobei sich die Gruppe III-Septine, zu denen Sept4 und Sept5 gehören, durch eine polybasische Region auszeichnen (Kartmann & Roth, 2001).

Das Septin Sept4/H5/Pnutl2

Für Sept4 wurde eine Bindung an membranständige Phosphoinositide (Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat [PtdIns(4,5)P₂] und Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat [PtdIns(3,4,5)P₃]) mittels dieser polybasischen Region gezeigt, die aber nur im GDP-beladenen Zustand erfolgt. GTP-Bindung und -Hydrolyse verhindern die Bindung von Sept4 an PtdIns(4,5)P₂ (Zhang *et al.*, 1999). So könnten der GTP/GDP-Beladungszustand und die Konzentration der Phosphoinositide die Membranassoziation eines Septins wie Sept4 regulieren (Kartmann & Roth, 2001). In einer anderen Studie wurde Sept4 allerdings nicht membranassoziiert, sondern vornehmlich im Zytoplasma gefunden. Dabei wurde eine teilweise Kolo-kalisation mit kortikalen Aktin-Filamenten und Aktin-Streißfasern beobachtet (Xie *et al.*, 1999). Unter Aktin-depolymerisierenden Bedingungen wurde Sept4 in punktförmigen Aggregaten im Zytoplasma gefunden. In Zellfraktionierungen befand sich Sept4 in einer Fraktion mit Aktin, während das verwandte Septin Nedd5 in der Membranfraktion nachgewiesen wurde. Beide, Sept4 und Nedd5, sind in mitotischen Zellen in der Teilungsebene anzutreffen (Xie *et al.*, 1999). Im Gehirn der Maus wurde Sept4-Immunreaktivität diffus verteilt im Neuropil gefunden. In einigen Regionen, darunter Thalamus, Globus pallidus und cerebelläre Molekularschicht, wurden höhere Konzentrationen gefunden, während z. B. in den Laminae II, III und V des cerebralen Cortex nur Signale mittlerer Intensität beobachtet wurden. Eine elektronenmikroskopische Analyse nach Immungold-Markierung zeigte eine Lokalisierung entlang der Membranen GFAP-positiver distaler Fortsätze von Astrozyten, die Neurone und Kapillaren umgeben (Kinoshita *et al.*, 2000).

Hsu *et al.* isolierten durch Koimmunpräzipitation mit Sec8 ein aus vier Septinen bestehendes Filament, in dem unter anderem auch Sept4 enthalten ist (Hsu *et al.*, 1998). Sec8 ist eine Komponente des Sec6/Sec8-Komplexes. Dieser Komplex scheint in wachsenden Axonen Regionen zu definieren, in denen Membranaddition und Synaptogenese stattfinden (Hazuka *et al.*, 1999). Hsu *et al.* schlagen weiterhin vor, daß die Sec6/8- und Septin-Komplexe als transientes fokales Gerüst zur Rekrutierung und Anordnung von Proteinen und Vesikeln an geeigneten Stellen der Plasmamembran während verschiedener Stadien des Zellzyklus und der Entwicklung dienen (Hsu *et al.*, 1999).

Eine als SEPT4_v5 (Septin 4, Variante 5)/ARTS bezeichnete Form des humanen SEPT4 unterscheidet sich in der Lokalisation und ihrer wahrscheinlichen Funktion deutlich von den bisher beschriebenen Septinen. SEPT4_v5/ARTS stellt eine Variante dar, die wahrscheinlich durch alternatives Spleißen entsteht, einen von den anderen Sept4-Formen unterschiedlichen C-Terminus besitzt und in Säugerzellen in Mitochondrien lokalisiert ist. Proapoptotische Stimuli wie TGF- β (*transforming growth factor- β*) induzieren eine nukleäre Translokation des Proteins. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß diese Variante den durch TGF- β induzierten Zelltod verstärkt. Mutationen im *P-loop* (s. o.) berauben SEPT4_v5/ARTS seiner Fähigkeit, die Protease Caspase 3 zu aktivieren und Apoptose zu induzieren (Depraetere, 2000; Larisch-Bloch *et al.*, 2000; Larisch *et al.*, 2000).

Sept5/Pnut1/CDCrel-1

Sept5 wurde von Honer *et al.* (Honer *et al.*, 1993) als unbekanntes Protein in einem anti-Synaptophysin-Immunpräzipitat aus dem humanen Gehirn entdeckt und 1998 von Caltagarone *et al.* (Caltagarone *et al.*, 1998) als Septin mit neuronaler Expression beschrieben. In primären Kulturen hippocampaler Neurone wurde Sept5-Immunreaktivität mit einem gesprenkelten Muster in Perikarya und Dendriten gefunden, das mit dem Muster des v-SNARE¹⁸ VAMP-2/Synaptobrevin – einem membranständigen Protein in synaptischen Vesikeln – übereinstimmt (Peng *et al.*, 2002). Sept5 ist in PC12-Zellen an der Plasmamembran und in Wachstumszonen von Neuriten konzentriert. In beiden Bereichen kolokalisiert es mit dem t-SNARE Syntaxin. Außerdem assoziiert und kopräzipitiert es mit synaptischen Vesikeln (Beites *et al.*, 1999) und interagiert mit Syntaxin. Sept5 scheint eine inhibitorische Funktion in der Exozytose auszuüben, da eine Überexpression zu verminderter Sekretion führt, während eine dominant-negative Form eine stimulierende Wirkung hat. Außerdem zeigt die Mutante verstärkte Bindung an Syntaxin (Beites *et al.*, 1999). Im Gehirn der Maus wurde Sept5-Immunreaktivität konzentriert in inhibitorischen präsynaptischen Endigungen und assoziiert mit GABAergen Vesikeln in Thalamus, Globus pallidus und den cerebellären Nuclei gefunden. Insgesamt kommt Sept5 im Gehirn weitverbreitet vor, so auch im Hippocampus, im Gyrus dentatus, in der Substantia nigra, im cerebellärem Cortex und in weiteren Regionen (Kinoshita *et al.*, 2000).

Ebenso wie in anderen Spezies scheinen die Septine auch im Säuger-Gehirn Heterooligomere zu bilden, in denen Sept5, CDC10 und Nedd5 nachgewiesen werden

¹⁸ V-SNAREs sind Membranproteine in Vesikeln – wie beispielsweise den Neurotransmitter enthaltenden Vesikeln in Axonendigungen – und interagieren mit t-SNAREs, z. B. in der präsynaptischen Membran, im Verlaufe der Prozesse, die letztendlich zur Fusion des Vesikels mit der Membran und der Freisetzung des Vesikelinhalts führen (Jahn & Südhof, 1999).

konnten (Peng *et al.*, 2002). Die Funktion von Septinen im Gehirn könnte, so postulieren Beites *et al.* (Beites *et al.*, 1999), die Regulation der Exozytose durch die Errichtung einer physikalischen Barriere für synaptische Vesikel oder aber durch Quervernetzung der Vesikel untereinander oder mit der präsynaptischen Membran mittels Syntaxin sein.

In diese Richtung deutet auch ein Befund von Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2000): Die Autoren konnten zeigen, daß Sept5 mit der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin interagiert, durch Parkin ubiquitiniert wird und daß Parkin die Degradation von Sept5 stimuliert. Humane Mutanten von Parkin, wie sie in autosomal-rezessiven Formen des Parkinson-Syndroms vorkommen, können dagegen die Degradation von Sept5 nicht mehr induzieren. Zhang *et al.* postulieren, daß es aufgrund der Mutation von Parkin zu einer Akkumulation von Sept5 in dopaminergen Synapsen kommen könnte. Dies würde dann, in Übereinstimmung mit den Resultaten von Beites *et al.* (Beites *et al.*, 1999), zu einer verstärkten Hemmung der Dopaminfreisetzung führen und könnte letztlich zur Entstehung eines Parkinson-Syndroms beitragen. Auf eine mögliche Beteiligung von Septinen an neurodegenerativen Mechanismen deutet auch der Nachweis der Septine Nedd5, Sept4 und Diff6 in Alzheimer-Fibrillen und dystrophen Neuriten in senilen Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten *post mortem* hin (Kinoshita *et al.*, 1998).

Um die Funktion von Sept5 im Säugerorganismus zu klären, generierten Peng *et al.* (Peng *et al.*, 2002) Knock-Out-Mäuse, in denen ein essentieller Teil des *Sept5*-Gens deletiert wurde. Wider Erwarten zeigen diese Mäuse keinen auffälligen Phänotyp und keine Beeinträchtigung synaptischer Transmission. Der einzig nachweisbare Phänotyp waren erhöhte Konzentrationen von Nedd5 und eine verringerte Konzentration von CDC10 im Gehirn der Mäuse. Diese beiden Proteine sind Septine, die mit Sept5 heterooligomerisieren. Nach Ansicht der Autoren deutet dies auf einen Kompensationsmechanismus hin, und zwar dergestalt, daß der Mangel eines Septins durch erhöhte Expression eines anderen ausgeglichen wird. Dies wäre auch eine Erklärung für die unbeeinträchtigte synaptische Transmission und das Fehlen eines auffälligeren Phänotyps nach Deletion des *Sept5*-Gens.

Das humane *Sept5*-Gen liegt in einer Region auf Chromosom 22 (22q11.2), die im Falle des DiGeorge-Syndroms häufig deletiert ist (McKie *et al.*, 1997). Zu den Symptomen dieser Krankheit zählen unter anderem eine verminderte Lernfähigkeit und angeborene Taubheit. Da zwar BAC-transgene Mäuse, die *Sept5*, *GP1B β* , *TBX1* und *WDR14* überexprimieren, einen Phänotyp aufweisen, der einige Symptome des Syndroms reproduziert, dies im Falle von alleinig *Sept5* und *GP1B β* überexprimierenden Mäusen aber nicht der Fall ist, wird inzwischen angenommen, daß *Sept5* keine entscheidende Rolle zumindest für die Defekte an Mittel- und Innenohr spielt (Funke *et al.*, 2001).

7.3.2.2 Arip4, eine Chromatin-modellierende ATPase der SNF2-Familie

Arip4 (*androgen receptor-interacting protein 4*, [Rouleau *et al.*, 2002]) ist ein Mitglied der Familie der SNF2-ähnlichen Proteine, deren Prototyp SWI2/SNF2, ein Bestandteil des SWI/SNF-Komplexes der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, ist. Snf2 (*sucrose nonfermenting 2*) wurde erstmalig 1984 als Hefe-Mutante mit Defekten in der Regulation des Sucrase-(Invertase-)Gens *SUC2* beschrieben. Unabhängig davon wurde ebenfalls 1984 die Mutante *swi2* beschrieben, die einen Defekt im Umschalten des Paarungstyps (*switching of mating type*) aufweist (Egel *et al.*, 1984).

Der SWI/SNF-Komplex

Die Unfähigkeit der *snf2*-Mutante zur Derepression des *SUC2*-Gens wurde einige Jahre später erklärt, als die Fähigkeit des SWI/SNF-Komplexes zur Derepression von Genen und Verstärkung der Funktion von genregulatorischen Proteinen durch Veränderung der Chromatinstruktur gezeigt werden konnte (Hirschhorn *et al.*, 1992). Der SWI/SNF-Komplex ist dabei in seiner Aktivität von ATP abhängig. In den vergangenen Jahren wurden Säuger-, *Drosophila*- und Hefe-Homologe dieses Komplexes charakterisiert (Tamkun *et al.*, 1992; Kwon *et al.*, 1994; Tsuchiya *et al.*, 1998). In der Hefe sind die Komponenten des SWI/SNF-Komplexes nicht nur für die regulierte Transkription einer Reihe von Hefe-eigenen Genen notwendig, sondern auch für die Funktion des in Hefe-Zellen transformierten Glucocorticoid-Rezeptors aus der Ratte (Yoshinaga *et al.*, 1992). SWI/SNF gehört zu einer Reihe von Chromatin-modellierenden Komplexen, die in der Lage sind, in kondensiertem Chromatin die Histon-DNA-Assoziationen ATP-abhängig so zu modifizieren, daß regulatorische Sequenzen für sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren wie z. B. Steroidhormon-Rezeptoren zugänglich werden. Von diesen abzugrenzen sind Komplexe, die Chromatin durch kovalente Modifikation seiner Komponenten verändern (aktuelle Übersicht über beide Gruppen und Mechanismen der Chromatin-Modellierung in Narlikar *et al.*, 2002). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Aktivitäten die Expression von Genen sowohl in positiver als auch in negativer Richtung regulieren können (Übersicht in Havas *et al.*, 2001).

