

Charakterisierung der c-Src Interaktions- und Aktivierungsdomäne in hnRNP K

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Dörte Adolph
Diplom Biochemikerin
geb. am 04.11.1978 in Esslingen am Neckar

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karin D. Breunig
2. PD Dr. Dirk Ostareck
3. Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen

verteidigt am 9.4.2008

Meiner Freundin
YVONNE CERNOTA
in Liebe

*Es ist nicht zu wenig Zeit,
die wir haben,
sondern es ist zuviel Zeit,
die wir nicht nutzen.*
(Lucius Annaeus Seneca)

I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	IV
III	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Funktion von hnRNP K und hnRNP E1 bei der Regulation der Retikulozyten-15-Lipoxygenase-mRNA Translation.....	1
1.2	Post-translationale Modifikationen von hnRNP K und deren Einflüsse auf die Funktion von hnRNP K.....	3
1.3	Die Tyrosinkinase c-Src und die Regulation ihrer Aktivität.....	8
1.4	Zielstellung	15
2	MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Enzyme	21
2.1.3	Antikörper	21
2.1.4	Kits	22
2.1.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	22
2.2	Quantifizierung und Charakterisierung von DNA- und Proteinpräparationen.....	23
2.2.1	DNA Konzentrationsbestimmung.....	23
2.2.2	Agarosegel-Elektrophorese.....	23
2.2.3	Sequenzierung und enzymatischer Verdau von DNA	23
2.2.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	24
2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.2.6	Western-Blotting	26
2.3	Klonierung.....	27
2.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.3.2	Gerichtete Mutagenese	27
2.3.3	Deletions- und Insertionsmutanten.....	28
2.3.4	Klonierung von PCR-Fragmenten	29
2.3.5	Umklonierung von Plasmid-DNA	31

2.4 Proteinexpression und -reinigung	31
2.4.1 Reinigung von Proteinen mit His-Fusionspeptid.....	32
2.4.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen.....	33
2.5 <i>In vitro</i> Transkription und Translation	34
2.6 <i>In vitro</i> Protein-Interaktionsassay	35
2.7 Transfektion von HeLa-Zellen	36
2.7.1 Transfektion	36
2.7.2 HeLa-Zell-Lyse.....	37
2.7.3 Immunpräzipitation.....	38
2.8 <i>In vitro</i> Kinase-Aktivierungsassay	39
2.9 Immunfluoreszenz	40
2.10 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)	42
2.10.1 BiFC-Studien mit dem Chromophor Venus.....	42
2.10.2 Statistik	43
3 ERGEBNISSE	44
3.1 Aktivierung von c-Src durch Polyprolin-Motive in hnRNP K	44
3.1.1 Aktivierung von c-Src durch hnRNP K-Varianten <i>in vitro</i>	44
3.1.2 Aktivierung von c-Src durch hnRNP K-Varianten in transfizierten HeLa-Zellen	46
3.1.3 Aktivierung von c-Src <i>in vitro</i> allein durch die prolinreichen Sequenzen P2 und P3 in hnRNP K	48
3.1.4 HnRNP K als Aktivator und Interaktionspartner von Tyrosinkinase.....	49
3.1.5 Aktivität von rekombinantem c-Src aus <i>E.coli</i>	51
3.1.6 Übersicht zur Aktivierung von c-Src.....	54
3.2 Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen	56
3.3 Interaktion von Src-Varianten mit hnRNP K	61
3.4 <i>In vitro</i> Protein-Interaktionsstudien zur Eingrenzung der c-Src-Bindungsmotive in hnRNP K	63
3.5 BiFC-Bindungsstudien zwischen c-Src und hnRNP K-Varianten in HeLa-Zellen	64
3.5.1 Deletions- und Insertionsvarianten von hnRNP K.....	64
3.5.2 HnRNP K-Varianten mit modifizierter Aminosäuresequenz	68
3.6 Funktionelle Charakterisierung der hnRNP K-Deletionsvarianten	69
3.6.1 Das Verhalten der hnRNP K-Deletionsvarianten als Aktivator und Substrat von c-Src	69
3.6.2 Einfluss der Deletion der Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K auf weitere Protein-Protein-Interaktionen.....	70

3.7 Übersicht zur Interaktion	73
4 DISKUSSION.....	77
4.1 Aktivierung von c-Src durch hnRNP K.....	77
4.2 Eine von der aktivierenden Wechselwirkung unabhängige Interaktion zwischen c-Src und hnRNP K	82
5 ZUSAMMENFASSUNG	90
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	93
7 ANHANG.....	110
7.1 Primer	110
7.2 Konstrukte	111
7.3 Auszählungen der BiFC-Ergebnisse für die Statistik.....	114

DANKSAGUNG

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

LEBENS LAUF

PUBLIKATIONS LISTE

II ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Domänen-Struktur von hnRNP K	3
Abb. 1.2: Prolinreiche Sequenzen P1-3 in hnRNP K	5
Abb. 1.3: Domänen-Struktur von c-Src.....	9
Abb. 1.4: SH 3-Domänen und deren Ligandenbindung.....	10
Abb. 1.5: Struktur des c-Src-Peptids Aminosäuren 83 bis 533 (Xu <i>et al.</i> ,1999).....	13
Abb. 1.6: Ausschnitt aus dem Aminosäure-Sequenzvergleich von hnRNP K und hnRNP E1	16
Abb. 1.7: HeLa-Zell-Transfektionsexperiment mit der Variante hnRNP K (ΔP_{1-3}).....	17
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Herstellung von Deletions- bzw. Insertionsmutanten...	28
Abb. 2.2: Emissionsspektren ausgesuchter Fluorochrome	41
Abb. 3.1: A) HeLa-Zell-Lysat mit den exprimierten Src-Varianten B) His-hnRNP K-Varianten.....	44
Abb. 3.2: <i>In vitro</i> Kinase-Aktivierungsassay mit hnRNP K-Pro-Ala-Varianten	45
Abb. 3.3: Lokalisierung von His-hnRNP K und c-Src in transfizierten HeLa-Zellen	46
Abb. 3.4: Aktivierung von c-Src durch hnRNP K-Varianten in transfizierten HeLa-Zellen	47
Abb. 3.5: Aktivierung von c-Src durch das Peptid P ₂₋₃ <i>in vitro</i>	49
Abb. 3.6: HeLa-Zell-Transfektion mit hnRNP K-Varianten und den Tyrosinkinase c-Src, Lyn, Fyn und Lck	50
Abb. 3.7: Westernblot-Analysen der His-c-Src-Expression in <i>E.coli</i> -Zellen.....	52
Abb. 3.8: Vergleich der Reinigung von His-c-Src mit Ni-NTA oder Magne His™ Ni-Particles...52	
Abb. 3.9: A) Expression von c-Src in unterschiedlichen Systemen B) Autoradiographie des <i>in vitro</i> Kinase-Aktivierungsassay mit His-c-Src.....	53
Abb. 3.10: Übersicht zur Aktivierung von c-Src durch hnRNP K.....	55
Abb. 3.11: Der <i>in vitro</i> Protein-Interaktionsassay A) Coomassie-Färbung der GST-Fusionsproteine B) Autoradiographie.....	57
Abb. 3.12: Beispiel einer Analyse von transfizierten HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz und BiFC	58
Abb. 3.13: Selektivität des BiFC-Assays	60
Abb. 3.14: A) Autoradiographie des <i>in vitro</i> Protein-Interaktionsassays mit Src-Varianten B) Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription und Translation der Src-Varianten.....	61

Abb. 3.15: BiFC-Assay mit Src-Varianten.....	62
Abb. 3.16: Statistische Auswertung des BiFC-Assays mit Src-Varianten.....	62
Abb. 3.17: Übersicht über die GST-hnRNP K-Varianten und ihre Interaktion mit c-Src <i>in vitro</i>	64
Abb. 3.18: BiFC-Analyse der hnRNP K-Varianten, die c-Src nicht aktivieren	65
Abb. 3.19: Statistik der BiFC-Analyse der hnRNP K-Varianten, die c-Src nicht aktivieren	65
Abb. 3.20: BiFC-Assay mit Deletions- oder Insertionsvarianten von hnRNP K	66
Abb. 3.21: Statistik des BiFC-Assays mit Deletions- oder Insertionsvarianten von hnRNP K	67
Abb. 3.22: Statistik des BiFC-Assays mit Aminosäuresequenz-Varianten von hnRNP K.....	68
Abb. 3.23: <i>In vitro</i> Kinase-Aktivierungsassay mit hnRNP K-Deletionsvarianten.....	69
Abb. 3.24: BiFC-Assay zur Untersuchung der Interaktion der hnRNP K-Deletionsvarianten mit der Tyrosinkinase Lck	70
Abb. 3.25: BiFC-Assay zur Dimerisierung der hnRNP K-Deletionsvarianten mit hnRNP K.....	71
Abb. 3.26: BiFC-Assay zur Interaktion der hnRNP K-Deletionsvarianten mit hnRNP E1	72
Abb. 3.27 A) Übersicht zur Interaktion von c-Src-Varianten mit hnRNP K.....	74
Abb. 3.27 B) Übersicht der Wechselwirkungen von hnRNP K-Varianten.....	75
Tabelle 2.1: Absorptions- und Emissionsmaxima ausgewählter Fluorochrome	40
Tabelle 2.2: Verdünnungen von Fluoreszenz-markierten Antikörpern	42
Tabelle 3.1: Expressionsbedingungen für His-c-Src in <i>E.coli</i>	51
Tabelle 7.1: Primer für Mutagenesen	110
Tabelle 7.2: pSG5-Transfektionsplasmide	111
Tabelle 7.3: pET16b-Expressionsplasmide.....	112
Tabelle 7.4: pGEX 4T-1-Expressionsplasmide.....	112
Tabelle 7.5: pVenus-Transfektionsplasmide	113
Tabelle 7.6: Auszählung der BiFC-Studien	114

III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Abl	Abelson Kinase
AK	Antikörper
AMP-PNP	Adenylimidodiphosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Aminosäurenrepräsentiert durch deren Ein- oder Drei-Buchstaben-Symbol	
X steht für eine beliebige Aminosäure	
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescent Complementation</i> - bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Cas	<i>Crk-associated substrate</i>
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	<i>Complementary</i> -komplementäre DNA
Ci	Curie
CK	<i>casein-kinase</i>
c-Src	<i>Cellular</i> - zelluläres Src
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
3D	Dreidimensional
∅	Durchschnitt
Da	Dalton
DAPI	4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DICE	<i>Differentiation control element</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
ds	<i>Double-stranded</i> - doppelsträngige (DNA)
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor (Translation)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>

<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> - Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GSH	Reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks, Gebärmutterhalskrebs von 1951
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> – Rettich Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
IRE	<i>iron-responsive element</i>
IRP	<i>iron regulatory protein</i>
k	Kilo – 10^3
kb	Kilobasenpaar
KH	<i>HnRNP K homology</i>
KID	<i>Kinase interaction domain</i>
KNS	<i>HnRNP K nuclear shuttling signal</i>
l	Liter
λ	Lambda -Lichtwellenlänge
LB	Luria Bertani
LP	Leupeptin
LUC	Luciferase
m (Einheit)	Meter
m (Prefix)	Milli - 10^{-3}
M	Molare Masse
μ	Mikro - 10^{-6}
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein particle</i>
n	Nano - 10^{-9}
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
NP40	Nonidet P40
NTL	<i>Nuclease treated lysat</i>
p	Pico - 10^{-12}
%	Prozent
‰	Promille

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
P/S	Penicillin/Streptomycin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
PP II	Polyprolin Typ II
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PxxP	Polyprolin-Motiv
r 15-LOX	Retikulozyten-15-Lipoxygenase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonucleosidtriphosphat
rpm	<i>Revolutions per minute of rotor</i>
RRL	<i>Rabbit reticulocyte lysate</i> - Kaninchen Retikulozytenlysat
RT	Raumtemperatur
s	Anzahl der Nukleotide in einem Oligonukleotid
Σ	sigma - Summe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SH	<i>Src homology</i>
ss	<i>Single-stranded</i> – einzelsträngig (DNA)
T EMED	Tetramethylethylendiamin
Tip	<i>tyrosine kinase interacting protein</i>
T_M	<i>Melting temperature</i> – Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
ts	<i>Triple-stranded</i> – dreisträngig (DNA)
U	<i>Unit</i> (Enzymaktivität)
UTR	<i>Untranslated region</i>
V	Volt
V1	N-terminaler Teil von Venus Aminosäuren 1-154
V2	C-terminaler Teil von Venus Aminosäuren 155-238
vgl	vergleiche
v- <i>Src</i>	Virales <i>Src</i>
v/v	Volumen/Volumen
wt	Wildtyp
w/v	<i>Weight</i> – Masse/Volumen
Y FP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
Z BP	<i>Zipcode binding protein</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Die Funktion von hnRNP K und hnRNP E1 bei der Regulation der Retikulozyten-15-Lipoxygenase-mRNA Translation

Während der Entwicklung einer haematopoietischen, pluripotenten Stammzelle zum reifen Erythrozyten durchläuft eine Zelle verschiedene Stadien der Differenzierung. Die Zellteilung und Entwicklung der Vorläuferzellen wird durch Erythropoietin stimuliert und findet im Knochenmark statt. Bereits im Erythroblasten beginnt die Globinsynthese, bis ein stark mit Hämoglobin angereicherter Normoblast entsteht. Nach Eliminierung des Zellkerns tritt der junge Retikulozyt in die periphere Blutbahn über. Der reife Retikulozyt übernimmt für die nächsten 120 Tage als Erythrozyt den Sauerstofftransport, bis er schließlich in der Milz abgebaut wird (Castoldi und Beutler, 1988).

Es konnte gezeigt werden, dass die Retikulozyten-15-Lipoxygenase (r15-LOX) für die Dioxygenierung von Phospholipiden in der Mitochondrienmembran verantwortlich ist (Rapoport und Schewe, 1986, Schewe *et al.*, 1986, Van Leyen *et al.*, 1989, Grüllich *et al.*, 2001). Nach dem Abbau der Mitochondrien, der durch die r15-LOX initiiert wird, kann die Zelle ihren Energiebedarf nur noch durch die Glykolyse decken, weshalb die Aktivität des Enzyms einer exakten zeitlichen Regulation unterliegen muss, da die Zelle ansonsten nicht überlebensfähig wäre. Bereits vor der Eliminierung des Zellkerns wird die r15-LOX-mRNA im Erythroblasten synthetisiert, aber erst im reifen Retikulozyten translatiert (Höhne *et al.*, 1988). Die r15-LOX-mRNA und die α -Globin-mRNA bilden den Großteil der in *messenger ribonucleoprotein particles* (mRNPs) verpackten mRNA. Im mRNP-Komplex ist die r15-LOX-mRNA translationsinaktiv, wohingegen die α -Globin-mRNA dort stabilisiert und dadurch aktiv translatiert wird. Die Regulation der mRNA-Translation und die damit verbundene Regulation der Proteinexpression ist weit verbreitet. In den meisten bekannten Fällen erfolgt diese Regulation über die 5'-*untranslated region* (UTR) der mRNAs, indem die Initiation der Translation beeinflusst wird, wie dies zum Beispiel für die Wechselwirkung des *iron-responsive elements* (IREs) mit *iron regulatory proteins* (IRPs) gezeigt wurde (Gray und Hentze, 1994). Elemente der 3'UTR sind jedoch ebenfalls in der Lage, Einfluss auf die Regulation der Translation zu nehmen (Muckenthaler *et al.*, 1998). Die Translation der r15-LOX-mRNA wird über ihre 3'UTR reguliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). Die 3'UTR der r15-LOX-mRNA aus Kaninchenretikulozyten beinhaltet zehn Wiederholungen einer 19 Nukleotide langen pyrimidinreichen Sequenz (Fleming *et al.*, 1989), die als *differentiation control element* (DICE)

identifiziert wurde (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994, Ostareck *et al.*, 1997). Proteine aus Erythroblasten und Retikulozyten, nicht jedoch aus Erythrozyten, binden spezifisch an das DICE (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). Durch Affinitätsreinigung konnte eine Protein-Fraktion aus Retikulozyten isoliert werden, die eine Translationsinhibierung der r15-LOX-mRNA *in vitro* vermittelt (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). HnRNP K und hnRNP E1 aus der Familie der *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs) konnten als spezifisch an das DICE bindende Proteine identifiziert werden (Ostareck *et al.*, 1997). Aus Retikulozyten konnte eine mRNP-Fraktion isoliert werden, welche spezifisch an die r15-LOX-mRNA gebundenes hnRNP K enthielt (Ostareck *et al.*, 1997). Die Translationsinhibierung durch hnRNP K und hnRNP E1 ist unabhängig vom 5' *cap* und 3' Poly(A)-Schwanz der mRNA (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994, Ostareck *et al.*, 1997). Eine Hemmung der Translation durch hnRNP K und hnRNP E1 konnte auch in einem heterologen Weizenkeim-Extrakt-Translationssystem nachgewiesen werden. Somit sind keine weiteren gewebespezifischen Komponenten erforderlich (Ostareck *et al.*, 1997). HnRNP K und hnRNP E1 waren auch in der Lage, *in vitro* die Translation von Reporter-Konstrukten, beispielsweise die der Luciferase (LUC) oder Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) über ein DICE in deren 3' UTR zu regulieren (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994, Ostareck *et al.*, 1997). Im Gegensatz zum DICE der Kaninchen r15-LOX-mRNA enthält die humane r15-LOX-mRNA nur vier repetitive, pyrimidinreiche Elemente (Sigal *et al.*, 1988), die ebenfalls ausreichend für eine Regulation sind (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). Bereits zwei repetitive Elemente reichen aus, um hnRNP K und hnRNP E1 zu binden und eine Regulation der Translation *in vitro* zu bewirken (Ostareck *et al.*, 1997). Eine Translationsinhibierung konnte auch in HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten mit zwei Wiederholungen nachgewiesen werden, wobei die mRNA-Stabilität oder -Transkriptionsrate für ein Reporter-Konstrukt (LUC) dabei unverändert blieb (Ostareck *et al.*, 1997). Lag eine Mutation im DICE vor oder wurde die 3' UTR der α -Globin-mRNA stattdessen verwendet, die in der Lage ist hnRNP E1 und hnRNP E2 zu binden (Kiledjian *et al.*, 1995), konnte keine Translationskontrolle beobachtet werden (Ostareck *et al.*, 1997). Obwohl hnRNP E1 sowohl in α -Globin- und r15-LOX-mRNPs vorliegt, bewirkt die Zusammensetzung der mRNPs in einem Fall eine Stabilisierung und im anderen Fall eine Translationsinhibierung der mRNA (Ostareck-Lederer *et al.*, 1998).

Die Translation der r15-LOX-mRNA beginnt, indem die 40S ribosomale Untereinheit zusammen mit Initiationsfaktoren zum 43S-Prä-Initiationskomplex assembliert. Dieser Komplex wandert entlang der 5' UTR bis zum Initiationskodon (AUG). Sind hnRNP K und hnRNP E1 am DICE in der 3' UTR der mRNA gebunden, verhindert dies die Assoziierung der 60S ribosomalen Untereinheit. Translationsaktive 80S-Ribosomen können demzufolge nicht gebildet werden (Ostareck *et al.*, 2001). Wie dieser Schritt der Translationsinhibierung vermittelt wird und ob möglicherweise noch andere Initiationsfaktoren oder Proteine daran beteiligt sind, wird derzeit noch untersucht.

1.2 Post-translationale Modifikationen von hnRNP K und deren Einflüsse auf die Funktion von hnRNP K

HnRNP K ist an unterschiedlichen Prozessen der Regulation der Genexpression beteiligt. Dazu gehört die Regulation der Transkription verschiedener Gene (Michelotti *et al.*, 1996, Du *et al.*, 1998, Miao *et al.*, 1998), wie des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors (eIF) 4E (Lynch *et al.*, 2005), der Tyrosinkinase *c-src* (Ritchie *et al.*, 2003) und dem Proto-Onkogen *c-myc* (Takimoto *et al.*, 1993). Auch ein Einfluss auf die Prozessierung von pre-mRNAs (Dreyfuss *et al.*, 1993, Michael *et al.*, 1997) und den mRNA-Export aus dem Zellkern (Dreyfuss *et al.*, 2002) konnte bereits nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, spielt hnRNP K bei der Regulierung der Translation der r15-LOX-mRNA eine wichtige Rolle (Ostareck *et al.*, 1997, Ostareck *et al.*, 2001, Ostareck-Lederer und Ostareck, 2004). Die Translation der humanen Papillomavirus Typ 16 L2-mRNA (Collier *et al.*, 1998), der *c-myc*-mRNA (Evans *et al.*, 2003) und der Renin-mRNA (Persson *et al.*, 2003, Skalweit *et al.*, 2003) wird ebenfalls durch hnRNP K beeinflusst. Es konnten Interaktionen mit Faktoren aus dem Zellkern, dem Zytoplasma, den Mitochondrien, der Plasmamembran sowie mit extrazellulären Faktoren gezeigt werden (Mikula *et al.*, 2006). Verschiedene ribosomale Proteine interagieren direkt oder durch RNA vermittelt mit hnRNP K (Mikula *et al.*, 2006). HnRNP K dimerisiert und interagiert auch mit anderen hnRNP-Proteinen (Kim *et al.*, 2000, Shnyreva *et al.*, 2000, Wei *et al.*, 2006).

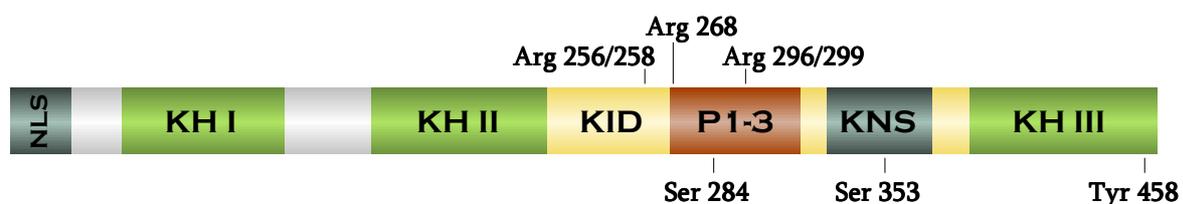


Abb. 1.1: Domänen-Struktur von hnRNP K. HnRNP K besteht aus drei *hnRNP K homology* (KH)-Domänen, dem *nuclear localisation signal* (NLS), dem *hnRNP K nuclear shuttling signal* (KNS) und der *kinase interaction domain* (KID), in der sich drei prolinreiche Sequenzen (P1-3) und RGG-Boxen befinden. Aminosäuren, deren post-translationale Modifikationen einen Einfluss auf die Funktion von hnRNP K haben, sind gekennzeichnet. (Habelhah *et al.*, 2001, Messias *et al.*, 2006, Ostareck-Lederer *et al.*, 2006, Chiou *et al.*, 2007)

HnRNP K besitzt drei *hnRNP K homology* (KH)-Domänen (Gibson *et al.*, 1993, Siomi *et al.*, 1993), zwei sind N-terminal gelegen, die dritte liegt C-terminal. Drei α -Helices und drei β -Faltblätter in der Abfolge $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ sind die wesentlichen Strukturelemente, wobei zwischen den ersten beiden α -Helices ein konserviertes GxxG-Motiv lokalisiert ist (Musco *et al.*, 1996). Die KH-Domänen zeichnen sich dadurch aus, dass sie bevorzugt pyrimidinreiche Sequenzen binden, wobei Interaktionen mit ssRNA, ssDNA, dsDNA als auch tsDNA nachgewiesen werden

konnten (Dejgaard und Leffers, 1996, Musco *et al.*, 1996, Guillonneau *et al.*, 2001, Braddock *et al.*, 2002, Ritchie *et al.*, 2003, Backe *et al.*, 2005). Die Bindung des DICE in der 3'UTR der r15-LOX-mRNA wird durch die KH-Domäne 3 in hnRNP K und durch die KH-Domäne 1 und 3 in hnRNP E1 vermittelt (Messias *et al.*, 2006).

Im Unterschied zu hnRNP E1 besitzt hnRNP K noch weitere Domänen, wie das *nuclear localisation signal* (NLS) am N-Terminus und das *hnRNP K nuclear shuttling signal* (KNS), welches sich zwischen der *kinase interaction domain* (KID) und der KH-Domäne 3 befindet (Michael *et al.*, 1995, Michael *et al.*, 1997). Während hnRNP K vorwiegend im Zellkern konzentriert ist, weist hnRNP E1 eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisierung auf. hnRNP K kann, bedingt durch sein KNS, bidirektional zwischen dem Zytosol und dem Zellkern transportiert werden (Michael *et al.*, 1997). Durch den MAP-Kinase-Signalweg kann die Lokalisierung von hnRNP K beeinflusst werden. Die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) phosphoryliert hnRNP K *in vitro* und *in vivo* an Serin 284 und 353 (Habelhah *et al.*, 2001). *In vitro* durch ERK serin-phosphoryliertes hnRNP K bindet an das DICE. In HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten kam es jedoch zu einer Akkumulation von hnRNP K im Zytoplasma und zu einer Verstärkung der DICE abhängigen Translationsinhibierung durch die Serin-Phosphorylierung von hnRNP K (Habelhah *et al.*, 2001). Bedenkt man, dass im Verlauf der erythroiden Zellreifung der Zellkern eliminiert wird, so bewirkt die Serin-Phosphorylierung von hnRNP K möglicherweise eine Verlagerung des hnRNP K/DICE-mRNPs aus dem Zellkern ins Zytosol. Damit wäre sichergestellt, dass die r15-LOX-mRNA in translationsinaktiven mRNA-Komplexen im Zytosol vorliegt. Dazu werden derzeit Studien durchgeführt.

Die KID von hnRNP K, die keine definierte Faltung aufweist (Kurowski und Bujnicki, 2003, Karplus *et al.*, 1998), vermittelt die Interaktion mit anderen Proteinen (Bomsztyk *et al.*, 2004). Für den Transkriptionsfaktor CREB konnte eine Interaktion mit der unstrukturierten KIX-Domäne von CPB gezeigt werden (Radhakrishnan *et al.*, 1997). Eine strukturierte Faltung wird dabei erst mit der Bindung der Interaktionspartner erreicht (Radhakrishnan *et al.*, 1997, Iakoucheva *et al.*, 2002, Krokowski *et al.*, 2005, Dyson und Wright, 2005). Möglicherweise bildet die KID in hnRNP K ebenfalls erst mit der Bindung eines Interaktionspartners die dafür notwendige Struktur aus. Dies könnte auch der Grund sein, warum hnRNP K in der Lage ist, verschiedene Interaktionspartner zu binden (Mikula *et al.*, 2006).

hnRNP K wird phosphoryliert, induziert durch Wachstumsfaktoren oder oxidativen Stress (Ostrowski *et al.*, 1991, Van Seuning *et al.*, 1995, Schullery *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Tyrosine 230, 234 und 236 in hnRNP K durch c-Src *in vitro* phosphoryliert werden, was eine reduzierte poly(C)-Bindungsaffinität des phosphorylierten hnRNP Ks zur Folge hat (Ostrowski *et al.*, 2000). Später konnten neben den drei Tyrosinen zusätzlich noch Tyr 72, 225 und 380 in HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten identifiziert werden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Bindung von hnRNP K an das DICE der r15-LOX-mRNA

wird ebenfalls durch die Tyrosin-Phosphorylierung beeinflusst. *In vitro* durch c-Src phosphoryliertes hnRNP K bindet nicht mehr an das DICE (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Dieser Vorgang ist reversibel, da phosphoryliertes hnRNP K, welches durch eine Phosphatase dephosphoryliert wurde, wieder an das DICE bindet (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Auch in HeLa-Zellen konnte die Translation von Reporter-mRNAs mit einem 3' UTR DICE durch c-Src phosphoryliertes hnRNP K nicht inhibiert werden. Inaktives Src (Y416F) oder die Verwendung von spezifischen c-Src-Inhibitoren führten dagegen zur Translationsinhibierung durch hnRNP K (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Interaktion zwischen hnRNP K und c-Src ist unabhängig von der enzymatischen Aktivität der Kinase oder der Phosphorylierung von hnRNP K (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Auch Tyrosin 458 in der KH-Domäne 3 von hnRNP K wird durch c-Src phosphoryliert, wodurch spezifisch die Bindung von hnRNP K an das DICE verhindert wird (Messias *et al.*, 2006). C-Src kann im Gegensatz zu Lyn in Retikulozyten und Erythrozyten, aber nicht in früheren Reifestadien nachgewiesen werden (Naarmann *et al.*, 2007 eingereicht zur Publikation). Daher ist ein Einfluss von c-Src auf die Aufhebung der Translationsinhibierung der r15-LOX-mRNA während der Erythropoese wahrscheinlich. Für die Translationsregulierung der β -Aktin-mRNA durch das *Zipcode binding protein 1* (ZBP1) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Translation der mRNA erst durch die Phosphorylierung eines spezifischen, für die Bindung der mRNA relevanten Tyrosins (Tyr 396) in ZBP1 durch Src ermöglicht wird (Hüttelmaier *et al.*, 2005).

hnRNP K ist nicht nur Substrat der Tyrosinkinase c-Src, sondern kann, im Gegensatz zu hnRNP E1, diese auch aktivieren (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). So wurde eine Bindung von hnRNP K an die isolierten *Src homology* (SH) 3-Domänen der Tyrosinkinasen Src, Lyn und Fyn *in vitro* nachgewiesen (Taylor und Shalloway, 1994, Weng *et al.*, 1994, Van Seuning *et al.*, 1995). Durch die Zugabe eines prolinreichen Liganden konnte diese Interaktion jedoch unterbunden werden (Weng *et al.*, 1994). Untersuchungen mit Peptid-Fragmenten von hnRNP K ergaben, dass die prolinreichen Sequenzen mit der isolierten SH 3-Domäne von c-Src interagieren (Van Seuning *et al.*, 1995). SH 3-Domänen interagieren meist mit prolinreichen Aminosäuresequenzen, die die Konformation einer linksgängigen Polyprolin TypII (PP II)-Helix einnehmen (Cicchetti *et al.*, 1992, Yu *et al.*, 1994, Mayer und Eck, 1995).

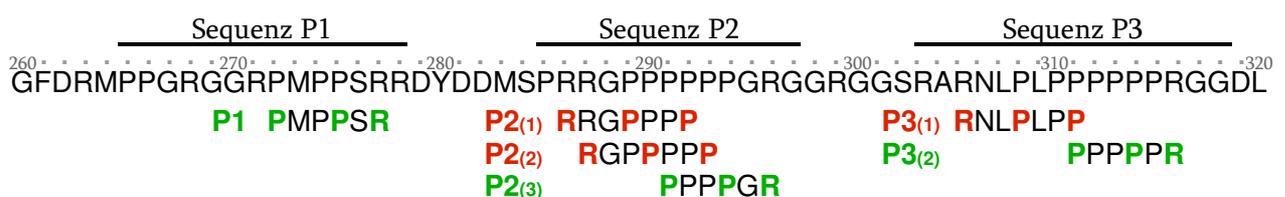


Abb. 1.2: Prolinreiche Sequenzen P1-3 in hnRNP K. Zuordnung der PxxP-Motive in hnRNP K (Aminosäuren 260 bis 320) in Klasse I- (PxxPxR) oder Klasse II-Liganden (RxxPxxP) von SH 3-Domänen.

In der KID von hnRNP K befinden sich drei prolinreiche Sequenzen (P1, 2 und 3), wobei die SH 3-Domäne mit einem Polyprolin (PxxP)-Motiv (X steht dabei für eine beliebige Aminosäure) und einem Arginin interagiert. Je nach N- oder C-terminaler Orientierung des Arginins unterscheidet man dabei Klasse I und II PxxP-Motive (Mayer, 2001). Zur Klasse I (RxxPxxP) gehören in hnRNP K die Motive P2₍₁₎, P2₍₂₎ und P3₍₁₎ und zur Klasse II (PxxPxR) gehören P1, P2₍₃₎ und P3₍₂₎ (Abb. 1.2). Die isolierten drei prolinreichen Sequenzpeptide P1₍₂₆₅₋₂₇₈₎, P2₍₂₈₅₋₂₉₇₎ und P3₍₃₀₃₋₃₁₈₎ zeigten *in vitro* von einander abweichende Affinitäten zur isolierten SH 3-Domäne von c-Src (Van Seuning *et al.*, 1995). In Far-Westernblot-Analysen wurde die inhibitorische Wirkung der drei Peptide P1-3 auf Interaktionen der SH 3-Domäne von c-Src hin untersucht. Hierbei wird anstelle eines Antikörpers ein potentieller Interaktionspartner mit der Blot-Membran inkubiert, woraufhin in einem weiteren Verfahren, zum Beispiel mittels Antikörpern oder radioaktiver Markierung, die Wechselwirkung des Interaktionspartners mit Proteinen auf der Blot-Membran nachgewiesen werden können. Für das Peptid P3 konnte dabei die höchste Affinität festgestellt werden, die fünfmal höher als die des Peptids P2 und 25-mal höher als die des Peptids P1 war (Van Seuning *et al.*, 1995).