Das SWI2/SNF2-Protein

Das SWI2/SNF2-Protein der Hefe wurde als die für die ATPase-Aktivität verantwortliche Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes beschrieben (Khavari *et al.*, 1993; Laurent *et al.*, 1993; Cote *et al.*, 1994). SWI2/SNF2 war das erste Mitglied einer Familie von SNF2-ähnlichen Proteinen, deren Gemeinsamkeit eine konservierte Domäne von 600 Aminosäureresten ist – SNF2-Domäne genannt –, die von nicht konservierten Bereichen

umgeben wird. Inzwischen sind mehr als 100 Mitglieder der SNF2-Superfamilie bekannt (Eisen *et al.*, 1995), die noch unterteilt werden in i) die SWI2/SNF2-Gruppe, ii) die Imitations-SWI-Gruppe (ISWI-Gruppe) und iii) die Mi-2-Gruppe (Vignali *et al.*, 2000). Die Funktion der meisten dieser Proteine ist noch unbekannt; diejenigen Proteine allerdings, deren Funktion bekannt ist, spielen Rollen in Prozessen wie der DNA-Replikation, DNA-Reparatur oder der Transkription (Pazin & Kadonaga, 1997; Kingston & Narlikar, 1999). Die SNF2-Domäne enthält sieben sogenannte Helikase-Motive und eine Konsensus-Region für die Bindung und Hydrolyse von ATP. Die Bedeutung der ATPase-Aktivität für die Funktion wurde für viele SNF2-ähnliche Proteine gezeigt (Kingston & Narlikar, 1999). Während bisher kein SNF2-ähnliches Protein gefunden wurde, das in *strand displacement assays* eine DNA-Helikase-Aktivität aufweist, konnte die Fähigkeit einiger ATP-abhängiger SNF2-Verwandter zur Generierung negativer superhelikaler Torsion gezeigt werden (Repp & Karsh, 1994). Nach einer phylogenetischen Analyse (Eisen *et al.*, 1995) wurde vorgeschlagen, daß die nichtkonservierten Regionen, die die SNF2-Domäne umgeben, für die Lokalisierung des jeweiligen SNF2-ähnlichen Proteins in spezifischen Kompartimenten einer Zelle verantwortlich sind (Peterson & Workman, 2000).

Arip4, ein Protein der SNF2-Superfamilie

Arip4 wurde von Rouleau *et al.* (Rouleau *et al.*, 2002) in einer *Yeast two-hybrid*-Suche nach Proteinen, die mit der Zinkfinger-Domäne des humanen Androgen-Rezeptors (AR) interagieren, in einer embryonalen Maus-cDNA-Bibliothek identifiziert. Dieselben Autoren klonierten anschließend die cDNA, die für ein Protein von 160 kDa kodiert, und beschrieben Arip4 als ein Protein mit einigen für SNF2-ähnliche Proteine typischen Merkmalen: Arip4 weist alle sieben Helikase-Motive der SNF2-Superfamilie auf, wobei der nächste Verwandte innerhalb dieser Familie das Atrx-Protein ist (Picketts *et al.*, 1996). Die Homologie ist allerdings auf die SNF2-Domäne beschränkt; die übrigen Bereiche weisen keinerlei Ähnlichkeiten zu anderen bekannten Proteinen auf. Das in einer Suche nach bisher unidentifizierten humanen Genen, die für große Proteine von 50 kDa und mehr kodieren, gefundene Protein KIAA0809 (Nagase *et al.*, 1998) weist eine zu mehr als 95 % identische Aminosäuresequenz zu Arip4 auf und ist somit wahrscheinlich das humane Ortholog. Weiterhin weist Arip4 eine Sumoylierungs-Konsensussequenz (Aminosäurereste ΨKXE, wobei Ψ einen großen hydrophoben Aminosäurerest repräsentiert und X einen beliebigen Rest). Eine sumoylierte Form von Arip4 konnte in transfizierten Zellen detektiert werden. Arip4 beinhaltet drei LXXLL-Motive, die auch als *nuclear receptor box* bezeichnet werden, da eine Reihe von Steroidhormon-Rezeptor-Kofaktoren diese Motive zur Bindung an die aktivierte Ligandenbindungsdomäne des Steroidhormon-Rezeptors nutzt. Die aminoterminalen Region inklusive des im *Yeast two-hybrid*-Experiment von Rouleau *et al.*

gefundenen Bereiches ist sehr reich an negativ geladenen Aminosäuren. Dies ist eine typische Eigenschaft von Proteinen, die in die Transkriptionsregulation involviert sind. Arip4 enthält drei nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS), und erwartungsgemäß konnten Rouleau *et al.* mittels Immunhistochemie zeigen, daß Arip4 in transfizierten COS-1-Zellen im Zellkern lokalisiert ist. Dabei war die Verteilung der Arip4-Immunreaktivität nicht homogen, sondern zeigte ein gesprenkeltes Muster. Die Identität des nukleären Subkompartimentes, in dem Arip4 lokalisiert ist, klärten die Autoren allerdings nicht. Mittels eines *Northern Blot* an RNA aus verschiedenen Organen der Maus konnte in Niere, Leber und Hoden eine starke und in anderen Organen wie Gehirn und Herz eine schwache *Arip4*-Expression nachgewiesen werden. In der Ratte dagegen wurde im Gehirn die stärkste Expression aller untersuchten Organe gefunden.

Zur weiteren Beschreibung der Eigenschaften von Arip4 führten Rouleau *et al.* eine Reihe von Experimenten durch und konnten zeigen, daß

- i) Arip4 intrinsische ATPase-Aktivität besitzt, die von der Anwesenheit doppelsträngiger DNA abhängig ist;
- ii) Arip4 mit dem Androgen-Rezeptor in transformierten Hefen und in transfizierten Säugerzellen sowie *in vitro* interagiert;
- iii) Arip4 superhelikale Torsion in linearen DNA-Fragmenten generiert, während ATPase-defiziente Mutanten von Arip4 hierzu nicht in der Lage sind;
- iv) Arip4 die Androgen-abhängige Transaktivierung durch AR in einem Experiment mit in COS-1-Zellen transfizierten Expressionsplasmiden für AR und Arip4 sowie einem Reporterplasmid mit einem minimalen Promotor ungefähr um den Faktor drei steigerte. Eine Arip4-Deletionsmutante, der der Aminoterminalteil fehlte, hatte hier keinen Effekt, während mit ATPase-defizienten Mutanten von Arip4 eine Verringerung des AR-Effektes, also ein dominant-negativer Effekt, erzielt wurde. In weiteren Experimenten in einem anderen System - in stabil transfizierten PC-3-Zellen mit einem AR-Expressionskonstrukt und einem *Probasin*-Promotor-regulierten *Luciferase*-Gen - hatte Arip4 nur einen ca. 1,5fach steigenden Effekt. In einem Experiment mit demselben Promotor, allerdings in transient transfizierten COS-1- oder PC-3-Zellen, hatte Arip4 einen abschwächenden Effekt auf die AR-vermittelte Transaktivierung.
- v) Arip4 die Östrogen-Rezeptor-vermittelte Transaktivierung auf etwa die Hälfte des Wertes ohne Arip4 verringert;
- vi) Arip4 auf die Funktion von Glucocorticoid-Rezeptor und Progesteron-Rezeptor keinen Einfluß hat.

Weitere Untersuchungen zu Arip4 sind zu diesem Zeitpunkt nicht publiziert; so ist z. B. nichts über eine mögliche Beeinflussung der Funktion von Arip4 durch Proteinkinasen wie Dyrk1A bekannt.

7.3.3 Bestätigung der spezifischen Interaktion von Dyrk1A mit Sept4 und Arip4 in *Saccharomyces cerevisiae*

In der *Yeast two-hybrid*-Suche wurden sechs Klone, DI1 bis DI6, gefunden, die für fünf mögliche Interaktoren kodieren (s. Abschnitt 6.3.1). Davon stellten sich nach weiteren Experimenten in der Hefe zwei, nämlich die Klone DI1 (Sept4_v7) und DI6 (Arip4¹⁰⁷⁸⁻¹⁴⁶⁶), als wahre Interaktoren heraus. Diese interagieren nur mit Dyrk1A und der Kinase-Domäne von Dyrk1A, nicht aber mit GAL4-AD alleine oder einem GAL4-AD-Lamin C-Fusionsprotein (s. Abschnitt 6.3.2). Es sollte hier darauf hingewiesen werden, daß der SWI/SNF-Komplex in der Hefe die Bindung von GAL4 an nucleosomale DNA verstärkt und daß dies von SWI2/SNF2, einem Homologen von Arip4, abhängig ist (Cote *et al.*, 1994). Die in dieser Arbeit durchgeführten Kontrollexperimente zeigen allerdings, daß Arip4¹⁰⁷⁸⁻¹⁴⁶⁶, das C-terminale Fragment von Arip4, das im Klon DI6 enthalten ist, nicht für eine Interaktion mit der GAL4-DNA-BD ausreicht und die gefundene Interaktion von Dyrk1A abhängig ist. Weiterhin sind die Helikasen-ähnliche Region von SNF2 und die ATPase-Aktivität von Arip4 für die von ihnen vermittelte transkriptionelle Aktivierung erforderlich (Laurent *et al.*, 1993; Rouleau *et al.*, 2002). Da in Arip4¹⁰⁷⁸⁻¹⁴⁶⁶ weder die Helikasen-ähnliche Region noch die ATP-Bindungsstelle enthalten sind, kann dieses Arip4-Fragment nicht direkt die Aktivierung der Reportergene beeinflussen. Auch eine Bindung des Arip4¹⁰⁷⁸⁻¹⁴⁶⁶-GAL4-AD-Hybrids an DNA findet offenbar nicht statt, da dem Fragment die notwendige Domäne fehlt, oder reicht zur Aktivierung der Reportergene nicht aus. Es ist zur Zeit nicht bekannt, ob Arip4 intrinsische DNA-bindende Aktivität besitzt (Rouleau *et al.*, 2002).

7.3.4 Bestätigung der Interaktion von Dyrk1A mit Sept4, Sept5 und Arip4 in HEK293-Zellen mittels Koimmunpräzipitation

Die Interaktion von Dyrk1A mit Sept4 und Arip4 wurde mittels Koimmunpräzipitation der aus transfizierten Säugerzellen isolierten Proteine bestätigt. Hierfür wurden Expressionskonstrukte generiert, die für die vollständigen Proteine, fusioniert mit einem FLAG-Epitop bzw. EGFP, kodieren, und in HEK293-Zellen transfiziert.

Die hier klonierten für Arip4 kodierenden Plasmide beinhalten dabei Teile der cDNAs von Arip4 aus der Maus (Rouleau *et al.*, 2002) und dem humanen Homologen KIAA0809 (Nagase *et al.*, 1998). Die starke Konservierung dieser beiden Proteine ließ es als wahrscheinlich erscheinen, daß das hergestellte Konstrukt für ein funktionsfähiges Protein kodiert, wie es auch für Chimären aus dem SWI2/SNF2 der Hefe und dem humanen BRG1 gezeigt wurde (Khavari *et al.*, 1993).

Von der im Klon DI1 gefundenen Sept4-Variante 7 wurde ein Konstrukt hergestellt, welches für ein FLAG-Fusionsprotein kodiert (J.103). Dieses konnte allerdings nicht mittels *Western Blot* detektiert werden. Deshalb wurde die vollständige cDNA der Sept4-Variante 1 (NP_035259.1) kloniert und für die weiteren Experimente – fusioniert entweder mit dem FLAG-Peptid oder EGFP – eingesetzt. Die hier mittels Koimmunpräzipitation erhobenen Daten, die die Interaktion von Dyrk1A und Sept4 bestätigen, gelten wahrscheinlich nicht nur für die eingesetzte Sept4-Variante 1, sondern für alle bisher bekannten Varianten, da diese den größten Teil der von DI1 kodierten Variante, die in der Hefe mit Dyrk1A interagiert, enthalten.

Zusätzlich zu den in der Hefe gefundenen Interaktoren Arip4 und Sept4 wurde in den Koimmunpräzipitationen auch Sept5, ein zu Sept4 verwandtes Protein, untersucht. Es wurde postuliert, daß wegen der hohen Ähnlichkeit zu Sept4 auch Sept5 mit Dyrk1A interagiert. Wegen seiner Expression in Neuronen und der angenommenen Funktion in der Regulation von Vesikelfusion und Transmitterfreisetzung könnte die Interaktion mit Sept5 eine große Bedeutung für die funktionelle Analyse von Dyrk1A im Nervensystem haben. Da die vollständige Sequenz des Sept5 der Maus nicht bekannt war, wurde dieses unter Ausnutzung der erhältlichen Sequenzdaten des Sept5 der Ratte und eines EST, der der 5'-nichtkodierenden Region der Maus-cDNA entspricht, per RT-PCR kloniert (s. Abschnitt 6.3.3). So konnte in dieser Arbeit erstmalig die vollständige kodierende Sequenz der Sept5-cDNA der Maus bestimmt werden. Per Koimmunpräzipitation konnte gezeigt werden, daß nicht nur Sept4, sondern auch Sept5 nach Transfektion in HEK293-Zellen mit Dyrk1A interagiert.

So konnte hier mit den in der Hefe und in Säugerzellen durchgeführten Experimenten nachgewiesen werden, daß Dyrk1A mit Sept4, Sept5 und Arip4 interagiert. Diese Befunde werden durch die Existenz der von Himpel *et al.* (Himpel *et al.*, 2000) vorgeschlagenen Konsensussequenz von Dyrk1A-Substraten, $RPX^S/I/P$, in den identifizierten Interaktoren untermauert: In Arip4¹⁰⁷⁸⁻¹⁴⁶⁶ kommt die Sequenz RPVSP vor, in Sept4 kommen sogar zwei dem Konsensus entsprechende Sequenzen vor: RPQSP und RPRSP, welche beide in dem in DI1 enthaltenen Bereich lokalisiert sind (s. Tabelle 7-1 und Abbildung 6-20). Sept5 weist eine leicht von der Substrat-Konsensussequenz abweichende Sequenz auf (s. Tabelle 7-1 und Abbildung 6-22).

Substrat	Sequenz	Referenz (Dyrk1A-Interaktion)
Histon H3 (Maus) 31-60	PHRYRFGVVALREIRRYQKSTE	Himpel <i>et al.</i> , 2000
DYRKtide	RRRF ^{SRP} ASPLRGPPK	Himpel <i>et al.</i> , 2000
Arip4 (Chimäre [Maus + Mensch], kodiert von J.149/J.150) 1151-1180	EGLAR ^{SRP} VSPDSPEIISELQQYA	diese Arbeit
Sept4 (Maus) 51-80 ¹	ILEPRFQSPDLRDDVEFRGSL	diese Arbeit
Sept4 (Maus) 91-110 ¹	SPS ^{SRPRSP} WGKLDPYDSEDD	diese Arbeit
Sept5 (Maus) 329-350	TQDS ^{SRME} SPIPILPLPTPAET	diese Arbeit
Gli1 (Maus) 101-130	FINS ^{SRCT} SPGGSYGHLSIGTMS	Mao <i>et al.</i> , 2002
Gli1 (Maus) 981-1010	PRLLP ^{PLSP} CYGPLKVGDTNPS	Mao <i>et al.</i> , 2002
CREB (Maus) 116-145	EIL ^{SRPS} YRKILNDLSSDAPG	Yang <i>et al.</i> , 2001
eIF2Be (Maus) 521-550	ELD ^{SRAGSP} QLDDIRVFQNEVL	Woods <i>et al.</i> , 2001a
FKHR (human) 311-340	STIS ^{GRLSP} IMTEQDDLGEQDV	Woods <i>et al.</i> , 2001b
Stat3 (Maus) 711-740	NTIDL ^{PMS} PTLDLSLMQFGNNG	Matsuo <i>et al.</i> , 2001
Tau (Maus) 485-515	TPG ^{SRSR} P ^{SR} SLPTPPTREP ^{SR} PKKV	Woods <i>et al.</i> , 2001a
Dynamin 1 (human) 841-864	ASP ^{SRPE} SPRPPFDL	Chen-Hwang <i>et al.</i> , 2002
Konsensus	SRP SR	

Tabelle 7-1: Dyrk1A-Substrate

Angegeben sind alle publizierten und die in dieser Arbeit identifizierten (Sept4, Sept5 und Arip4) Substrate bzw. Interaktoren mit einem Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz, der die jeweilige – wahrscheinliche oder nachgewiesene – Phosphorylierungsstelle (rot; definiert als Position 1) umgibt. Konservierte Aminosäurereste der Substrat-Konsensussequenz sind blau hinterlegt, ähnliche Reste grün. Auffällig ist die Konservierung eines Serin-Restes an der Position –4 in einer Reihe der Substrate, der nicht in dem von Himpel *et al.* optimierten Substrat-Peptid DYRKtide (Himpel *et al.*, 2000) enthalten ist. ¹ Die Positionsangabe gilt für die Sept4-Variante 1 (NP_035259.1).

7.3.5 Vergleichende Expressions- und Lokalisationsanalyse von Sept4, Arip4 und Dyrk1A

Zur weiteren Analyse der gefundenen Interaktoren und zur Beurteilung der physiologischen Relevanz der Interaktionen wurden vergleichende Expressions- und Lokalisationsanalysen von Dyrk1A und den Interaktoren Sept4, Sept5¹⁹ und Arip4 durchgeführt. Mittels *Yeast two-hybrid*-Verfahren und Immunpräzipitation lassen sich zwar physikalische Interaktionen nachweisen, jedoch können diese nur von physiologischer Relevanz sein, wenn die entsprechenden Gene zumindest teilweise koexprimiert und die Proteine kolokalisiert sind. Aus diesem Grunde wurde schon zu einem frühen Zeitpunkt der Untersuchungen der Klon DI2 aus der *Yeast two-hybrid*-Suche, der ein Fragment eines extrazellulären membranassoziierten Proteins enthält, von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

¹⁹ Von Sept5 wurde nur die intrazelluläre Lokalisation untersucht, nicht die Expression im Gehirn.

In Ermangelung von Antikörpern, die eine immunhistochemische Markierung der Proteine zuließen, wurde folgende Strategie gewählt: Zur Analyse der Koexpression von *Sept4* und *Arip4* mit *Dyrk1A* wurden *in situ*-Hybridisierungen an Gehirnschnitten durchgeführt, und parallel – um die subzelluläre Lokalisation der Proteine in Neuronen untersuchen und vergleichen zu können – EGFP-Fusionen von *Sept4*, *Sept5*, *Arip4* und *Dyrk1A* in neuronalen Primärkulturen exprimiert.

7.3.5.1 Expression von *Sept4*, *Arip4* und *Dyrk1A* im Gehirn der Maus

Expression von Dyrk1A und Sept4

Die für die *Sept4*-Expressionsanalyse eingesetzte Sonde (J.103-Insertion) entspricht dem im Klon DI1 exprimierten Fragment. Die bisher bekannten *Sept4*-Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer N- und C-Termini, wohingegen ein großer Teil des in DI1 enthaltenen Fragmentes in allen Varianten vorkommt. Deshalb ist anzunehmen, daß die Sonde alle bislang beschriebenen *Sept4*-Isoformen erkennt.

In teilweisem Widerspruch zu den von Kinoshita *et al.* publizierten Befunden (s. o., Kinoshita *et al.*, 2000), die eine *Sept4*-Immunreaktivität in Astrocyten beschreiben, wurde eine *Sept4*-Expression in einer Reihe von neuronalen Zelltypen gefunden. In vielen dieser Neurone wurde auch die *Dyrk1A*-mRNA gefunden, so daß in Anbetracht der zwar nicht deckungsgleichen, aber deutlich überlappenden Expression dieser beiden Gene von einer teilweisen Koexpression von *Dyrk1A* und *Sept4* im Gehirn der adulten Maus gesprochen werden kann. Zumindest in Purkinje-Zellen wurden beide mRNAs innerhalb derselben Zellen nachgewiesen. Beide Gene wurden auch in Gliazellen exprimiert gefunden. Allerdings bedeutet diese Koexpression nicht unbedingt, daß die Proteine auch kolokalisieren und interagieren, da erstens nicht beide mRNAs auch zwangsläufig zu einem Protein translatiert werden müssen und zweitens die Proteine in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten vorkommen können. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine wurde deshalb anhand von EGFP-Fusionsproteinen näher untersucht.

Expression von Dyrk1A und Sept5

Die Expression von *Sept5* wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, jedoch kann aufgrund der Befunde von Kinoshita *et al.* (Kinoshita *et al.*, 2000), die eine weitverbreitete *Sept5*-Immunreaktivität im Gehirn der Maus und insbesondere auch in Regionen, in denen *Dyrk1A* vorkommt, davon ausgegangen werden, daß *Dyrk1A* und *Sept5* im Gehirn der Maus zumindest teilweise koexprimiert sind.

Expression von Dyrk1A und Arip4

Erstmals wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression von *Arip4* auf zellulärer Ebene untersucht. Dabei wurde eine weitgehende Überlappung mit der Expression von *Dyrk1A* in Hippocampus, Neocortex und Cerebellum in einer Reihe von neuronalen Zelltypen gefunden. Die Koexpression in diesen für kognitive und motorische Funktionen wichtigen Gehirnarealen ist ein weiteres Indiz für eine physiologisch relevante Interaktion von Dyrk1A und Arip4, welche auch im Zusammenhang mit dem Down-Syndrom eine bedeutende Rolle spielen könnte.

7.3.5.2 Intrazelluläre Lokalisation von Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 in neuronalen Primärkulturen und in HEK293-Zellen

Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 in neuronalen Primärkulturen

Dyrk1A, Sept4, Sept5 und Arip4 wurden als EGFP-Fusionen in Zellen neuronaler Primärkulturen aus dem Hippocampus der Ratte exprimiert, so daß ihre Lokalisation per Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden konnte. Der Zelltyp der erfolgreich transfizierten Zellen wurde nach morphologischen Gesichtspunkten beurteilt; so können Neurone mit ausreichender Sicherheit von Astrocyten unterschieden werden. Die Neurone stellen mit 95 % die weitaus größte Population in dieser Art neuronaler Primärkultur dar; zu 5 % kommen Gliazellen und andere Zellen wie undifferenzierte Vorläuferzellen vor (Reisert *et al.*, 1996). Die Bewertung der intrazellulären Lokalisation der Fusionsproteine geschah ausschließlich anhand transfizierter Zellen mit neuronaler Morphologie.

Für EGFP-Dyrk1A und EGFP-Arip4 wurde ausschließlich eine nukleäre Lokalisation gefunden. Beide sind offenbar in einer nukleären Substruktur konzentriert, da die Signale von Dyrk1A und Arip4 nicht homogen im Nukleus verteilt, sondern punktförmig konzentriert erscheinen. Diese Befunde decken sich mit denen von Becker *et al.* für EGFP-Dyrk1A in COS-7- und HEK293-Zellen (Becker *et al.*, 1998) bzw. Rouleau *et al.* für Arip4 in COS-1-Zellen (Rouleau *et al.*, 2002). Weiterhin deckt sich die subzelluläre Lokalisation des EGFP-Dyrk1A-Fusionsproteins gut mit der per Immunhistochemie an Gehirnschnitten dargestellten überwiegend nukleären Lokalisation von Dyrk1A in hippocampalen Neuronen (s. Abschnitt 6.1.2). Die Übereinstimmung der Muster der Signale von EGFP-Dyrk1A und EGFP-Arip4 legt nahe, daß diese in Neuronen kolokalisiert sind. Um diese Kolokalisation zu beweisen, wurden Zellen mit ECFP-/EYFP-Fusionsproteinen kotransfiziert und die Lokalisationen beider Proteine simultan untersucht (s. u. und Abbildung 6-32).

Im Gegensatz zu Dyrk1A und Arip4 wurden die EGFP-Fusionen der Septine Sept4 und Sept5 im Zytoplasma detektiert. Es konnte dabei keine besondere Konzentration in membrannahen Bereichen oder Axonendigungen festgestellt werden, wie beispielsweise Beites *et al.* nach Markierung von Sept5 mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern in PC12-Zellen beobachtet haben (Beites *et al.*, 1999). Diese Divergenz könnte in der starken Überexpression von Sept4 und -5 in den hier beschriebenen Experimenten unter Verwendung von Expressionsplasmiden mit CMV-Promotor (J.129 und J.151) begründet liegen, in der Verwendung eines unterschiedlichen Zelltyps oder der Verwendung einer immortalisierten Zelllinie im Falle von Beites *et al.* und von Primärkulturen im hier beschriebenen Falle. Nach Transfektion eines ähnlichen Konstruktes, allerdings mit einem mit dem C-Terminus von Sept5 fusionierten EGFP, fanden Beites *et al.* in HeLa-Zellen Pnut11-EGFP im Zytoplasma in fibrillärer Anordnung (Beites *et al.*, 2001). Da im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Sept4 und Sept5 keine Komarkierung beispielsweise von Syntaxin, einem in der präsynaptischen Membran lokalisierten t-SNARE, durchgeführt wurde, kann nicht eingeschätzt werden, inwieweit die Septine in den untersuchten Primärkulturen synaptisch lokalisiert sind.