Interaktionen von SH 2- oder SH 3-Domänen sind strukturell bereits gut charakterisiert (Pawson und Nash, 2003). So wurde angenommen, dass die stabile Interaktion von hnRNP K mit Vertretern der Src-Tyrosinkinasen über die SH 3-Domäne vermittelt wird (Weng *et al.*, 1994). Die Interaktion zwischen hnRNP K und einer Variante von c-Src, in der die SH 3-Domäne deletiert ist, weist jedoch auf zusätzliche Wechselwirkungen beider Proteine hin (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Eine Interaktion kann auch durch die Wechselwirkung zwischen einem phosphorylierten Tyrosin und der SH 2-Domäne entstehen, wie für das KH-Domänen Protein Sam68 gezeigt wurde (Taylor und Shalloway, 1994). Interaktionen mit der KID werden häufig über post-translationale Modifikationen reguliert (Schullery *et al.*, 1999, Ostrowski *et al.*, 2000, Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). So wurde gezeigt, dass die in der KID liegenden Tyrosine 225, 230, 234, 236 und 380 in HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten durch c-Src phosphoryliert werden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Demzufolge wäre eine Wechselwirkung mit der SH 2-Domäne nach Beginn der Substrat-Phosphorylierung denkbar. Für die Interaktion von hnRNP K mit der Tyrosinkinase Lck oder dem Proto-Onkogen Vav konnte *in vitro* eine erhöhte Affinität zu bereits phosphoryliertem hnRNP K nachgewiesen werden (Ostrowski *et al.*, 2000). Eine Interaktion der SH 2-Domäne von c-Src wäre erst nach der Aktivierung der Tyrosinkinase und nach dem Beginn der Phosphorylierung von hnRNP K möglich und könnte zur Prozessivität der Substrat-Phosphorylierung beitragen, wie sie für die Abelson Kinase (Abl) gezeigt werden konnte (Mayer *et al.*, 1995). Für die Interaktion von c-Src und phosphoryliertem hnRNP K wurde jedoch keine erhöhte Affinität nachgewiesen (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) katalysieren die Mono- und Dimethylierung von Arg-Reste in Gly-Arg-reichen Motiven (Lin *et al.*, 1996, Tang *et al.*, 2000) und RxR-Sequenzen

(Smith *et al.*, 1999). Bisher wurden 9 verschiedene PRMTs charakterisiert, wobei PRMTs vom Typ1 (PRMT 1, 2, 3, 4, 6 und 8) Arginine asymmetrisch dimethylieren (Lin *et al.*, 1996, Tang *et al.*, 1998, Schurter *et al.*, 2001, Frankel *et al.*, 2002, Qui *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2005) und PRMTs vom Typ2 (PRMT 5, 7 und 9) Arginine symmetrisch dimethylieren (Branscombe *et al.*, 2001, Miranda *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2005, Cook *et al.*, 2006). RNA bindende Proteine wie hnRNPs werden methyliert (Boffa *et al.*, 1997). In dem KH-Domänen-Protein Sam68 und in hnRNP A1 lag zum Beispiel eine Methylierung von Argininen in RGG-Boxen vor (Liu und Dreyfuss, 1995, Kim *et al.*, 1997; Côté *et al.*, 2003). Andere hnRNPs wie hnRNP A, B, D, E und auch K sind *in vivo* methyliert, es gibt jedoch auch Ausnahmen wie hnRNP C, bei dem keine Methylierung gefunden wurde (Liu und Dreyfuss, 1995). HnRNP K weist im Bereich der prolinreichen Sequenzen ebenfalls charakteristische RGG-Boxen auf. Mittels Massenspektroskopie und Edman-Abbau konnte gezeigt werden, dass in zellulärem hnRNP K die Arginine 256, 258, 268, 296 und 299 quantitativ asymmetrisch dimethyliert sind (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Durch die Fraktionierung von HeLa-Zell-Extrakt, sowie Experimente mit rekombinanten Methyltransferasen und Studien mit embryonalen Stammzellen der Maus, die kein PRMT 1 exprimieren, konnte PRMT 1 als das einzige Enzym identifiziert werden, das hnRNP K *in vitro* und *in vivo* modifiziert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Obwohl gerade RNA bindende Proteine häufig methyliert werden, konnte bisher keine Beeinflussung der RNA-Bindung durch Methylierung gezeigt werden (Valentini *et al.*, 1999, Kühn *et al.*, 2003). Die Interaktion von hnRNP K mit dem DICE in der 3'UTR der r15-LOX-mRNA wird ebenfalls durch die PRMT 1-abhängige Methylierung nicht gestört (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Lokalisierung von RNA bindenden Proteinen kann durch die Arg-Methylierung reguliert werden (Yun und Fun, 2000, Côté *et al.*, 2003), hnRNP K blieb jedoch unabhängig von einer Methylierung durch PRMT 1 im Zellkern lokalisiert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Arg-Methylierung von Sam68 verhindert die Interaktion der Polyprolin-Motive mit der SH 3-Domäne der Tyrosinkinase Fyn (Bedford *et al.*, 2000). In HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die PRMT 1-anhängige Arginin-Methylierung von hnRNP K zu einer Reduktion der Interaktion mit c-Src führt (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Dies bewirkt eine Inhibierung der Aktivierung von c-Src und damit verbunden eine stark verminderte Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Arginin-Methylierung spielt nachweislich eine wichtige Rolle in der erythroiden Zellentwicklung. Hemmt man die PRMT-Aktivität, so wird die Entwicklung vom Erythroblasten zum reifen Erythrozyten verhindert (Bakker *et al.*, 2004). Wie das Zusammenspiel der Arginin-Methylierung, sowie der Tyrosin- und Serin-Phosphorylierung von hnRNP K im Zusammenhang mit der Regulierung der r15-LOX-mRNA während der Reifung erythroider Zellen verläuft, wird derzeit in einem induzierten humanen erythroiden Zellsystem untersucht (Naarmann *et al.*, 2007 eingereicht zur Publikation).

1.3 Die Tyrosinkinase c-Src und die Regulation ihrer Aktivität

Die Tyrosinkinase c-Src ist in vielen Geweben von höheren Organismen, jedoch nicht in Bakterien, Pflanzen oder Pilzen exprimiert. C-Src gehört zur Src-Tyrosinkinase-Familie, mit deren weiteren Mitgliedern Lyn, Fyn, Lck, Hck, Yes, Yrk, Blk und Fgr sich c-Src einen einheitlichen Strukturaufbau und die Fähigkeit zur katalytischen Übertragung eines γ -Phosphats von ATP auf spezifische Tyrosinreste in Substratmolekülen teilt (Brown und Cooper, 1996).

Das virale Homolog von *c-src* ist *v-src*, welches als erstes identifiziertes Onkogen zur Tumorbildung in Hühnern durch das *Rous Sarcoma Virus* beiträgt (Rous, 1911, Brugge und Erikson, 1977, Martin, 2001). Wie v-Src, so ist auch c-Src an der Bildung von Tumoren beteiligt, jedoch nur, wenn eine nicht regulierte erhöhte Aktivität in Zellen auftritt (Brugge und Erikson, 1977, Levin, 2004). Mögliche Ursachen hierfür können eine gesteigerte c-Src-Konzentration oder eine erhöhte spezifische Aktivität sein. In Fibroblasten oder auch bei Brustkrebs wurde gezeigt, dass dies zu einer Entartung der Zellen führt (Snyder *et al.*, 1985, Kato *et al.*, 1986, González *et al.*, 2006). C-Src kann durch verschiedene Interaktionen aus einem autoinhibierten Zustand in einen aktivierten überführt werden. Die Tyrosinkinase ist dann in der Lage, eine Vielzahl von Substratmolekülen zu phosphorylieren, die an Signalwegen beteiligt sind, welche die Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Morphologie und den Zellzyklus steuern (Brown und Cooper, 1996, Thomas und Brugge, 1997). In der Zelle ist c-Src meist mit Desmosomen der Plasmamembran, intrazellulären Membranen wie dem Endoplasmatischen Retikulum oder Endosomen assoziiert (Courtneidge *et al.*, 1980, Rohrschneider, 1980, Krueger *et al.*, 1983). Für Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass c-Src auch in sekretorischen Vesikeln und an der perinukleären Membran lokalisiert ist (David-Pfeuty und Nouvian-Dooghe, 1990, Kaplan *et al.*, 1992). Der Einfluss von c-Src erstreckt sich auf viele zelluläre Signalwege, was die Bedeutung der Tyrosinkinasen unterstreicht. Überraschenderweise waren Mäuse, aus deren Genom das *src*-Gen eliminiert wurde (*src-Knockout*-Mäuse) überlebensfähig (Soriano *et al.*, 1991). Auch bei *lck-Knockout*-Mäusen konnte lediglich eine Störung bei der peripheren T-Zell-Entwicklung nachgewiesen werden (Molina *et al.*, 1992). Dies lässt sich durch eine mögliche Redundanz der verschiedenen Tyrosinkinasen erklären, in der bei Verlust einer Tyrosinkinase andere aus der Familie deren Funktion übernehmen können. Da in Geweben von höheren Organismen immer mindestens eine der drei Tyrosinkinasen Fyn, Yes oder c-Src exprimiert wird, wurden Doppel-*Knockout*-Mäuse mit *c-src* und Tripel-*Knockout*-Mäuse generiert. Keine dieser Mäuse war überlebensfähig und kam über eine anfängliche embryonale Entwicklung hinaus (Stein *et al.*, 1994, Klinghoffer *et al.*, 1999).

Mitglieder der Tyrosinkinase-Familie besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau (Abb. 1.3) mit vier SH-Domänen (Superti-Furga und Courtneidge, 1995, Brown und Cooper, 1996,

Roskoski, 2004). Von c-Src (aus Mensch und Hühnern) und Hck existieren bereits 3D-Strukturen (Sicheri *et al.*, 1997, Williams *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 1997).

Bei der N-terminal gelegenen SH 4-Domäne handelt es sich um eine Myristoyl-Gruppe (C₁₄). Im Verlauf der Translation wird diese, unter Abspaltung des Start-Methionins, irreversibel an die zweite Aminosäure im Protein (Gly) gebunden (Towler *et al.*, 1988, Brown und Cooper, 1996). Obwohl sich im Zytosol geringe Mengen an myristoyliertem c-Src befinden, ist die Myristoyl-Gruppe der Hauptgrund für die vorwiegende Lokalisierung von c-Src an Membranen (David-Pfeuty *et al.*, 1993). Wird die Verankerung in der Membran verhindert, so konnte in Studien mit v-Src keine Entartung der Zellen gezeigt werden (Kamps *et al.*, 1986). Weitere Untersuchungen ergaben, dass aktive Kinasen aus der Src-Familie zur Signaltransduktion an einer Membran lokalisiert vorliegen müssen (Spencer *et al.*, 1995), was die Bedeutung der SH 4-Domäne für die Funktion der Tyrosinkinasen verdeutlicht.

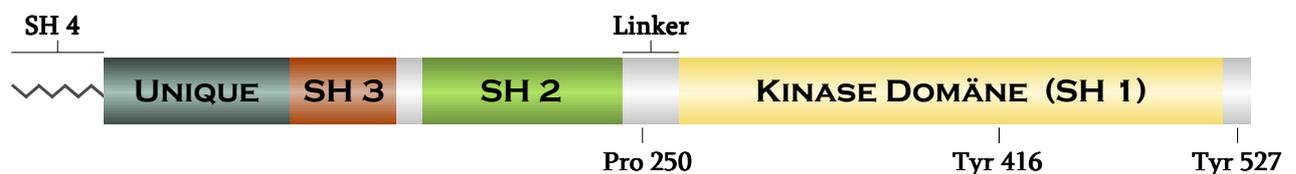


Abb. 1.3: Domänen-Struktur von c-Src. Die Tyrosinkinase c-Src besitzt vier SH-Domänen. Die N-terminale SH 4-Domäne besteht aus einer Myristoyl-Gruppe an die sich die *unique*-Domäne anschließt, die ausgeprägte Unterschiede unter den Tyrosinkinasen aufweist. Es folgen die SH-Domänen 3 und 2, welche eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Aktivität, der Interaktion mit anderen Faktoren und der Lokalisierung innerhalb der Zelle besitzen. Nach einer kurzen Linkersequenz folgen die Kinase-Domäne (SH 1) und das C-terminale Segment. Aminosäuren mit wichtigen Funktionen für die Regulierung der enzymatischen Aktivität wurden hervorgehoben.

An die SH 4-Domäne schließt sich die *unique*-Domäne an, die 30 bis 70 Aminosäuren lang und in der Src-Tyrosinkinase-Familie nicht konserviert ist. Die Funktion dieser Domäne ist noch nicht aufgeklärt, jedoch hat die Phosphorylierung bestimmter Serine und Threonine einen Einfluss auf die Aktivität von c-Src (Shenoy *et al.*, 1992).

Die SH 3-Domäne ist rund 50 Aminosäuren lang und bildet aus anti-parallelen β -Faltblättern eine globuläre Struktur mit einer hydrophoben Einbuchtung und einem sauren Bereich (Yu *et al.*, 1992, Noble *et al.*, 1993, Yu *et al.*, 1994). Für die Vermittlung von spezifischen SH 3-Ligand-Interaktionen sind der *RT-loop* und der *nSrc-loop* entscheidend (Musacchio *et al.*, 1992, Yu *et al.*, 1992, Noble *et al.*, 1993, Erpel *et al.*, 1995, Feng *et al.*, 1995, Lee *et al.*, 1995). Die dazwischen gelegenen aromatischen und hydrophoben Reste sind für die Erkennung und hydrophoben Wechselwirkungen mit dem PxxP-Motiv notwendig (Nobel *et al.*, 1993, Weng *et al.*, 1995, Mayer, 2001, Li, 2005). Das Polyprolin-Motiv bildet dabei eine linksgängige, helikale PP II-Konformation, die von der SH 3-Domäne als Ligand erkannt wird (Cicchetti *et al.*, 1992, Lim *et al.*, 1994, Yu *et al.*, 1994, Mayer und Eck, 1995). Durch das Aspartat 99 im sauren Bereich

der SH 3-Oberfläche kann ein Arginin über eine Salzbrücke gebunden werden (Lim *et al.*, 1992, Feng *et al.*, 1994, Weng *et al.*, 1995), was zur weiteren Spezifizierung der SH 3-Liganden-Interaktion beiträgt. Je nach Orientierung dieses Arginins N- oder C-terminal zum PxxP-Motiv werden die Liganden in zwei Klassen aufgeteilt (Mayer, 2001). Klasse I- und Klasse II-Motive werden dabei in gegenläufiger Orientierung auf der SH 3-Oberfläche gebunden, da das Arginin des Liganden stets mit dem Aspartat 99 der SH 3-Domäne eine Salzbrücke ausbildet (Mayer, 2001).

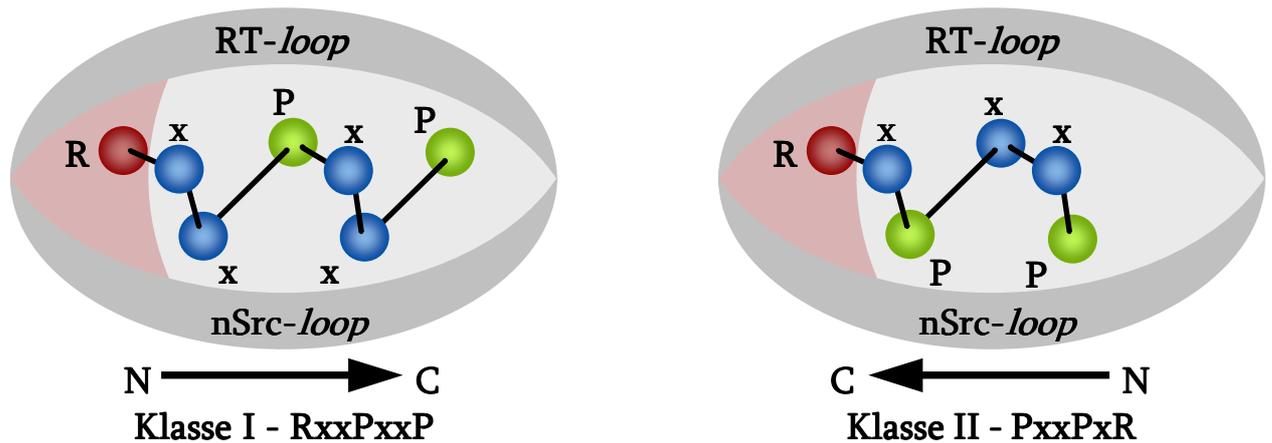


Abb. 1.4: SH 3-Domänen und deren Ligandenbindung. Liganden von SH 3-Domänen nehmen die Konformation einer linksgängigen PP II-Helix ein. Das Arginin (R) der Sequenz wird über eine Salzbrücke im sauren Teil der SH 3-Domänenoberfläche (rot) gebunden. Je nach Orientierung des Polyprolin-Motivs N- oder C-terminal zum Arginin werden die Liganden den Klassen I (RxxPxxP) oder II (PxxPxR) zugeteilt und in gegensätzlicher Orientierung an der hydrophoben Oberfläche der SH 3-Domäne gebunden. Der nSrc-loop und der RT-loop vermitteln weitere Spezifizierungen der SH 3-Liganden-Interaktion. (nach Mayer, 2001)

Die SH 3-Domäne und ihre Interaktionen haben einen großen Einfluss auf die Aktivität von c-Src und spielen eine wichtige Rolle in der Autoinhibierung und Aktivierung der Kinase (Superti-Furga *et al.*, 1993, Brown und Cooper, 1996, Xu *et al.*, 1997). Einen weiteren Einfluss hat sie jedoch möglicherweise auch auf die Substraterkennung von c-Src und dessen Lokalisierung. Mutationen in der SH 3-Domäne führen zur Veränderung der zellulären Lokalisierung, da hier möglicherweise bestimmte SH 3-Interaktionspartner nicht mehr binden können, welche die Lokalisierung beeinflussen (Kaplan *et al.*, 1990).

Die SH 2-Domäne setzt sich aus zwei α -Helices und vier β -Faltblättern zusammen und vermittelt spezifische Protein-Protein-Interaktionen der Tyrosinkinase. Sie interagiert mit phosphorylierten Tyrosinen, im Fall von c-Src, Fyn, Lck und Fgr bevorzugt mit solchen pYEEI-Sequenzen (Songyang *et al.*, 1993). Das phosphorylierte Tyrosin bildet eine Salzbrücke mit einem hoch konservierten Arginin (Arg175 in c-Src) und über hydrophobe Wechselwirkungen wird das Isoleucin gebunden (Eck *et al.*, 1993, Waksman *et al.*, 1993, Waksman und Kuriyan, 2004). Die sauren Glutamat-Reste stabilisieren diese Interaktion, indem sie mit basischen Aminosäureresten auf der SH 2-Oberfläche interagieren (Waksman

et al., 1993). Auch die SH 2-Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Autoinhibierung der Tyrosinkinase und der Regulation ihrer Aktivität (Superti-Furga *et al.*, 1993, Brown und Cooper, 1996, Xu *et al.*, 1997). Die SH 2-Domänen-Konsensussequenz von c-Src ähnelt seiner Substrat-Konsensussequenz (Songyang *et al.*, 1994). Es wäre denkbar, dass die SH 2-Domäne deshalb auch an der Stabilisierung von Kinase-Substrat-Interaktionen oder der Prozessivität der Substrat-Phosphorylierung beteiligt ist, wie dies für Abl gezeigt wurde (Mayer *et al.*, 1995). Mutationen innerhalb der SH 2-Domäne können, wie bei der SH 3-Domäne, zu veränderten Protein-Interaktionen führen, die eine veränderte Lokalisierung zur Folge haben (Kaplan *et al.*, 1990). Die Lokalisierung von Tyrosinkinase an Membranen könnte ebenfalls durch die SH 2-Domäne vermittelt werden, da diese selektiv Phospholipide wie Phosphatidylinositol (3,4,5)trisphosphat binden (Rameh *et al.*, 1995).

Zwischen der SH 2-Domäne und der Kinase-Domäne befindet sich eine kurze Linkersequenz mit dem Prolin 250. In der autoinhibierten Konformation von c-Src besteht hier eine intramolekulare Verbindung mit der SH 3-Domäne (Xu *et al.*, 1997, Roskoski, 2004).

Die sich anschließende Kinase-Domäne, früher auch als SH 1-Domäne bezeichnet, hat einen Aufbau, der innerhalb der Src-Tyrosinkinase-Familie hoch konserviert ist. Sie besitzt eine typisch zweigeteilte Struktur aus einem kürzeren N-terminalen Bereich von Aminosäure 267 bis 337, dem *small lobe* und einem größeren C-terminalen Anteil von Aminosäure 341 bis 529, dem *large lobe* (Knighton *et al.*, 1991, Xu *et al.*, 1997). Der N-terminale Bereich besteht aus antiparallelen β -Faltblättern und ist hauptsächlich für die Bindung und Orientierung des ATPs zuständig. Der C-terminale Bereich der Kinase-Domäne besteht dagegen überwiegend aus α -Helices und ist ebenfalls an der Bindung des ATPs, vor allem aber an der Substratbindung beteiligt. Zwischen beiden Teilen befindet sich der katalytische Spalt, in dem die Nukleotidbindung und der γ -Phosphat-Transfer erfolgt (Knighton *et al.*, 1991, Boggon und Eck, 2004). Für die katalytische Aktivität ist die Kinase-Domäne allein ausreichend (Cooper, 1990), alle anderen Domänen dienen der Regulation der Aktivität, der Spezifizierung der Interaktion mit anderen Proteinen und der Lokalisierung in der Zelle.

Das katalytische Zentrum besteht aus konservierten Aminosäuren und Strukturen (Huse und Kuriyan, 2002). Die KDD-Triade aus Lys 295, Asp 386 und Asp 404 spielt dabei eine wichtige Rolle (Hanks *et al.*, 1988). Lys 295 koordiniert durch Ionenbindungen das α - und β -Phosphat von ATP in der Katalyse (Xu *et al.*, 1999). Asp 386 ermöglicht als die katalytische Base den nukleophilen Angriff des γ -Phosphats auf die Tyrosyl-Gruppe des Substrats (Xu *et al.*, 1999). Asp 404 bindet das zweiwertige Ion, welches wiederum zur Stabilisierung des α - und β -Phosphats von ATP beiträgt (Xu *et al.*, 1999). Als zweiwertige Ionen können Magnesium (Mg^{2+})- oder Mangan (Mn^{2+})-Ionen fungieren, wobei es sich bei Magnesium um das natürlich vorkommende Ion handelt (Roskoski, 2004). Neben diesen für die Katalyse unabdingbaren Aminosäuren gibt es zwei weitere Strukturen, die einen entscheidenden Einfluss auf die

Aktivität der Kinase haben, nämlich die α C-Helix und der *activation loop*. Diese beiden Strukturen ändern ihre Konformation in Abhängigkeit vom aktiven oder inhibierten Zustand der Kinase (Sicheri und Kuriyan, 1997, Xu *et al.*, 1997, Huse und Kuriyan, 2002). Die α C-Helix gehört zum N-terminalen, der *activation loop* zum C-terminalen Bereich der Kinase-Domäne. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Autoinhibierung und Aktivierung der Tyrosinkinase. Hierbei ist besonders das Tyr 416 im *activation loop* und dessen Phosphorylierung entscheidend (Xu *et al.*, 1999, Huse und Kuriyan, 2002). C-Src phosphoryliert bevorzugt Substrate mit der Konsensussequenz EEEIYG/E-EFD, welche wie bereits erwähnt eine große Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz der SH 2-Domäne aufweist (Songyang *et al.*, 1993, Songyang *et al.*, 1994) und möglicherweise die Prozessivität der Substrat-Phosphorylierung unterstützt.

An die Kinase-Domäne schließt sich ein aus wenigen Aminosäuren bestehendes C-terminales Segment an, das entscheidend für die Regulierung der Aktivität der Kinase ist. Über 90% der c-Src Moleküle einer Zelle sind an Tyr 527 phosphoryliert (Kussick und Cooper, 1992 a und b, Shenoy *et al.*, 1992, Zheng *et al.*, 2000). Die zytoplasmatische *C-terminal Src kinase* (Csk) wird ubiquitär in Säugern exprimiert und phosphoryliert spezifisch das Tyr 527 in c-Src (Okada und Nakagawa, 1989, Nada *et al.*, 1991). Auffällig dabei ist, dass die SH 2-Domäne von Csk eine hohe Affinität zur Umgebung des phosphorylierten Tyr 416 in c-Src besitzt, was eine Beteiligung von Csk an der Regulierung der Deaktivierung von c-Src vermuten lässt (Bougeret *et al.*, 1995). Neben Csk ist auch noch die *Csk homologous kinase* (Chk) für die Phosphorylierung von Tyr 527 in c-Src verantwortlich (Hamaguchi *et al.*, 1996, Zrihan-Licht *et al.*, 1997, Chong *et al.*, 2004). Die SH 2-Domäne von c-Src kann intramolekular mit dem phosphorylierten Tyrosin interagieren, wodurch der inaktive Zustand von c-Src stabilisiert wird (Matsuda *et al.*, 1990). Das virale Homolog v-Src ist im Gegensatz zu c-Src verkürzt und besitzt kein C-terminales Fragment zur Regulierung seiner Aktivität (Jove und Hanafusa, 1987, Parsons und Webber, 1989). V-Src ist deshalb konstitutiv aktiv, was zur Tumorentstehung beiträgt (Cooper *et al.*, 1986).

C-Src kann zwei verschiedene Konformationen einnehmen, welche Einfluss auf die katalytische Aktivität der Kinase-Domäne haben. In der autoinhibierten Konformation kann durch intramolekulare Interaktionen der SH 2- und SH 3-Domäne das katalytische Zentrum nicht seine aktive Konformation einnehmen und die katalytische Aktivität wird supprimiert (Superti-Furga *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 1997, Hubbard, 1999, Xu *et al.*, 1999). Die SH 2-Domäne bindet dabei das phosphorylierte Tyr 527 im C-terminalen Segment, wodurch sie direkt neben dem *large lobe* der Kinase-Domäne positioniert wird (Roussel *et al.*, 1991, Brown und Cooper, 1996, Thomas und Brugge, 1997, Bjorge *et al.*, 2000, Hubbard und Till, 2000). Die SH 3-Domäne ist in der autoinhibierten Konformation intramolekular mit dem zwischen der SH 2- und der Kinase-Domäne liegenden Linker verbunden (Xu *et al.*, 1997). Die normalerweise

von der SH 3-Domäne gebundenen Liganden besitzen die Konformation einer linksgängigen PP II-Helix (Cicchetti *et al.*, 1992, Yu *et al.*, 1994, Mayer und Eck, 1995), die Linkerregion bildet jedoch lediglich eine Pseudo-PP II-Helix (Cohen *et al.*, 1995). In der Kristallstruktur von c-Src (Abb. 1.5) bilden die Aminosäuren 413 bis 418 im *activation loop* eine helikale Struktur und Tyr 416 wird nach innen gerichtet (Xu *et al.*, 1997). Prolin 250 im Linker kontaktiert durch hydrophobe Wechselwirkungen die aromatischen Aminosäurereste auf der SH 3-Domänenoberfläche und wird an der ersten Prolin-Bindestelle positioniert (Xu *et al.*, 1997). Die Aminosäuren 254 bis 259 kontaktieren ebenfalls die Oberfläche der SH 3-Domäne (Xu *et al.*, 1997). Durch die Interaktion mit dem Linker wird die SH 3-Domäne direkt neben dem *small lobe* der Kinase platziert und dort durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken zwischen dem *RT-loop* beziehungsweise dem *nSrc-loop* mit der Kinase-Domäne stabilisiert (Erpel *et al.*, 1995, Xu *et al.*, 1997).

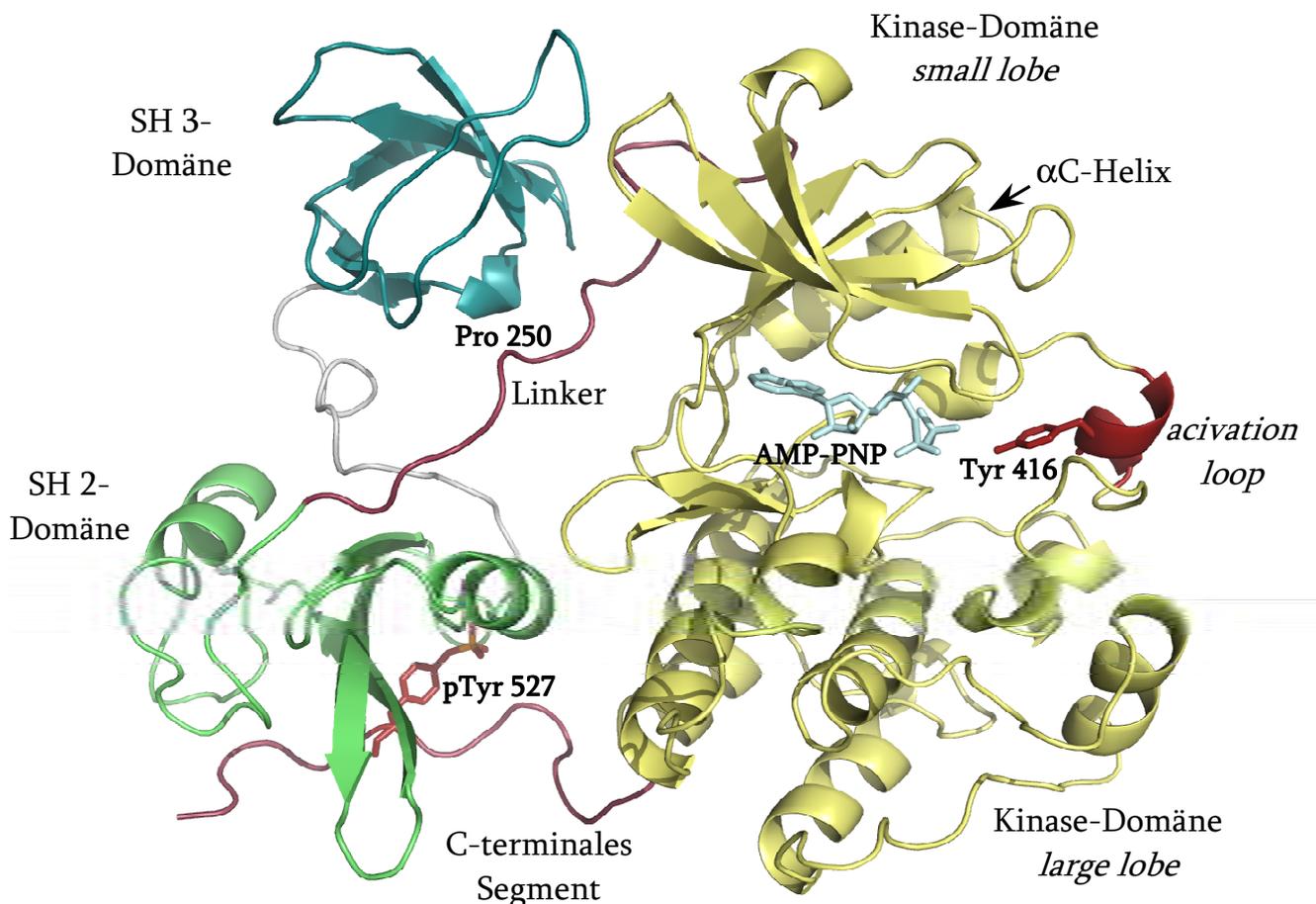


Abb. 1.5: Struktur des c-Src-Peptides Aminosäuren 83 bis 533 (Xu *et al.*, 1999). SH 3- und SH 2-Domäne am N-Terminus, die Linkerregion, die Kinase-Domäne, bestehend aus dem *small lobe* und dem *large lobe*, und dem C-terminalen Segment. 3D-Darstellung der inaktiven Konformation von c-Src: Prolin 250 interagiert mit der SH 3-Domäne, phosphoryliertes Tyr 527 bindet die SH 2-Domäne und die α C-Helix liegt in ihrer inaktiven Konformation vor. Ein Teil des *activation loops* bildet eine helikale Struktur, wodurch das Tyr 416 in das katalytische Zentrum hinein zeigt, in dem nicht hydrolysierbares AMP-PNP anstelle von ATP gebunden ist.

Die kompakte Konformation, in der die SH-Domänen 2 und 3 direkt an der Kinase-Domäne platziert sind, wird als *clamp* bezeichnet und inhibiert die Kinase-Aktivität (Harrison, 2003). Die für die Aktivität ungünstige Verschiebung der α C-Helix im *small lobe* wird durch Interaktionen mit Leu 255 und Trp 260 stabilisiert (Gonfloni *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 1997, Gonfloni *et al.*, 1999), so dass keine Salzbrücke zwischen Lys 295 und Glu 310 ausgebildet werden kann (Sicheri und Kuriyan, 1997, Xu *et al.*, 1997). Die richtige Ausrichtung von Lys 295 ist jedoch für die Bindung des ATPs nötig (Zheng *et al.*, 1993, Sicheri und Kuriyan, 1997, Xu *et al.*, 1999, Huse und Kuriyan, 2002). Neben der α C-Helix liegt auch der *activation loop* in seiner inaktiven helikalen Konformation vor, wodurch die Substratbindung verhindert wird und das Tyr 416 für eine Phosphorylierung unzugänglich in das katalytische Zentrum hineinragt (Xu *et al.*, 1999).

Äußere Einflüsse wie oxidativer Stress oder Strahlung (UV- und γ -Strahlung), aber auch eine erhöhte Kalziumkonzentration in der Zelle können eine Aktivierung von c-Src verursachen (Ward, 1994, Rusanescu *et al.*, 1995). Eine Öffnung der Konformation und somit eine Aktivierung kann durch die Dephosphorylierung von Tyr 527 verursacht werden (Courtneidge, 1985), was bereits für die Phosphatasen PTP1B, Shp1 und Shp2 gezeigt wurde (Zheng *et al.*, 1992, Bjorge *et al.*, 2000, Roskoski, 2005). Auch die Interaktion der SH-Domänen 2 und 3 mit externen Liganden höherer Affinität führt zu einer Öffnung der Struktur und damit zu einer Aktivierung der Kinase-Aktivität (Brown und Cooper, 1996). Diese Form der Aktivierung konnte für die Interaktion von c-Src mit Cas (Sakai *et al.*, 1994, Nakamoto *et al.*, 1996, Burnham *et al.*, 2000, Nasertorabi *et al.*, 2006), dem PDGF-Rezeptor (Kypta *et al.*, 1990, Erpel und Courtneidge, 1995) oder dem *Src interacting / signal integrating protein* Sin (Alexandropoulos und Baltimore, 1996) gezeigt werden. Auch die Deletion der SH 2- oder SH 3-Domäne kann eine Aktivierung der Kinase bewirken (Seidel-Dugan *et al.*, 1992, Moarefi *et al.*, 1997). Ist die geschlossene, inaktive *clamp*-Konformation aufgehoben, nehmen die α C-Helix und der *activation loop* im katalytischen Zentrum ihre aktive Konformation ein (Xu *et al.*, 1999). Das Tyr 416 im *activation loop* zeigt nicht mehr in Richtung des katalytischen Zentrums, sondern ist nach außen gestellt (Xu *et al.*, 1999). Dies ist Voraussetzung für eine Autophosphorylierung in *trans* zwischen zwei c-Src-Molekülen (Cooper und MacAuley, 1988, Sun *et al.*, 2002). Der *activation loop* nimmt daraufhin seine endgültig aktive Konformation ein, wobei Asp 404 das zweiwertige Ion bindet und der C-terminale Teil des *activation loops* als Plattform für die Substratbindung fungiert, womit die Rekonstitution des aktiven Zentrums abgeschlossen ist (Zheng *et al.*, 1993, Yamaguchi und Hendrickson, 1996, Xu *et al.*, 1999, Huse und Kuriyan, 2002). Tyr 416 ist die Haupt-Autophosphorylierungsstelle in c-Src (Smart *et al.*, 1981) und die volle katalytische Aktivität des Enzyms hängt von dessen Phosphorylierung ab, da dies die aktive Konformation des *activation loops* stabilisiert (Xu *et al.*, 1999, Huse und Kuriyan, 2002).