Kolokalisation von Dyrk1A und Arip4 in HEK293-Zellen

Die Lokalisation von EGFP-Dyrk1A und EGFP-Arip4 in punktförmig erscheinenden Arealen in den Zellkernen transfizierter Zellen in neuronalen Primärkulturen deutete auf eine Kolokalisation beider Proteine hin. Um dies zu belegen, wurde die Lokalisation von ECFP-Dyrk1A und EYFP-Arip4 bzw. ECFP-Arip4 und EYFP-Dyrk1A in HEK-Zellen per konfokaler *Laser scanning*-Mikroskopie untersucht. Es konnte so gezeigt werden, daß die Dyrk1A- und Arip4-Fusionsproteine in verschiedenen nukleären Strukturen zumindest teilweise kolokalisieren: in kugelförmigen Arealen, in länglichen, schlangenartigen Strukturen, die sich, wie eine dreidimensionale Analyse ergab, durch den Zellkern hindurchwinden, sowie diffus verteilt im gesamten Nukleus. Beide Proteine kommen allerdings in geringem Maße auch alleine in kugelförmigen Aggregaten vor. In den länglich-schlangenartigen Strukturen konnte Dyrk1A nur nach Kotransfektion mit Arip4 beobachtet werden, Arip4 dagegen auch alleine als GFP-Fusionsprotein (s. Abbildung 6-31). Dies deutet darauf hin, daß Dyrk1A durch die Bindung an Arip4 umverteilt wird, was ein weiterer Beweis für die Interaktion dieser beiden Proteine wäre. Ein interessanter Befund erscheint, daß in den transfizierten Neuronen EGFP-Arip4 ausschließlich in punktförmigem Muster gefunden wurde. Außerdem sind die Dyrk1A- und Arip4-Fusionsproteine in HEK-Zellen im Kern einer Zelle immer nur in einem Muster vorhanden; die punktförmigen und die schlangenartigen Signale kommen nicht nebeneinander vor. Dies deutet darauf hin, daß diese Strukturen von bestimmten Zuständen der Zelle, wie beispielsweise dem Stadium des Zellzyklus, abhängig sind. Ein solcher

Zusammenhang würde auch das Fehlen der länglich-schlängenartigen Strukturen in den postmitotischen primären Neuronen erklären. Zur Klärung der Identität und Zusammensetzung der punkt- und schlängenförmigen nukleären Strukturen sind weitere Untersuchungen geplant, die Hinweise auf die Bedeutung der Lokalisation von Dyrk1A und Arip4 geben sollten.

Die ähnliche Lokalisation von Dyrk1A und Arip4 in neuronalen Primärkulturen und die Kolokalisation beider in HEK-Zellen sind im Zusammenhang mit der hier gezeigten physikalischen Interaktion sowie der Koexpression der entsprechenden Gene im Gehirn der Maus starke Hinweise auf eine physiologisch relevante Interaktion dieser beiden Proteine.

7.3.6 Zur Relevanz der Interaktion zwischen Dyrk1A und den Septinen

Es konnte hier keine Kolokalisation von Dyrk1A mit den Septinen Sept4 und Sept5 festgestellt werden. Dies stellt die Relevanz der in der Hefe gefundenen und in HEK293-Zellen bestätigten Interaktion zumindest teilweise in Frage, bedeutet aber nicht, daß Dyrk1A definitiv nicht mit den Septinen interagiert, da es einerseits eine Reihe von Hinweisen darauf gibt, daß Dyrk1A auch im Zytoplasma vorkommen kann, andererseits auch nukleäre Septine beschrieben wurden.

Eine zytoplasmatische Lokalisation von Dyrk1A zeigen neben der in dieser Arbeit beschriebenen immunhistochemischen Untersuchung auch Bartsch *et al.*, die Dyrk1A in undifferenzierten PC12-Zellen und in nicht stimulierten hippocampalen Neuronen von Mäusen (s. 2.2.5) im Zytoplasma finden (Bartsch *et al.*, 1998). Außerdem deuten die Befunde von Chen-Hwang *et al.*, die die physikalische und funktionelle Interaktion von Dyrk1A mit Dynamin zeigen, auf eine zytoplasmatische Funktion von Dyrk1A hin. Zytoplasmatisch lokalisiertes Dyrk1A könnte so mit den Septinen auch *in vivo* interagieren und deren Funktion beeinflussen. Damit würde Dyrk1A eventuell an zwei Stellen regulierend in den Kreislauf von Vesikelfusion, Transmitterfreisetzung und Vesikelrecycling eingreifen: einerseits durch Phosphorylierung von Dynamin in ruhenden Neuronen, wie Chen-Hwang *et al.* vorschlagen (Chen-Hwang *et al.*, 2002), andererseits durch Interaktion mit den Septinen, wie sie in dieser Arbeit gefunden wurde.

Vorstellbar wäre neben einer Interaktion von Dyrk1A mit Septinen im Zytoplasma andererseits auch eine im Zellkern, und zwar mit einer nukleären Form von Sept4 wie der Variante 5 (ARTS), die in Mitochondrien lokalisiert ist und in apoptotischen Zellen in den Nukleus transloziert (Larisch *et al.*, 2000). SEPT4_v5²⁰ ist in der Lage, den Effekt von proapoptischen Stimuli zu verstärken und Caspase 3 zu aktivieren. Aus einer Sept4_v5-

²⁰ Von SEPT4_v5/ARTS ist bisher nur die humane Form beschrieben.

Dyrk1A-Interaktion ergäbe sich die Möglichkeit, daß eine Funktion von Dyrk1A die Regulation der Apoptose ist. Es ist zwar davon auszugehen, daß die hier in der *Yeast two-hybrid*-Suche gefundene Sept4-Variante 7 zytoplasmatisch lokalisiert ist, die mit Dyrk1A interagierende Domäne von Sept4 – der von DI1 kodierte Bereich mit einer²¹ Dyrk1A-Substrat-Konsensussequenz – ist allerdings auch in der Variante 5 größtenteils enthalten.

7.3.7 Funktionelle Analyse der Interaktion zwischen Dyrk1A und Arip4: aktueller Stand und Ausblick

Zur funktionellen Analyse der Interaktion zwischen Dyrk1A und Arip4 werden zur Zeit Reporter-Experimente durchgeführt. In diesen soll ein eventueller Einfluß von Dyrk1A auf Steroidhormon-Rezeptor-vermittelte Transaktivierung untersucht werden. Es sollen dabei neben dem Androgen-Rezeptor (AR) und dem Östrogen-Rezeptor, deren Beeinflussung durch Arip4 von Rouleau *et al.* gezeigt wurde (Rouleau *et al.*, 2002), auch andere Steroidhormon-Rezeptoren wie beispielsweise der Glucocorticoid-Rezeptor zum Einsatz kommen. Eine Beeinflussung der Androgen- und Östrogen-vermittelten Signaltransduktion durch Dyrk1A würde wegen der vielfältigen Rollen dieser Hormone und ihrer Rezeptoren im Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisprozessen (Übersicht in Dohanich, 2002) auch die These unterstützen, daß Dyrk1A eine wichtige Rolle in kognitiven Prozessen spielt.

Erste Experimente mit Arip4 und AR zeigten eine Inhibition der Androgen-abhängigen Transaktivierung durch das im Rahmen dieser Arbeit klonierte Arip4-Konstrukt aus den cDNAs von Maus und Mensch. Dies belegt die Funktionsfähigkeit der Chimäre. Über eine Beeinflussung der Funktion von Arip4 durch Dyrk1A liegen zur Zeit noch keine Daten vor.

7.4 Hinweise zur Funktion von Dyrk1A in physiologischen und pathophysiologischen Zuständen

In der hier beschriebenen Arbeit wurde die Interaktion von Dyrk1A mit der Chromatin-modellierenden ATPase Arip4 – einem Steroidhormon-Rezeptor-Kofaktor – gezeigt. Diese Interaktion stellt erstmals einen Zusammenhang zwischen Dyrk1A und der Steroidhormon-vermittelten Signaltransduktion her. So scheint Dyrk1A eine Reihe von Signaltransduktionskaskaden und insbesondere Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen: Neben STAT3, CREB, FKHR und Gli1 (s. Einleitung) auch Steroidhormon-Rezeptoren wie

²¹ Das humane SEPT4 weist im Gegensatz zum Sept4 der Maus nur eine Dyrk1A-Substrat-Konsensussequenz auf.

den Androgen-Rezeptor und den Östrogen-Rezeptor, deren Aktivität durch Arip4 beeinflusst wird (Rouleau *et al.*, 2002). Welche Rolle diese Interaktion spielt, ist zur Zeit noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Ebenso ist ungeklärt, welche die relevanten Interaktoren von Dyrk1A im gesunden, euploiden Organismus und in aneuploiden Zuständen wie der Trisomie 21 sind. Hier sollte ein Maus-Modell wie die in dieser Arbeit geplante *Dyrk1A* konditional überexprimierende Mauslinie Möglichkeiten bieten, eine eventuelle Dysregulation der unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden, die Dyrk1A beeinflusst, zu untersuchen. Dies wiederum würde maßgeblich zum Verständnis der molekularen und zellulären Mechanismen beitragen, die den kognitiven Defiziten von Down-Syndrom-Individuen zugrunde liegen, und so langfristig auch neue Ansatzpunkte zu einer möglichen Therapie liefern.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Altafaj, X. *et al.* (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.
- Antonarakis, S. E., Lyle, R., Chrast, R., Scott, H. S. (2001). Differential gene expression studies to explore the molecular pathophysiology of Down syndrome. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **36**, 265-274.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1999). Short Protocols in Molecular Biology. (New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Inc.).
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliot, M., Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors; an update. *Biochem. J.*, im Druck.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11984-11989.
- Bartsch, D., Patterson, S., Karl, K. A., Yang, X., Chen, A., Kandel, E. R. (1998): Transgenic model of memory deficit in Down syndrome: Role of the minibrain kinase. *Soc. Neurosci. Abstract* **24**.
- Baumgärtel, K. (2002): Charakterisierung von Interaktionspartnern der Kinase Dyrk1A. *Diplomarbeit des Fachbereiches Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Baxter, L. L., Moran, T. H., Richtsmeier, J. T., Troncoso, J., Reeves, R. H. (2000). Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 195-202.
- 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., Weber, Y., Wetzelschöner, K., Eirambter, 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.
- Beites, C. L., Peng, X. R., Trimble, W. S. (2001). Expression and analysis of properties of septin CDCrel-1 in exocytosis. *Methods Enzymol.* **329**, 499-510.
- Beites, C. L., Xie, H., Bowser, R., Trimble, W. S. (1999). The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat. Neurosci.* **2**, 434-439.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

- Blencowe, B. J. (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 106-110.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* **35**, 567-576.
- Brodin, L., Low, P., Shupliakov, O. (2000). Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 312-320.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.
- Caltagarone, J., Rhodes, J., Honer, W. G., Bowser, R. (1998). Localization of a novel septin protein, hCDCrel-1, in neurons of human brain. *Neuroreport* **9**, 2907-2912.
- 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.
- Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859-869.
- Carlesimo, G. A., Marotta, L., Vicari, S. (1997). Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome. *Neuropsychologia* **35**, 71-79.
- Chang, L. & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- 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.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2745-2752.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chrast, R., Scott, H. S., Madani, R., Huber, L., Wolfer, D. P., Prinz, M., Aguzzi, A., Lipp, H. P., Antonarakis, S. E. (2000). Mice trisomic for a bacterial artificial chromosome with the single-minded 2 gene (Sim2) show phenotypes similar to some of those present in the partial trisomy 16 mouse models of Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1853-1864.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175.
- Cooper, J. A. & Kiehart, D. P. (1996). Septins may form a ubiquitous family of cytoskeletal filaments. *J. Cell Biol.* **134**, 1345-1348.
- Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L., Peterson, C. L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**, 53-60.
- Dahmane, N. *et al.* (1998). Transcriptional map of the 2.5-Mb CBR-ERG region of chromosome 21 involved in Down syndrome. *Genomics* **48**, 12-23.
- Daoud, R., Da Penha, B., Siedler, F., Hubener, M., Stamm, S. (1999). Activity-dependent regulation of alternative splicing patterns in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 788-802.

- 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.
- Depraetere, V. (2000). The ARTS of apoptosis. *Nat. Cell. Biol.* **2**, E219.
- Dierssen, M., Fillat, C., Crnic, L., Arbones, M., Florez, J., Estivill, X. (2001). Murine models for Down syndrome. *Physiol. Behav.* **73**, 859-871.
- Dohanich, G. (2002): Gonadal steroids, learning and memory. In: Hormones, Brain and Behaviour, D. W. Pfaff, A. Arnold, A. M. Etgen, S. E. Fahrbach, and R. T. Rubin, eds. (San Diego / London: Academic Press), pp. 265-327.
- Egel, R., Beach, D. H., Klar, A. J. (1984). Genes required for initiation and resolution steps of mating-type switching in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3481-3485.
- Eisen, J. A., Sweder, K. S., Hanawalt, P. C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2715-2723.
- Ema, M., Ikegami, S., Hosoya, T., Mimura, J., Ohtani, H., Nakao, K., Inokuchi, K., Katsuki, M., Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Mild impairment of learning and memory in mice overexpressing the mSim2 gene located on chromosome 16: an animal model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1409-1415.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von, H. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005-1016.
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J., Muller, G. A. (1993). Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations. *Anal. Biochem.* **210**, 235-244.
- Epstein, C. J. (1995): Down Syndrome (Trisomy 21). In: The metabolic and molecular bases of inherited disease, C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 749-794.
- Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Vallina, I. F., Baamonde, C., Lumbreras, M. A., Dierssen, M., Tobena, A., Florez, J. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci. Lett.* **199**, 143-146.
- Escorihuela, R. M., Vallina, I. F., Martinez, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobena, A., Florez, J., Fernandez, T. (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci. Lett.* **247**, 171-174.
- Feiss, M., Kobayashi, I., Widner, W. (1983a). Separate sites for binding and nicking of bacteriophage lambda DNA by terminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 955-959.
- Feiss, M., Widner, W., Miller, G., Johnson, G., Christiansen, S. (1983b). Structure of the bacteriophage lambda cohesive end site: location of the sites of terminase binding (cosB) and nicking (cosN). *Gene* **24**, 207-218.
- Field, C. M. & Kellogg, D. (1999). Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol.* **9**, 387-394.
- Fields, S. & Bartel, P. L. (1997): The two-hybrid system: a personal view. In: The Yeast Two-Hybrid System, P. L. Bartel and S. Fields, eds. (New York: Oxford University Press), pp. 3-7.

- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcantara, S., Martinez, S., Marti, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., Arbones, M. L. (2002). Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol. Cell Biol.* **22**, 6636-6647.
- Frengen, E., Weichenhan, D., Zhao, B., Osoegawa, K., van Geel, M., de Jong, P. (1999): A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics* **58**, 250-253.
- Funke, B. *et al.* (2001). Mice overexpressing genes from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome have middle and inner ear defects. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2549-2556.
- Galdzicki, Z., Siarey, R., Pearce, R., Stoll, J., Rapoport, S. I. (2001). On the cause of mental retardation in Down syndrome: extrapolation from full and segmental trisomy 16 mouse models. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **35**, 115-145.
- Giraldo, P. & Montoliu, L. (2001). Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res.* **10**, 83-103.
- Gitton, Y. *et al.* (2002). A gene expression map of human chromosome 21 orthologues in the mouse. *Nature* **420**, 586-590.
- Gladfelter, A. S., Pringle, J. R., Lew, D. J. (2001). The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 681-689.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74.
- Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., Pritchard, M. (1999). Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* **57**, 407-418.
- Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, 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.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Miller, G., Zimmer, A. (1999). The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. *J. Mol. Med.* **77**, 459-468.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Harlow, E. & Lane, D. (1999). Using Antibodies. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hartley, A. D., Ward, M. P., Garrett, S. (1994). The Yak1 protein kinase of Saccharomyces cerevisiae moderates thermotolerance and inhibits growth by an Sch9 protein kinase- independent mechanism. *Genetics* **136**, 465-474.
- Hartwell, L. H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* **69**, 265-276.
- Hattori, M. *et al.* (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* **405**, 311-319.
- Havas, K., Whitehouse, I., Owen-Hughes, T. (2001). ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 673-682.

- Hazuka, C. D., Foletti, D. L., Hsu, S. C., Kee, Y., Hopf, F. W., Scheller, R. H. (1999). The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse- assembly domains. *J. Neurosci.* **19**, 1324-1334.
- Hämmerle, B., Vera-Samper, E., Speicher, S., Arencibia, R., Martinez, S., Tejedor, F. J. (2002). Mnb/Dyrk1A is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells at the transition to neurogenic divisions. *Dev. Biol.* **246**, 259-273.
- Heisenberg, M. & Böhl, K. (1979). Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z. Naturforsch.* **34**, 143-147.
- Higgins, R. R., Lucko, H. J., Becker, A. (1988). Mechanism of cos DNA cleavage by bacteriophage lambda terminase: multiple roles of ATP. *Cell* **54**, 765-775.
- Himpel, S. *et al.* (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.
- Hirschhorn, J. N., Brown, S. A., Clark, C. D., Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.* **6**, 2288-2298.
- Honer, W. G., Hu, L., Davies, P. (1993). Human synaptic proteins with a heterogeneous distribution in cerebellum and visual cortex. *Brain Res.* **609**, 9-20.
- Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Cerreti, D. P., Urdal, D. L., Conlon, P. J. (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* **6**, 1204-1210.
- Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Foletti, D. L., Scheller, R. H. (1999). Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol.* **9**, 150-153.
- Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Roth, R., Foletti, D. L., Heuser, J., Scheller, R. H. (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* **20**, 1111-1122.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**, 1693-1696.
- Jahn, R. & Südhof, T. C. (1999): Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 863-911.
- Jones, M. D. (1993). Reverse transcription of mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase followed by polymerase chain reaction amplification. *Methods Enzymol.* **218**, 413-419.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030-1038.
- Kartmann, B. & Roth, D. (2001). Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J. Cell Sci.* **114**, 839-844.
- Kato, K. (1990). A Collection of cDNA Clones with Specific Expression Patterns in Mouse Brain. *Eur. J. Neurosci.* **2**, 704-711.
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schrmann, 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.
- Khavari, P. A., Peterson, C. L., Tamkun, J. W., Mendel, D. B., Crabtree, G. R. (1993). BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature* **366**, 170-174.
- Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., Cobb, M. H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**, 605-615.
- Kingston, R. E. & Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* **13**, 2339-2352.
- Kinoshita, A., Kinoshita, M., Akiyama, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Kumar, S., Noda, M., Kimura, J. (1998). Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **153**, 1551-1560.
- Kinoshita, A., Noda, M., Kinoshita, M. (2000). Differential localization of septins in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **428**, 223-239.
- Kinoshita, M., Kumar, S., Mizoguchi, A., Ide, C., Kinoshita, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Noda, M. (1997). Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes. Dev.* **11**, 1535-1547.
- Kola, I. & Pritchard, M. (1999). Animal models of Down syndrome. *Mol. Med. Today* **5**, 276-277.
- Korenberg, J. R. (1995). Mental modelling. *Nat. Genet.* **11**, 109-111.
- Korenberg, J. R. *et al.* (1994). Down syndrome phenotypes: The consequences of chromosomal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4997-5001.
- Kwan, K. M. (2002). Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* **32**, 49-62.
- Kwon, H., Imbalzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E., Green, M. R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* **370**, 477-481.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langdon-Down, J. L. H. (1866). Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hospital Clinical Lecture Reports* **3**, 259-262.
- Larisch-Bloch, S., Danielpour, D., Roche, N. S., Lotan, R., Hsing, A. Y., Kerner, H., Hajouj, T., Lechleider, R. J., Roberts, A. B. (2000). Selective loss of the transforming growth factor-beta apoptotic signaling pathway in mutant NRP-154 rat prostatic epithelial cells. *Cell Growth Differ.* **11**, 1-10.
- Larisch, S. *et al.* (2000). A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat. Cell Biol.* **2**, 915-921.
- Laurent, B. C., Treich, I., Carlson, M. (1993). The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.* **7**, 583-591.

- 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.
- Lejeune, J. & Gautier, M. T. R. (1959). Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C. R. Acad. Sci. Paris* **248**, 1721-1722.
- Levy, D. E. & Darnell, J. E. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 651-662.
- Li, B. & Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**, 957-963.
- Longtine, M. S., DeMarini, D. J., Valencik, M. L., Al Awar, O. S., Fares, H., De Virgilio, C., Pringle, J. R. (1996). The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 106-119.
- Lonze, B. E. & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* **35**, 605-623.
- Lonze, B. E., Riccio, A., Cohen, S., Ginty, D. D. (2002). Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* **34**, 371-385.
- Macara, I. G. *et al.* (2002). Mammalian septins nomenclature. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4111-4113.
- Magdaleno, S. M. & Curran, T. (1999). Gene dosage in mice--BAC to the future. *Nat. Genet.* **22**, 319-320.
- 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.
- 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.
- Mayr, B. & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 599-609.
- McKie, J. M., Sutherland, H. F., Harvey, E., Kim, U. J., Scambler, P. J. (1997). A human gene similar to *Drosophila melanogaster* peanut maps to the DiGeorge syndrome region of 22q11. *Hum. Genet.* **101**, 6-12.
- McPherson, P. S. (1999). Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. *Cell Signal* **11**, 229-238.
- Meijer, H. A. & Thomas, A. A. (2002). Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem. J.* **367**, 1-11.
- Miwa, T. & Matsubara, K. (1983). Lambda phage DNA sequences affecting the packaging process. *Gene* **24**, 199-206.
- Mohr, E. & Richter, D. Axonal mRNAs: functional significance in vertebrates and invertebrates. *J. Neurocytol.* **29**, 783-791.
- Morimoto, B. H. & Koshland, D. E., Jr. (1990). Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3518-3521.
- Morishima, K., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K., Ihara, Y. (1995). Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.* **270**, 823-829.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263-273.
- Mural, R. J. *et al.* (2002). A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science* **296**, 1661-1671.
- Nagase, T., Ishikawa, K., Suyama, M., Kikuno, R., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., Ohara, O. (1998). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XI. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* **5**, 277-286.
- Nakamura, A., Hattori, M., Sakaki, Y. (1997). Isolation of a novel human gene from the Down syndrome critical region of chromosome 21q22.2. *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 872-877.
- Narayanan, K., Williamson, R., Zhang, Y., Stewart, A. F., Ioannou, P. A. (1999). Efficient and precise engineering of a 200 kb beta-globin human/bacterial artificial chromosome in *E. coli* DH10B using an inducible homologous recombination system. *Gene Ther.* **6**, 442-447.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y., Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-487.
- Neufeld, T. P. & Rubin, G. M. (1994). The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* **77**, 371-379.
- Ohira, M. *et al.* (1997). Gene identification in 1.6-Mb region of the Down syndrome region on chromosome 21. *Genome Res.* **7**, 47-58.
- Okui, M., Ide, T., Morita, K., Funakoshi, E., Ito, F., Ogita, K., Yoneda, Y., Kudoh, J., Shimizu, N. (1999). High-level expression of the *Mnb/Dyrk1A* gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* **62**, 165-171.
- Oliver, S. (2000). Guilt-by-association goes global. *Nature* **403**, 601-603.
- Osoegawa, K., Tateno, M., Woon, P. Y., Frengen, E., Mammoser, A. G., Catanese, J. J., Hayashizaki, Y., de Jong, P. (2000). Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res.* **10**, 116-128.
- Osoegawa, K., Woon, P. Y., Zhao, B., Frengen, E., Tateno, M., Catanese, J. J., de Jong, P. (1998). An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics* **52**, 1-8.
- Parisi, M. J. & Lin, H. (1998). The role of the hedgehog/patched signaling pathway in epithelial stem cell proliferation: from fly to human. *Cell Res.* **8**, 15-21.
- Pazin, M. J. & Kadonaga, J. T. (1997). SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell* **88**, 737-740.
- Peng, X. R., Jia, Z., Zhang, Y., Ware, J., Trimble, W. S. (2002). The septin CDCrel-1 is dispensable for normal development and neurotransmitter release. *Mol. Cell Biol.* **22**, 378-387.
- Peterson, C. L. & Workman, J. L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 187-192.
- Picketts, D. J., Higgs, D. R., Bachoo, S., Blake, D. J., Quarrell, O. W., Gibbons, R. J. (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1899-1907.