Die verschiedenen Möglichkeiten der Regulierung der enzymatischen Aktivität weisen darauf hin, dass die Kontrolle des Aktivierungszustandes von c-Src in der Zelle von großer Bedeutung ist. Durch die Phosphorylierung als post-translationale Modifikation werden viele Interaktionen zwischen Proteinen, RNA und DNA reguliert. Eine unkontrollierte Phosphorylierungsaktivität kann somit zur Entartung und Tumorbildung führen (Cooper *et al.*, 1986, Brown und Cooper, 1996, Thomas und Brugge, 1997).

1.4 Zielstellung

Sowohl hnRNP K als auch c-Src werden in verschiedenen Geweben höherer Organismen exprimiert. C-Src kann durch intermolekulare Wechselwirkungen mit Proteinen aktiviert werden und phosphoryliert Tyrosine. Post-transnationale Modifikationen, wie die Phosphorylierung von Proteinen, sind eine wichtige Möglichkeit in den Zellen Signalkaskaden zu regulieren. Die Aktivierung von c-Src und damit die gesamte Steuerung der Kinaseaktivität muss streng reguliert sein, da sonst andere Prozesse nicht mehr spezifisch kontrolliert werden können. HnRNP K gehört zu den wenigen bekannten Proteinen, die c-Src sowohl aktivieren können, als auch von aktivem c-Src phosphoryliert werden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Wie entscheidend sich die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K auf die Interaktion mit anderen Faktoren auswirkt, konnte anhand des DICE in der 3'UTR der r15-LOX-mRNA gezeigt werden. Ist Tyr 458 in der KH-Domäne 3 von hnRNP K phosphoryliert, so bindet hnRNP K nicht mehr an das DICE (Messias *et al.*, 2006). Die inaktive Konformation von c-Src wird stabilisiert durch die Wechselwirkung seiner SH 3-Domäne mit einer pseudo-helikalen Struktur um Prolin 250 im Linker (Xu *et al.*, 1997). Eine Aktivierung der Tyrosinkinase kann durch die intermolekulare Interaktion seiner SH 3-Domäne mit einer linksgängigen PP II-Helix höherer Affinität erfolgen (Brown und Cooper, 1996). In hnRNP K existieren drei prolinreiche Sequenzen (P1-3) (Abb. 1.2), die möglicherweise durch ihre Interaktion mit der SH 3-Domäne von c-Src eine Aktivierung der Tyrosinkinase bewirken können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die prolinreichen Sequenzen in hnRNP K mit der isolierten SH 3-Domäne von c-Src *in vitro* interagieren (Van Seuning *et al.*, 1995). HnRNP E1, ein strukturell eng mit hnRNP K verwandtes Protein, besitzt keine prolinreichen Sequenzen (Abb. 1.6) und kann c-Src nicht aktivieren (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Der Grund, warum hnRNP K und nicht hnRNP E1 c-Src aktiviert, könnte also möglicherweise in den prolinreichen Sequenzen von hnRNP K liegen. Ausgehend von dieser Annahme wurden in hnRNP K die Aminosäuren 240 bis 337 deletiert (hnRNP K (ΔP_{1-3})) um eine Variante zu erzeugen, die genau wie hnRNP E1, keine prolinreichen Sequenzen enthält (Abb. 1.6).

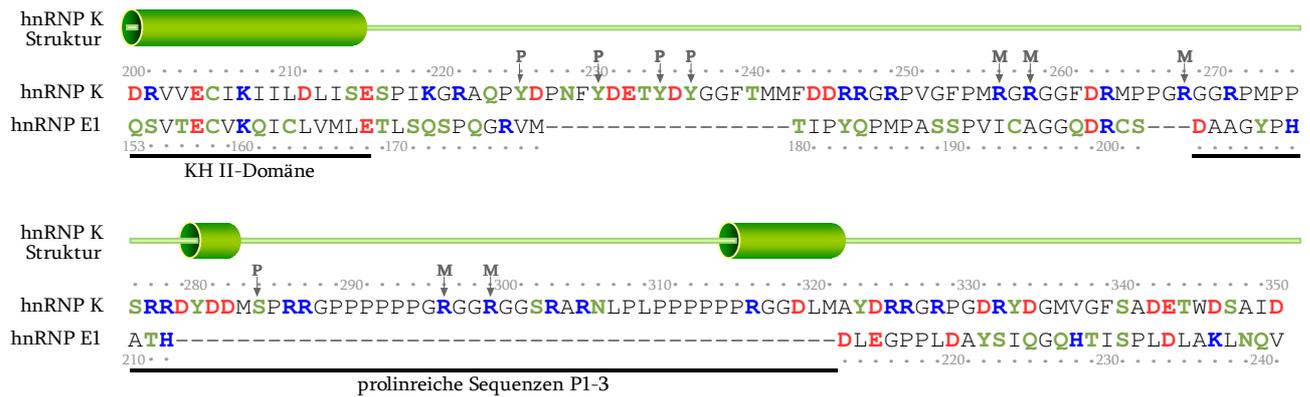


Abb. 1.6: Ausschnitt aus dem Aminosäure-Sequenzvergleich von hnRNP K und hnRNP E1. Sequenzvergleich der Aminosäuren 200 bis 350 aus hnRNP K mit den Aminosäuren 153 bis 241 von hnRNP E1. Post-translational in hnRNP K modifizierte Aminosäuren wurden gekennzeichnet (P: Tyrosin-Phosphorylierung durch c-Src, Serin-Phosphorylierung durch ERK, M: Arginin-Methylierung durch PRMT1). Aminosäurereste: sauer (D,E), basisch (R,K,H), ungeladen und polar (S,N,T,Q,C,Y), neutral (G,A,V,M,I,P,L,W,F). Strukturelle Vorhersage von hnRNP K nach Bairoch *et al.* (1997): helikale Struktur, unstrukturierter Bereich.

In HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten sollte untersucht werden, ob die Variante hnRNP K (ΔP_{1-3}) genau wie der Wildtyp mit c-Src interagiert und die Tyrosinkinase aktiviert. Sowohl hnRNP K als auch hnRNP E1 binden das DICE in der 3'UTR der r15-LOX-mRNA und verhindern über diese Bindung die Translation der mRNA (Ostareck *et al.*, 1997, Ostareck *et al.*, 2001). Die Inhibierung der Translation sollte dementsprechend unabhängig von den prolinreichen Sequenzen erfolgen. Die Translationsinhibierung eines Reporter-Luciferase-Konstrukts mit einem DICE in der 3'UTR (LUC-DICE) sollte zur funktionellen Charakterisierung ebenfalls untersucht werden (Adolph *et al.*, 2007, Abb. 1.7). HeLa-Zellen wurden co-transfiziert mit cDNAs, die für LUC-DICE (Bahn 1-7), U1A (Bahn 1), His-hnRNP K (Bahn 2-4) oder His-hnRNP K (ΔP_{1-3}) (Bahn 5-7), c-Src (Bahn 3 und 6) oder Src (Y416F) (Bahn 4 und 7) kodieren. Das Zell-Lysat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen den His-tag der hnRNP K-Varianten (α -His), Src (α -Src), phosphorylierte Tyrosine (α -pY) oder einer Ladekontrolle (α -GAPDH) untersucht. Die His-hnRNP K-Varianten wurden immunpräzipitiert (α -His) und Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen den His-tag der hnRNP K-Varianten (α -His), Src (α -Src) oder phosphorylierte Tyrosine (α -pY) durchgeführt. Die Expression des Reporter-Proteins wurde anhand der Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Variante hnRNP K (ΔP_{1-3}) bindet wie hnRNP K an das DICE und inhibiert die Translation der Reporter-LUC-DICE-mRNA (Bahn 2 und 5). Die Co-Expression von c-Src mit hnRNP K (ΔP_{1-3}) bewirkt nicht die Aufhebung der Translationsinhibierung wie es für c-Src und hnRNP K nachgewiesen wurde (Bahn 3 und 6). Dies lässt darauf schließen, dass hnRNP K (ΔP_{1-3}) im Gegensatz zu hnRNP K in der Gegenwart von c-Src an das DICE bindet.

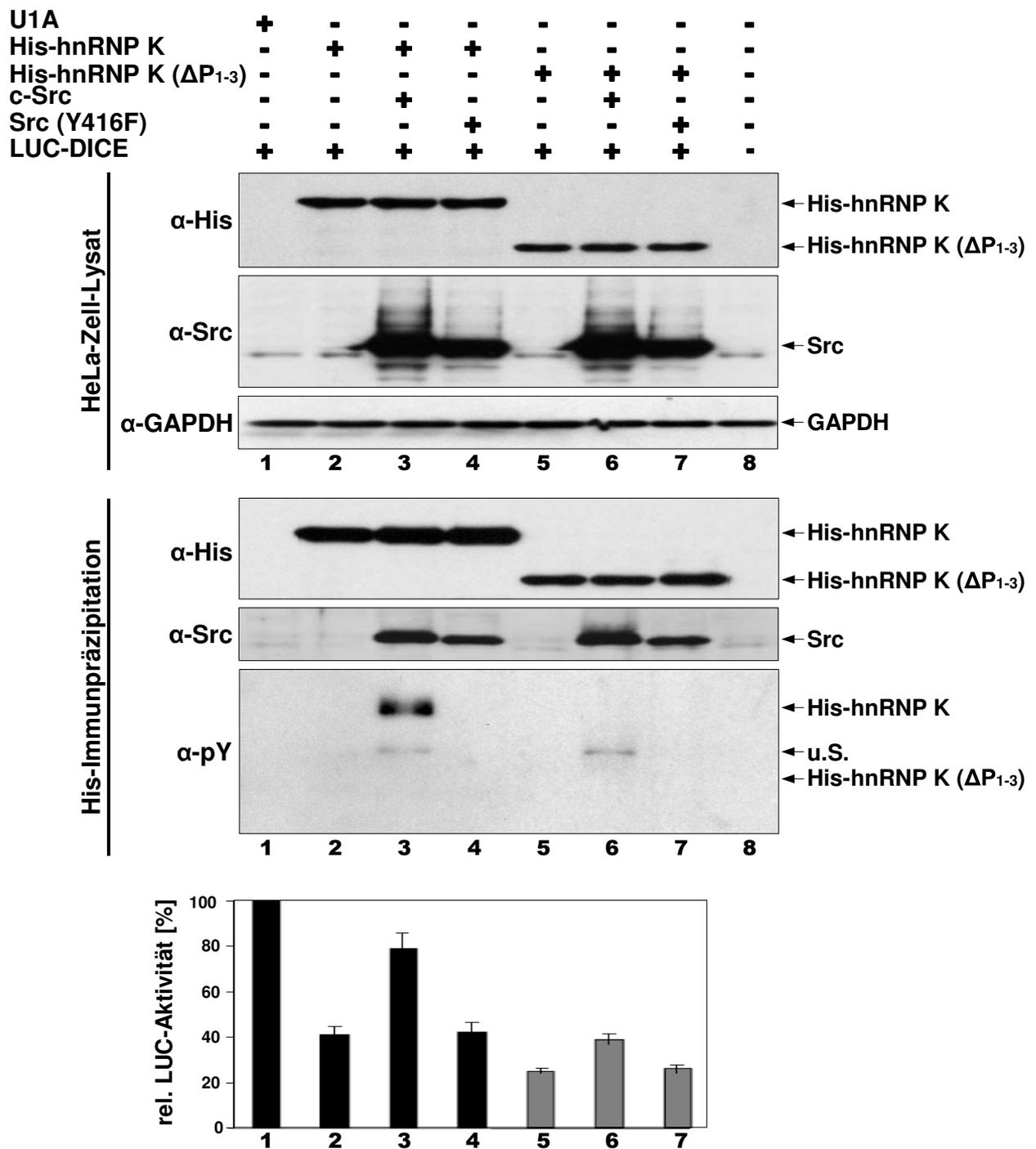


Abb. 1.7: HeLa-Zell-Transfektionsexperiment mit der Variante hnRNP K (ΔP_{1-3}). HeLa-Zellen wurden transfiziert mit cDNAs, die für LUC-DICE (1-7), U1A (1), His-hnRNP K (3-4), His-hnRNP K (ΔP_{1-3}) (5-7), c-Src (3, 6) oder Src (Y416F) (4, 7) kodieren. HeLa-Zell-Lysat wurde in Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen die His-hnRNP K-Varianten (α -His), Src (α -Src) und die Ladekontrolle GAPDH (α -GAPDH) analysiert. Nach Immunpräzipitation der His-hnRNP K-Varianten (α -His) erfolgten Westernblot-Analyse mit Antikörpern gegen den His-tag (α -His), Src (α -Src) und phosphorylierte Tyrosine (α -pY). Die Expression der Reporter-mRNA wurde anhand der relativen enzymatischen Aktivität bezogen auf die Kontrollreaktion mit U1A (1) angegeben (Adolph *et al.*, 2007).

In der Immunpräzipitation von hnRNP K (ΔP_{1-3}) konnte keine Tyrosin-Phosphorylierung des Proteins detektiert werden, wohingegen hnRNP K phosphoryliert vorlag (Bahn 3 und 6). HnRNP K (ΔP_{1-3}) aktiviert c-Src nicht und wird demzufolge nicht phosphoryliert. Die prolinreichen Sequenzen P1-3 in hnRNP K sind also für die Aktivierung von c-Src notwendig (Abb. 1.7), aber nicht für die Bindung an das DICE (Abb. 1.7, Messias *et al.*, 2006). Welche der sechs PxxP-Motive in den prolinreichen Sequenzen P1-3 für die Aktivierung von c-Src notwendig sind, sollte in *in vitro* Kinase-Aktivierungsassays und in HeLa-Zell-Transfektions-experimenten (*in vivo*) untersucht werden.

Interessanterweise konnte in dem Versuch ebenfalls gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen hnRNP K und c-Src nicht ausschließlich auf einer Wechselwirkung zwischen den prolinreichen Sequenzen mit der SH 3-Domäne beruht (Abb. 1.7). In der Immunpräzipitation der His-hnRNP K-Varianten präzipitiert hnRNP K beide Src-Varianten (Bahn 3 und 4) und auch in Abwesenheit der prolinreichen Sequenzen in hnRNP K (ΔP_{1-3}) erfolgte eine Co-Immunpräzipitation der Src-Varianten (Bahn 6 und 7). Für Src-Varianten, in denen die SH 3-Domäne deletiert worden war, konnte bereits eine Interaktion mit hnRNP K nachgewiesen werden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Neben der Polyprolin-SH 3-Wechselwirkung, die zur Aktivierung von c-Src führt, muss dementsprechend noch ein weiterer Kontakt zwischen den Proteinen existieren, der die stabile Interaktion ermöglicht. Um den Bereich in hnRNP K eingrenzen zu können, durch den diese Interaktion mit c-Src zustande kommt, wurden verschiedene Varianten von hnRNP K generiert. Diese sollten auf ihr Bindeverhalten mit c-Src in Protein-Interaktionsassays (*in vitro*), als auch in HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten (*in vivo*) mit bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) (Hu *et al.*, 2002, Hu und Kerppola, 2003) untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acryl/Bisacrylamid	Roth
Accustain [®] Formalinsolution 10% (v/v)	Sigma-Aldrich
[$\gamma^{32}\text{P}$]Adenosintriphosphat ([$\gamma^{32}\text{P}$]ATP)	Amersham Biosciences
Agarose	Invitrogen
Aminosäuren	Sigma
Aminosäurelösung	GIBCO (Invitrogen)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck
Ammoniumchlorid	Merck
Ampicillin, Na-Salz	Roth
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Merck
β -Glycerophosphat	Sigma
β -Mercaptoethanol	Fluka
Casein, hydrolysiert	Life Technologies
Coomassie-Brilliantblau R250	Serva
DAPI	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	GERBU
DMEM	GIBCO (Invitrogen)
DMSO	Merck
DNA ladder 1kb Plus	Invitrogen
DNA ladder 50bp	New England BioLabs
EDTA (TitriplexIII)	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol (99%)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Glukose	Merck
Glutathion	Merck
Glycerin	Roth

Glycin	Merck
GSH-Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences
HEPES Na-Salz	Sigma
HEPES	GERBU
HiDi	Applied Biosystems
Imidazol	Merck
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	Peqlab
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kalziumdichlorid	Merck
Kreatinphosphat	Sigma
(Luria Bertani) LB-Medium	Roth
Leupeptin	Roche
Magne His™ Ni- <i>Particles</i>	Promega
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Mangan (II) chlorid	Merck
Methanol	Roth
Mowiol	Calbiochem®
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat	Serva
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydroxid	Merck
Natriummolybdat	Sigma
Natriumorthovanadat	Sigma
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Nonidet P40	Fluka
Oligonukleotide	Invitrogen
PageRuler™ pre-stained protein ladder	Fermentas
Penicillin/Streptomycin	GIBCO (Invitrogen)
Performance optimized Polymer 6	Applied Biosystems
Phenyl-methyl-sulfonylfluorid (PMSF)	Roth
p-nitro-phenylphosphat	Sigma
Protein A-Sepharose	Amersham Biosciences
Protein G-Agarose	Roche

Rinderserumalbumin (BSA)	Merck
Salzsäure, rauchend	Merck
Select Agar	Invitrogen
Sephadex G50	Amersham
[³⁵ S]-Methionin	Perkin Elmer
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Triton X-100	ICN Biomedicals Inc.
Trypsin	Gibco (Invitrogen)
Tween [®] 20	Merck

2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
DNA-Polymerase I, large Fragm. (Klenow)	New England BioLabs
KspA1	Fermentas
Nuklease (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Roche
Restriktionsenzyme	New England BioLabs
RNase A	Roche
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs
T7-RNA-Polymerase	Stratagene
Turbo Pfu DNA-Polymerase	Stratagene

2.1.3 Antikörper

α-c-Src	Abcam
α-v-Src	Oncogene
α-Lck	Santa Cruz Biotechnologie
α-Lyn	Santa Cruz Biotechnologie
α-Fyn	Santa Cruz Biotechnologie
α-hnRNP K R20745	Santa Cruz Biotechnologie
α-hnRNP K	Matritech
α-hnRNP E1	Eurogentec
α-hnRNP E2	Eurogentec
α-GAPDH	Abcam
α-pY	Santa Cruz Biotechnologie

α -His 5	Qiagen
α -His 15	Santa Cruz Biotechnologie
α -mouse IgG-HRP	Amersham Biosciences
α -rabbit IgG-HRP	Amersham Biosciences
α -chicken IgY-HRP	Promega
α -mouse Cy3	Dianova
α -rabbit Cy3	Dianova
α -mouse Cy5	Dianova
α -rabbit Cy5	Dianova
α -rabbit-FITC	Dianova
Phalloidin-TRITC	Sigma

2.1.4 Kits

AccuPrime™ Pfx Super Mix	Invitrogen
Big-DyeTerminator-cycle-sequencing-Kit	Applied Biosystems
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep-KitI	Peqlab
Plasmid Midiprep-Kit	Qiagen
QIAEX®-Gel Extraction-Kit	Qiagen
QIAquick®-PCR-Purification-Kit	Qiagen
QuickLigations-Kit	New England BioLabs
Super Signal®West Pico chemilumin. Substr.	Pierce

2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer
Chromatographie-Säulen	BioRad
Immobilon™ P Transfer Membran	Millipore
Mikroskop E600	Nikon
Phosphoimager Typhoon 9200	Amersham Biosciences
Robo Cycler Gradient 96	Stratagene
Röntgenfilm, Kodak	Sigma
Spektrophotometer Hitachi U3000	Scientific Instruments
Zellkultur Zubehör	TPP

2.2 Quantifizierung und Charakterisierung von DNA- und Proteinpräparationen

2.2.1 DNA Konzentrationsbestimmung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Konzentration einer Lösung wurde durch ein Spektrum im Wellenlängenbereich 240-320nm ermittelt. Nukleinsäuren weisen bei 260nm ein Absorptionsmaximum auf, wobei eine Absorption von 1 bei 260nm einer DNA-Konzentration von 50ng/µl entspricht. Um bei den Messungen im linearen Messbereich des Photometers (Hitachi U3000) zu bleiben, wurde nur bis zu einer Absorption von 1,0 gemessen. Bei höheren Absorptionen musste die Messung mit einer stärkeren Verdünnung wiederholt werden. Verunreinigungen der DNA-Lösung durch Protein (λ_{\max} 280nm) oder andere Stoffe wie zum Beispiel Phenol (λ_{\max} 240nm) wären im Spektrum sichtbar gewesen.

2.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die qualitative Untersuchung von nukleinsäurehaltigen Lösungen erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese. 1% (w/v) Agarose wurde in TBE-Puffer aufgekocht, bis sich die Agarose gelöst hatte. Beim Gießen des Gels wurde zusätzlich 0,001‰ (w/v) Ethidiumbromid zugegeben. Die Proben wurden mit vierfachem DNA-Probenpuffer versetzt und im Agarosegel (70mA) elektrophoretisch aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Eine erste Abschätzung der DNA-Menge in den Proben wurde anhand von Markern (DNA ladder 1kb Plus, Invitrogen; DNA ladder 50bp, NEB) und deren bekannten Konzentrationen durchgeführt.

4x DNA-Probenpuffer:		1x TBE-Puffer:	
0,25% (w/v)	Bromphenolblau	90mM	Tris-Base
0,25% (w/v)	Xylen-Cyanol FF	90mM	Borsäure
30% (v/v)	Glycerin	2mM	EDTA

2.2.3 Sequenzierung und enzymatischer Verdau von DNA

Die Überprüfung von Plasmid-DNA erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Kam es im Verlauf einer Klonierung zu Veränderungen der Restriktionsschnittstellen oder der Abstand zwischen zwei Restriktionsschnittstellen variierte, ließ sich mutierte DNA mit Hilfe eines

Restriktionsverdau nachweisen. Es wurden dabei spezifische Restriktionsenzyme verwendet und die entstandenen Fragmentgrößen nach einer Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.2) im Vergleich mit dem Marker bestimmt.

Eine weitere Möglichkeit war die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). In der Polymerasekettenreaktion (PCR) -Reaktion waren hier neben den 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch 2'-3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) vorhanden, die entsprechend der 4 Basen mit verschiedenen Fluorophoren markiert waren. Wurden diese ddNTPs in den zu synthetisierenden DNA-Strang eingebaut, wurde eine weitere Verlängerung durch die fehlende 3'-OH-Gruppe verhindert. Dieser Kettenabbruch erfolgte statistisch über das ganze DNA-Fragment verteilt und die unterschiedlich langen Fragmente konnten kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Anregung der Fluorophore erfolgte durch Laserenergie und ermöglichte eine Zuordnung der jeweiligen Base zu einer bestimmten Fragmentlänge.

Die Sequenzierungs-PCR wurde mit 10µl H₂O komplettiert und mit Hilfe von Sephadex G50 Säulenmaterial aufgereinigt, welches die ungebundenen dNTPs, Fluorophor-ddNTPs und weitere Bestandteile aus der PCR abtrennte. Anschließend wurden 8µl der PCR mit 25µl HiDi vermischt und 5min bei 95°C gekocht. Die Kapillarelektrophorese erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer).

PCR-Ansatz:		PCR-Bedingungen:	
150ng	DNA	1x	95°C 5min
0,33µM	Primer		
2µl	5x Terminator Puffer		{ 95°C 30sec
2µl	ABI-Mix	35x	{
add 10µl	H ₂ O		{ 55°C 4,5min

2.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von proteinhaltigen Lösungen wurde nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Im sauren Milieu der Bradford-Lösung liegen alle Aminosäurereste protoniert vor und die unprotonierte Sulfonat-Form des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau wird durch Bindung mit den Seitenketten von Proteinen stabilisiert. Dies verschiebt das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465nm nach 595nm. Das verwendete Bradford-Reagenz von Bio-Rad wurde 5-fach verdünnt und mit 1-10µl der Probe versetzt. Die Messung der Absorption bei 595nm erfolgte nach fünfminütiger Inkubationszeit im Photometer. Die Absorptionswerte wurden mit einer Standardgeraden ausgewertet, welche mit BSA erstellt wurde.

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Reinheit von Proteinlösungen wurde mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Durch die Anlagerung von SDS an die Proteine werden diese entsprechend ihrer Größe in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Ein reduzierendes Milieu wird durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol im Probenpuffer erreicht, sodass Disulfidbrücken vollständig reduziert vorliegen.

Die mit 2x Probenpuffer versetzten Proben wurden für 5min bei 90°C gekocht und anschließend auf ein diskontinuierliches Gel geladen. Dieses bestand aus einem Sammelgelbereich (5% (w/v) Acrylamid) zur Fokussierung der geladenen Proben und einem Trenngelbereich (8-12% (w/v) Acrylamid) zur Auftrennung der verschiedenen Proteingrößen. Die Gelelektrophorese wurde bei 180V oder über Nacht bei 30V durchgeführt. Das Gel wurde in angewärmter Färbelösung für 30min eingefärbt und der Hintergrund mit wiederholtem Inkubieren in frischer Entfärbelösung wieder entfärbt. Proteine verhindern ein schnelles Entfärben und zeichnen sich so durch eine dunklere Färbung vom schneller entfärbbaren Hintergrund des Acrylamidgels ab.

Sammelgel:		Trenngel:	
5% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid	8 bis 12% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid
125mM	Tris-HCl	375mM	Tris-HCl
0,1% (w/v)	APS	0,1% (w/v)	APS
0,4‰ (v/v)	TEMED	0,4‰ (v/v)	TEMED
	pH 6,8		pH 8,7
2x Probenpuffer:		Laufpuffer:	
250mM	Tris-HCl	25mM	Tris
140mM	SDS	3,5mM	SDS
0,2‰ (w/v)	Bromphenolblau	250mM	Glycin
10% (v/v)	β -Mercaptoethanol		
20% (v/v)	Glycerin		
	pH 6,8		
Färbelösung :		Entfärbelösung :	
10% (v/v)	Essigsäure	10% (v/v)	Essigsäure
30% (v/v)	Methanol	30% (v/v)	Methanol
0,1% (w/v)	Coomassie-Brilliantblau R250		

2.2.6 Western-Blotting

Werden in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen, spricht man vom Western-Blotting. Als Membran wurden Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen verwendet, die nach kurzem Kontakt mit Methanol für den Transfer von Proteinen aktiviert wurden. Proteine wurden durch Elektroblothing in einem Puffersystem (Westernpuffer) aus dem SDS-Gel auf die Membran übertragen (16h, 24V).

Zur Detektion bestimmter Proteine wurden spezifische Antikörper (AK) verwendet. Zu Beginn wurde die PVDF-Membran für eine Stunde in TBST-Puffer inkubiert, der mit 5% (w/v) Magermilchpulver oder für den Phosphotyrosin-AK (α -pY) mit 1,1% (w/v) Magermilchpulver und 1,1% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) komplettiert wurde. Dies sollte eine unspezifische AK-Bindung an die PVDF-Membran verhindern. Im zweiten Schritt wurden die spezifischen AK (Verdünnungen nach Angaben des Herstellers, bzw. empirisch im Bereich 1:750 bis 1:2000) gegen den His-*tag* oder spezifisch gegen die jeweiligen Proteine in Milchpulver oder auch BSA enthaltendem TBST-Puffer für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 10min) mit TBST-Puffer wurde die Membran mit einem sekundären AK (Verdünnung nach Angaben des Herstellers, Amersham Biosciences) in Milchpulver/BSA enthaltendem TBST-Puffer inkubiert. Dieser sekundäre AK war mit dem Enzym Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt und gegen den konstanten Teil des ersten Antikörpers gerichtet. Der konstante Bereich eines AKs ist spezifisch für den Organismus aus dem der AK gewonnen wurde. Immunglobuline (Ig), die hier als primäre AK verwendet wurden, stammten entweder aus Kaninchen (IgG), Mäusen (IgG) oder Hühnern (IgY). Um die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen, wurde die Membran erneut dreimal für mindestens 10min mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Gemisch aus Peroxid und Luminol (1:1) inkubiert. An HRP gekoppelten Proteinen entstand durch die Umsetzung des HRP-Substrats ein Lumineszenzsignal, dessen Intensität durch die Belichtung eines Röntgenfilms detektiert werden konnte.

1x Westernpuffer :		1x TBST-Puffer :	
190mM	Glycin	150mM	NaCl
25mM	Tris Base	50mM	Tris-HCl
		0,5‰ (v/v)	Tween 20
			pH 7,4

2.3 Klonierung

2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente können in einer PCR selektiv amplifiziert werden. Ausgehend von kurzen Oligonukleotiden (Primer) kann eine DNA-Polymerase anhand einer DNA-Matrize einen komplementären DNA-Strang synthetisieren. Im ersten Schritt wurde die als Matrize eingesetzte DNA aufgeschmolzen (95°C, 5 min) und die DNA-Polymerase aktiviert. Die aus drei Teilen bestehende Polymerasereaktion wurde in Zyklen (16-30 Zyklen nach Angabe des Herstellers der Polymerase) durchgeführt. Die DNA wurde aufgeschmolzen (95°C, 15sec), dann erfolgte die Hybridisierung der Primer bei einer für die Primer spezifischen Temperatur (55°C-70°C, 30sec) und anschließend wurde die DNA, ausgehend von den jeweiligen Primern, der Matrize entsprechend neu synthetisiert. Die Temperatur wurde je nach verwendeter Polymerase nach Angaben des Herstellers, die Dauer entsprechend der Synthesegeschwindigkeit der Polymerase und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments gewählt.

2.3.2 Gerichtete Mutagenese

Mutationen eines bereits bestehenden Konstruktes wurden durch gerichtete Mutagenese mit Turbo Pfu DNA-Polymerase (Stratagene) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Bei der gerichteten Mutagenese wurde in den Primern ein selektiver Basenaustausch im Vergleich zur Matrize vorgenommen. Die Primer banden mit dieser leicht abweichenden Sequenz immer noch die ursprüngliche Hybridisierungsstelle der Matrize, die Hybridisierungsenergie jedoch war reduziert. Die Hybridisierungsenergie kann mit der folgenden Formel (Gleichung 2-1) für ein Oligonukleotid mit mehr als 15 Nukleotiden berechnet werden. Bei dieser Temperatur liegen theoretisch 50% der Oligonukleotide frei in der Lösung vor. Für die gerichtete Mutagenese wurden Primer mit Schmelztemperaturen zwischen 60°C und 80°C verwendet. Die veränderte Basensequenz sollte sich etwa mittig im Primer befinden. Bei den durchgeführten gerichteten Mutagenesen wurden bis zu 5 Basen in einer PCR ausgetauscht.

$$T_M = 69,3 + 41 * \frac{(\sum G + \sum C)}{s} - \frac{650}{s} \quad \text{Gleichung 2-1}$$

T_M = Schmelztemperatur [C°] (50% hybridisiert)

$\sum C, \sum G$ = Summe der Cytosine und Guanine im Oligonukleotid

s = Anzahl der Nukleotide des Oligonukleotids (Primer)

2.3.3 Deletions- und Insertionsmutanten

Untersuchungen von Deletionsvarianten oder auch Insertionsvarianten von hnRNP K waren ein wesentlicher Teil dieser Arbeit. Die Konstrukte wurden nach dem folgenden Schema kloniert.

Es wurden drei aufeinander folgende PCRs durchgeführt, wobei vier verschiedene Primer (A-D) verwendet wurden. Jeder der beiden Primer (A und D), die mit der 5'- bzw. 3'-Region der kodierenden Sequenz hybridisieren, enthielten zusätzlich noch die Erkennungssequenz für eine Endonuklease und hybridisieren jeweils mit unterschiedlichen Strängen der Matrizen-DNA (A_{sense} , $D_{anti-sense}$). Die beiden Primer B und C entsprachen den Bereichen vor und nach der Deletion und hybridisierten ebenfalls an entgegengesetzten DNA-Strängen ($B_{anti-sense}$, C_{sense}). Handelte es sich um eine Insertion, kodierte der eine Primer für die Insertion und die nachfolgende DNA-Sequenz (c_{sense}) und der andere für die Insertion mit der vorhergehenden Sequenz ($b_{anti-sense}$). Der Übersichtlichkeit wegen werden die folgenden Arbeitsschritte anhand eines Schemas (Abb. 2.1) erklärt.

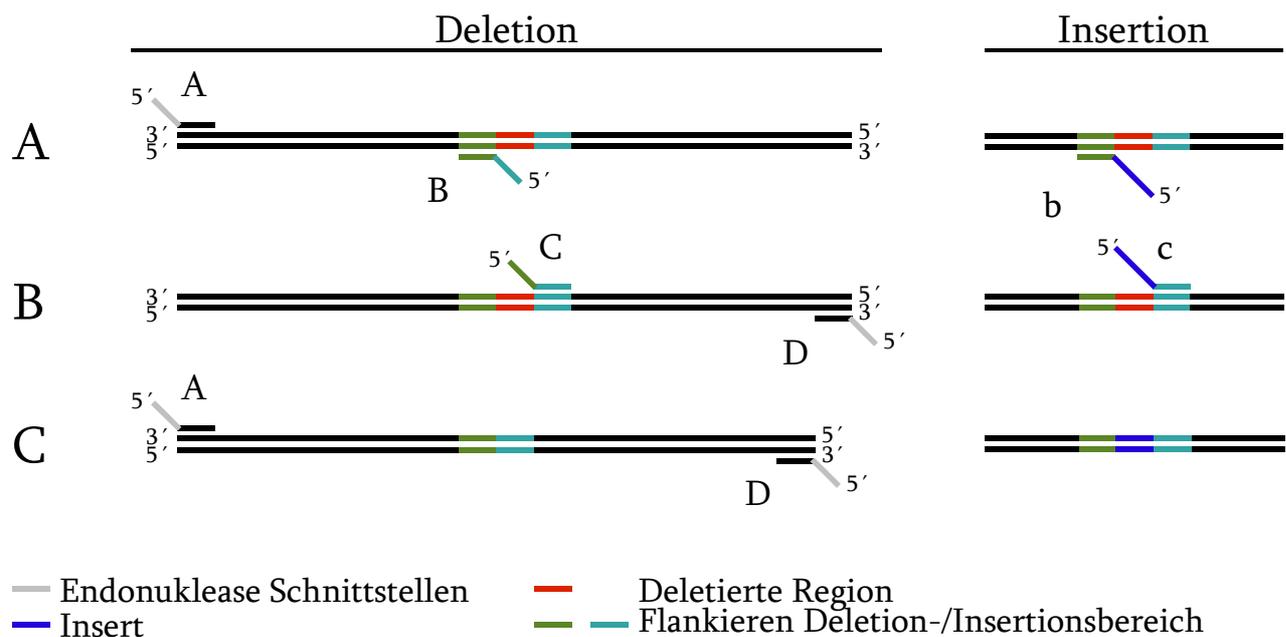


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Herstellung von Deletions- bzw. Insertionsmutanten. Primer A,C,c sind *sense* Primer; Primer B,b,D sind *anti-sense* Primer. PCR A und B werden unabhängig von einander durchgeführt und nach einem DpnI-Verdau deren Produkte zusammen in PCR C eingesetzt.