- Rahmani, Z., Blouin, J. L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P. C., Mattei, J. F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A. (1989). Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5958-5962.
- Rahmani, Z., Blouin, J. L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P. C., Mattei, J. F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A. (1990): Down syndrome critical region around D21S55 on proximal 21q22.3. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* **7**, 98-103.
- Rahmani, Z., Lopes, C., Rachidi, M., Delabar, J. M. (1998). Expression of the *mnB* (*dyrk*) protein in adult and embryonic mouse tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 514-518.
- Raleigh, E. A., Murray, N. E., Revel, H., Blumenthal, R. M., Westaway, D., Reith, A. D., Rigby, P. W., Elhai, J., Hanahan, D. (1988). *McrA* and *McrB* restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1563-1575.
- Raz, N., Torres, I. J., Briggs, S. D., Spencer, W. D., Thornton, A. E., Loken, W. J., Gunning, F. M., McQuain, J. D., Driesen, N. R., Acker, J. D. (1995). Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: Evidence from MRI morphometry. *Neurology* **45**, 356-366.
- Reeves, R. H., Irving, N. G., Moran, T. H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S. S., Schmidt, C., Bronson, R. T., Davisson, M. T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* **11**, 177-184.
- Reisert, I., Lieb, K., Beyer, C., Pilgrim, C. (1996). Sex differentiation of rat hippocampal GABAergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1718-1724.
- Repp, A. C. & Karsh, K. G. (1994). Hypothesis-based interventions for tantrum behaviors of persons with developmental disabilities in school settings. *J. Appl. Behav. Anal.* **27**, 21-31.
- Reymond, A. *et al.* (2002). Human chromosome 21 gene expression atlas in the mouse. *Nature* **420**, 582-586.
- Rogers, D. C., Fisher, E. M., Brown, S. D., Peters, J., Hunter, A. J., Martin, J. E. (1997). Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm. Genome* **8**, 711-713.
- Rouleau, N., Domans'kyi, A., Reeben, M., Moilanen, A. M., Havas, K., Kang, Z., Owen-Hughes, T., Palvimo, J. J., Jänne, O. A. (2002). Novel ATPase of SNF2-like Protein Family Interacts with Androgen Receptor and Modulates Androgen-dependent Transcription. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2106-2119.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minoshima, S., Shimizu, Y., Shimizu, N. (1996). Cloning of a human homolog of the *Drosophila* *minibrain*/rat *Dyrk* gene from the Down syndrome critical region of chromosome 21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 92-99.
- Silva, A. J. & Giese, K. P. (1998): Gene targeting: A novel window into the biology of learning and memory. In: *Neurobiology of learning and memory*, J. L. Martinez and R. P. Kesner, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 89-142.
- Smith, D. J. & Rubin, E. M. (1997b). Functional screening and complex traits: human 21q22.2 sequences affecting learning in mice. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1729-1733.

- Smith, D. J. & Rubin, E. M. (1997a). Functional screening and complex traits: human 21q22.2 sequences affecting learning in mice. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1729-1733.
- Smith, D. J. *et al.* (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, D. J., Zhu, Y., Zhang, J., Cheng, J. F., Rubin, E. M. (1995). Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21q22.2. *Genomics* **27**, 425-434.
- 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.
- Song, W. J. *et al.* (1996). Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". *Genomics* **38**, 331-339.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spector, D. L., Goldman, R. D., Leinwand, L. A. (1998). *Cells; Culture and Biochemical Analysis of Cells.* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sung, J. Y., Shin, S. W., Ahn, Y. S., Chung, K. C. (2001). Basic fibroblast growth factor-induced activation of novel CREB kinase during the differentiation of immortalized hippocampal cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 13858-13866.
- Tamkun, J. W., Dearing, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C., Kennison, J. A. (1992). brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**, 561-572.
- 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.
- Toda, S., Kajii, Y., Sato, M., Nishikawa, T. (2000). Reciprocal expression of infant- and adult-preferring transcripts of CDCrel-1 septin gene in the rat neocortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 723-728.
- Toftgard, R. (2000). Hedgehog signalling in cancer. *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 1720-1731.
- Toyoda, A., Noguchi, H., Taylor, T. D., Ito, T., Pletcher, M. T., Sakaki, Y., Reeves, R. H., Hattori, M. (2002). Comparative genomic sequence analysis of the human chromosome 21 Down syndrome critical region. *Genome Res.* **12**, 1323-1332.
- Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., Mayford, M., Kandel, E. R., Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* **87**, 1317-1326.
- Tsuchiya, E., Hosotani, T., Miyakawa, T. (1998). A mutation in NPS1/STH1, an essential gene encoding a component of a novel chromatin-remodeling complex RSC, alters the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae* centromeres. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3286-3292.
- Vicari, S., Bellucci, S., Carlesimo, G. A. (2000). Implicit and explicit memory: a functional dissociation in persons with Down syndrome. *Neuropsychologia* **38**, 240-251.

- Ward, W. W. & Cormier, M. J. (1979). An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* **254**, 781-788.
- Waterston, R. H. *et al.* (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562.
- Weeber, E. J. & Sweatt, J. D. (2002). Molecular neurobiology of human cognition. *Neuron* **33**, 845-848.
- Wei, J., Hodes, M. E., Piva, R., Feng, Y., Wang, Y., Ghetti, B., Dlouhy, S. R. (1998). Characterization of murine Girk2 transcript isoforms: structure and differential expression. *Genomics* **51**, 379-390.
- Welsh, G. I., Miyamoto, S., Price, N. T., Safer, B., Proud, C. G. (1996). T-cell activation leads to rapid stimulation of translation initiation factor eIF2B and inactivation of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* **271**, 11410-11413.
- Wen, Z. & Darnell, J. E. (1997). Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2062-2067.
- Wen, Z., Zhong, Z., Darnell, J. E. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241-250.
- Wigge, P. & McMahon, H. T. (1998). The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci.* **21**, 339-344.
- Wisniewski, K. E. (1990). Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* **7**, 274-281.
- Woods, Y. L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., Proud, C. G. (2001a). 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., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T. G., Cohen, P. (2001b). The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem. J.* **355**, 597-607.
- Xie, H., Surka, M., Howard, J., Trimble, W. S. (1999). Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* **43**, 52-62.
- 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. W., Model, P., Heintz, N. (1997). Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. Biotechnol.* **15**, 859-865.
- Yoshinaga, S. K., Peterson, C. L., Herskowitz, I., Yamamoto, K. R. (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* **258**, 1598-1604.
- Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P. S., Grinstein, S., Trimble, W. S. (1999). Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol.* **9**, 1458-1467.

- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. P., Stewart, F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* **20**, 123-128.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K. K., Huang, H., Dawson, V. L., Dawson, T. M. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13354-13359.
- Zieger, B., Tran, H., Hainmann, I., Wunderle, D., Zgaga-Griesz, A., Blaser, S., Ware, J. (2000). Characterization and expression analysis of two human septin genes, PNUTL1 and PNUTL2. *Gene* **261**, 197-203.

9 ANHANG

9.1 Plasmidkarten

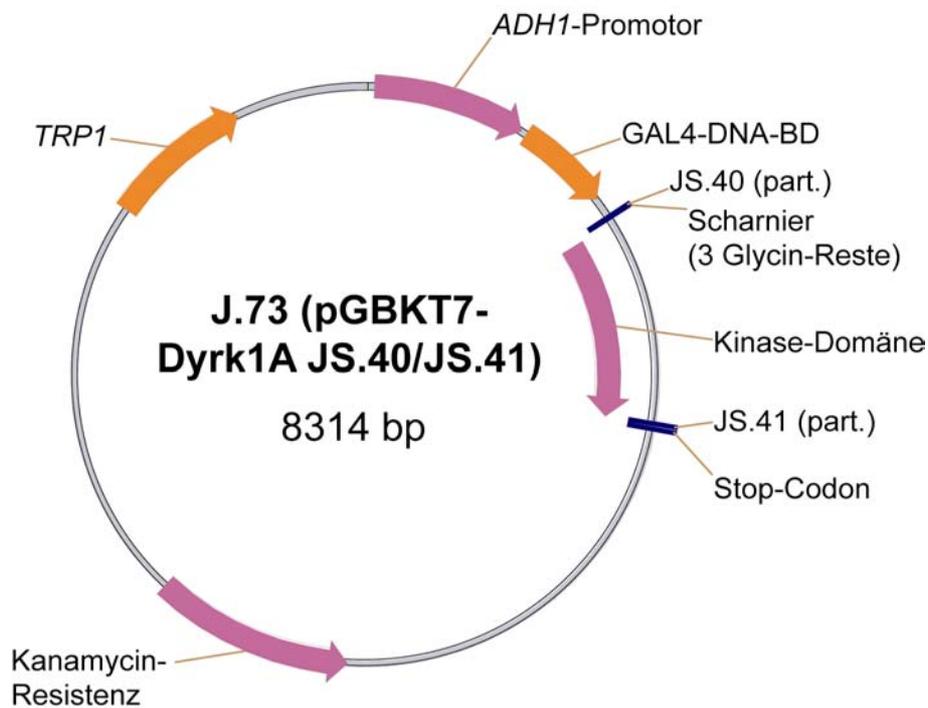


Abbildung 9-1: Karte des Plasmids J.73 (pGBKT7-Dyrk1A JS.40/JS.41)

Eingezeichnet sind alle wichtigen Elemente des Konstrukts: das *TRP1*-Gen für die Selektion in Hefen, die Kanamycin-Resistenz für die Selektion in *E. coli*, die GAL4-DNA-BD und die Dyrk1A-Kinase-Domäne. GAL4-DNA-BD und Dyrk1A-Kinase-Domäne werden als Fusionsprotein, verbunden durch 3 Glycin-Reste, unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimiert. part.: partiell, d. h. ein Teil des zur Amplifikation und Klonierung verwendeten Primers kommt nicht im Konstrukt vor.

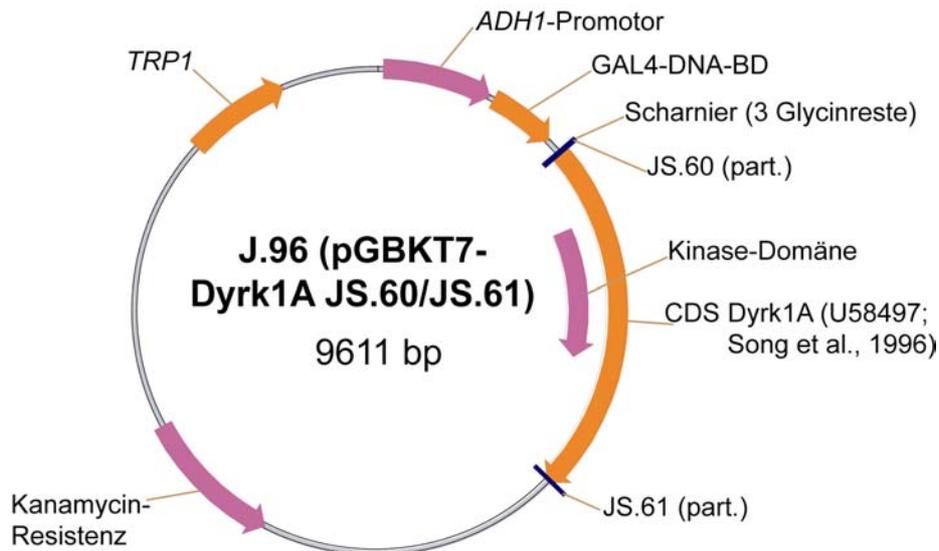


Abbildung 9-2: Karte des Plasmids J.96 (pGBKT7-Dyrk1A JS.60/JS.61)

Eingezeichnet sind alle wichtigen Elemente des Konstrukts: das *TRP1*-Gen für die Selektion in Hefen, die Kanamycin-Resistenz für die Selektion in *E. coli*, die GAL4-DNA-BD, die für Dyrk1A kodierende Sequenz (CDS) und die für die Dyrk1A-Kinase-Domäne kodierende Sequenz. GAL4-DNA-BD und Dyrk1A werden als Fusionsprotein, verbunden durch 3 Glycin-Reste, unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimiert. Dieses Konstrukt verfügt, ebenso wie J.98 (s. u.), über das Exon 6a. part.: partiell, d. h. ein Teil des zur Amplifikation und Klonierung verwendeten Primers kommt nicht im Konstrukt vor.

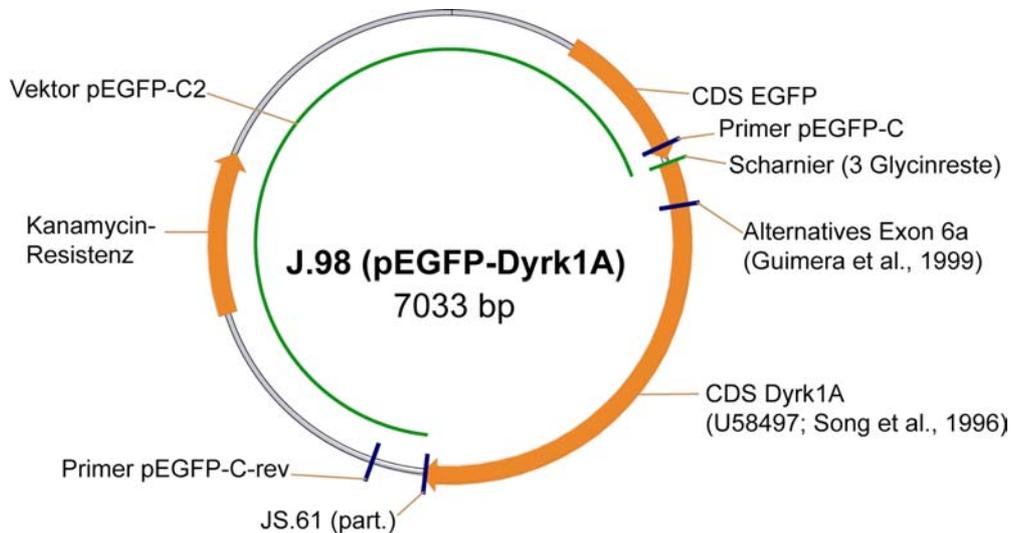


Abbildung 9-3: Karte des Plasmids J.98 (pEGFP-Dyrk1A)

Eingezeichnet sind alle wichtigen Elemente des Konstrukts: die Kanamycin-Resistenz für die Selektion in *E. coli*, die für Dyrk1A kodierende Sequenz (CDS) und die für EGFP kodierende Sequenz. EGFP und Dyrk1A werden als Fusionsprotein, verbunden durch 3 Glycin-Reste, translatiert. Die Konstrukte J.129 (pEGFP-Sept4) und J.151 (pEGFP-Sept5) basieren auf dem gleichen Vektor, sie enthalten allerdings die *Sept4*- bzw. die *Sept5*-cDNA. Diese Konstrukte weisen im Gegensatz zu J.98 kein Scharnier von 3 Glycinresten zwischen EGFP und dem zweiten Protein auf.

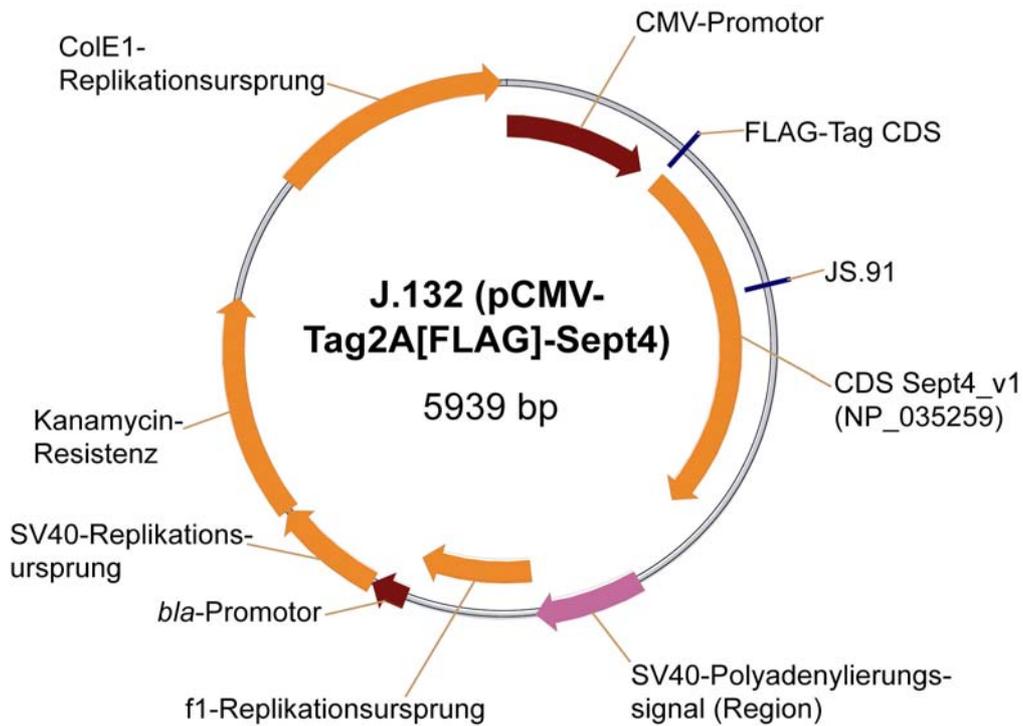


Abbildung 9-4: Karte des Plasmids J.132 (pCMV-Tag2A[FLAG]-Sept4)

Eingezeichnet sind alle wichtigen Elemente des Konstrukts: die Kanamycin-Resistenz für die Selektion in *E. coli*, die für Sept4 kodierende Sequenz (CDS) und die für das FLAG-Peptid kodierende Sequenz. FLAG-Peptid und Sept4 werden als Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Die Konstrukte J.131 (pCMV-Tag2A[FLAG]-Dyrk1A), J.133 (pCMV-Tag2A[FLAG]-Sept5) und J.150 (pCMV-Tag2A[FLAG]-Arip4) besitzen den gleichen Vektor, anstelle der Sept4-cDNA enthalten sie allerdings die von *Dyrk1A*, *Sept5* bzw. *Arip4*.

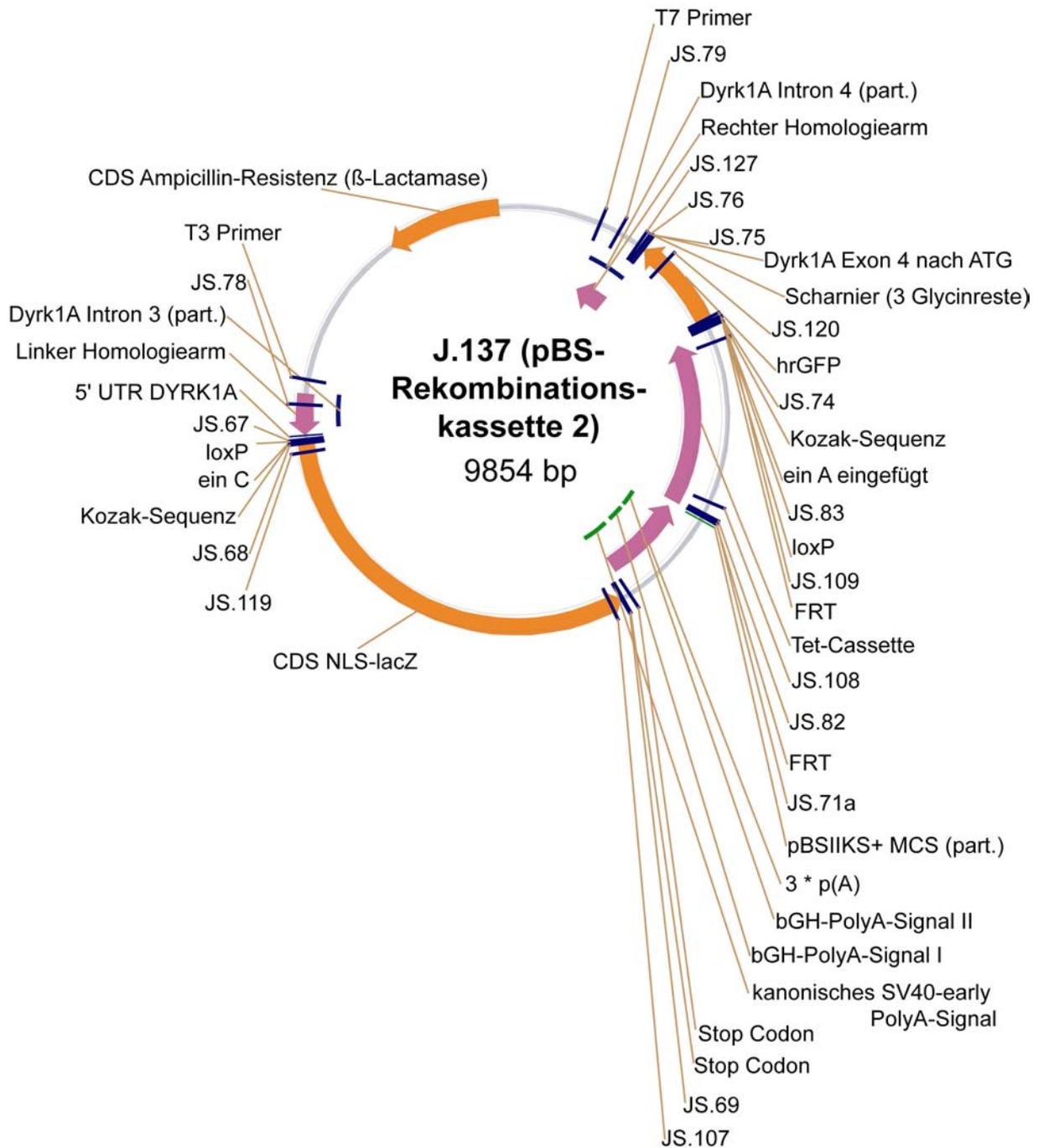


Abbildung 9-5: Karte des Plasmids J.137 (pBS-Rekombinationskassette 2) mit allen Elementen der Rekombinationskassette 2

CDS: kodierende Sequenz; part.: partiell

9.2 Sequenzen

9.2.1 Sequenz von Sept4_v7 (cDNA und Protein)

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

1 M I K H F L E D S S D D A E L S K ·
CATGATCAAG CACTTCCTGG AGGACAGCAG TGATGATGCT GAGCTGAGCA

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

51 · F V K D F P G S E P Y H S A E S
AGTTTCGTGAA GGATTTCCCA GGAAGCGAAC CCTACCACTC AGCGGAGTCC

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

101 K T R V A R P Q I L E P R P Q S P ·
AAGACAAGGG TGGCCAGGCC CCAGATCTTG GAGCCAAGGC CCCAGAGCCC

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

151 · D L C D D D V E F R G S L W P Q P ·
AGACCTCTGT GATGATGACG TGGAGTTTAG AGGCTCCTTG TGGCCCCAGC

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

201 · S D S Q Q Y F S A P A P L S P S
CCTCTGACAG TCAGCAGTAC TTCAGTGCCC CAGCCCCTCT CAGCCCCTCC

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

251 S R P R S P W G K L D P Y D S S E ·
TCCAGGCCCC GCAGTCCATG GGGCAAGCTT GATCCTTATG ATTCCTCTGA

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

301 · D D K E Y V G F A T L P N Q V H R ·
GGATGACAAG GAGTATGTGG GCTTTGCAAC CCTCCCCAAT CAAGTCCACA

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

351 · K S V K K G F D F T L M V A G E
GGAAGTCTGT GAAGAAAGGC TTTGACTTTA CACTCATGGT GGCAGGAGAA

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

401 S G L G K S T L V N X L F L T D L ·
TCTGGTCTGG GTAAATCCAC TCTTGTC AAC ARCCTCTTCC TCACTGACTT

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

• Y R D R K L L G A E E R I M Q T V •
 451 GTACCGGGAT CGGAAACTGC TGGGCGCCGA AGAGCGGATC ATGCAAACCG

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

• E I T K H X V D I E E K G V R L •
 501 TGGAGATTAC TAAGCACSCA GTGGATATAG AAGAGAAGGG AGTGAGGCTG
 CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

R L T I V D T P G F G D A V N N T •
 551 CGGCTYACCA TTGTGGACAC TCCAGGATTT GGGGATGCAG TCAACAACAC

CDS Sept4_v7 (DI1-Insertion)

• E W Y V •
 601 AGAGTGGTAT GTCTGACCAA GTACAGCCCC AGCTGCCCTT GTCCCACCCA
 651 CAAACTGCAT GCATCTACAC AGGTCACATT CGGTCACAGA CATAGTCATA
 701 TTTGCTAGGA CGAAGAGGCC AGTGACCTTA TTGGACAGCT GGGTTCCTTT
 751 AGCTGGACAG CTGTCTCTTC TGTAGGAGTG AGAGAAAAAA GACCGAGATG
 801 GGTGGTTTTG TTTACATTTG AGACACTCTT ACTATRTAGC CCCAGKGGGC
 851 CTCGAACTCA CTATGTGGGT TGGGCAGGCC TTGACCTCAG AGATCTGCCT
 901 CACAGCATTT CACATTA ACT TTTTAAAGAT TAGGGTCTCT TGGTGWAGAG
 951 CCTGGGACTT GCTGTGTAAC TCAGGCTAGC CTTGAGCTCA GTGGTCTCT
 1001 CGAATTAGCC TCCCAAGTGT TGGGACTGCA AGCATGCGTT ACTGTGCATA
 1051 TAGCTCGATG ATGTGAGGMC CTCACCAGTG AAAAGCCTCA AAAGAGTAAA
 1101 CGCCCGTGAG CACGTGTAGG TGCAAGGTGA ACACCACCAT CCCTCCTTCC
 1151 TTTCTTTCCC AGTTATTTTA GATGCTGAAA ACAGTTCTTG TACAAGGGGA
 1201 GAGGAGGAAG GGAGGCATAA AGGAAAAGAGA AGCAAAAAGAG CGGGGTGGG
 1251 GGTGGGGGAA CCAGTAAGGG AATGCCAGGC GGCACCGTGG TGCACATCAT
 1301 CTGCCCAGCA CCAGCACTCA GGAGCTGCAG GCAGGACCAG TCTCAACCAT
 1351 GAAGCTTGGC TTATATGAGA TTCTGTCTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
 1401 A

Sept4_v7-cDNA und -Protein

Angegeben ist die Sequenz der in dieser Arbeit klonierten cDNA von Sept4_v7 (*Mus musculus*), welche die vollständige proteinkodierende Sequenz der im Klon DI1 translatierten Sept4-Variante (CDS, schwarze Linie oberhalb der Sequenz) umfaßt, sowie die Sequenz des entsprechenden Proteins (Aminosäure jeweils oberhalb des Codons).