In der ersten PCR (Abb. 2.1 A) wurde nur das den N-terminalen Anteil bis zur Deletionsstelle kodierende Fragment synthetisiert. Hierbei wurde eine PCR mit der Matrize und den Primern A_{sense} und $B_{anti-sense}$ ($b_{anti-sense}$) durchgeführt. In der unabhängigen zweiten PCR (Abb. 2.1 B) wurde hingegen nur das den C-terminalen Anteil kodierende Fragment mit den Primern C_{sense} (c_{sense}) und $D_{anti-sense}$ auf der selben Matrize basierend synthetisiert. Diese zwei ersten PCRs wurden mit dem Enzym DpnI (37°C, 1,5h, NEB) verdaut, welches ausschließlich die in

Escherichia coli (*E.coli*) synthetisierte, methylierte DNA-Matrize schneidet. Die DNA-Bruchstücke, die Primer und die Enzyme wurden mit einem PCR-Aufreinigungs-Kit (QIAquick®-PCR-Purification-Kit, Qiagen) nach Angaben des Herstellers von der synthetisierten DNA abgetrennt. Die quantitative Ausbeute der beiden PCRs wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.2) überprüft, um für die dritte PCR vergleichbare äquimolare Mengen an DNA aus den beiden ersten PCRs einsetzen zu können. Erst nach 5 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 55°C wurde der dritten PCR (Abb. 2.1 C) für die nächsten 20 Zyklen die Primer *A_{sense}* und *D_{anti-sense}* zugegeben und die Hybridisierungstemperatur auf 65°C erhöht. In den ersten 5 Zyklen konnten beide Fragmente im Bereich der ihnen gemeinsam ist, also der Bereich vor und nach der Deletionsstelle bzw. mit der Insertionssequenz, hybridisieren und fungieren so gegenseitig als Primer. Die Zugabe der Primer erhöhte die Syntheserate des gesamten Konstrukts. Alle PCRs wurden mit AccuPrime™ Pfx Super Mix (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Die dritte PCR wurde mit 10µl 4x Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel (1%(w/v) Agarose) geladen (Kapitel 2.2.2). Das Fragment mit der berechneten Größe wurde ausgeschnitten und die DNA mit einem Gelextraktions-Kit (QIAEX®-Gel Extraction-Kit) entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Die Klonierung in einen Vektor erfolgte wie die Klonierung von PCR-Fragmenten (Kapitel 2.3.4) ohne Deletion bzw. Insertion.

2.3.4 Klonierung von PCR-Fragmenten

Das gewünschte DNA-Fragment wurde durch eine PCR mit einem Primer für das 5' Ende (*sense*) und einem Primer für das 3'-Ende (*anti-sense*) der Sequenz amplifiziert. Für die Klonierung in den Vektor enthielten beide Primer zusätzliche Restriktionsschnittstellen. Die PCR-Reaktion wurde entsprechend der Angaben des verwendeten PCR-Mixes (AccuPrime™ Pfx Super Mix, Invitrogen) wie folgt durchgeführt:

PCR-Zusammensetzung:		PCR-Bedingungen:		
100ng	DNA	1x	95°C	5min
200nM	Primer <i>sense</i>		{ 95°C	15sec
200nM	Primer <i>anti-sense</i>	35x	{ 60°C	30sec
22,5µl	AccuPrime™ Pfx Super Mix		{ 68°C	1kb/min
<u>Σ25µl</u>				

Zum PCR-Reaktionsansatz wurden 20U der Endonuklease DpnI gegeben, um wie bereits beschrieben (Kapitel 2.3.3), die methylierte DNA-Matrize zu verdauen (37°C, 1,5h). Das neu

synthetisierte DNA-Fragment wurde von den Bestandteilen der PCR-Reaktion und des DpnI Verdaus mit einem Reinigungs-Kit (QIAquick[®]-PCR-Purification-Kit, Qiagen) abgetrennt. Das Ergebnis der PCR und des Verdaus wurde auf einem Agarosegel (1% (w/v) Agarose) überprüft (Kapitel 2.2.2) und das Fragment hinterher mit den jeweiligen Endonukleasen (nach Angaben des Herstellers, NEB, Fermentas) verdaut. Die geschnittene DNA wurde nach den Restriktionen gereinigt (QIAquick[®]-PCR-Purification-Kit, Qiagen) und mit dem Vektor ligiert.

Der Vektor, in welchen das PCR-Fragment kloniert werden sollte, wurde ebenfalls mit den entsprechenden Endonukleasen geschnitten (10µg Vektor-DNA, 20U Enzym, 1h, nach Herstellerangaben), gereinigt (QIAquick[®]-PCR-Purification-Kit, Qiagen) und mit dem PCR-Fragment ligiert. Konnte nur ein Enzym für die Ligation des 5'- und 3'-Endes verwendet werden, verhinderte die Dephosphorylierung (alkalische Phosphatase, Roche, nach Angaben des Herstellers) die Religation des geschnittenen Vektors.

Für die Ligation von unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen wurde der 5'-Überhang der „klebrigen Enden“ der DNA-Fragmente durch Klenow-DNA-Polymerase (New England BioLabs) mit Nukleotiden aufgefüllt (5' → 3' Richtung), so dass „glatte Enden“ entstanden. Nach 15-minütiger Inkubation wurde durch Zugabe von 6,5mM EDTA die Reaktion gestoppt (10min, 75°C). Für die Ligation solcher DNA-Fragmente wurde der Vektor mit Enzymen geschnitten, die „glatte Enden“ generieren. Dazu wurde nach Abschätzung aus einem Agarosegel 200ng Vektor mit dem 7- bis 9-fachen der äquimolaren Menge an DNA-Fragment (Insert) eingesetzt.

Generierung „glatte Enden“:		Ligationsansatz:	
in 90µl	DNA	≈200ng	Vektor
1x	NEB 2-Puffer	7-9fach	DNA-Fragment (Insert)
2,7µM	dNTPs	1x	Quick Ligase Puffer
30U	Klenow	800U	T4-DNA-Ligase
Σ110µl		Σ 20µl	

Der Ligationsansatz wurde für 5min bei RT inkubiert und bis zur Transformation (3µl) in chemokompetente XL1 *blue E.coli*-Zellen (Sambrook *et al.*, 1989) auf Eis gehalten. Zur Kontrolle der Vektorpräparation wurde ein Ligationsansatz ohne Insert mitgeführt. Kontrollen für die Aktivität der Ligase, die Aufnahmefähigkeit der chemokompetenten *E.coli*-Zellen und deren Resistenzen wurden durchgeführt.

Die Transformation des Plasmids erfolgte mittels Hitzeschock (30min auf Eis, 45sec bei 42°C, 2min auf Eis, +400µl LB-Medium, 1h bei 37°C) in die *E.coli*-Zellen, das Zellgemisch wurde auf LB-Antibiotika-Platten (1,5% (w/v) Agar) entsprechend der Resistenz des Vektors ausplattiert und über Nacht im Brutschrank (37°C) inkubiert. Pro Konstrukt wurden zwischen 3 und 15 Kolonien in jeweils 3ml LB-Antibiotika-Medium (30ng/µl Kanamycin, 100ng/µl Ampicillin)

überimpft und eine Plasmid-Präparation (E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep-KitI, Peqlab) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Klone wurden durch Restriktion mit Endonukleasen oder mit Hilfe der DNA Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) untersucht (Kapitel 2.2.3). Enthielt ein Klon das erwartete Konstrukt, wurde die DNA erneut in XL1 *blue E.coli*-Zellen transformiert, diese auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen, eine Vorkultur angeimpft und schließlich mit einer Übernachtskultur (100ml) eine Midi-Plasmid-Präparation (Plasmid Midiprep-Kit, Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.5 Umklonierung von Plasmid-DNA

Für unterschiedliche Untersuchungen des gleichen Proteins in verschiedenen Organismen konnte teilweise die entsprechende DNA aus einem Vektor in einen anderen umkloniert werden. Besaßen sowohl der Ausgangsvektor als auch der Ziel-Vektor geeignete Restriktionsschnittstellen, erfolgte die Umklonierung durch Spaltung mit Restriktionsenzymen. Das Ausgangskonstrukt mit dem Insert (10µg DNA, 20U, 1h) und ebenso der Zielvektor (10µg DNA, 20U, 1h) wurden mit zwei Endonukleasen entsprechend der Herstellerangaben verdaut. Die Abtrennung des Inserts vom ursprünglichen Vektor erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.2). Das Insert wurde herausgeschnitten, aus dem Gel eluiert (QIAEX[®]-Gel Extraction-Kit), wie bereits beschrieben (Kapitel 2.3.4) mit dem Ziel-Vektor ligiert und die Klone überprüft.

2.4 Proteinexpression und -reinigung

Für die *in vitro* Experimente wurden verschiedene Varianten von hnRNP K in *E.coli* überexprimiert, gereinigt und dialysiert. Die Varianten wurden in chemokompetente Zellen des *E.coli*-Expressionsstamms BL21 DE3 durch Hitzeschock (Kapitel 2.3.4) transformiert, auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Vorbereitung der Proteinexpression wurden transformierte *E.coli*-Zellen in 400ml LB-Medium (100µg/ml Ampicillin) inokuliert und bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht war. Nach einer Zentrifugation (10min, 4000rpm, 4°C) wurden die Zellen mit 20 ml Minimalmedium gewaschen, erneut zentrifugiert (10min, 4000rpm, 4°C) und das Zellpellet in 400ml Minimalmedium aufgenommen, welches mit 1mM IPTG zur Induktion der Proteinexpression versetzt wurde. Nach 4h Induktion bei 25°C im Schüttler wurden die Zellen

erneut zentrifugiert (10min, 4000rpm, 4°C), mit 20ml Minimalmedium (ohne IPTG) gewaschen, zentrifugiert (10min, 4000rpm, 4°C) und anschließend in 7ml Lysepuffer aufgenommen und in Trockeneis eingefroren. Die Zusammensetzung der verwendeten Lysepuffer ist bei den jeweiligen Reinigungen beschrieben.

Minimalmedium:		1x M9 Salz:	
1x	M9 Salz	48mM	Na ₂ HPO ₄
0,4% (w/v)	Casein	22mM	KH ₂ PO ₄
0,2% (w/v)	Glukose	8,5mM	NaCl
1mM	MgSO ₄	19mM	NH ₄ Cl
		0,3mM	CaCl ₂

2.4.1 Reinigung von Proteinen mit His-Fusionspeptid

Die eingefrorenen Zellen wurden am folgenden Tag auf Eis aufgetaut und durch Ultraschallbehandlung (Intervall 50, Stufe 5, 30sec, Eiswasserkühlung) aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation (6000g, 10min, 4°C) wurde der klare Überstand zusammen mit 400µl Ni-NTA Agarose (Qiagen) in eine Säule überführt und bei 4°C 1,5h invertiert. Der Durchfluss und die verschiedenen Wasch- und Elutionsfraktionen wurden gesammelt. Das Protein wurde mit ansteigender Imidazolkonzentration eluiert: 2 x 0M (1ml); 2 x 5mM (1ml); 2 x 20mM (1ml); 2 x 50mM (1ml); 2 x 200mM (500µl); 2 x 500mM (1ml); 1 x 1M (1ml).

Vom Rohextrakt sowie den Wasch- und Elutionsfraktionen wurden Proben (10µl) entnommen und mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5) und Coomassie-Färbung auf überexprimiertes His-hnRNP K (oder dessen Varianten) hin untersucht. Fraktionen, die das His-Protein in genügender Quantität und Qualität beinhalteten, wurden vereinigt und zuerst gegen einen Hochsalzpuffer (1M KCl) und anschließend gegen einen Niedrigsalzpuffer (100mM KCl) dialysiert, um den Salzgehalt den späteren Reaktionsbedingungen anzupassen.

Lysepuffer:	Puffer N:	Dialysepuffer:
1M KCl	1M KCl	1M/100mM KCl
20mM Tris-HCl	24mM HEPES	20mM HEPES
0,25%(v/v) NP40	5% (v/v) Glycerin	5% (v/v) Glycerin
1mM PMSF	1,5mM MgSO ₄	1mM EDTA
10µg/ml Leupeptin	1mM DTT	1mM DTT
1mM DTT	pH 7,4	pH 7,4
pH 8,0		

Die Reinigung von His-c-Src wurde auch mit Magne His™ Ni-*Particles* (Promega) durchgeführt. Die BL21 DE3 *E.coli*-Zellen wurden hierbei nach der Expression in mit 0,75mM PMSF komplettiertem Waschpuffer aufgenommen. Nach dem Aufschluss mittels Ultraschall (Intervall 50, Stufe 5, 30sec, Eiswasserkühlung) wurden 150 µl Magne His™ Ni-*Particles* zum Zell-Lysat gegeben und 2min bei RT invertiert. Die Magne His™ Ni-*Particles* wurden durch einen Magneten pelletiert und der Überstand abgenommen. Nach dreimaligem Waschen mit 750µl Waschpuffer und zweimaligem Eluieren mit 250µl Elutionspuffer, wobei in jedem Schritt 2min bei RT mit der jeweiligen Lösung invertiert wurden, konnten His-c-Src enthaltende Fraktionen vereinigt und gegen den Dialysepuffer dialysiert werden.

Waschpuffer:	Elutionspuffer:	Dialysepuffer:
100mM HEPES	100mM HEPES	100mM HEPES
10mM Imidazol	250mM Imidazol	1mM DTT
pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4

2.4.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mittels Ultraschall (Intervall 50, Stufe 5, 30sec, Eiswasserkühlung) aufgeschlossen, die Zelltrümmer abzentrifugiert (6000g, 10min, 4°C) und der Überstand mit 500µl GSH-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) 1h 30min invertiert (4°C). Nach zweimaligem Waschen der Sepharose mit Lysepuffer (1ml) wurde mit freiem, reduziertem Glutathion im Elutionspuffer (5x 250µl) eluiert. Fraktionen, welche das gesuchte Protein kontrolliert durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5) und Coomassie-Färbung enthielten, wurden vereinigt und dialysiert. Die Dialyse (16h, 4°C) gegen den Hochsalzpuffer (1M KCl) wurde zur vollständigen Entfernung des freien Glutathion durchgeführt, da in den folgenden Experimenten die gereinigten GST-Proteine erneut an GSH-Sepharose gekoppelt werden mussten. Eine Dialyse gegen den Niedrigsalzpuffer schloss sich an. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt und diese für die verschiedenen Proteinvarianten im Vergleich mit bekannten BSA-Konzentrationen durch eine SDS-PAGE und Coomassie-Färbung abgeglichen.

Lysepuffer:	Elutionspuffer:	Dialysepuffer:
1M KCl	1M KCl	1M/100mM KCl
20mM Tris-HCL	20mM HEPES	20mM HEPES
2mM EDTA	5% (v/v) Glycerin	5% (v/v) Glycerin
2mM PMSF	50mM Glutathion	0,05% (v/v) NP40
10µg/ml Leupeptin	1mM DTT	1mM DTT
1mM DTT	pH 7,4	pH 7,4
pH 7,4		

2.5 *In vitro* Transkription und Translation

Für die gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation wurde mit Nuklease behandeltes Retikulozytenlysat von Kaninchen (RRL) verwendet (Jackson und Hunt, 1983). Das Retikulozytenlysat wurde mit Kreatinkinase (50µg/ml), Hämin (25µM), CaCl₂ (1mM) und Mikrokokken Nuklease (10µg/ml) bei RT für 12min inkubiert. Die Nukleasereaktion wurde abgestoppt durch die Zugabe von EGTA (Endkonzentration 2,5mM), welches die für die Nukleaseaktivität notwendigen Ca²⁺-Ionen komplexiert. Das so behandelte Lysat (NTL) wurde aliquotiert und bis zur Durchführung der gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation über flüssigem Stickstoff gelagert.

Wird dem NTL exogene DNA zugegeben, erfolgt eine gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation. Exogene mRNA wird in diesem System translatiert. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten gekoppelten Transkriptions- und Translations-Reaktionen. Es wurden die für die Translation optimierten Bedingungen verwendet (Craig *et al.*, 1992), da hierbei auch eine ausreichende Transkription gewährleistet ist (30mM K⁺, 2mM Mg²⁺). Zu 9µl Reaktionsansatz wurden 3µl DNA-Lösung (0,33µg/µl) gegeben und für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurde die synthetisierte mRNA durch die Zugabe von 22,7µg/ml einer RNase-Stopplösung bei 30°C für weitere 15min wieder abgebaut. Um zu überprüfen, ob das gewünschte Protein in der gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation entstand, wurde eine radioaktiv markierte Aminosäure ([³⁵S]-Met) verwendet. Nach einer SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5) konnten die radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie mittels Röntgenfilm oder Phosphoimagerscreen detektiert werden.

Reaktionsansatz der gekoppelten			
<i>in vitro</i> Transkription und Translation:		RNase-Stopplösung:	
6,66µl	NTL	50µg/ml	RNase A
6,7mM	Kreatinphosphat	10mM	EDTA
je 67µM	Aminosäuren (- Met)		
3,96µCi	[³⁵ S]-Met		
30,5µM	KCl		
1,9mM	MgCl ₂		
je 0,67mM	rATP/ rCTP/ rGTP/ rUTP		
6U	T7-RNA-Polymerase		
3,24U	RNasin		
1µg	DNA		
<hr/>			
Σ12µl			

2.6 *In vitro* Protein-Interaktionsassay

Diese Methode wurde zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen unter definierten Bedingungen (*in vitro*) eingesetzt. Das Protein mit GST-*tag* (Kapitel 2.4.2) wurde an GSH-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) gekoppelt und mit dem potentiellen Interaktionspartner aus einer mit [³⁵S]-Met versetzten gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translations-Reaktion (Kapitel 2.5) inkubiert. Konnte selbst nach intensivem Waschen der Sepharose der radioaktive Interaktionspartner nachgewiesen werden (SDS-PAGE Kapitel 2.2.5, Autoradiographie), so lag eine stabile Interaktion der beiden Proteine vor. Die Ausgangsbedingungen des *in vitro* Protein-Interaktionsassays wurden einer Veröffentlichung von Medenbach *et al.* (2004) entnommen und für die Interaktion von [³⁵S]-Met-markiertem c-Src (Kapitel 2.5) mit GST-hnRNP K (Kapitel 2.4.2) von K. Müller (2006) optimiert.

Die GSH-Sepharose wurde mit dem 10fachen Volumen an Reaktionspuffer gewaschen und über Nacht im Kühlraum (8°C) in Reaktionspuffer mit zusätzlich 250µg/µl BSA invertiert, um unspezifische Bindungen an die Sepharose zu minimieren. Die Sepharose wurde durch Zentrifugieren (50g, 15min, 4°C) sedimentiert, in 100µl Reaktionspuffer pro Ansatz aufgenommen und in 500µl Eppendorfgefäße aliquotiert (entspricht 20µl der ursprünglichen GSH-Sepharose). Die Ansätze wurden mit 4µg des jeweiligen GST-Proteins (Kapitel 2.4.2) versetzt, mit Waschpuffer auf ein Volumen von 400µl aufgefüllt und für eine Stunde invertiert (8°C). Die Sepharose wurde einmal mit 500µl Reaktionspuffer gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Das radioaktiv markierte Protein (10µl des gekoppelten *in vitro*

Transkriptions- und Translations-Ansatzes, Kapitel 2.5) wurde in 400µl Reaktionspuffer verdünnt zur Sepharose gegeben und für 45min (8°C) invertiert. Ungebundenes Protein wurde durch zweimaliges Waschen mit 500µl Waschpuffer entfernt, die Sepharose in 2x Probenpuffer aufgekocht (5min) und eine SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5) durchgeführt. Die Detektion des radioaktiv markierten Proteins erfolgte durch Autoradiographie.

Sollten mehrere Ansätze mit dem gleichen Protein (radioaktiv markiertes Protein) inkubiert werden, wurde eine Verdünnung für alle Ansätze hergestellt oder auch das GST-Protein in einem großen Ansatz an die GSH-Sepharose gekoppelt und anschließend aliquotiert. Diese Vorgehensweise sollte für alle Ansätze möglichst gleiche Ausgangsbedingungen schaffen und Schwankungen in den Ergebnissen minimieren.

Reaktionspuffer:	
20mM	HEPES
100mM	KCl
0,05% (v/v)	NP40
5µg/µl	BSA
1mM	DTT

2.7 Transfektion von HeLa-Zellen

2.7.1 Transfektion

Zum Studium der Aktivierung von c-Src durch hnRNP K-Varianten oder der Interaktion der beiden Proteine wurden diese in HeLa-Zellen, einer Zelllinie aus einem Gebärmutterhalskarzinom (Gey *et al.*, 1952), überexprimiert und unter *in vivo* Bedingungen untersucht. Es wurden hierfür zwei verschiedene Vektoren für die Transfektion der HeLa-Zellen verwendet, der Vektor pSG5 (Stratagene) für die Aktivierungsstudien, der Vektor pVenus1/2-C bzw. pVenus1/2-N (Stöhr *et al.*, 2006) für die Interaktionsstudien. Bei dem pSGT-Vektor handelt es sich um eine vom pSG5-Vektor abgeleitete Form, in der die *multiple cloning site* die folgenden Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen EcoRI, SpeI, BamHI, EcoRV, XhoI und BglII enthält.

Für eine Kalzium-Phosphat-Transfektion (Graham und Van der Eb, 1973) wurden $0,4 \times 10^6$ HeLa-Zellen in 10ml (37°C) DMEMc-Medium in einer Zellkulturschale (Ø 10cm) ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂-Begasung für einen Tag kultiviert. Intakte HeLa-Zellen setzen sich auf dem Boden ab, wachsen dort adherent weiter und besiedeln diesen in einer Schicht. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 10ml DMEMc-Medium überschichtet und drei

Stunden später mit 10µg DNA transfiziert. Bei einer Transfektion mit zwei verschiedenen Konstrukten wurden jeweils 5µg DNA verwendet. Die DNA wurde zusammen mit frisch gelöstem und steril filtriertem CaCl₂ in 550µl H₂O aufgenommen. Diese DNA/CaCl₂-Mischung (0,25M CaCl₂, 10µg DNA) wurde innerhalb einer Minute unter ständigem Vortexen zu 550µl 2x HBS bei Raumtemperatur (RT) zugetropft. In der folgenden 15-minütigen Inkubation (RT) bildeten sich unlösliche Kalziumphosphat-Kristalle aus. Der Zeitrahmen von 15min musste genau eingehalten werden, da sich sonst nicht genügend oder zu große Kristalle bildeten. Unter vorsichtigem Schwenken des Mediums wurde der DNA-haltige Ansatz hinzugetropft, um einen abrupten Wechsel des pH-Werts für die Zellen zu vermeiden.

Nach 16 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Begasung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 5ml warmem (37°C) PBS-Puffer gewaschen. Ein Teil der Kristalle wurde durch Endozytose von den Zellen aufgenommen und somit auch die darin enthaltene DNA. Nach 16 Stunden waren ausreichend Kristalle mit DNA aufgenommen worden und die verbleibenden Kristalle konnten aus dem Medium entfernt werden. Die Zellen wurden mit 10ml DMEMc-Medium überschichtet und für einen weiteren Tag kultiviert (37°C, 5% CO₂).

1x PBS:	DMEMc-Medium:	2x HBS:
137mM NaCl	DMEM (GIBCO)	280mM NaCl
2,7mM KCl	+ Pyruvat	45mM HEPES Na-Salz
10mM Na ₂ HPO ₄	+ Glutamax™-I	1,5mM Na ₂ HPO ₄
2mM KH ₂ PO ₄	4,5g/l Glukose	pH 7,1
pH 7,4	10% (v/v) FCS	
	1% (v/v) P/S (GIBCO)	

2.7.2 HeLa-Zell-Lyse

Das Medium über den adherent wachsenden Zellen wurde abgenommen, die Zellen zweimal mit 10ml eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und in 5ml eiskaltem PBS-Puffer mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt. Die PBS-Zelllösung wurde abgenommen und gesammelt, die Zellkulturschale mit weiteren 5ml eiskaltem PBS-Puffer gespült und zu der PBS-Zelllösung hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 4°C für 10min bei 200g im *Swingout*-Rotor pelletiert, der PBS-Puffer entfernt und die Zellen mit 400µl Lysepuffer in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Nach vorsichtigem auf und ab pipettieren wurden die Zellen für 30min auf Eis lysiert und nach einer Zentrifugation (20800g, 10min, 4°C) der Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentration des Zell-Lysats wurde nach Bradford (1976) bestimmt (Kapitel 2.2.4) und 10µg des Zell-Lysats für eine SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5) mit anschließender

Westernblot-Analyse (Kapitel 2.2.6) gegen die überexprimierten Proteine eingesetzt. Eine Westernblot-Analyse gegen das endogene Protein GAPDH wurde als Protein-Ladekontrolle mitgeführt.

<u>Lysepuffer:</u>	
300mM	NaCl
50mM	Tris
1% (v/v)	Triton X-100
1mM	DTT
0,5mM	PMSF
10µg/ml	Leupeptin
100µM	NaMb
10mM	β-Glycerophosphat
10mM	NaF
10mM	Na ₃ VO ₄
13,84mg/ml	p-Nitro-Phenylphosphat
	pH 7,4

2.7.3 Immunpräzipitation

Für viele weitere Untersuchungen mussten die überexprimierten Proteine weiter selektiert und von den endogenen Bestandteilen der Zelle abgetrennt werden. Dies konnte durch eine Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern erreicht werden. Für die Untersuchungen zur Aktivierung von c-Src durch hnRNP K wurde zum Beispiel eine Immunpräzipitation gegen den N-terminal fusionierten His-tag (α -His5) der hnRNP K-Varianten durchgeführt, um den Phosphorylierungsgrad von hnRNP K bestimmen zu können. Dies war im Zell-Lysat wegen der Vielzahl an anderen ebenfalls phosphorylierten endogenen Proteinen nicht möglich. Für die *in vitro* Kinase-Aktivierungsstudien (Kapitel 2.8) musste ebenfalls das überexprimierte Protein Src mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (α -c-Src) aus dem Zell-Lysat isoliert werden. Im Folgenden wird die Immunpräzipitation für die Studien der Aktivierung von c-Src durch hnRNP K-Varianten in HeLa-Zellen (*in vivo*) beschrieben.

Es wurden 250µg des Zell-Lysats mit 1µg His-Antikörper (α -His5) versetzt und mit Lysepuffer auf 600µl aufgefüllt. Nach zweistündigem Invertieren (8°C) wurden 25µl Protein G-Agarose hinzugefügt und weitere 2 Stunden invertiert. Der Antikörper (α -His5) bindet spezifisch den N-terminalen His-tag des Proteins (hnRNP K-Varianten) und wird im zweiten Schritt durch das an die Agarose gekoppelte Protein G gebunden. Nach einer Zentrifugation (50g, 10min, 4°C)

wurde die Agarose zweimal mit 500µl Lysepuffer gewaschen und am Ende mit 60µl 2x SDS-Probenpuffer gekocht (90°C, 10min). Die Proben wurden in einer SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5) aufgetrennt und anschließend per Westernblot-Analyse (Kapitel 2.2.6) untersucht. Für die Detektion der phosphorylierten Tyrosine (α -pY) wurden 10µl geladen. Zum Nachweis der erfolgreichen Immunpräzipitation wurden 20µl (α -His15) und zur Detektion des co-immunpräzipitierten Proteins Src (α -v-Src) weitere 20µl verwendet.

2.8 *In vitro* Kinase-Aktivierungsassay

C-Src, die konstitutiv aktive Variante Src (KP) (K249E/P250G; Gonfloni *et al.*, 1997) oder inaktives Src (Y416F) (Kmiecik und Shalloway, 1987) wurden in HeLa-Zellen überexprimiert (Kapitel 2.7). Pro Ansatz wurden 20µg Zell-Lysat mit 0,75µl c-Src-Antikörper (α -c-Src, Abcam) versetzt und mit Lysepuffer für HeLa-Zellen auf 800µl aufgefüllt. Nach einstündigem Invertieren (8°C) wurde pro Ansatz 20µl Protein A-Sepharose hinzugegeben und für eine weitere Stunde invertiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert (50g, 5min, 4°C) und mit 2x 500µl Lysepuffer gewaschen. Bei Durchführung mehrerer gleicher Immunpräzipitationen wurde die Sepharose im Lysepuffer des zweiten Waschschritts aliquotiert. Das an die Sepharose gekoppelte Src-Protein wurde in dem folgenden *in vitro* Kinase-Aktivierungsassay eingesetzt.

In vitro Kinase-Aktivierungsassay:

aus 20µg Lysat	Src an Sepharose gekoppelt
1µg (18pmol)	His-hnRNP K oder Varianten
275µM	ATP
4,5mM	MnCl ₂
add 20µl	HeLa-Lysepuffer

Der Ansatz wurde für 10min bei 30°C inkubiert, mit 15µl 4x SDS-Probenpuffer gemischt und gekocht (90°C, 10min). Eine SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5) wurde mit 20µl für die Westernblot-Analyse (Kapitel 2.2.6) gegen phosphorylierte Tyrosine (α -pY) geladen, mit 2µl wurden die His-hnRNP K-Varianten (α -His) und mit 10µl die Immunpräzipitation (α -Src) überprüft.

Die Zusammensetzung des Aktivierungs-Ansatzes wurde für manche Untersuchungen variiert. Die Änderungen werden entsprechend bei den Ergebnissen vermerkt.

2.9 Immunfluoreszenz

Diese Technik ermöglicht die Detektion von Proteinen innerhalb von Zellen durch die spezifische Antikörper-Protein-Wechselwirkung. Fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper, die gegen den invariablen Anteil der spezifischen primären AK gerichtet sind, können im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Neben der Aussage, dass ein bestimmtes Protein in der Zelle vorhanden ist, können auch Angaben über deren Lokalisierung gemacht werden.

Fluorochrome können durch Absorption von Energie in einen angeregten Zustand überführt werden, wobei die Lichtenergie aus einem bestimmten Wellenlängenbereich zur Anregung verwendet wird. Die überschüssige Energie wird teilweise in Form von Wärme abgegeben, der Rest als Fluoreszenzlicht emittiert. Die ausgesandte Strahlung weist somit für gewöhnlich eine tiefere Frequenz auf (größere Wellenlänge), als die ursprünglich absorbierte (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Absorptions- und Emissionsmaxima ausgewählter Fluorochrome. 4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI), *Yellow fluorescent protein* (YFP), Indocarbocyanin (Cy3), Indodicarbocyanin (Cy5).

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
DAPI	350nm	470nm
Venus (YFP)	515nm	528nm
Cy3	550nm	570nm
Cy5	650nm	667nm

Die Kopplung der Fluorochrome an sekundäre AK ermöglicht die spezifische Detektion eines Proteins. Die Verwendung verschiedener Fluorochrome ermöglicht unter bestimmten Voraussetzungen die Detektion mehrerer Proteine in derselben Zelle.

- 1) Der primäre AK muss das nativ gefaltete Protein erkennen.
- 2) Die primären AK stammen aus verschiedenen Organismen, besitzen somit unterschiedliche konstante Bereiche, die der Fluoreszenz markierte sekundäre AK spezifisch erkennt.
- 3) Die Absorptions- und Emissionsspektren der Fluorochrome und deren Maxima stören oder überlagern sich nicht gegenseitig (Abb. 2.2).

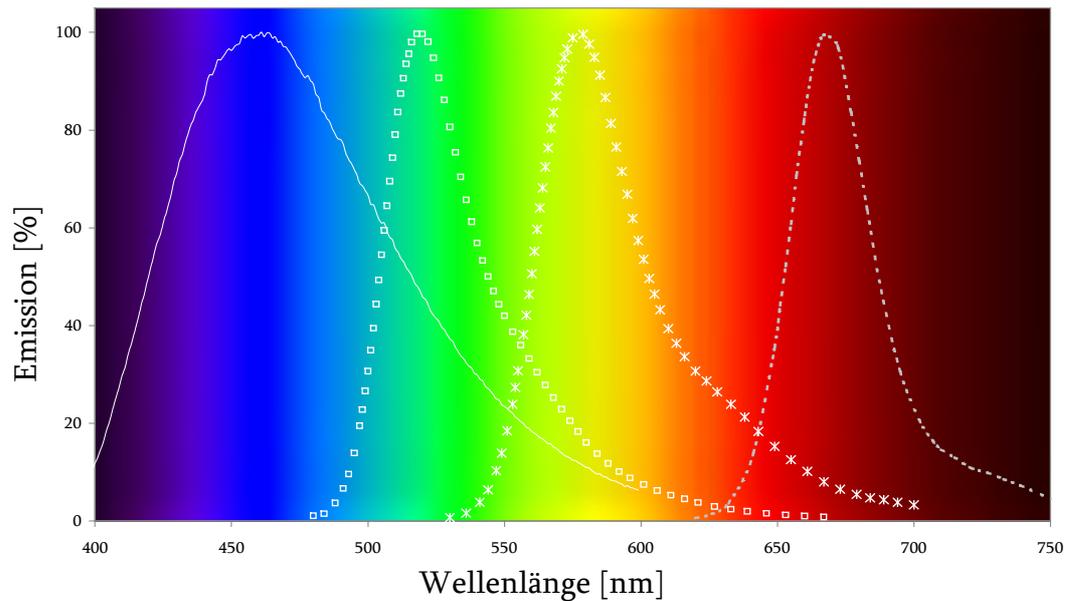


Abb. 2.2: Emissionsspektren ausgesuchter Fluorochrome.

- DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)
- Venus
- ***** Cy3 (Indocarbocyanin)
- Cy5 (Indodicarbocyanin)

Die Detektion mittels Immunfluoreszenz wurde sowohl für endogene Proteine (HeLa-, CaCo2-Zellen) als auch für überexprimierte Proteine in HeLa-Zellen angewendet. Änderungen zur üblicherweise durchgeführten Transfektion von HeLa-Zellen (Kapitel 2.7) waren:

- 1) In die Zellkulturschalen wurden vor dem Animpfen mit den HeLa-Zellen sterile Deckgläschen (\varnothing 20mm) gelegt.
- 2) Es wurden weniger Zellen ausplattiert $0,2 \times 10^6$ statt der üblichen $0,4 \times 10^6$ HeLa-Zellen, um ein zu dichtes Wachstum zu vermeiden.

Nach der ansonsten wie beschrieben durchgeführten Transfektion wurden die Deckgläschen am Tag der Ernte aus den Zellkulturschalen entnommen und zweimal in vorgewärmtem (37°C) PBS-Puffer gewaschen. Die adherent wachsenden HeLa-Zellen wurden mit einer formaldehydhaltigen Lösung (Accustain[®] Formalinsolution 10% (v/v), Sigma-Aldrich; auf 4% (v/v) verdünnt in PBS-Puffer) für 30min (RT) fixiert, um ein Ablösen von den Deckgläschen während der folgenden Behandlungen zu verhindern. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit TritonX-100 (0,2% (v/v) in PBS) für 10min bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit 2% (w/v) BSA in PBS-Puffer für 30min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen der AK mit Zellbestandteilen zu reduzieren. Die primären AK wurden in 0,2% (w/v) BSA enthaltendem PBS-Puffer verdünnt (1:200) und $25\mu\text{l}$ pro Deckgläschen tropfenweise auf Parafilm aufgetragen. Die Deckgläschen wurden mit der bewachsenen Seite nach unten in die AK-Lösung gelegt und bei 37°C für 2 Stunden in einer puffergesättigten Atmosphäre inkubiert, die ein Austrocknen verhindert. Nach dreimaligem

Waschen mit PBS-Puffer (5-10min pro Waschschritt) wurde erneut mit 2% (w/v) BSA in PBS-Puffer für 30min gegen unspezifische AK-Reaktionen geblockt. Der Fluoreszenz markierte sekundäre AK wurde mit 0,2% (w/v) BSA in PBS-Puffer verdünnt (Kapitel 2.7.1).

Tabelle 2.2: Verdünnungen von Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Indocarbocyanin (Cy3), Indodicarbocyanin (Cy5).

α -mouse Cy3	1:1000	α -rabbit Cy3	1:1000
α -mouse Cy5	1:100	α -rabbit Cy5	1:100

Nach der Inkubation der Deckgläschen mit den fluoreszenz-markierten sekundären AKs (37°C, Puffer gesättigte Atmosphäre, 45min) wurde zweimal mit PBS gewaschen (5-10min pro Waschschritt). Durch eine Inkubation (2min, RT) der Zellen in einer DAPI-Lösung (1:5000) wurde im Zellkern die DNA angefärbt. Erneut wurde mit PBS gewaschen (dreimal je 5-10min), die Deckgläschen in destilliertes Wasser getaucht (5mal) um Salze abzuspielen, kurz in absoluten Alkohol getaucht und bei RT getrocknet. Zum Einbetten der Zellen wurde rund 25 μ l Mowiol zwischen den Objektträger und die Deckgläschen gegeben. Nach rund einem Tag bei RT war dieses getrocknet und die Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Ein E600 (Nikon) Mikroskop, ausgestattet mit einer Digitalkamera (Hamamatsu) wurde verwendet und die Bilder mit den Programmen Lucia G (Nikon) und Adobe Photoshop dargestellt.

2.10 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

2.10.1 BiFC-Studien mit dem Chromophor Venus

Ausgehend von dem aus der Quallenart *Aequorea victoria* isolierten *green fluorescent protein* (GFP) wurden weitere Chromophore entwickelt (Tsien, 1998), wie unter anderem das *yellow fluorescent protein* (YFP). Venus ist ein aus dem YFP abgeleitetes Chromophor und enthält Mutationen zur Verbesserung der Funktion und Struktur. Für die Mutationen S65G/S72A/T203Y konnte für andere GFP-Varianten eine verbesserte Faltungseffizienz gezeigt werden und die Mutationen M153T/V163A/S175G relativieren die Empfindlichkeit des YFPs gegenüber Säuren und Kalziumionen (Cl⁻). Die Mutation F46L führte zu einer verbesserten Oxidation des Proteins (Nagai *et al.*, 2002), was bis dahin ein limitierender Faktor für die Entwicklung des Chromophors darstellte.

Für die Studien der Interaktion von hnRNP K-Varianten mit Varianten von c-Src unter nativen Zellbedingungen wurde der BiFC-Assay (Hu *et al.*, 2002, Hu und Kerppola, 2003) verwendet. Der N-terminale Teil (V1; Aminosäuren 1-154) und der C-terminale Teil (V2; Aminosäuren 155-238) des Venus Proteins wurde jeweils an einen der potentiellen Interaktionspartner fusioniert (Kapitel 2.3). Diese Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert (Kapitel 2.7.1 und 2.9) und die Expression der Proteine durch Immunfluoreszenz mit deren spezifischen AK nachgewiesen (Kapitel 2.9). Zwei Proteine, die miteinander interagieren, führen die Hälften des Venus-Proteins so dicht zueinander, dass ein funktionstüchtiges Venus Protein rekonstituiert werden kann, was durch ein intensives Venus-Fluoreszenzsignal erkennbar wird. Kann durch Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass beide Proteine zwar in der Zelle überexprimiert werden, jedoch kein Venus-Fluoreszenzsignal detektiert wird, interagieren die Proteine nicht.

2.10.2 Statistik

Es wurden nur Zellen in die Statistik aufgenommen, in denen beide überexprimierten Proteine durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren wurden jeweils mindestens 50 Zellen aus mindestens 3 unabhängigen Transfektionen (Kapitel 2.7.1 und 2.9) ausgewertet. Die drei ermittelten Ergebnisse wurden miteinander verglichen, um mögliche durch die unabhängigen Transfektionen verursachten Effekte abschätzen zu können.

Für die Statistik zur Interaktion von V1-Src-Varianten mit V2-hnRNP K-Varianten wurden zwei Kriterien ausgewertet. Es wurden Zellen mit einem Venus-Fluoreszenzsignal im Vergleich zu solchen gezählt, die kein Signal für ein positives Rekonstitutionsereignis zeigten. Da stets auch eine Verlagerung des Immunfluoreszenzsignals für V1-Src aus dem Zytoplasma in den Zellkern mit einem Rekonstitutionsereignis einherging, wurde auch dieses Merkmal als Signal für eine vorhandene Interaktion interpretiert und ausgewertet. Zellen, bei denen Zweifel über einen positiven oder negativen Zustand einer der beiden Kriterien bestand, wurden in den Fehler der Statistik aufgenommen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Aktivierung von c-Src durch Polyprolin-Motive in hnRNP K

Die Tyrosinkinase c-Src kann durch intermolekulare Wechselwirkungen ihrer SH 3-Domäne mit einem Polyprolin-Motiv (PxxP) aktiviert werden (Brown und Cooper, 1996) und katalysiert dann die Phosphorylierung von spezifischen Tyrosinresten in Substratmolekülen. HnRNP K besitzt drei prolinreiche Sequenzen im Bereich der Aminosäuren 240-337, in dem sich sechs PxxP-Motive befinden. Wird dieser Bereich wie in der Variante hnRNP K (ΔP_{1-3}) deletiert, kann c-Src nicht mehr aktiviert werden (Abb. 1.7). In den sechs Varianten von hnRNP K (P1 bis P3₍₂₎) wurden jeweils beide Proline eines Polyprolin-Motivs durch Alanine (AxxA) ersetzt. Des Weiteren wurden Doppel- beziehungsweise Vierfach-Varianten von hnRNP K generiert, in denen alle für die Aktivierung von c-Src relevanten Substitutionen vereinigt wurden. Die Aktivierung von c-Src konnte anhand seiner enzymatischen Aktivität, das heißt der Phosphorylierung eines Substrats (hnRNP K-Varianten) bestimmt werden.

3.1.1 Aktivierung von c-Src durch hnRNP K-Varianten *in vitro*

Im *in vitro* Kinase-Aktivierungsassay (Kapitel 2.8) wurden äquimolare Mengen der in *E.coli* exprimierten und gereinigten hnRNP K oder Pro-Ala-Varianten eingesetzt (Abb. 3.1 B).

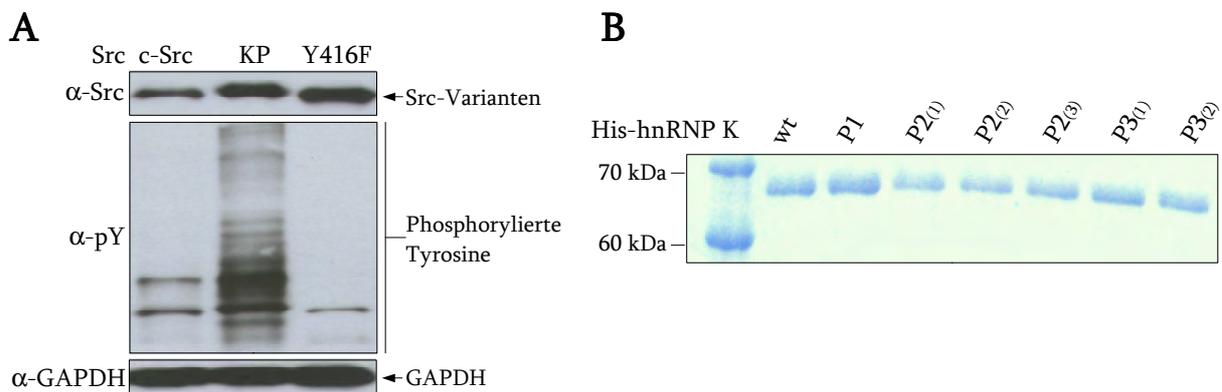


Abb. 3.1: A) HeLa-Zell-Lysat mit den exprimierten Src-Varianten. HeLa-Zellen wurden mit folgenden cDNAs transfiziert: c-Src, aktivem Src (KP) oder inaktivem Src (Y416F). Jeweils 10 μ g HeLa-Zell-Lysat wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und in Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen Src (α -Src), phosphorylierte Tyrosine (α -pY) oder eine Ladekontrolle (α -GAPDH) untersucht.

B) His-hnRNP K-Varianten. In *E.coli* exprimierte hnRNP K-Varianten wurden über deren His-tag gereinigt.

Die Src-Varianten wurden in HeLa-Zellen exprimiert (Abb. 3.1 A) und für den *in vitro* Kinase-Aktivierungsassay immunpräzipitiert (α -c-Src). Src (KP) ist bereits im HeLa-Zell-Lysat aktiv und phosphoryliert eine Vielzahl endogener Proteine, wozu c-Src und Src (Y416F) nicht in der Lage sind (Abb. 3.1). Nach Auftrennung des *in vitro* Kinase-Aktivierungsassays (Abb. 3.2) durch SDS-PAGE erfolgten Westernblot-Analysen gegen das fusionierte His-tag (α -His), Src (α -Src) und phosphorylierte Tyrosine (α -pY).

Es konnte gezeigt werden, dass hnRNP K in Abwesenheit von c-Src keine Tyrosin-Phosphorylierung aufweist (Bahn 1) und mit der inaktiven Variante Src (Y416F) (Bahn 2) nur eine sehr schwache Phosphorylierung auftrat. Konstitutiv aktives Src (KP) und c-Src hingegen phosphorylieren hnRNP K (Bahn 3 und 4). Die Varianten P2⁽²⁾, P2⁽³⁾, P3⁽¹⁾ und P3⁽²⁾ (Bahn 7-10) zeigten ein deutlich reduziertes Phosphorylierungs-Signal im Vergleich zu hnRNP K (Bahn 4). Die Tyrosin-Phosphorylierung der Varianten P2^(2,3) war deutlich reduziert, bei P3^(1,2) und P2^(2,3)P3^(1,2) lag sie unter der Nachweisgrenze der durchgeführten Westernblot-Analyse (Bahn 11-13). Es konnte gezeigt werden, dass die hnRNP K-Varianten P2⁽²⁾, P2⁽³⁾, P3⁽¹⁾ und P3⁽²⁾ c-Src nicht mehr im gleichen Maß wie hnRNP K aktivieren und die Substrat-Phosphorylierung dieser Varianten deutlich reduziert war. HnRNP K (P2^(2,3)P3^(1,2)), welches alle vier Variationen in sich vereinigt, bewirkte *in vitro* keine nachweisbare Aktivierung von c-Src.

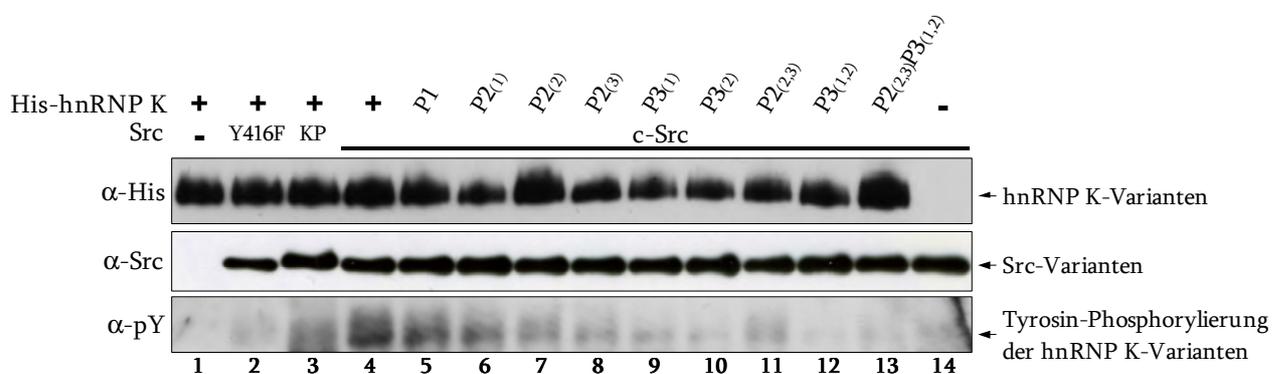


Abb. 3.2: *In vitro* Kinase-Aktivierungsassay mit hnRNP K-Pro-Ala-Varianten. Inaktives Src (Y416F) (2), konstitutiv aktives Src (KP) (3) oder c-Src (4-14) wurde aus 20 μ g HeLa-Zell-Lysat, die entsprechend mit cDNAs transfiziert waren, immunpräzipitiert (α -c-Src). Äquimolare Mengen rekombinantes hnRNP K (1-4) oder Pro-Ala-Varianten (5-13) wurden in Anwesenheit von ATP und Mangan mit den Src-Varianten inkubiert. Nach einer SDS-PAGE wurden Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen den His-tag der hnRNP K-Varianten (α -His), Src (α -Src) und phosphorylierte Tyrosine (α -pY) durchgeführt (vgl. Adolph *et al.*, 2007).

3.1.2 Aktivierung von c-Src durch hnRNP K-Varianten in transfizierten HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit folgenden cDNAs transfiziert (Abb. 3.3): c-Src (Zeile 2), His-hnRNP K (Zeile 3), c-Src und His-hnRNP K (Zeile 4). Die Expression der Proteine und deren Lokalisierung innerhalb der Zellen wurde durch Immunfluoreszenz (Src mit Cy3, hnRNP K mit Cy5, Kapitel 2.9) nachgewiesen und der Zellkern durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht.

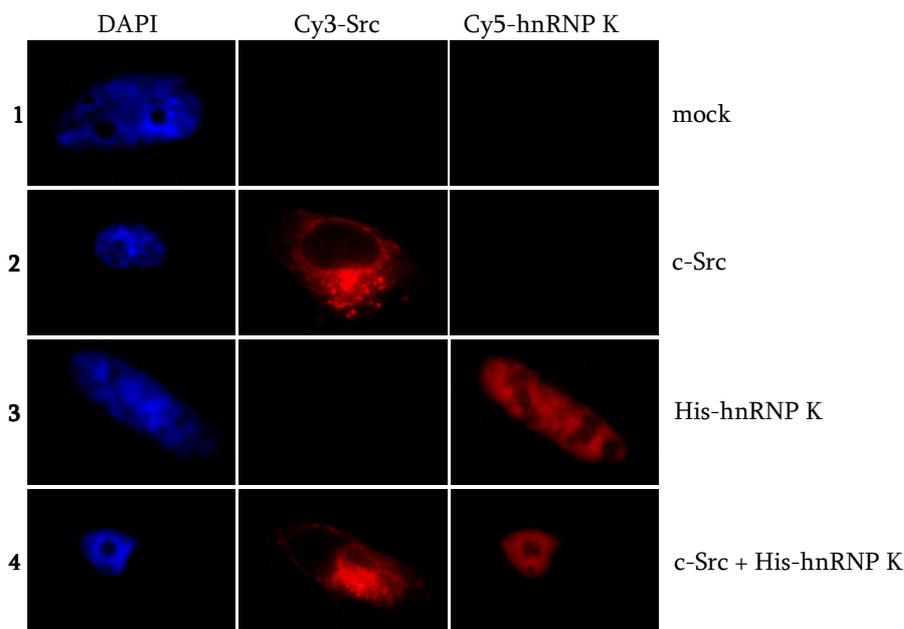


Abb. 3.3: Lokalisierung von His-hnRNP K und c-Src in transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden wie folgt transfiziert: Vektor-Kontrolle (1), c-Src (2), His-hnRNP K (3), c-Src und His-hnRNP K (4). Durch Immunfluoreszenz wurde die Proteinexpression von Src mit Cy3 und hnRNP K mit Cy5 nachgewiesen. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

HeLa-Zellen, die lediglich mit der Vektor-Kontrolle transfiziert wurden (Zeile 1), weisen kein endogenes c-Src auf, jedoch wird ein schwaches Signal für endogenes hnRNP K detektiert. Überexprimiertes c-Src ist im Zytoplasma hauptsächlich um den Zellkern lokalisiert (Zeile 2). His-hnRNP K hingegen befindet sich im Zellkern, ist jedoch wie das endogene Protein aus den Nukleoli ausgeschlossen (Zeile 3). Werden sowohl c-Src als auch His-hnRNP K gleichzeitig in den Zellen exprimiert, so ist keine Veränderung in deren Lokalisierung innerhalb der Zelle sichtbar (Zeile 4). Die in dem *in vitro* Kinase-Aktivierungsassay gezeigte Aktivierung von c-Src, dessen Wechselwirkungen mit His-hnRNP K und ebenso die Phosphorylierung beider Interaktionspartner hat demzufolge keinen nachweisbaren Einfluss auf die Lokalisierung der Proteine innerhalb der Zelle.

Um festzustellen, welche der sechs Polyprolin-Motive zur Aktivierung von c-Src *in vivo* beitragen, wurden HeLa-Zellen mit cDNAs der verschiedenen Pro-Ala-Varianten von hnRNP K und der Tyrosinkinase c-Src co-transfiziert (Kapitel 2.7.1). Als Kontrolle erfolgten Transfektionen mit der inaktiven Variante Src (Y416F) und der konstitutiv aktiven Variante Src (KP). Das HeLa-Zell-Lysat wurde durch SDS-PAGE und Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen den His-tag der hnRNP K-Varianten (α -His), Src (α -Src), an Tyrosin 416 phosphoryliertem Src (α -Src (pY416)) und die Ladekontrolle (α -GAPDH) überprüft (Abb. 3.4). Die mit einem Antikörper (α -His) gegen die His-hnRNP K-Varianten durchgeführte Immunpräzipitation aus HeLa-Zell-Lysat (Kapitel 2.7.3) wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot-Analysen auf präzipitiertes hnRNP K (α -His), die Phosphorylierung von Tyrosinen (α -pY) und das co-immunpräzipitierte Src (α -Src) untersucht (Abb. 3.4).

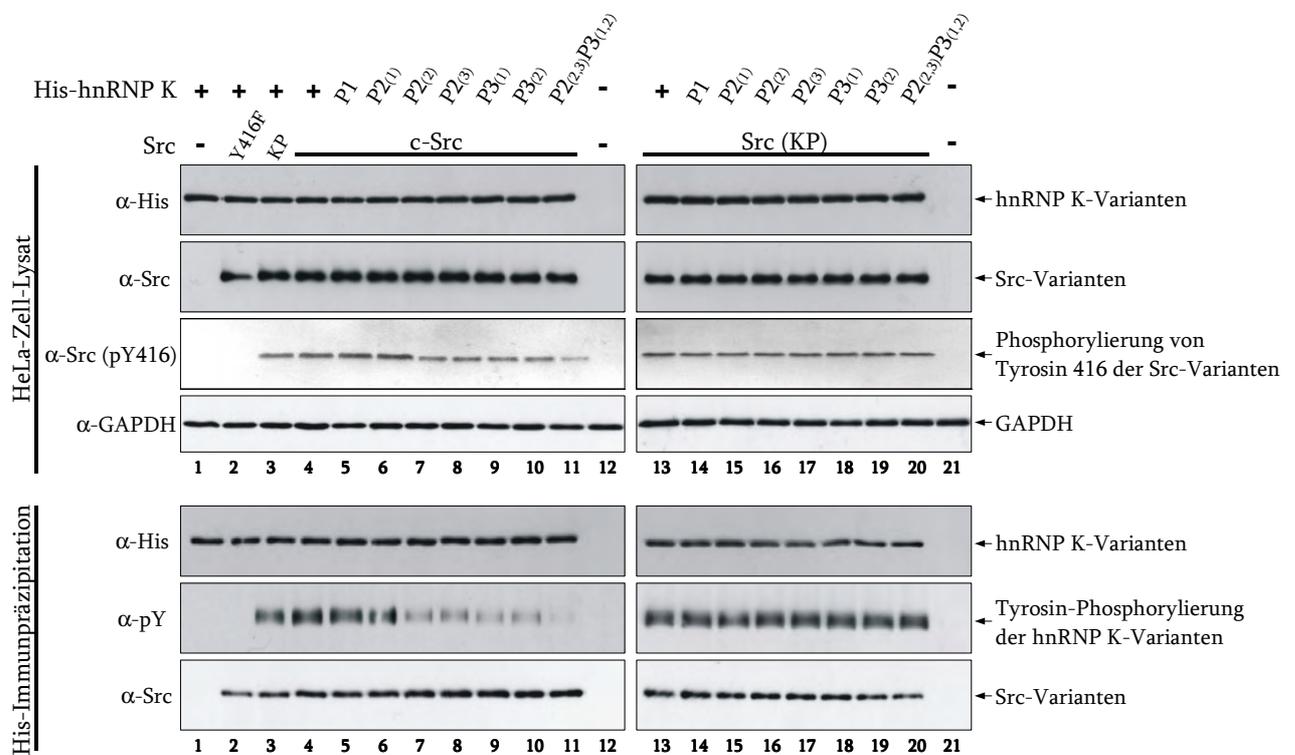


Abb. 3.4: Aktivierung von c-Src durch hnRNP K-Varianten in transfizierten HeLa-Zellen.

HeLa-Zell-Transfektionen wurden wie folgt durchgeführt: hnRNP K (1-4 und 13), hnRNP K-Varianten (5-11 und 14-20), inaktives Src (Y416F) (2), aktives Src (KP) (3 und 13-20), c-Src (4-11). HeLa-Zell-Lysat wurde in Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen die His-hnRNP K-Varianten (α -His), Src (α -Src), an Tyrosin 416 phosphoryliertem Src (α -Src (pY416)) und die Ladekontrolle GAPDH (α -GAPDH) untersucht. Nach Immunpräzipitation der His-hnRNP K-Varianten (α -His 5) erfolgten Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen den His-tag (α -His), die Phosphorylierung von Tyrosinen (α -pY) und Src (α -Src). (Adolph *et al.*, 2007)

Ausgehend von homogen exprimierten Proteinmengen im HeLa-Zell-Lysat konnten gleichbleibende Mengen der hnRNP K-Varianten immunpräzipitiert werden. Mit den verwendeten hnRNP K-Varianten wurden vergleichbare Mengen der Src-Varianten

co-immunpräzipitiert. Die Interaktion der hnRNP K-Varianten mit den Src-Varianten wird somit nicht durch die modifizierte Aminosäuresequenz der hnRNP K-Varianten, der Aktivität der Src-Varianten und damit dem Grad der Tyrosin-Phosphorylierung beider Proteine, beeinflusst. Als Marker für die Aktivität der Src-Varianten wurde im HeLa-Zell-Lysat die Phosphorylierung des Tyrosins 416 untersucht, welche für die Stabilisierung der aktiven Konformation der Tyrosinkinase c-Src essentiell ist (Xu *et al.*, 1999, Huse und Kuriyan, 2002). Eine deutliche Reduktion der Tyrosin 416-Phosphorylierung in c-Src konnte in den Bahnen 7-11 mit den hnRNP K-Varianten P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎, P3₍₂₎ und P2_(2,3)P3_(1,2) festgestellt werden. Src (KP) hingegen war, unabhängig von den verwendeten hnRNP K-Varianten, gleichmäßig am Tyrosin 416 phosphoryliert und somit konstitutiv aktiv (Bahn 13-20). Als zweites Merkmal für die Aktivität der Tyrosinkinase wurde die Phosphorylierung der hnRNP K-Varianten in der Immunpräzipitation überprüft. Die inaktive Variante Src (416F) (Bahn 2) phosphorylierte hnRNP K nicht in vergleichbarem Maß wie c-Src (Bahn 4) oder das konstitutiv aktive Src (KP) (Bahn 3). Die Co-Expressionen der hnRNP K-Varianten P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎, P3₍₂₎ und P2_(2,3)P3_(1,2) (Bahn 7-11) mit c-Src zeigten eine deutlich reduzierte Substrat-Phosphorylierung der Tyrosine im Vergleich zu hnRNP K (Bahn 4). Wurden die hnRNP K-Varianten jedoch mit dem konstitutiv aktiven Src (KP) co-exprimiert, war die Phosphorylierung aller hnRNP K-Varianten vergleichbar mit der des Wildtyps (Bahn 13-20). Die in den hnRNP K-Varianten P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎, P3₍₂₎ und P2_(2,3)P3_(1,2) reduzierte Phosphorylierung durch c-Src ist demzufolge nicht auf eine verschlechterte Substrataffinität der hnRNP K-Varianten zu aktivem Src zurück zu führen, sondern beruht auf einer ineffektiven Aktivierung der Tyrosinkinase. Vier der möglichen sechs Polyprolin-Motive haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die vollständige Aktivierung von c-Src. Die Variation der Polyprolin-Motive P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ führte sowohl zu einer reduzierten Phosphorylierung des Tyrosins 416 in c-Src, als auch zu einer verminderten Substrat-Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase.

3.1.3 Aktivierung von c-Src *in vitro* allein durch die prolinreichen Sequenzen P2 und P3 in hnRNP K

Weiterhin sollte überprüft werden, ob die prolinreichen Sequenzen P2 und P3 aus hnRNP K für eine Aktivierung von c-Src ausreichend sind oder eine zusätzliche Interaktion beider Proteine für die Aktivierung erforderlich ist. Hierfür wurde ein rekombinant in *E.coli* exprimiertes Peptidfragment von hnRNP K (Aminosäuren 285 bis 318; P2-3) verwendet, welches die für die Aktivierung notwendigen prolinreichen Sequenzen P2 und P3 beinhaltet. Als Substrat für aktiviertes c-Src wurde die Variante hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) verwendet, die keine aktivierende

Wirkung besitzt, wie bereits in Abb. 3.2 gezeigt wurde. In Abb. 3.5 wurde c-Src aus 20µg transfiziertem HeLa-Zell-Lysat immunpräzipitiert (α -c-Src), mit 1µg hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (18pmol) (Bahn 3-6), 1µg hnRNP K (18pmol) (Bahn 2), ATP (275µM) und ansteigenden Mengen (0-100ng=21,4pmol) des Peptids P₂₋₃ (Bahn 4-6) inkubiert (Kapitel 2.8). C-Src wird durch hnRNP K aktiviert, welches anschließend als Substrat phosphoryliert wird (Bahn 2). HnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) hingegen aktiviert c-Src nicht mehr und wird somit nicht phosphoryliert (Bahn 3). Ansteigende Mengen des Peptids P₂₋₃ in der Reaktion führen zu einer Zunahme der hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2))-Phosphorylierung (Bahn 4-6). Die Polyprolin-Motive im Peptid P₂₋₃ aktivieren c-Src, woraufhin das Substrat phosphoryliert werden kann. C-Src wird durch 100ng des Peptids P₂₋₃ etwa ebenso stark aktiviert, wie durch die äquimolare Menge an hnRNP K. Die Polyprolin-Motive in hnRNP K sind demzufolge für die Aktivierung von c-Src notwendig und hinreichend und bewirken die Aktivierung unabhängig von weiteren Interaktionen zwischen Aktivator und Tyrosinkinase.

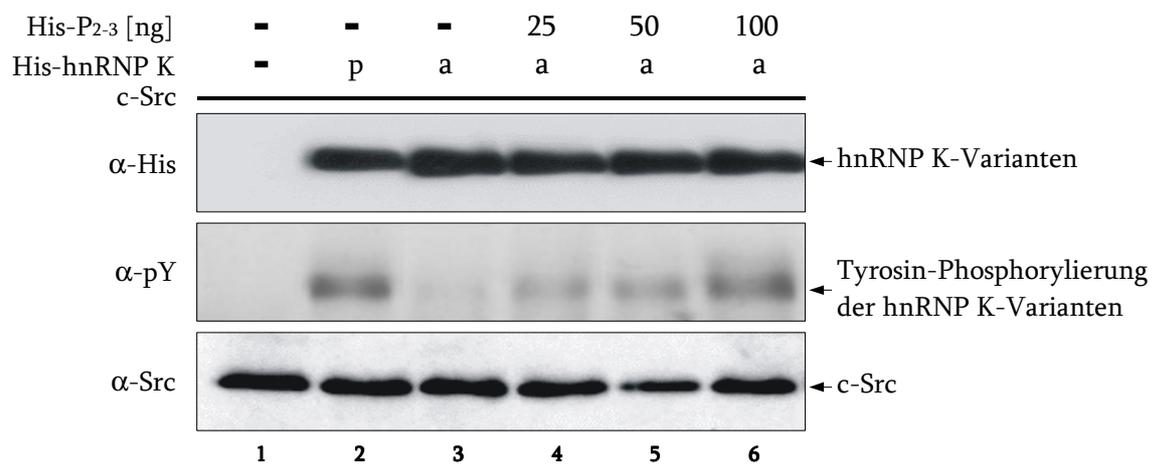


Abb. 3.5: Aktivierung von c-Src durch das Peptid P₂₋₃ *in vitro*. C-Src (1-6) wurde aus 20µg Lysat transfizierter HeLa-Zellen mit einem Antikörper gegen Src (α -c-Src) immunpräzipitiert. Der Aktivierungsreaktion wurde 1µg hnRNP K (2) oder hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) mit ansteigenden Mengen (0-100ng) des Peptids P₂₋₃ (3-6) zugesetzt. Nach einer Auftrennung durch SDS-PAGE wurden Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen Src (α -Src), His-hnRNP K oder His-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (α -His) und phosphorylierte Tyrosine (α -pY) durchgeführt. P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ in His-hnRNP K: p= PxxP-Motive (Wildtyp), a= durch AxxA-Motive ersetzt. (Adolph *et al.*, 2007)

3.1.4 HnRNP K als Aktivator und Interaktionspartner von Tyrosinkinasen

HnRNP K interagiert mit den isolierten SH 3-Domänen der Tyrosinkinasen c-Src, Lyn und Fyn (Taylor und Shalloway, 1994, Weng *et al.*, 1994, Van Seuning *et al.*, 1995). C-Src und eine konstitutiv aktive Variante von Lck können eine Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K bewirken (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002, Ostrowski *et al.*, 2000). Dementsprechend wurde

überprüft, ob die Veränderung der prolinreichen Sequenzen P2 und P3 in hnRNP K auch auf die Aktivierung und Interaktion mit den Tyrosinkinassen Lyn, Fyn und Lck Auswirkungen hat (Abb. 3.6, Adolph *et al.*, 2007).

HeLa-Zellen wurden folgendermaßen transfiziert: His-hnRNP K (Bahn 2, 6, 10 und 14) oder His-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (Bahn 3, 7, 11 und 15), eine der vier Tyrosinkinassen c-Src (Bahn 1-4), Lyn (Bahn 5-8), Fyn (Bahn 9-12) oder Lck (Bahn 13-16). HeLa-Zell-Lysat wurde in Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen den His-*tag* der hnRNP K-Varianten (α -His), die verschiedenen Tyrosinkinassen (α -Kinase), die Tyrosin-Phosphorylierung (α -pY) und die Ladekontrolle GAPDH (α -GAPDH) untersucht. Nach Immunpräzipitation der hnRNP K-Varianten (α -His) erfolgten Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen den His-*tag* (α -His), die verschiedenen Tyrosinkinassen (α -Kinase) und die Tyrosin-Phosphorylierung (α -pY).