9.2.2 Sequenz von Sept5 (cDNA und Protein)

JS.93

1 TATGGCTCGC AGGAATTCTG AGGTCAGCGG CCTACCAGGT GGGCGACGCT
 51 CCCTCTCCGG GGCTCAGTTT TCGCGTCTTC AAAACCCGAG GCAGAAGAGG
 101 GCTTAAGAGC AGATTTACCC AGCGCAAATC GCTCGAGATC GCTGGCCCCG
 151 ACAGGCCTGA CCCTGGTGTA GGGTCTGAAC GAGGCCGTCA GGGCCCCGCG

Kozak-Sequenz

CDS Sept5

201 M D S L A A P Q D R L V E Q ·
 GGTCAACCACG ATGGACTCAC TGGCAGCACCC CCAGGACCGC CTGGTGGAGC

CDS Sept5

251 · L L S P R T Q A Q R R L K D I D
 AGCTGCTGTC GCCGCGCACC CAGGCCCAGA GGCGACTGAA GGACATCGAC

CDS Sept5

301 K Q Y V G F A T L P N Q V H R K S ·
 AAGCAGTACG TTGGTTTCGC CACTGCCCC AACCCAGGTGC ACCGCAAGTC

CDS Sept5

351 · V K K G F D F T L M V A G E S G L ·
 CGTCAAGAAA GGTTTCGACT TCACGCTCAT GGTGGCCGGT GAGTCCGGCC

CDS Sept5

401 · G K S T L V H S L F L T D L Y K
 TGGGGAAGTC CACCCTTGTC CATAGCCTCT TTCTGACCGA CCTGTATAAG

CDS Sept5

451 D R K L L S A E E R I N Q T V E I ·
 GACCGGAAAC TGCTGAGTGC TGAGGAACGC ATCAACCAGA CGGTAGAGAT

CDS Sept5

501 · L K H T V D I E E K G V K L K L T ·
 CCTGAAACAC ACCGTCGACA TTGAGGAGAA GGGGGTCAAG TTAAAGCTCA

CDS Sept5

551 · I V D T P G F G D A V N N S E C
 CCATTGTGGA CACGCCCGGC TTTGGGGACG CGGTGAACAA CTCTGAATGT

CDS Sept5

601 W K P I T D Y V D Q Q F E Q Y F R ·
 TGGAAGCCCA TCACTGACTA TGTGGACCAG CAGTTTGAGC AGTATTTCCG

CDS Sept5

651 · D E S G L N R K N I Q D N R V H C ·
TGATGAGAGT GGCCTGAACC GCAAGAACAT CCAGGACAAC CGGGTACACT

CDS Sept5

701 · C L Y F I S P F G H G L R P V D ·
GCTGCCTGTA CTTTCATCTCC CCGTTCCGAC ACGGACTGAG GCCAGTGGAT

CDS Sept5

751 V G F M K A L H E K V N I V P L I ·
GTAGGCTTCA TGAAGGCACT GCATGAGAAG GTGAACATCG TCCCCTCAT

CDS Sept5

801 · A K A D C L V P S E I R K L K D R ·
CGCCAAAGCT GACTGCCTGG TGCCAGTGA GATCCGGAAG CTGAAGGACA

CDS Sept5

851 · I R E E I D K F G I H V Y Q F P ·
GAATACGTGA GGAGATCGAC AAGTTTGGGA TCCACGTGTA CCAGTTTCCA

CDS Sept5

901 E C D S D E D E D F K Q Q D R E L ·
GAATGTGATT CGGATGAAGA TGAAGATTTC AAGCAACAGG ACCGGGAACT

CDS Sept5

951 · K E S A P F A V I G S N T V V E A ·
GAAGGAAAGT GCACCTTTCG CCGTTATTGG CAGCAACACT GTGGTGGAGG

CDS Sept5

1001 · K G Q R V R G R L Y P W G I V E ·
CCAAGGGGCA GCGGGTCCGG GGGCGACTGT ACCCCTGGGG GATCGTCGAA

CDS Sept5

1051 V E N Q A H C D F V K L R N M L I ·
GTGGAGAATC AGGCGCACTG CGACTTTGTG AAGCTCCGCA ACATGCTCAT

CDS Sept5

1101 · R T H M H D L K D V T C D V H Y E ·
CCGCACTCAC ATGCACGACC TCAAAGATGT GACGTGCGAC GTGCACTATG

CDS Sept5

1151 · N Y R A H C I Q Q M T S K L T Q ·
AGAACTACCG TGCCCACTGC ATCCAGCAGA TGACCAGCAA ACTCACCCAG

CDS Sept5

1201 D S R M E S P I P I L P L P T P D ·
GACAGCCGCA TGGAGAGCCC CATTCTATC CTCCCCTAC CCACACCGGA

CDS Sept5

• A E T E K L I R M K D E E L R R M •
 1251 TGC GGAGACC GAGAAGCTCA TCAGGATGAA GGATGAAGAG TTAAGGCGCA

CDS Sept5

• Q E M L Q K M K Q Q M Q D Q
 1301 TGCAGGAGAT GTTGCAGAAG ATGAAGCAGC AAATGCAAGA CCAGTGACAC
 1351 CCGCCCCCAGC CCCACGTCGT CGACAAGGAT AGACGGCCCG TTTCCGGGCT

JS. 81

1401 GGCCCTCCT ACCCTGGAT CCCAGACTGT CCTGGATTCC ACCCTGGGTT
 1451 CATCTGGATC TCAGAAGGCC TGGACCTCAC CCTAATCCAA AGTGGCTTTG
 1501 ACCAGACTGT TCAGACCTGG AGCCACAGAG CCACAGCCCC CAGATGACCC
 1551 TAATTTATTC TCGGCGTCCA CCCTTCCCGG TCATTTGTAT CTGCTTCCGA
 1601 GTGCTCTGAA TCACAGCCCC TCCCCAACCT CCTGCCCCCG CCCCACCCG
 1651 CACCTCCCCG CCTATCATAA GGAACAAGA TGTGCACAAC CTCCAAGATC
 1701 TCCCTTCTTA GAAGATCACT GCCCCCAGC GGGCCAATAA ACCAGGGTAG
 1751 AGGAGGGACG TGGATGCAGG ATCTTGGGCC TATTACCCAA GCTAGTGCTG
 1801 CAGAGTGGAG TTGGGAGGCC CCCTCTGCCG ATTCCAGTGG GCTACGAAGC
 1851 ATTTGCTAAT GGCCTACTGA GCGCGGAAGT AGGCCGGTTC CTCCCTTACT
 1901 CCCTAATCAT GCTCTGTTCA GGATCGGAGG CGGCGGGGTT TGGAGGCTAA
 1951 GGCCTTTAGG AAGACCCAG ATCTAGAGGC TTCTGGGAGG AAGGCGGGGC
 2001 CGCGATGCTC TAGACCGCTC GCGCCCCTTC CTGAGTCTAC CTGAAGGACT
 2051 CCAAGGGCGG TAGAGACGGG GTGTCCCTAT GCCTAGACTA CTTTCGTCCA
 2101 CCCATAGGTC AAGGTCTTTT CTTCCCAGCA ACTCTGTTGC ACAAGGATTC
 2151 CAGCCCTTGG CCTCCTCCAT ATCTCCACCC GCATGATTCC TCCCACACA
 2201 CCCCATGCTC CGTTTTGTTC AGTTGTGAAT GCCGCGTCCT GTCTGGTGA

Poly-A-Signal

2251 CAGGAGAACA AAGTTGGTGA ACGTC

Sept5-cDNA und -Protein

Angegeben ist die Sequenz der in dieser Arbeit klonierten cDNA von Sept5 (*Mus musculus*), welche die vollständige proteinkodierende Sequenz (CDS, schwarze Linie oberhalb der Sequenz) umfaßt, sowie die Sequenz des entsprechenden Proteins (Aminosäure jeweils oberhalb des Codons). Rote Linien kennzeichnen die zur Klonierung verwendeten Primer.

9.3 Danksagung

Zuallererst möchte ich Dr. Beat Lutz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas, das mich auch nach vierjähriger Bearbeitung noch fasziniert, danken. Ohne seine Unterstützung in fachlicher, personeller und finanzieller Hinsicht sowie seine Geduld auch in widrigen Zeiten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei „meinen“ Diplomanden Karsten Baumgärtel und Marcel Tigges für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken, die es uns erlaubte, dieses Projekt ein gutes Stück voranzubringen.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Molekulare Genetik des Verhaltens“, Dr. Maria Brenz Verca, Dr. Astrid Cannich, Heike Hermann, Dr. Giovanni Marsicano, Dr. Krisztina Monory, Peter Weber, Dr. Zuwen Zhang, für wertvolle Diskussionen, Anregungen und Hilfestellung, sowie Anika Daschner, Henriette Dietrich, Barbara Fackelmeier, Nadine Franke, René Schadowski, Christine Schleicher, Michaela Wiedemann und Barbara Wölfel für die Unterstützung bei einer Reihe von Experimenten, ohne die diese Arbeit nur halb so dick ausgefallen wäre, weiterhin Elisabeth Güll und Regine Stoeger für die Hilfe in bürokratischen Angelegenheiten.

Zu Dank verpflichtet bin ich außerdem Dr. Nadhim Bayatti, der mir neuronale Primärkulturen zur Verfügung stellte, Dr. Peter Hutzler (GSF, Neuherberg) für die Unterstützung bei der konfokalen Mikroskopie, Dr. Kenji Imai (GSF, Neuherberg), bei dem ich die grundlegenden Techniken für die Arbeit mit BACs erlernen konnte, und Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn für wertvolle Hilfestellung in Sachen Anatomie und Histologie sowie allen weiteren Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Großen Dank bin ich dem *Boehringer-Ingelheim-Fonds* schuldig, der mich während eines Großteils der Arbeit an diesem Projekt finanzierte und mich vielfach förderte.

Ein persönliches Dankeschön geht an meine Eltern, die mir das Studium der Humanbiologie ermöglichten, sowie an Marianne für ihr Verständnis und ihre Geduld sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

9.4 Lebenslauf

Jan Hendrik Sitz geboren am 24. April 1972 in Dortmund

Schulbildung

1978-1982: Besuch der Grundschule „Schule Nord“ (Schleswig) und der „Grundschule Busdorf“
1982-1991: Besuch des Gymnasiums „Domschule“ in Schleswig
31.05.1991: Abitur

Wehr- und Zivildienst

01.07.1991 bis 01.10.1991: Grundwehrdienst
02.10.1991 bis 30.09.1992: Zivildienst beim Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes in Schleswig als Staatlich geprüfter Rettungssanitäter

Studium und Promotion

01.10.1992 bis 30.09.1993: Studium des Maschinenbaus an der Universität Hannover
01.10.1993 bis 16.12.1998: Studium der Humanbiologie (Theoretische Medizin) an der Philipps-Universität Marburg
Oktober 1995: Diplom-Vorprüfung in den Fächern Zoologie, Chemie, Physik, Anatomie, Biochemie und Physiologie
Hauptfach: Zellbiologie
Wahlnebenfächer: Biochemie, Physiologie, Immunologie, Molekularbiologie
Diplomarbeit: *Expression der FGF-Rezeptoren 1 und 2 in der Entwicklung von Nebenniere, Spinalganglien und Rückenmark* (Institut für Anatomie und Zellbiologie des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, Betreuung durch Prof. Dr. E. Weihe und HD. Dr. R. Westermann)
September 1998: Diplomprüfung in den Fächern Zellbiologie, Biochemie und Physiologie
Dezember 1998: Abschluß des Studiums mit dem Diplom
Januar 1999: Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
01.10.1999 bis 31.12.2001: Stipendiat des *Boehringer-Ingelheim-Fonds*
SS 1999 bis WS 2001/2002: Promotionsstudent an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Biologie

9.5 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

München, im Februar 2003

Jan Hendrik Sitz