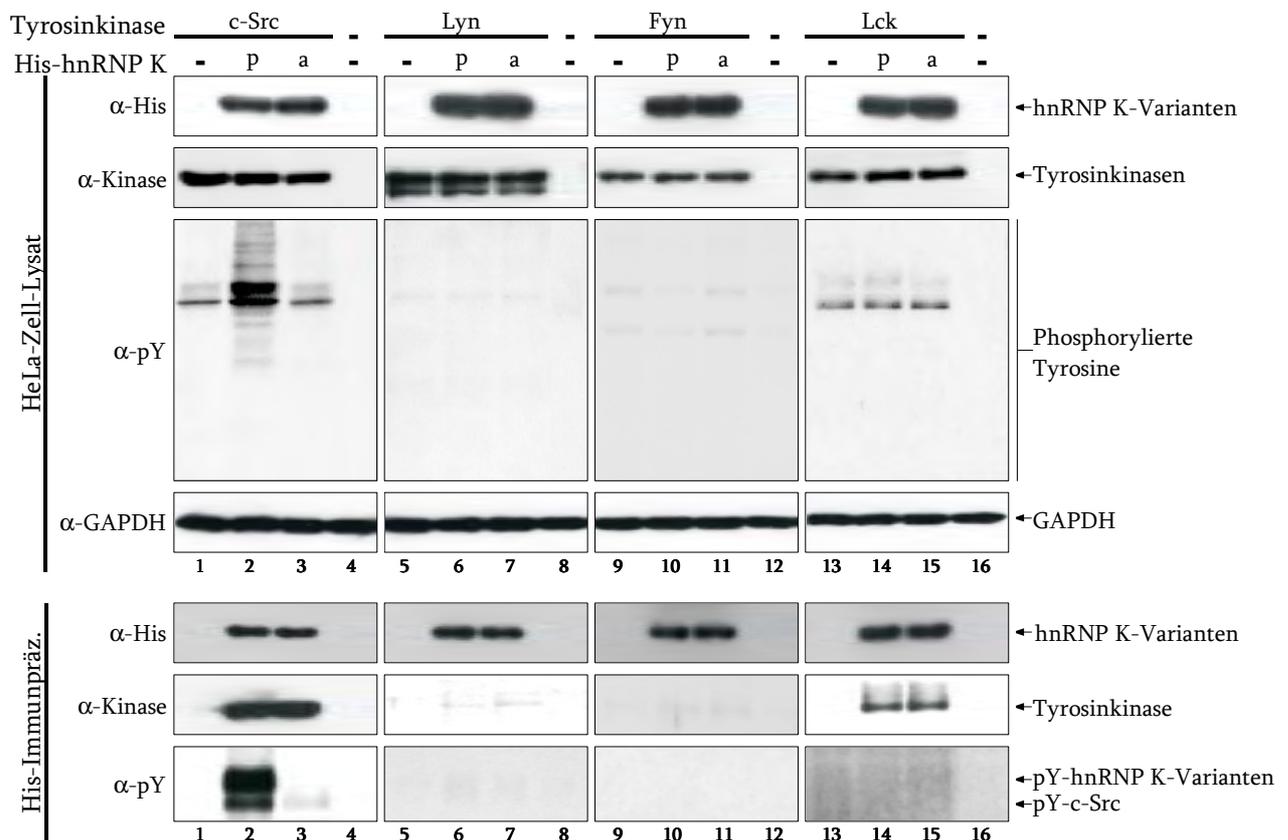


Abb. 3.6: HeLa-Zell-Transfektion mit hnRNP K-Varianten und den Tyrosinkinassen c-Src, Lyn, Fyn und Lck. HeLa-Zellen wurden wie folgt transfiziert: His-hnRNP K (Bahn 2, 6, 10, 14), His-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (Bahn 3, 7, 11, 15), c-Src (Bahn 1-4), Lyn (Bahn 5-8), Fyn (Bahn 9-12), Lck (Bahn 13-16). HeLa-Zell-Lysat wurde in Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen die His-hnRNP K-Varianten (α -His), die verschiedenen Tyrosinkinassen (α -Kinase), die Tyrosin-Phosphorylierung (α -pY) und die Ladekontrolle GAPDH (α -GAPDH) untersucht. Nach Immunpräzipitation der His-hnRNP K-Varianten (α -His) erfolgten Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen den His-*tag* (α -His), die verschiedenen Tyrosinkinassen (α -Kinase) oder die Tyrosin-Phosphorylierung (α -pY). P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ in His-hnRNP K: p= PxxP-Motive (Wildtyp), a= durch AxxA-Motive ersetzt. (Adolph *et al.*, 2007)

Wie in Abbildung Abb. 3.6 zu erkennen ist, aktiviert hnRNP K c-Src und wird von der Kinase phosphoryliert (Bahn 2), wohingegen hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) c-Src nicht zu aktivieren vermag (Bahn 3). Beide Varianten interagieren mit c-Src, wodurch die Tyrosinkinase co-immunpräzipitiert wurde. Die Co-Transfektion der Tyrosinkinasen Lyn, Fyn und Lck mit hnRNP K oder hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) führten zu keiner erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung der hnRNP K-Varianten (Bahn 6, 7, 10, 11, 14, 15). Eine Aktivierung der Tyrosinkinasen Lyn, Fyn und Lck durch hnRNP K oder hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) wurde nicht nachgewiesen. Beide hnRNP K-Varianten co-immunpräzipitieren jedoch c-Src und Lck (Bahn 2, 3, 14, 15). Eine sehr schwache Interaktion mit Lyn oder Fyn konnte nur mit langen Expositionszeiten in den Westernblot-Analysen gezeigt werden. Die Interaktion mit den Tyrosinkinasen c-Src und Lck ist jedoch unabhängig von den sechs Polyprolin-Motiven in hnRNP K.

3.1.5 Aktivität von rekombinantem c-Src aus *E.coli*

Die Expression von c-Src mit N-terminalem His-tag (His-c-Src) wurde unter verschiedenen Bedingungen getestet und optimiert, um eine möglichst hohe Ausbeute an Protein zu erreichen. Ausgehend von den für His-hnRNP K optimierten Bedingungen (Kapitel 2.4 und Tabelle 3.1 Expression A) wurden drei weitere Expressionsbedingungen getestet (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Expressionsbedingungen für His-c-Src in *E.coli*.

Expression A:	Expression B:	Probennahme:
Minimalmedium	Minimalmedium	1) 1h
pH 7,0	pH 5,0	2) 2h
		3) 3h
Expression C:	Expression D	4) 4h
Minimalmedium	LB-Medium	5) 6h
pH 9,0	pH 7,0	

Ein Ansatz wurde in LB-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 kultiviert, abzentrifugiert, anschließend in Schüttelkolben aufgeteilt und den vier Expressionsbedingungen ausgesetzt. In allen vier Medien betrug die Expressionstemperatur 25°C, die Ampicillinkonzentration 100ng/µl, sowie die IPTG-Konzentration 1mM. Zu den jeweiligen Erntezeitpunkten wurden 10ml des Mediums steril entnommen, die Zellen abzentrifugiert, in Lysepuffer für His-Proteine (Kapitel 2.4.1) aufgenommen und auf Trockeneis eingefroren. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Intervall 20, Stufe 5, 15sec, Eiswasserkühlung). In einer SDS-PAGE wurde jeweils ein Lysatvolumen, das 9µg Gesamtprotein enthielt (bestimmt nach Bradford, 1976), aufgetrennt und mit Westernblot-Analyse nach überexprimiertem His-c-Src (α-Src) untersucht (Abb. 3.7).

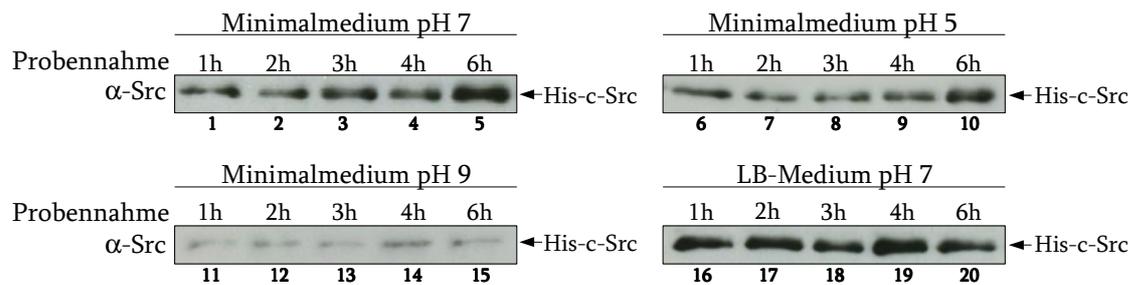


Abb. 3.7: Westernblot-Analysen der His-c-Src-Expression in *E.coli*-Zellen. Westernblot-Analysen der Expression von His-c-Src in *E.coli* (α -Src) unter verschiedenen Bedingungen. Minimalmedium, pH 7,0 (1-5), Minimalmedium, pH 5,0 (6-10), Minimalmedium pH 9,0 (11-15) oder LB-Medium, pH 7,0 (16-20). 25°C, 1mM IPTG, Probenahme nach 1h, 2h, 3h, 4h, 6h (1-20).

Unter den Ausgangsbedingungen (A, Bahn 1-5) konnte nur eine sehr langsam akkumulierende Expression von His-c-Src erreicht werden. Die Veränderung des pH-Werts (B, Bahn 6-10 und C, Bahn 11-15) führte im Vergleich dazu zu einer Verschlechterung der Protein-Ausbeute. Die Verwendung von LB-Medium bei neutralem pH-Wert (D, Bahn 16-20) erzielte von Beginn der Expression an die beste Expressionsrate und Ausbeute, wobei keine der vier Bedingungen zu einer sichtbaren Überexpression in einer Coomassie gefärbten SDS-PAGE ausreichte (Daten nicht gezeigt). Die Expression von His-c-Src wurde anschließend bei 25°C, in LB-Medium, pH 7,0 mit 1mM IPTG für vier Stunden vorgenommen.

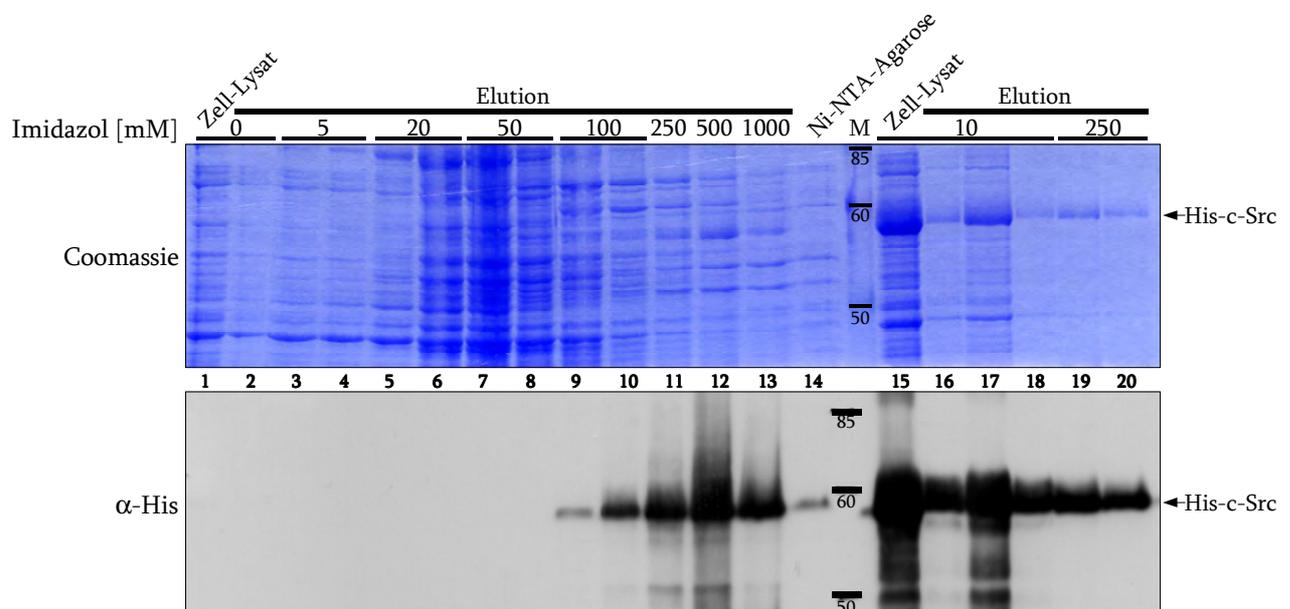


Abb. 3.8: Vergleich der Reinigung von His-c-Src mit Ni-NTA oder Magne His™ Ni-Particles. Der Aufschluss der *E.coli*-Zellen erfolgte durch Ultraschall. Die Inkubationszeit des Zell-Lysats mit der Ni-NTA-Agarose wurde auf 16h verlängert. Reinigung mit Ni-NTA (1-14) und mit Magne His™ Ni-Particles (15-20). Durch die ansteigende Imidazol-Konzentration wurden Proteine eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt (Coomassie) oder mit Westernblot-Analyse gegen His-c-Src (α -His) untersucht. Angaben des Markers (M) in kDa.

Für die Reinigung von His-c-Src (Abb. 3.8) werden nachfolgend die Ergebnisse unter Verwendung von Ni-NTA oder Magne His™ Ni-Particles (Kapitel 2.4.1) verglichen. Bei der Aufreinigung mit Ni-NTA wurde die Inkubation des *E.coli*-Zell-Lysats mit der Ni-NTA-Agarose auf 16 Stunden bei 4°C verlängert, da innerhalb der üblicherweise verwendeten Zeit (1,5h) His-c-Src nicht gebunden hatte. Des Weiteren erfolgte die Elution mit Imidazol wie folgt: 1 x 0M (1ml), 2 x 5mM (1ml); 2 x 20mM (1ml); 2 x 50mM (1ml); 2 x 100mM (500µl); 1 x 250mM (500µl); 1 x 500mM (500µl); 1 x 1M (1ml). In der Coomassie-Färbung (Abb. 3.8) wird deutlich, dass alle Fraktionen der Ni-NTA Reinigung mit endogenen Proteinen verunreinigt sind. Ohne die Westernblot-Analyse gegen den His-tag von c-Src (α -His) wäre ein Nachweis der Expression nicht möglich gewesen. Mit Hilfe der Magne His™ Ni-Particles konnten quantitativ vergleichbare Mengen an His-c-Src gereinigt werden (α -His, Bahn 18-20), die Fraktionen enthielten jedoch erheblich weniger Verunreinigungen durch endogene Proteine aus *E.coli* (Coomassie).

Mögliche Einflüsse durch die Expression in *E.coli*, den N-terminalen His-tag oder die Reinigung mit Magne His™ Ni-Particles auf die Aktivität von His-c-Src wurde *in vitro* im Kinase-Aktivierungsassay überprüft (Abb. 3.9). His-c-Src (Bahn 1) wurde in *E.coli*-Zellen, c-Src in HeLa-Zellen (Bahn 3) überexprimiert (Abb. 3.9 A). Extrakt aus nicht transformierten *E.coli*-Zellen enthält kein c-Src (Bahn 2), wohingegen bei den transformierten Zellen eine deutlich sichtbare Überexpression von His-c-Src sichtbar ist (Bahn 1). Der durch den N-terminalen His-tag verursachte Größenunterschied zwischen His-c-Src und c-Src ist deutlich in der SDS-PAGE zu sehen (Bahn 1 und 3).

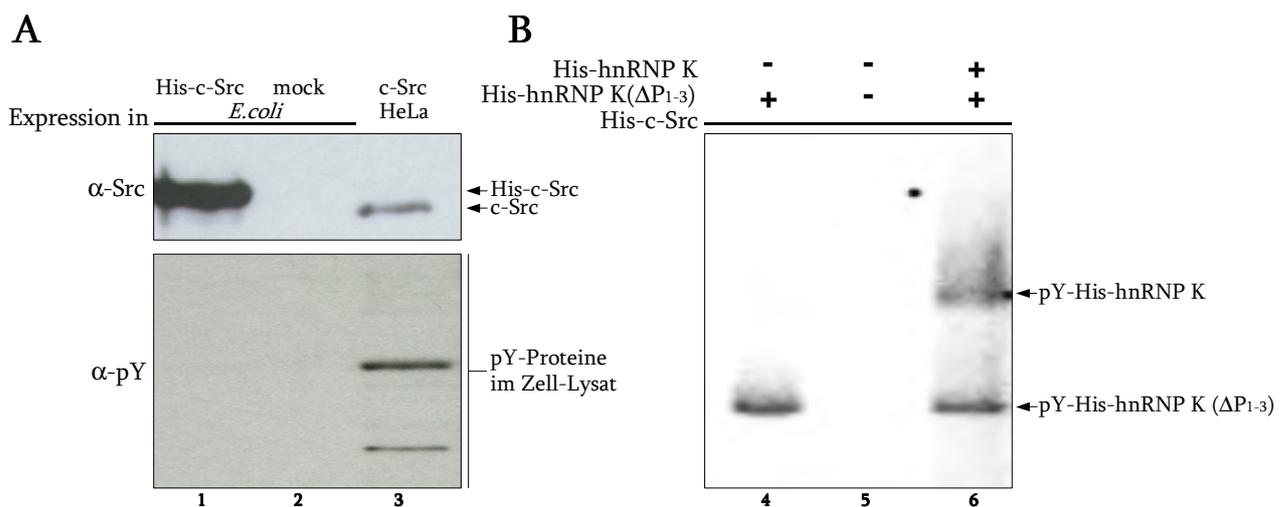


Abb. 3.9: A) Expression von c-Src in unterschiedlichen Systemen. Auftrennung mittels SDS-PAGE von 6,6µg *E.coli*-Zell-Lysat (1, 2), bzw. mit c-Src aus transfiziertem HeLa-Zell-Lysat (3). Anschließend erfolgten Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen Src (α -Src) oder phosphorylierte Tyrosine (α -pY).

B) Autoradiographie des *in vitro* Kinase-Aktivierungsassay mit His-c-Src. In *E.coli* exprimiertes und über Magne His™ Ni-Particles gereinigtes His-c-Src (20ng) (4-6) wurde mit 150ng His-hnRNP K (Δ P1-3) (4), ohne hnRNP K (5) oder 150ng His-hnRNP K (Δ P1-3) und 500ng His-hnRNP K (6) in Anwesenheit von [γ ³²P]-ATP im Aktivitätsassay eingesetzt.

Die Westernblot-Analyse gegen die Tyrosin-Phosphorylierung (α -pY) weist kein Signal in den *E.coli*-Lysaten auf (Bahn 1 und 2), wohingegen für überexprimiertes c-Src aus transfizierten HeLa-Zellen eine Phosphorylierung im Zell-Lysat sichtbar ist. His-c-Src wurde mit Magne His™ Ni-Particles gereinigt und ein Aktivitätsassay durchgeführt, wobei radioaktiv markiertes [γ^{32} P]-ATP (1,65 μ Ci) verwendet wurde (Abb. 3.9 B). His-c-Src (20ng) wurde zusammen mit 150ng His-hnRNP K (Δ P₁₋₃) (Bahn 4), ohne hnRNP K (Bahn 5) oder mit 150ng His-hnRNP K (Δ P₁₋₃) und 500ng hnRNP K (Bahn 6) eingesetzt. Nach einer SDS-PAGE wurde ein Autoradiogramm angefertigt. Wurde nur His-hnRNP K (Δ P₁₋₃) mit His-c-Src eingesetzt, war eine Tyrosin-Phosphorylierung der hnRNP K-Variante sichtbar (Bahn 4). War zusätzlich noch His-hnRNP K im Ansatz, wurde ein zusätzliches Signal für dessen Tyrosin-Phosphorylierung sichtbar (Bahn 6). Wurde nur His-c-Src alleine untersucht, so war keinerlei Phosphorylierung zu detektieren (Bahn 5). Die Variante His-hnRNP K (Δ P₁₋₃) konnte in HeLa-Zellen exprimiertes c-Src nicht aktivieren und wies keine Phosphorylierung auf (Abb. 1.7), jedoch konnte durch His-c-Src eine Substrat-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von His-hnRNP K (Δ P₁₋₃) fiel in den Bahnen 4 und 6 vergleichbar stark aus. Die Zugabe von His-hnRNP K mit den prolinreichen Sequenzen P1-P3 bewirkte somit keine ansteigende Enzymaktivität und hatte keine aktivierende Wirkung auf His-c-Src (Bahn 6). His-c-Src wird in *E.coli*-Zellen nicht phosphoryliert und kann somit nicht in einer vollständig reprimierten Konformation vorliegen. Weitere Wechselwirkungen mit einem Liganden sind nicht notwendig, um in Anwesenheit von ATP und einem zweiwertigen Ion enzymatisch aktiv zu sein.

3.1.6 Übersicht zur Aktivierung von c-Src

Die prolinreichen Sequenzen in hnRNP K sind für die Aktivierung von c-Src notwendig. Fehlen sie wie bei hnRNP K (Δ P₁₋₃) in der Proteinsequenz, ist keine Aktivierung von c-Src möglich (Abb. 1.7). Zur Bestimmung der für die Aktivierung notwendigen PxxP-Motive, wurden diese durch AxxA-Motive ersetzt, was eine Interaktion mit der SH 3-Domäne verhindert (Lang *et al.*, 1997, Kay *et al.*, 2000). Für hnRNP K (P1) und (P2₍₁₎) konnte weder in HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten noch *in vitro* vom Wildtyp hnRNP K abweichende Eigenschaften bezogen auf die Aktivierung von c-Src gefunden werden (Abb. 3.2, Abb. 3.4, Abb. 3.10 Nr.1 und 3). Die Phosphorylierung der vier Varianten P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ war gegenüber hnRNP K reduziert. Für alle Varianten wurde jedoch eine gleichmäßige Tyrosin-Phosphorylierung durch konstitutiv aktives Src (KP) nachgewiesen (Abb. 3.4, Abb. 3.10 Nr.13). Die Substrataffinität der hnRNP K-Varianten zur aktiven Tyrosinkinase ist somit nicht herabgesetzt.

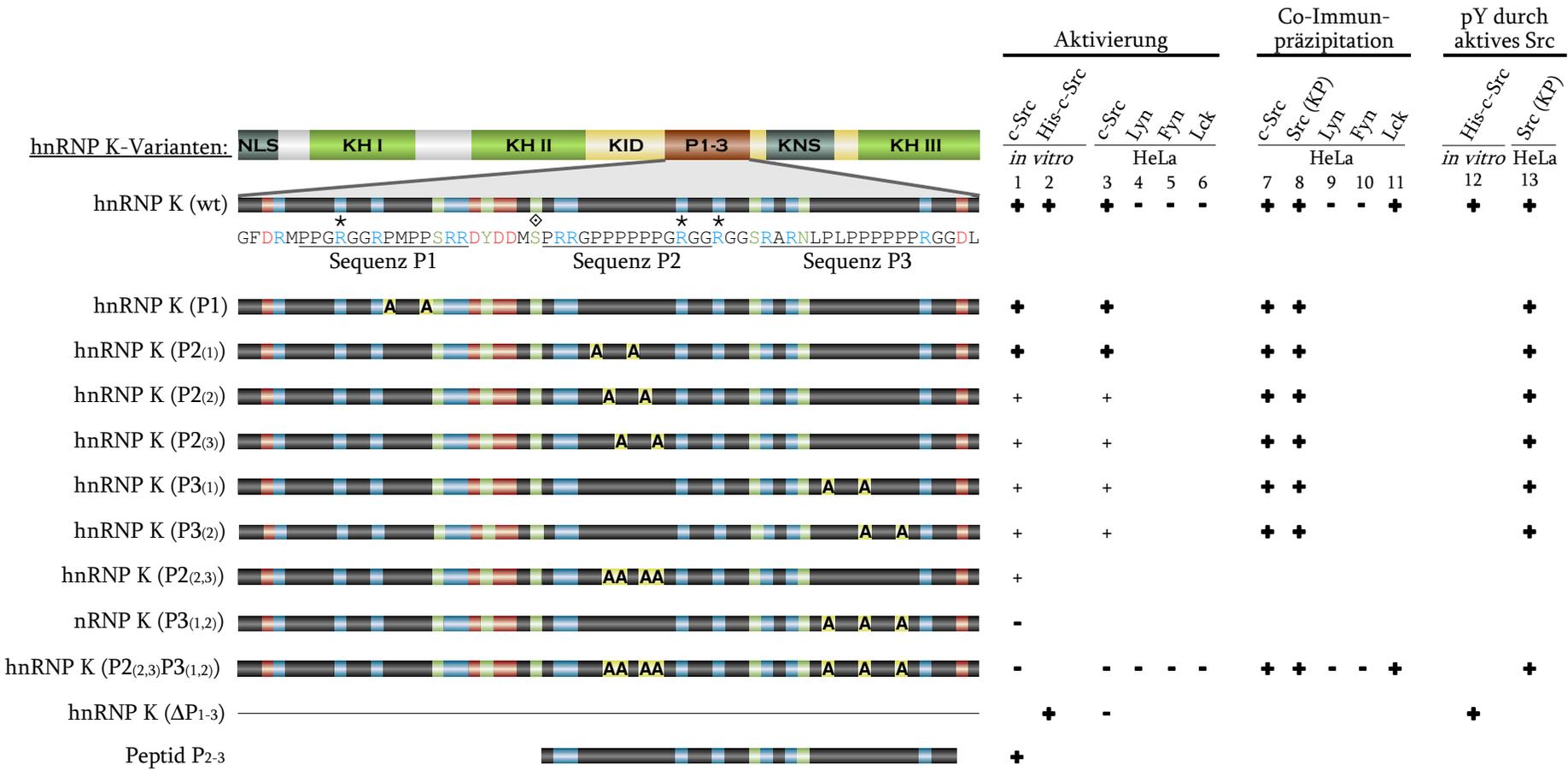


Abb.3.10: Übersicht zur Aktivierung von c-Src durch hnRNP K. Darstellung der Aminosäuren 260 bis 320 in hnRNP K. Mit „in vitro“ (Nr. 1,2,12) gekennzeichnete Daten wurden durch den Kinase-Aktivierungsassay, mit „HeLa“ (Nr. 3 bis 11, 13) gekennzeichnete Daten in HeLa-Zell-Transfektions-experimenten und Immunpräzipitationen ermittelt. Die durch Alanine (A) ausgetauschten Aminosäuren in den hnRNP K-Varianten wurden jeweils hervorgehoben. Aminosäurereste: sauer (D,E); basisch (R,K,H); ungeladen und polar (S,N,T,Q,C,Y); neutral (G,A,V,M,I,P,L,W,F); * durch PRMT1 methylierte Arginine; ◇ durch ERK phosphorylierte Serine; + vergleichbar mit dem Wildtyp; + deutlich schlechter als der Wildtyp; - keine Angabe. Sind keine Angaben vorhanden, wurde die Variante nicht getestet.

Die reduzierte Phosphorylierung an Tyrosin 416 in c-Src zeigte ebenfalls, dass c-Src durch die hnRNP K-Varianten P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ nicht in vollem Umfang aktiviert wird. Die Vereinigung dieser vier Varianten in hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) hatte zur Folge, dass c-Src nicht mehr aktiviert werden kann. Dennoch ist hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) ein Substrat von aktivem Src (KP). *In vitro* ist ein Fragment von hnRNP K, welches die prolinreichen Sequenzen P2 und P3 enthält (P₂₋₃), in der Lage c-Src zu aktivieren, ohne dass eine zusätzliche Interaktion notwendig ist (Abb. 3.5, Abb. 3.10 Nr.1). Alle Variationen in hnRNP K haben keinerlei Einfluss auf die Interaktion mit c-Src oder Src (KP) (Abb. 1.7, Abb. 3.4, Abb. 3.10 Nr.7 und 8). Die stabile Interaktion von hnRNP K und c-Src ist demnach unabhängig von der Wechselwirkung der Polyprolin-Motive mit der SH 3-Domäne von c-Src, welche zur Aktivierung der Tyrosinkinase führt. Die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K oder die von Tyrosin 416 in c-Src besitzt ebenfalls keinen Einfluss auf die Interaktion der beiden Proteine. HnRNP K kann c-Src aktivieren, jedoch nicht die Tyrosinkinasen Lyn, Fyn und Lck (Abb. 3.6, Abb. 3.10 Nr. 4-6). Lck interagiert wie c-Src mit hnRNP K und auch diese Interaktion wird nicht durch den Aminosäure-Austausch in hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) beeinflusst (Abb. 3.6, Abb. 3.10 Nr. 9-11).

In *E.coli* exprimiertes und über Magne HisTM Ni-Particles gereinigtes His-c-Src wurde mit in HeLa-Zellen exprimiertem c-Src funktionell verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass His-c-Src, im Gegensatz zu c-Src, in einer vollständig unphosphorylierten Form vorliegt und durch die Zugabe von ATP und einem zweiwertigen Ion (Mn²⁺) bereits enzymatisch aktiv ist (Abb. 3.9). Die stabile Interaktion von His-c-Src mit hnRNP K und auch die Erkennung von hnRNP K als Substrat werden durch die Expression in *E.coli* nicht beeinflusst (Abb. 3.9, Abb. 3.10 Nr.2 und 12).

3.2 Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen hnRNP K, E1 und c-Src wurde ein *in vitro* Protein-Interaktionsassay (Kapitel 2.6) und ein BiFC-Assay (Kapitel 2.10) verwendet. Für den *in vitro* Protein-Interaktionsassay wurden GST, GST-hnRNP E1 und GST-hnRNP K in *E.coli* exprimiert, über das N-terminal fusionierte GST gereinigt (Abb. 3.11 A) und an GSH-Sepharose gebunden (Abb. 3.11 B, Bahn 3-5). Um unspezifische Wechselwirkungen von c-Src mit der GSH-Sepharose auszuschließen, enthielt eine Kontrollreaktion Puffer und kein GST-Protein (Bahn 2). Nach Zugabe von radioaktiv markiertem c-Src aus einer gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translations-Reaktion ([³⁵S-Met]c-Src, Bahn 1) wurden durch intensives Waschen unspezifisch interagierende Proteine gelöst. Die Bindung von c-Src wurde

nach Elution von der GSH-Sepharose durch SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht (Abb. 3.11 B). Eine unspezifische Wechselwirkung zwischen c-Src und der GSH-Sepharose (Bahn 2) oder GST (Bahn 3) lag nicht vor. Auch das strukturell und funktionell eng mit hnRNP K verwandte GST-hnRNP E1 interagiert nicht mit c-Src (Bahn 4), was die hohe Spezifität des Assays veranschaulicht. Ausschließlich GST-hnRNP K interagiert unter den Bedingungen des *in vitro* Protein-Interaktionsassays spezifisch mit c-Src (Bahn 5).

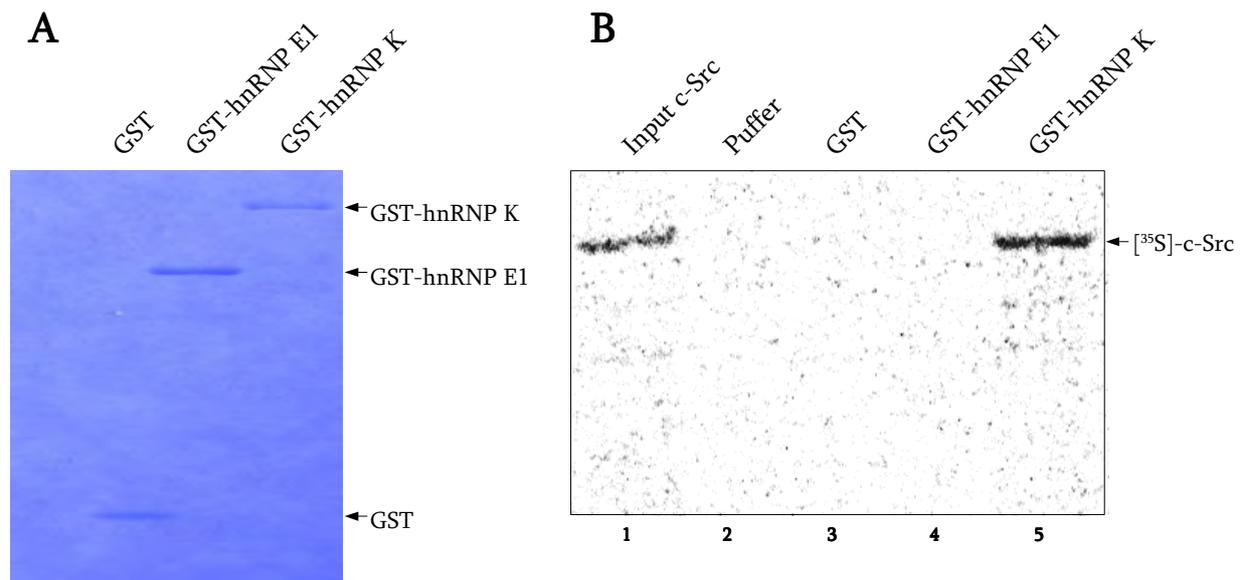


Abb. 3.11: Der *in vitro* Protein-Interaktionsassay.

A) Coomassie-Färbung der GST-Fusionsproteine. B) Autoradiographie. GST (3), GST-hnRNP E1 (4) und GST-hnRNP K (5) wurden rekombinant exprimiert, mittels GSH-Sepharose gereinigt und 4 µg des jeweiligen Proteins im *in vitro* Protein-Interaktionsassay an 20 µl GSH-Sepharose gebunden. In einer Kontrollreaktion wurde kein GST-Protein, sondern lediglich Puffer verwendet (2). Nach Inkubation mit [³⁵S]-Met markiertem c-Src aus einer gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translations-Reaktion (1) wurde die Sepharose intensiv gewaschen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und diese durch Autoradiographie ausgewertet.

Die Interaktion zwischen hnRNP K und c-Src wurde in transfizierten HeLa-Zellen mit dem BiFC-Assay nachgewiesen. Das Fluorochrom Venus, eine YFP-Variante, wurde hierfür in einen N-terminalen (V1) und einen C-terminalen (V2) Bereich geteilt (Hu *et al.*, 2002). Die selbst nicht fluoreszierenden Teilpeptide wurden jeweils an einen der potentiellen Interaktionspartner fusioniert. V1 in den folgenden Untersuchungen an den N-Terminus von c-Src (V1-c-Src), V2 N-terminal beziehungsweise C-terminal an die verschiedenen Varianten von hnRNP K (V2-hnRNP K bzw. hnRNP K-V2). Werden beide Venus-Hälften durch eine Interaktion ihrer Fusionsproteine in der Zelle in räumliche Nähe zueinander gebracht, kann das Fluorochrom rekonstituieren und dessen spezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden. HeLa-Zellen wurden mit cDNAs kodierend für jeweils ein V1-Konstrukt und ein V2-Konstrukt co-transfiziert (Kapitel 2.7 und 2.9).

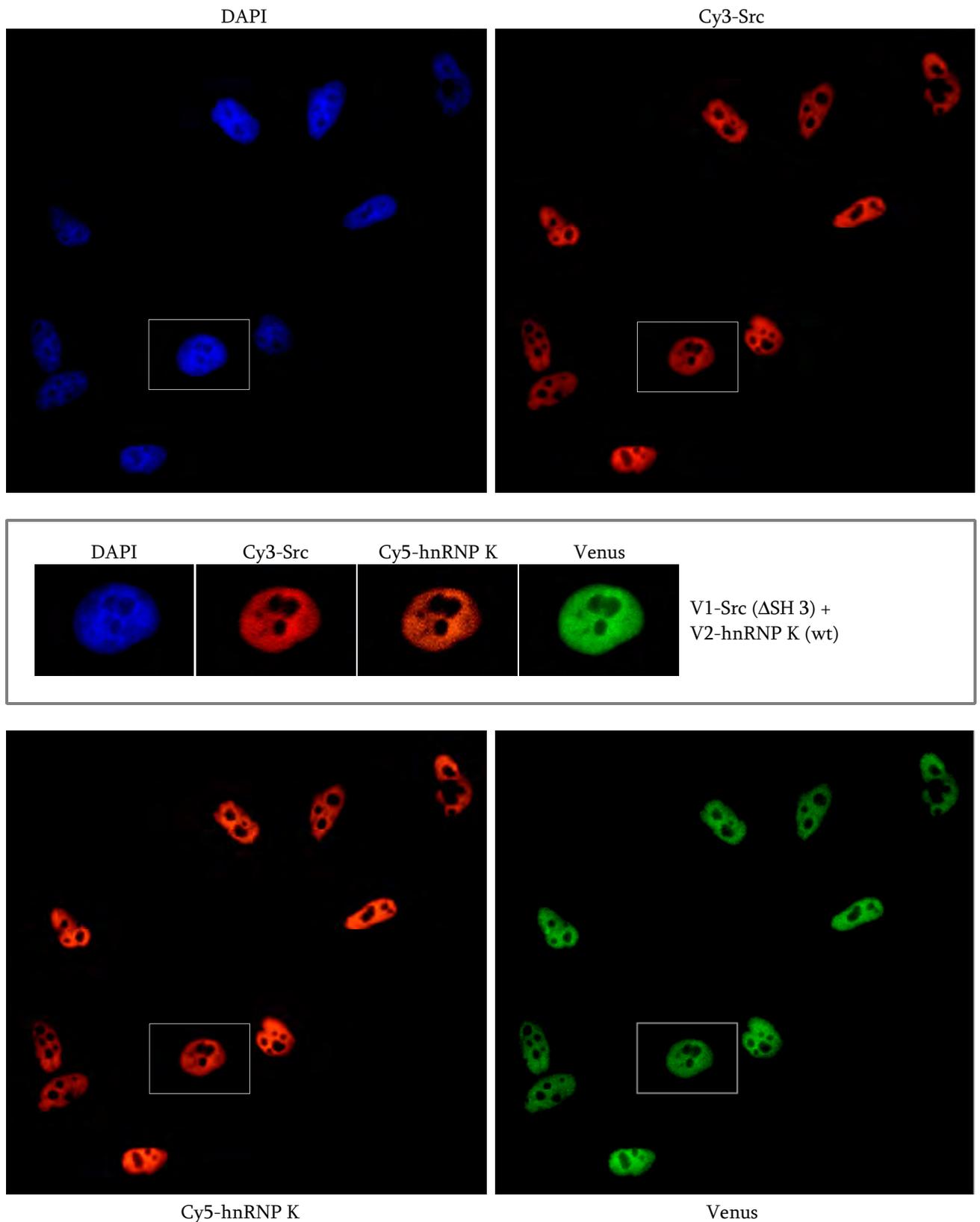


Abb. 3.12: Beispiel einer Analyse von transfizierten HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz und BiFC. HeLa-Zellen wurden co-transfiziert mit V1-Src (Δ SH 3) und V2-hnRNP K. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Immunfluoreszenz (Src mit Cy3, hnRNP K mit Cy5), der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt und eine Interaktion von c-Src und hnRNP K konnte durch die Fluoreszenz von rekonstituiertem Venus nachgewiesen werden.

Die Transfektionsrate betrug rund 80%, die Färbung mit DAPI diente der Lokalisierung des Zellkerns (Abb. 3.12). Durch Immunfluoreszenz (Kapitel 2.9) wurde die Expression und Lokalisierung von Src und hnRNP K in den einzelnen Zellen nachgewiesen (Abb. 3.12: Src mit Cy3, hnRNP K mit Cy5). Interagieren beide Proteine innerhalb einer Zelle miteinander, wird das Fluorochrom Venus rekonstituiert, dessen spezifische Fluoreszenz nachweisbar ist. Zur besseren Anschaulichkeit wird in den folgenden Auswertungen eine exemplarische Zelle gezeigt (Abb. 3.12).

Zu Beginn wurde überprüft, ob der BiFC-Assay zur Untersuchung der stabilen Interaktion zwischen Src und hnRNP K geeignet ist (Abb. 3.13). Ohne Plasmid transfizierte HeLa-Zellen (mock, Zeile 1) wiesen keine Expression von Src oder Venus-Fluoreszenz auf. Lediglich ein schwaches Signal des endogenen hnRNP K wurde im Zellkern detektiert, wobei die Nukleoli ausgeschlossen waren. Die Expression von V1-c-Src (Zeile 2, Cy3) konnte im Zytoplasma der Zellen jedoch nicht im Zellkern nachgewiesen werden. Die Lokalisierung konzentrierte sich auf den Kernmembran umgebenden Bereich und wurde zur Peripherie der Zelle hin schwächer. Wurde hnRNP K in den Zellen überexprimiert (V2-hnRNP K, Zeile 3 oder hnRNP K-V2, nicht abgebildet), stimmte dessen Lokalisierung im Zellkern unter Ausschluss der Nukleoli mit dem des endogenen Proteins überein. In Zellen mit überexprimiertem hnRNP K war die Signalintensität im Vergleich zum Signal des endogenen Proteins deutlich höher (Cy5-hnRNP K Zeile 1 bzw. 3). Wurden V1-c-Src und V2-hnRNP K in einer Zelle co-exprimiert, konnte zusätzlich zur Immunfluoreszenz von Cy3 und Cy5 die Venus-Fluoreszenz detektiert werden. Beide Proteine interagierten miteinander, was zur Rekonstitution und Fluoreszenz von Venus führte. Diese war unter Ausschluss der Nukleoli auf den Zellkern beschränkt. Die Lokalisierung von V2-hnRNP K änderte sich nicht, die von V1-c-Src jedoch konzentrierte sich in diesen Experimenten auf den Zellkern. Da die Verlagerung des Signals für Src meist mit dem Auftreten einer Venus-Fluoreszenz einherging, wurde die Verlagerung des Src-Signals ebenfalls als Indikator für eine Interaktion zwischen hnRNP K und Src gewertet. In den Statistiken zu den BiFC-Resultaten wurde sowohl die Verlagerung des Src-Signals, als auch das Venus-Fluoreszenzsignal separat ausgewertet. Es wurden dazu jeweils mindestens 50 transfizierte Zellen aus je mindestens drei separaten Transfektionen untersucht. Zellen, über die keine sichere Aussage getroffen werden konnte, sind in der Statistik als Fehler aufgeführt. Vergleicht man nun die Zeile 5 mit der Zeile 4 (Abb. 3.13) wird deutlich, wie spezifisch die Interaktion zwischen V1-c-Src und V2-hnRNP K nachgewiesen werden konnte. Die Verlagerung der V2-Hälfte an den C-Terminus von hnRNP K hatte zur Folge, dass eine Rekonstituierung von Venus nicht möglich war. Beide Proteine wurden in den Zellen exprimiert (Cy3 und Cy5, Zeile 5), es war jedoch weder eine Venus-Fluoreszenz, noch eine Verlagerung der Lokalisierung von V1-c-Src in den Zellkern nachweisbar.

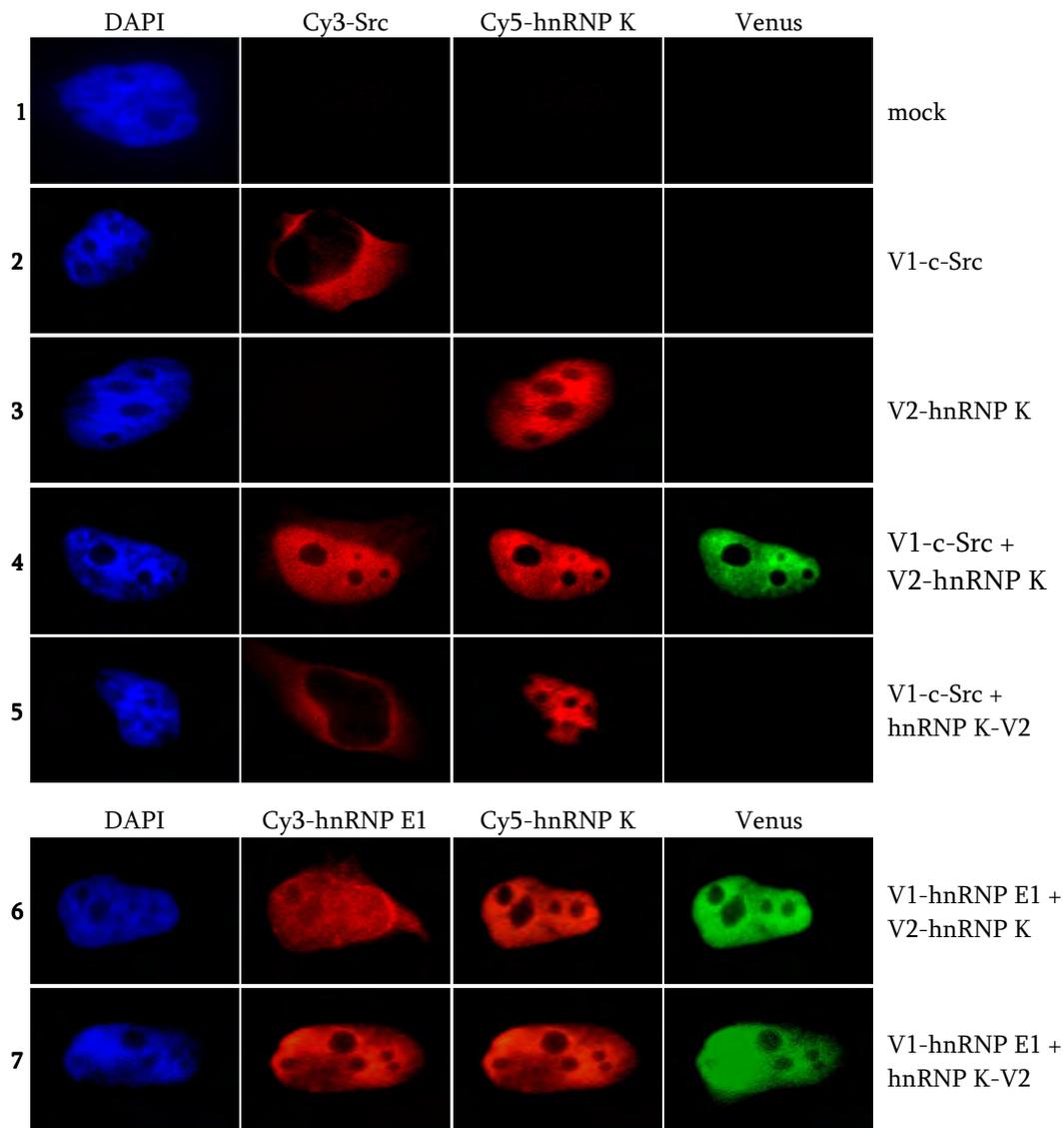


Abb. 3.13: Selektivität des BiFC-Assays. HeLa-Zellen wurden wie folgt transfiziert: Puffer (1) V1-c-Src (2), V2-hnRNP K (3), V1-c-Src mit V2-hnRNP K (4), V1-c-Src mit hnRNP K-V2 (5), V1-hnRNP E1 mit V2-hnRNP K (6) oder V1-hnRNP E1 mit hnRNP K-V2 (7). Die Proteinexpression wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen: Src mit Cy3 (1 bis 5), hnRNP E1 mit Cy3 (6 und 7), hnRNP K mit Cy5 (1 bis 7). DAPI-Färbung zur Darstellung des Zellkerns und Fluoreszenz des rekonstituierten Chromophors Venus bei Protein-Protein-Interaktion. (vgl. Adolph *et al.*, 2007)

HeLa-Zellen transfiziert mit V1-hnRNP E1 und entweder V2-hnRNP K (Zeile 6) oder hnRNP K-V2 (Zeile 7) zeigten dagegen mit beiden Varianten von hnRNP K eine Venus-Fluoreszenz. Beide hnRNP K-Varianten interagierten mit hnRNP E1, jedoch konnte nur für V2-hnRNP K eine Interaktion mit V1-c-Src nachgewiesen werden. Wurde V1-hnRNP E1 mit einer hnRNP K-Variante co-transfiziert, kam es ähnlich wie bei V1-c-Src zu einer Konzentrierung des Signals für V1-hnRNP E1 im Zellkern. Einzeltransfektionen von V1-hnRNP E1 zeigten hingegen eine gleichmäßige Verteilung des Proteins über die gesamte Zelle (nicht dargestellt).

3.3 Interaktion von Src-Varianten mit hnRNP K

Die Interaktion von radioaktiv markiertem c-Src aus einer gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translations-Reaktion mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-hnRNP K konnte bereits im *in vitro* Protein-Interaktionsassay gezeigt werden (Abb. 3.11). Nachfolgend sollte der Einfluss der SH 3-Domäne auf die Interaktion von c-Src mit hnRNP K untersucht werden (Abb. 3.14). Hierfür wurde aus gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translations-Reaktionen mit [³⁵S]-Met c-Src (Bahn 9) oder Src (Δ SH 3) (Bahn 10) verwendet (Abb. 3.14 B). GST (1 und 5), GST-hnRNP K (2 und 6), GST-hnRNP E1 (3 und 7) wurden an GSH-Sepharose gekoppelt, in einer Kontrollreaktion wurde Puffer verwendet (4 und 8) (Abb. 3.14 A). Im *in vitro* Protein-Interaktionsassay wurde die Bindung der radioaktiv markierten Src-Varianten c-Src (1-4) und Src (Δ SH 3) (5-8) mit den GST-Fusionsproteinen nach einer SDS-PAGE mittels Autoradiographie untersucht (Abb. 3.14 A). C-Src und Src (Δ SH 3) interagierten mit GST-hnRNP K (2 und 6) und zeigten keine unspezifischen Wechselwirkungen mit den anderen GST-Fusionsproteinen (1, 3, 4, 5, 7, 8).

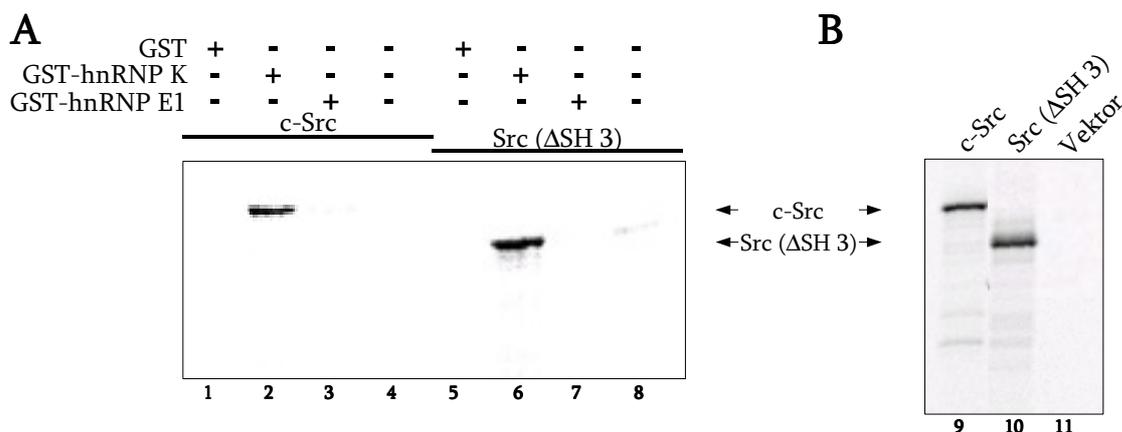


Abb. 3.14: A) Autoradiographie des *in vitro* Protein-Interaktionsassays mit Src-Varianten. An GSH-Sepharose immobilisiertes GST (1 und 5), GST-hnRNP K (2 und 6), GST-hnRNP E1 (3 und 7) oder Puffer (4 und 8) mit radioaktiv markiertem c-Src (1-4) oder Src (Δ SH 3) (5-8) aus gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translations-Reaktionen.

B) Gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation der Src-Varianten. Gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation von cDNAs kodierend für c-Src (9), Src (Δ SH 3) (10) und Vektor (11) mit [³⁵S]-Met.

Der Einfluss der SH 3-Domäne und der Aktivität der Tyrosinkinase auf die Interaktion mit hnRNP K wurde auch in HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten mit Hilfe des BiFC-Assays untersucht (Abb. 3.15). HeLa-Zellen wurden co-transfiziert mit V2-hnRNP K (Zeile 1-3) zusammen mit V1-c-Src (Zeile 1), V1-Src (Y416F) (Zeile 2) oder V1-Src (Δ SH 3) (Zeile 3). Die Proteinexpression in den Zellen wurde durch Immunfluoreszenz nachgewiesen (Kapitel 2.9). Src

wurde mit Cy3, hnRNP K mit Cy5 nachgewiesen, wobei die Antikörper α -v-Src und α -hnRNP K (Zeile 1 und 2) oder α -c-Src und α -hnRNP K R20745 (Zeile 3) verwendet wurden. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz untersucht. Bei allen drei Src-Varianten konnten Zellen mit Venus-Fluoreszenz nachgewiesen werden, was einer Interaktion mit V2-hnRNP K entspricht (Abb. 3.15).

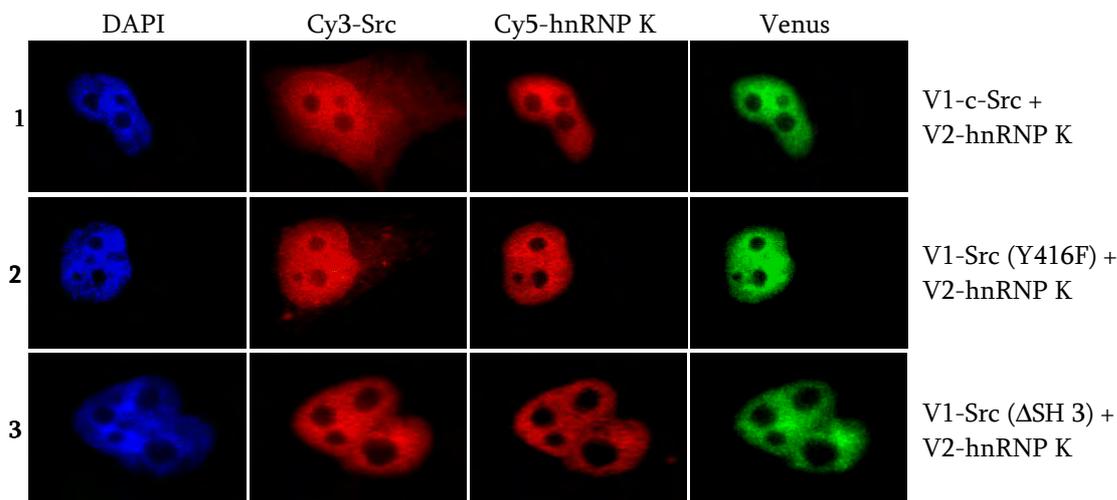


Abb. 3.15: BiFC-Assay mit Src-Varianten. HeLa-Zellen wurden co-transfiziert mit V2-hnRNP K (1-3) zusammen mit V1-c-Src (1), V1-Src (Y416F) (2) oder V1-Src (Δ SH 3) (3). Durch Immunfluoreszenz wurde die Expression von Src mit Cy3 und hnRNP K mit Cy5 nachgewiesen (α -v-Src und α -hnRNP K (1 und 2), α -c-Src und α -hnRNP K R20745 (3)). Zellkerne wurden DAPI gefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz hin untersucht. (vgl. Adolph *et al.*, 2007)

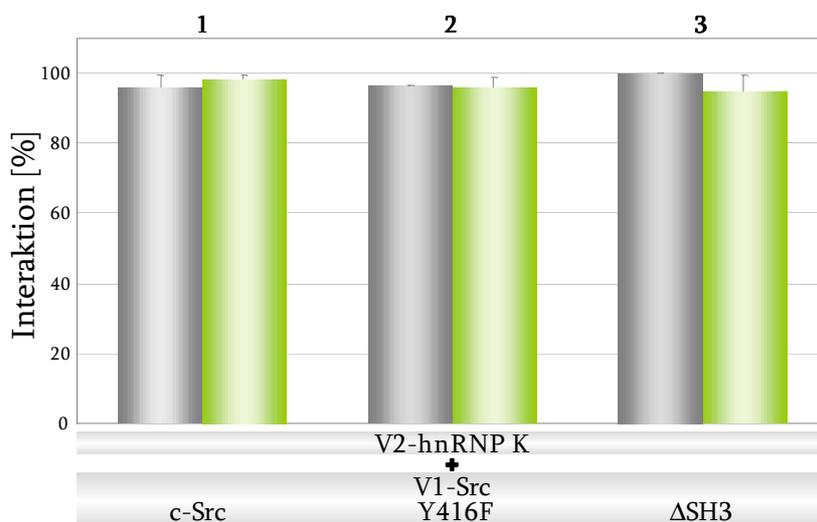


Abb. 3.16: Statistische Auswertung des BiFC-Assays mit Src-Varianten. HeLa-Zellen wurden wie folgt transfiziert: V2-hnRNP K (1-3) und entweder V1-c-Src (1), V1-Src (Y416F) (2) oder V1-Src (Δ SH 3) (3). Mindestens 50 transfizierte Zellen wurden pro Experiment aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen auf eine Verlagerung von Src in den Zellkern (grau) und auf das Auftreten der Venus-Fluoreszenz (grün) untersucht. Der prozentuale Anteil dieser Zellen (Interaktion) an der Gesamtheit der transfizierten Zellen ist im Diagramm dargestellt. Der Fehlerbalken verweist auf Zellen, bei denen keine exakte Zuordnung vorgenommen werden konnte.

Eine statistische Auswertung der BiFC-Ergebnisse wurde angeschlossen. Die Verlagerung von Src in den Zellkern (Abb. 3.16 grau) und das Auftreten der Venus-Fluoreszenz (Abb. 3.16 grün) wurden separat in den Zellen ausgewertet. Das Auftreten dieser Signale für eine stabile Interaktion zwischen beiden Proteinen wurde prozentual zum Anteil der transfizierten Zellen aufgeführt. V2-hnRNP K und V1-c-Src zeigten in fast hundert Prozent der Fälle eine Interaktion. Sowohl das Auftreten der Venus-Fluoreszenz als auch die Verlagerung von c-Src in den Zellkern konnte in nahezu jeder transfizierten Zelle nachgewiesen werden. Die Varianten Src (Y416F) und Src (Δ SH 3) verhielten sich in ihrer Interaktion mit hnRNP K wie c-Src. Venus-Fluoreszenz und Lokalisierung von Src im Zellkern war bei annähernd allen transfizierten Zellen zu beobachten.

3.4 *In vitro* Protein-Interaktionsstudien zur Eingrenzung der c-Src-Bindungsmotive in hnRNP K

Neben der Wechselwirkung der SH 3-Domäne von c-Src mit den Polyprolin-Motiven in hnRNP K, die für die Aktivierung von c-Src notwendig ist, besteht eine weitere stabile Interaktion, welche trotz veränderter bzw. deletierter SH 3-Domäne oder Polyprolin-Motive eine Interaktion beider Proteine ermöglicht (Abb. 1.7, Abb. 3.4, Abb. 3.14, Abb. 3.15). Zur Eingrenzung des Interaktionsbereiches in hnRNP K wurden GST-hnRNP K-Varianten auf ihre Interaktion mit radioaktiv markiertem c-Src aus einer gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translations-Reaktion untersucht. Das Ergebnis dieser Experimente ist schematisch in Abb. 3.17 dargestellt.

Drei hnRNP K-Varianten, welche die KH-Domänen repräsentieren, interagierten nicht mit c-Src. Die Interaktion ist demnach unabhängig von den KH-Domänen. C-Src interagiert mit GST-hnRNP K-Varianten, denen am C-Terminus die KNS- und die KH-Domäne 3 fehlt (hnRNP K (1-337)), die prolinreichen Sequenzen deletiert wurde (hnRNP K (Δ P₁₋₃)) oder denen die zur Aktivierung von c-Src notwendigen Polyprolin-Motive fehlen (hnRNP K (P_{2(2,3)}P_{3(1,2)})). Auch die Deletion der Sequenz zwischen der KH-Domäne 1 und 2 reduzierte die Interaktion nicht (hnRNP K (Δ 123-136)). Eine Variante, welche dem N-Terminus von hnRNP K einschließlich der ersten und zweiten KH-Domäne entsprach (hnRNP K (1-218)), interagiert nicht mit c-Src. Wurde die Sequenz jedoch um wenige Aminosäuren verlängert (hnRNP K (1-242) und hnRNP K (1-250)), war eine Interaktion mit c-Src nachweisbar. Demzufolge ist die direkt an die KH-Domäne 2 anschließende Aminosäuresequenz (218 bis 242) für die Ausbildung der zusätzlichen, stabilen und von der aktivierenden Wechselwirkung unabhängigen Interaktion zwischen hnRNP K und c-Src erforderlich.



Abb. 3.17: Übersicht über die GST-hnRNP K-Varianten und ihre Interaktion mit c-Src *in vitro*. Alle GST-hnRNP K-Varianten wurden an GSH-Sepharose gekoppelt und auf ihre Bindung mit [³⁵S]-c-Src untersucht. + Interaktion; - keine Interaktion (vgl. Adolph *et al.*, 2007)

3.5 BiFC-Bindungsstudien zwischen c-Src und hnRNP K-Varianten in HeLa-Zellen

3.5.1 Deletions- und Insertionsvarianten von hnRNP K

In den folgenden Transfektionsexperimenten sollte der Bereich in hnRNP K eingegrenzt werden, über den die stabile, nicht aktivierende Interaktion mit c-Src vermittelt wird. Zu Beginn wurde überprüft, ob auch im BiFC-Assay die Varianten hnRNP K (ΔP_{1-3}) und hnRNP K (P2(2,3)P3(1,2)) ohne die aktivierende Wechselwirkung der prolinreichen Sequenzen mit der SH 3-Domäne von c-Src interagieren, wie dies bereits in vorhergegangenen Untersuchungen der Fall gewesen war (Abb. 1.7, Abb. 3.4, Abb. 3.14, Abb. 3.15, Abb. 3.17). HeLa-Zellen wurden hierfür mit cDNAs für V1-c-Src und verschiedenen N-terminal an V2 fusionierten hnRNP K-Varianten (V2-hnRNP K) co-transfiziert. Die Expression von V1-c-Src wurde mit Cy3, die der V2-hnRNP K-Varianten mit Cy5 durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die transfizierten Zellen auf Venus-Fluoreszenz untersucht.

Wurden hnRNP K und c-Src exprimiert (Zeile 1), konnte wie in den *in vitro* Untersuchungen eine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden (Abb. 3.18). In transfizierten Zellen

war sowohl eine Venus-Fluoreszenz, als auch eine Verlagerung des Src-Cy3-Signals detektierbar. Die Varianten V2-hnRNP K (ΔP_{1-3}) und V2-hnRNP K ($P_{2(2,3)}P_{3(1,2)}$) konnte ebenfalls mit V1-c-Src interagieren (Zeile 2 und 3). Die statistische Auswertung des BiFC-Assays ergab eine Interaktion von über 93% der transfizierten Zellen für beide hnRNP K-Varianten (Abb. 3.19). Die Affinität dieser V2-hnRNP K-Varianten, welche keine aktivierende Wechselwirkung mit c-Src mehr eingehen können, weicht dementsprechend nicht von der des Wildtyps (97%) ab.

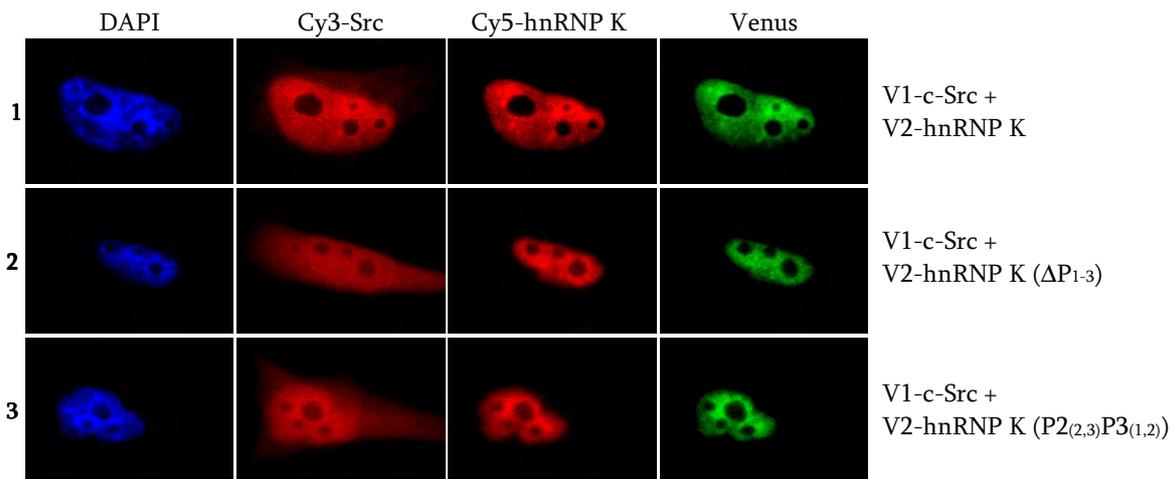


Abb. 3.18: BiFC-Analyse der hnRNP K-Varianten, die c-Src nicht aktivieren. HeLa-Zellen wurden co-transfiziert mit cDNAs für V1-c-Src (1-3) kombiniert mit V2-hnRNP K (1), V2-hnRNP K (ΔP_{1-3}) (2) oder V2-hnRNP K ($P_{2(2,3)}P_{3(1,2)}$) (3). Durch Immunfluoreszenz wurde die Expression von Src mit Cy3 und hnRNP K mit Cy5 nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz untersucht. (vgl. Adolph *et al.*, 2007)

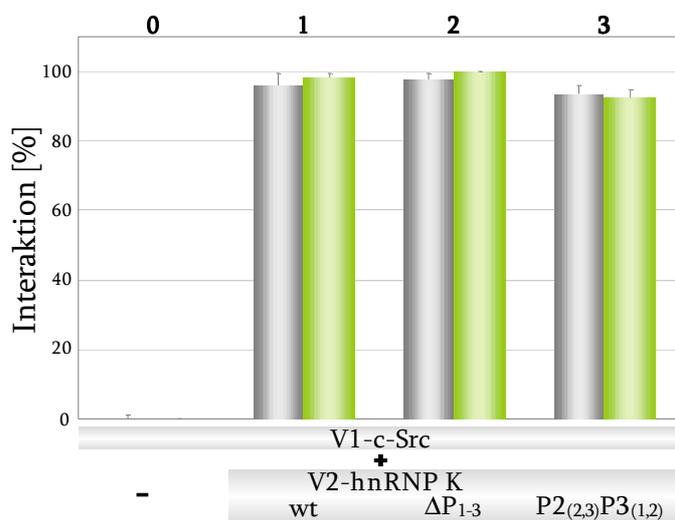


Abb. 3.19: Statistik der BiFC-Analyse der hnRNP K-Varianten, die c-Src nicht aktivieren. HeLa-Zellen wurden wie folgt transfiziert: V1-c-Src (0-3) zusammen mit V2-hnRNP K (1), V2-hnRNP K (ΔP_{1-3}) (2) oder V2-hnRNP K ($P_{2(2,3)}P_{3(1,2)}$) (3). Mindestens 50 transfizierte Zellen wurden pro Experiment aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen auf eine Verlagerung von Src in den Zellkern (grau) und auf das Auftreten der Venus-Fluoreszenz (grün) untersucht. Der prozentuale Anteil dieser Zellen (Interaktion) an der Gesamtheit der transfizierten Zellen ist im Diagramm dargestellt. Der Fehlerbalken verweist auf Zellen, bei denen keine exakte Zuordnung vorgenommen werden konnte.

Um den Bereich für die stabile Interaktion mit c-Src in hnRNP K einzugrenzen, wurde die Interaktion ausgewählter Deletions- oder Insertionsvarianten von V2-hnRNP K mit V1-c-Src in HeLa-Zellen untersucht (Abb. 3.20). Die Analyse C-terminal verkürzter V2-hnRNP K-Varianten zeigte, dass die Interaktion mit V1-c-Src durch eine spezifische Aminosäuresequenz vermittelt wird. Wurde ein Fragment, welches den beiden ersten KH-Domänen in hnRNP K entspricht (V2-hnRNP K (1-218), Zeile 1) um wenige Aminosäuren verlängert (V2-hnRNP K (1-242) und (1-250), Zeile 2 und 3), so konnte viermal häufiger eine stabile Interaktion mit V1-c-Src festgestellt werden. Die statistische Auswertung (Abb. 3.21) ergab für V2-hnRNP K (1-218) lediglich eine Interaktion von 26% (1), wohingegen die verlängerten Varianten V2-hnRNP K (1-242) und V2-hnRNP K (1-250) eine mit dem Wildtyp vergleichbare Interaktion mit V1-c-Src zeigten (2 und 3).

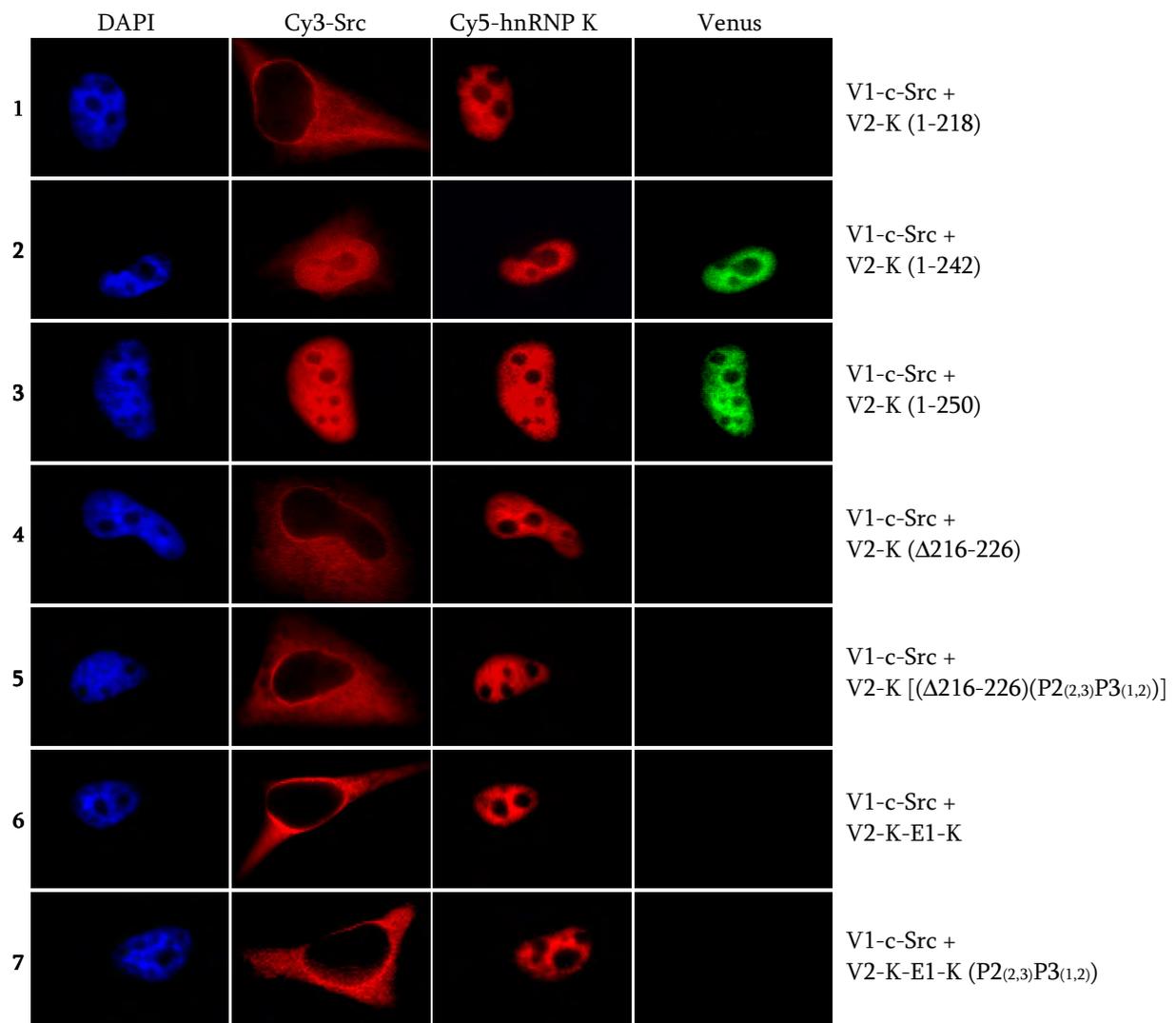


Abb. 3.20: BiFC-Assay mit Deletions- oder Insertionsvarianten von hnRNP K. HeLa-Zellen wurden co-transfiziert mit V1-c-Src (1-7), V2-hnRNP K (1-218) (1), V2-hnRNP K (1-242) (2), V2-hnRNP K (1-250) (3), V2-hnRNP K (Δ 216-226) (4), V2-hnRNP K [(Δ 216-226) (P2_(2,3)P3_(1,2))] (5), V2-hnRNP K-E1-K (6) und V2-hnRNP K-E1-K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (7). Durch Immunfluoreszenz wurde die Expression von Src mit Cy3 und die der hnRNP K-Varianten mit Cy5 nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz untersucht. (vgl. Adolph *et al.*, 2007)

Interessanterweise enthält diese Region eine Aminosäuresequenz (216 bis 226), in der sich hnRNP K und hnRNP E1, das nicht mit c-Src interagiert, unterscheiden (Abb. 1.6). Waren die Aminosäuren 216 bis 226 deletiert, so war eine Verlagerung des Src-Cy3-Signals oder ein Venus-Signal in den meisten Zellen (Restinteraktion 6%) nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.21 4 und 5). Wurden die entsprechenden Aminosäuren 169 bis 179 aus hnRNP E1 (Abb. 1.6) an Stelle der Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K eingesetzt (V2-hnRNP K-E1-K), so konnte ebenfalls keine Interaktion mit V1-c-Src festgestellt werden (Restinteraktion 19%, 6 und 7).

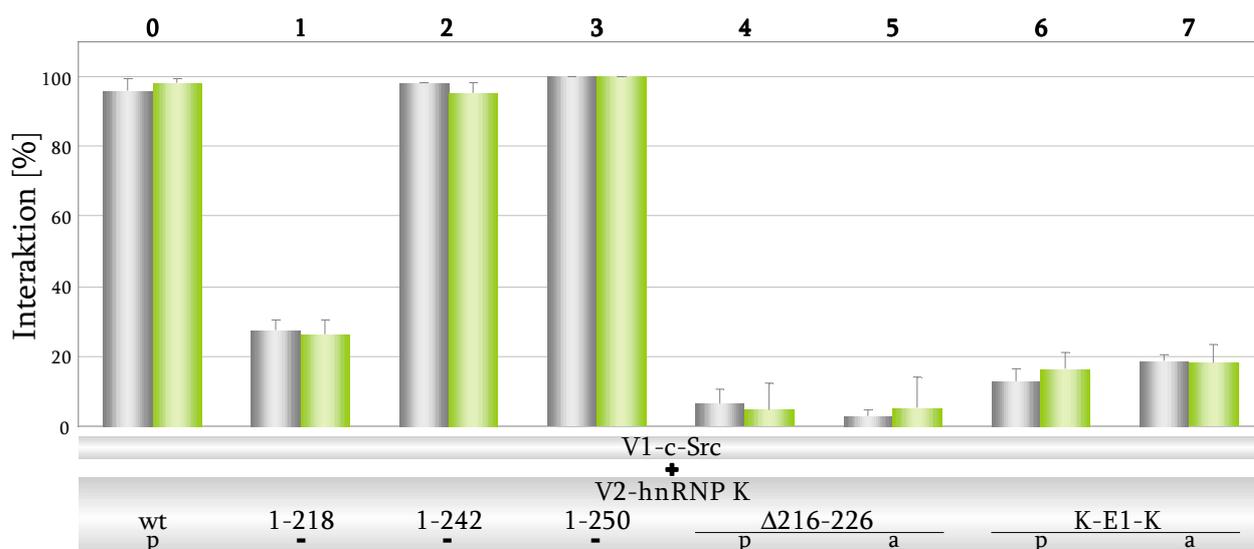


Abb. 3.21: Statistik des BiFC-Assays mit Deletions- oder Insertionsvarianten von hnRNP K. HeLa-Zellen wurden transfiziert mit V1-c-Src (0-7) zusammen mit V2-hnRNP K (0), V2-hnRNP K (1-218) (1), V2-hnRNP K (1-242) (2), V2-hnRNP K (1-250) (3), V2-hnRNP K (Δ 216-226) (4), V2-hnRNP K [(Δ 216-226) (P2(2,3)P3(1,2))] (5), V2-hnRNP K-E1-K (6) und V2-hnRNP K-E1-K (P2(2,3)P3(1,2)) (7). Mindestens 50 transfizierte Zellen wurden pro Experiment aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen auf eine Verlagerung von Src in den Zellkern (grau) und auf das Auftreten einer Venus-Fluoreszenz (grün) untersucht. Der prozentuale Anteil dieser Zellen (Interaktion) an der Gesamtheit der transfizierten Zellen ist im Diagramm dargestellt. Der Fehlerbalken verweist auf Zellen, bei denen keine exakte Zuordnung vorgenommen werden konnte. P2(2), P2(3), P3(1) und P3(2) in His-hnRNP K: p= PxxP-Motive (Wildtyp), a= durch AxxA-Motive ersetzt.

Es konnte somit gezeigt werden, dass sowohl im *in vitro* Protein-Interaktionsassay, als auch in BiFC-Untersuchungen transfizierter HeLa-Zellen, der an die KH-Domäne 2 anschließende Bereich (Aminosäuren 218 bis 242) in hnRNP K für die stabile Interaktion mit c-Src nötig ist. Zusätzlich konnte in BiFC-Untersuchungen der für die Interaktion mit c-Src notwendige Sequenzbereich auf die Aminosäuren 216 bis 226 eingegrenzt werden, der zwischen hnRNP K und hnRNP E1 differiert. Die Wechselwirkung der Polyprolin-Motive in hnRNP K mit der SH 3-Domäne von c-Src, welche c-Src aktiviert, hat dabei weder *in vitro* noch *in vivo* einen Einfluss auf die stabile Interaktion beider Proteine.

3.5.2 HnRNP K-Varianten mit modifizierter Aminosäuresequenz

Die Region für die stabile Interaktion mit c-Src in hnRNP K konnte auf die direkt an die KH-Domäne 2 folgenden Aminosäuren eingegrenzt werden (216 bis 226). Aminosäuren aus dieser Sequenz wurden variiert (Ala/Gly) und in BiFC-Studien mit V1-c-Src in HeLa-Zellen co-exprimiert. Abb. 3.22 zeigt die statistische Auswertung der BiFC-Untersuchungen.

In diesem Bereich befindet sich ein Polyprolin-Motiv der Klasse II (RAQPYDP, Aminosäuren 221 bis 227). Um zu überprüfen, ob dieses Sequenzmotiv an der stabilen Interaktion beteiligt ist, wurden wiederum die Proline durch Alanine ersetzt. Unabhängig davon, ob die für die Aktivierung essentiellen Polyprolin-Motive P2_(2,3)P3_(1,2) vorhanden waren, konnte keine deutliche Reduktion der Interaktion mit V1-c-Src gefunden werden (1 und 2 Abb. 3.22). Ein Austausch der Aminosäuresequenzen 212 bis 214 (3), 214 bis 216 (4), 215 bis 217 (5), 218 bis 219 (6) oder 215 bis 219 (7) gegen Alanine zeigte keinen Einfluss auf die Interaktion der V2-hnRNP K-Varianten mit V1-c-Src. Der Austausch von sauren (8) oder basischen (9) durch neutrale Aminosäurereste zeigte ebenfalls keinen Effekt. Alle V2-hnRNP K-Varianten interagierten in mehr als 85% der Fälle in BiFC-Assay mit V1-c-Src (Abb. 3.22).

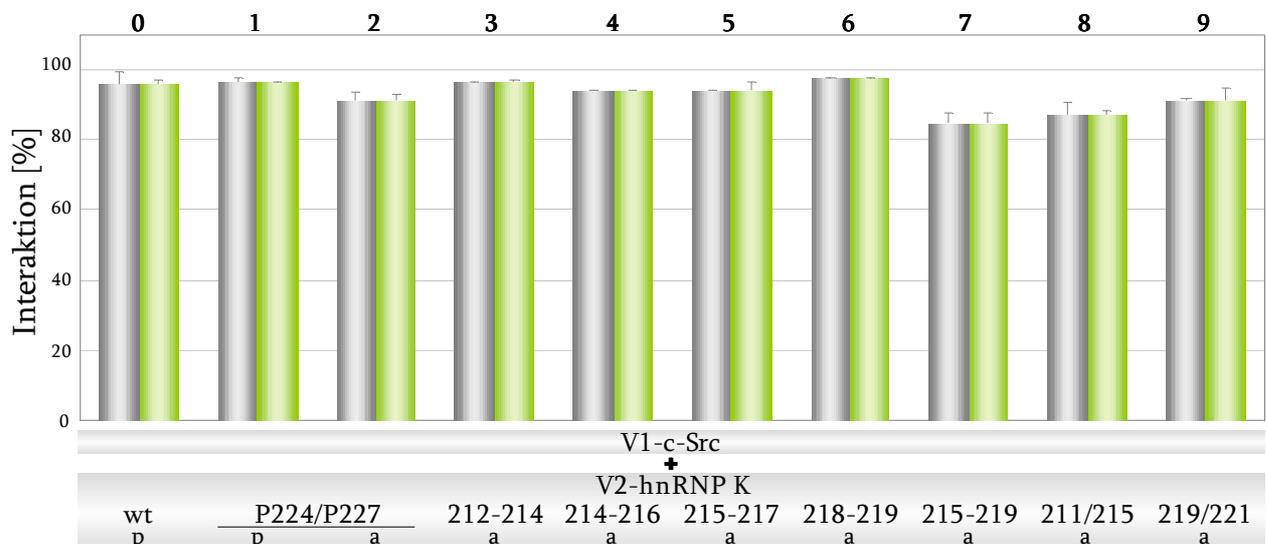


Abb. 3.22: Statistik des BiFC-Assays mit Aminosäuresequenz-Varianten von hnRNP K. HeLa-Zellen wurden transfiziert mit V1-c-Src (0-9), V2-hnRNP K (0), V2-hnRNP K (P224A/P227A) (1), V2-hnRNP K [(P224A/P227A)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (2), V2-hnRNP K [(L212A/I213A/S214A)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (3), V2-hnRNP K [(S214A/E215A/S216A)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (4), V2-hnRNP K [(E215A/S216A/P217A)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (5), V2-hnRNP K (I218A/K219A)(P2_(2,3)P3_(1,2)) (6), V2-hnRNP K [(E215A/S216A/P217A/I218A/K219A)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (7), V2-hnRNP K (D211A/E215A)(P2_(2,3)P3_(1,2)) (8) und V2-hnRNP K [(K219A/R221G)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (9). Mindestens 50 transfizierte Zellen wurden pro Experiment aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen auf eine Verlagerung von Src in den Zellkern (grau) und auf das Auftreten einer Venus-Fluoreszenz (grün) untersucht. Der prozentuale Anteil dieser Zellen (Interaktion) an der Gesamtheit der transfizierten Zellen ist im Diagramm dargestellt. Der Fehlerbalken verweist auf Zellen, bei denen keine exakte Zuordnung vorgenommen werden konnte. P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ in His-hnRNP K: p= PxxP-Motive (Wildtyp), a= durch AxxA-Motive ersetzt.

3.6 Funktionelle Charakterisierung der hnRNP K-Deletionsvarianten

3.6.1 Das Verhalten der hnRNP K-Deletionsvarianten als Aktivator und Substrat von c-Src

Die Deletion der Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K hebt die Interaktion mit c-Src auf (Abb. 3.20). Wie sich der Verlust dieser Interaktion auf die weiteren Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen auswirkt, wurde in den folgenden Untersuchungen analysiert.

Die Deletionsvarianten His-hnRNP K ($\Delta 216-226$) und His-hnRNP K [$(\Delta 216-226)(P2_{(2,3)}P3_{(1,2)})$] wurden in *E.coli* exprimiert und über deren N-terminalen His-tag gereinigt (Kapitel 2.4.1). Im *in vitro* Kinase-Aktivierungsassay (Kapitel 2.8) wurden identische Mengen der His-hnRNP K-Varianten zusammen mit c-Src inkubiert (Abb. 3.23).

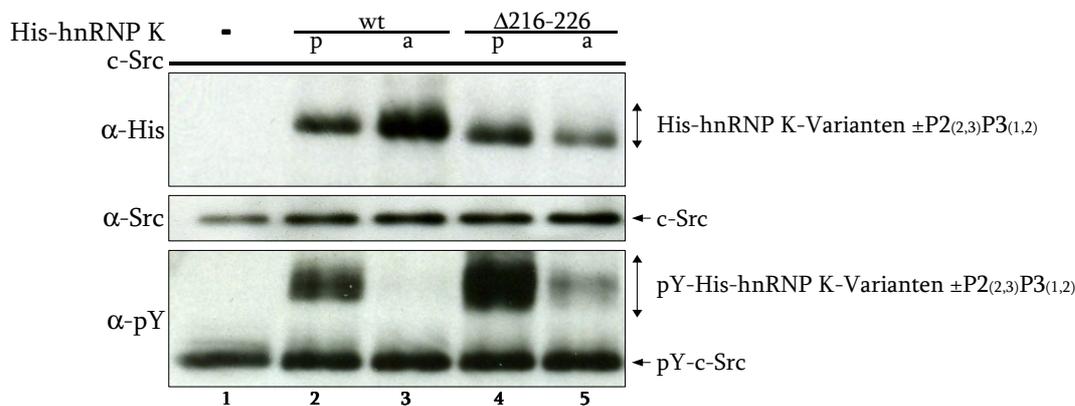


Abb. 3.23: *In vitro* Kinase-Aktivierungsassay mit hnRNP K-Deletionsvarianten. C-Src (1-5) wurde aus 20 μ g transfiziertem HeLa-Zell-Lysat immunpräzipitiert (α -c-Src). Es wurde 1 μ g der rekombinant exprimierten hnRNP K-Varianten His-hnRNP K (2), His-hnRNP K ($P2_{(2,3)}P3_{(1,2)}$) (3), His-hnRNP K ($\Delta 216-226$) (4), His-hnRNP K [$(\Delta 216-226)(P2_{(2,3)}P3_{(1,2)})$] (5) zugesetzt. Anschließend erfolgten Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen Src (α -Src), den His-tag der hnRNP K-Varianten (α -His) und phosphorylierte Tyrosine (α -pY).

HnRNP K aktiviert c-Src und wird phosphoryliert (Bahn 2). His-hnRNP K ($P2_{(2,3)}P3_{(1,2)}$) kann c-Src nicht aktivieren und weist keine Tyrosin-Phosphorylierung auf (Bahn 3). HnRNP K ($\Delta 216-226$), das wie der Wildtyp noch die für die Aktivierung essentiellen Polyprolin-Motive enthält (Bahn 4), kann c-Src aktivieren und zeigt eine intensive Tyrosin-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung der hnRNP K-Deletionsvariante ist deutlich stärker, als die von hnRNP K. Die Aktivierung von c-Src ist somit unabhängig von der stabilen Interaktion mit hnRNP K, die durch die Aminosäuren 216 bis 226 vermittelt wird. Wurden zusätzlich die Polyprolin-Motive durch Alanine in der hnRNP K-Deletionsvarianten ersetzt (Bahn 5), kann diese Variante c-Src nicht mehr aktivieren und es kann nur eine sehr geringe Phosphorylierung nachgewiesen werden.

3.6.2 Einfluss der Deletion der Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K auf weitere Protein-Protein-Interaktionen

Es konnte in BiFC-Untersuchungen gezeigt werden, dass hnRNP K-Varianten, in denen die Aminosäuren 216 bis 226 deletiert wurden, nicht mehr mit c-Src interagieren (Abb. 3.20). Der Einfluss der Deletion in hnRNP K auf andere Protein-Protein-Wechselwirkungen, wurde in den folgenden Experimenten untersucht.

Für hnRNP K konnte in HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten neben der Tyrosinkinase c-Src auch eine stabile Interaktion mit Lck nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Welchen Einfluss die Deletion der Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K auf die Interaktion mit Lck hat, wurde in dem folgen BiFC-Assay untersucht (Abb. 3.24). HeLa-Zellen wurden dazu mit V1-Lck (Zeile 1-5) und V2-hnRNP K (Zeile 2), V2-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (Zeile 3), V2-hnRNP K (Δ 216-226) (Zeile 4) oder V2-hnRNP K [(Δ 216-226)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (Zeile 5) co-transfiziert. Durch Immunfluoreszenz wurde die Expression aller hnRNP K-Varianten mit Cy5, die von Lck mit Cy3 nachgewiesen.

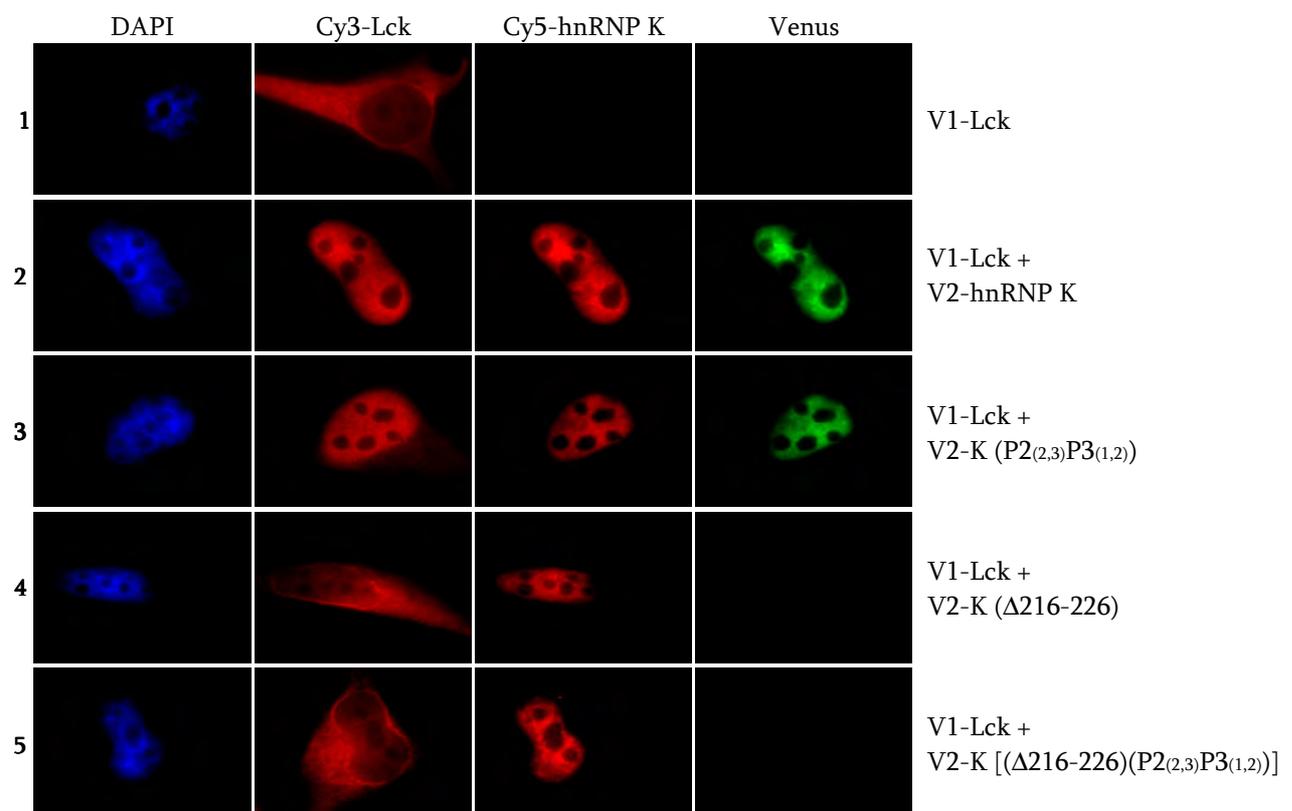


Abb. 3.24: BiFC-Assay zur Untersuchung der Interaktion der hnRNP K-Deletionsvarianten mit der Tyrosinkinase Lck. HeLa-Zellen wurden transfiziert: V1-Lck (1-5), V2-hnRNP K (2), V2-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (3), V2-hnRNP K (Δ 216-226) (4), V2-hnRNP K [(Δ 216-226)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (5). Durch Immunfluoreszenz wurde die Expression aller hnRNP K-Varianten mit Cy5, die der Tyrosinkinase Lck mit Cy3 nachgewiesen. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz untersucht.

V1-Lck wurde, im Gegensatz zum ausschließlich zytosolisch exprimierten V1-c-Src, in der gesamten Zelle, jedoch unter Ausschluss der Nukleoli, detektiert (Zeile 1). Auch für V1-Lck ist wie für V1-c-Src eine intensive Cy3-Fluoreszenz an der Kernmembran der Zellen erkennbar. V1-Lck interagiert mit V2-hnRNP K und V2-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) und wird wie V1-c-Src durch die kovalente Verknüpfung der Venus-Fragmente von hnRNP K im Zellkern lokalisiert (Zeile 2 und 3). Die Deletionsvarianten V2-hnRNP K (Δ 216-226) und V2-hnRNP K [(Δ 216-226)(P2_(2,3)P3_(1,2))] interagieren nicht mit V1-Lck (Zeile 4 und 5). Für eine Interaktion von c-Src und Lck mit hnRNP K sind in beiden Fällen die Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K erforderlich.

Da hnRNP K sowohl Homo- als auch Hetero-Oligomere mit hnRNP E1 bilden kann (Kim *et al.*, 2000, Ostareck nicht publizierte Ergebnisse) wurde die Dimerisierung der Deletionsvarianten mit hnRNP K untersucht (Abb. 3.25). HeLa-Zellen wurden co-transfiziert mit V1-hnRNP K (Zeile 1-4) und V2-hnRNP K (Zeile 1), V2-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (Zeile 2), V2-hnRNP K (Δ 216-226) (Zeile 3) oder V2-hnRNP K [(Δ 216-226)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (Zeile 4). Durch Immunfluoreszenz wurde die Expression aller hnRNP K-Varianten mit Cy3 nachgewiesen. Da der Antikörper nicht zwischen den hnRNP K-Varianten unterscheidet, konnte hiermit kein Nachweis einer Co-Expression erbracht werden. Durch das Auftreten einer Venus-Fluoreszenz kann jedoch eine Co-Transfektion nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz untersucht.

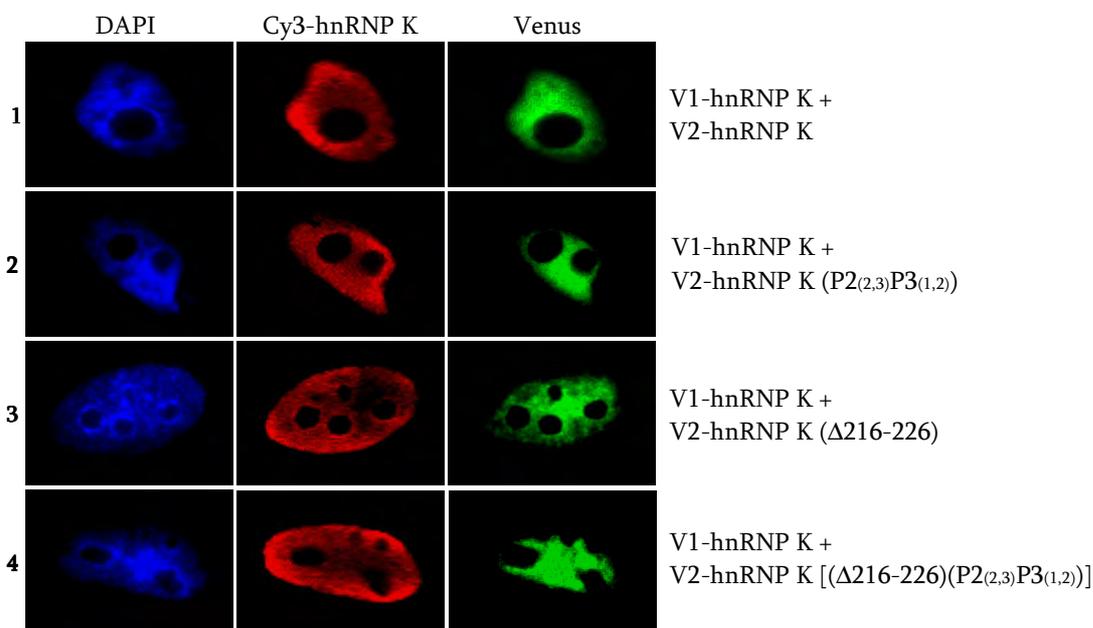


Abb. 3.25: BiFC-Assay zur Dimerisierung der hnRNP K-Deletionsvarianten mit hnRNP K. HeLa-Zellen wurden wie folgt transfiziert: V1-hnRNP K (1-4), V2-hnRNP K (1), V2-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (2), V2-hnRNP K (Δ 216-226) (3), V2-hnRNP K [(Δ 216-226)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (4). Durch Immunfluoreszenz wurde die Expression aller hnRNP K-Varianten mit Cy3 nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz untersucht.

V2-hnRNP K dimerisiert mit V1-hnRNP K (Zeile 1). Auch die Variante V2-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)), welche keine aktivierende Wechselwirkung mit c-Src eingeht, zeigte eine Dimerisierung mit V1-hnRNP K (Zeile 2). Ebenso interagieren die Deletionsvarianten V2-hnRNP K (Δ 216-226) und V2-hnRNP K [(Δ 216-226)(P2_(2,3)P3_(1,2))] unabhängig von ihren veränderten Aminosäuresequenzen mit V1-hnRNP K (Zeile 3 und 4). Die Homo-Dimerisierung von hnRNP K ist demzufolge unabhängig von dem Bereich, der die Interaktion mit c-Src ermöglicht.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Interaktion von hnRNP K mit dem strukturell eng verwandten Protein hnRNP E1 durch die Deletion der Aminosäuren 216 bis 226 beeinflusst wird. HeLa-Zellen wurden co-transfiziert mit V1-hnRNP E1 (Zeile 1-4), V2-hnRNP K (Zeile 1), V2-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (Zeile 2), V2-hnRNP K (Δ 216-226) (Zeile 3) oder V2-hnRNP K [(Δ 216-226)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (Zeile 4). Durch Immunfluoreszenz wurde die Expression von hnRNP E1 mit Cy3 und die der hnRNP K-Varianten mit Cy5 nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz untersucht. V2-hnRNP K interagiert mit V1-hnRNP E1 im BiFC-Assay und auch V2-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) konnte unabhängig von den Modifikationen in der Aminosäuresequenz mit V1-hnRNP E1 interagieren (Zeile 1 und 2).

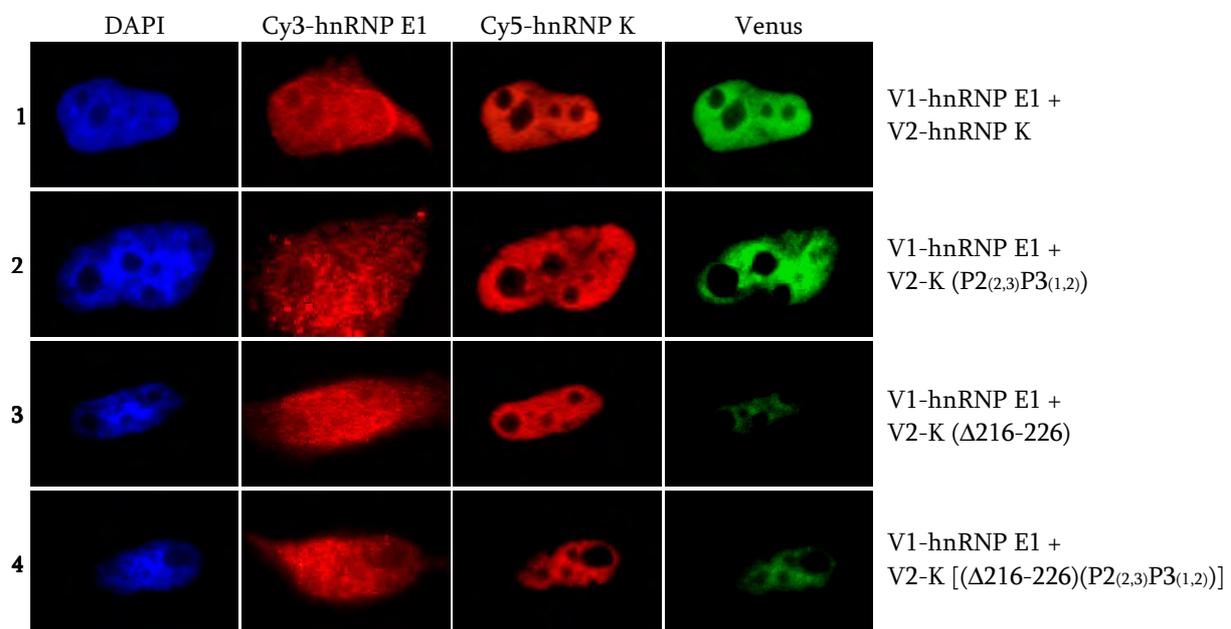


Abb. 3.26: BiFC-Assay zur Interaktion der hnRNP K-Deletionsvarianten mit hnRNP E1. HeLa-Zellen wurden wie folgt transfiziert: V1-hnRNP E1 (1-4) und V2-hnRNP K (1), V2-hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) (2), V2-hnRNP K (Δ 216-226) (3) oder V2-hnRNP K [(Δ 216-226)(P2_(2,3)P3_(1,2))] (4). Durch Immunfluoreszenz wurde die Expression von hnRNP E1 mit Cy3 und die der hnRNP K-Varianten mit Cy5 nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen auf Venus-Fluoreszenz untersucht.

HnRNP K-Varianten, denen die Aminosäuren 216 bis 226 fehlten, zeigten eine gegenüber hnRNP K deutlich verringerte Venus-Fluoreszenz (Zeile 3 und 4). Die Interaktion zwischen hnRNP K und hnRNP E1 ist demzufolge abgeschwächt, wenn die Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K deletiert wurden.

3.7 Übersicht zur Interaktion

Die Interaktion von c-Src und hnRNP K wurde mit dem *in vitro* Protein-Interaktionsassay und durch BiFC-Bindungsstudien untersucht. Die Daten sind in Abb. 3.27 zusammengefasst. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass GST-hnRNP K spezifisch an c-Src, aus gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translations-Reaktionen, bindet (Abb. 3.11). Im BiFC-Assay war ebenfalls eine spezifische und stabile Interaktion zwischen beiden Proteinen zu detektieren, jedoch nur, wenn V2 N-terminal und nicht C-terminal an hnRNP K fusioniert vorlag (Abb. 3.13). V1-hnRNP E1 hingegen interagiert mit beiden hnRNP K-Formen und zeigte keine Präferenz für V2-hnRNP K (Abb. 3.13). Rund 80% der HeLa-Zellen waren in den Experimenten transfiziert und eine Proteinexpression konnte durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Sämtliche V2-hnRNP K-Varianten waren unter Ausschluss der Nukleoli im Zellkern lokalisiert (Abb. 3.13). V1-c-Src hingegen wurde in den transfizierten HeLa-Zellen im Zytoplasma, besonders an der Zellkernmembran lokalisiert. Wurden mit V1-c-Src interagierende V2-hnRNP K-Varianten co-exprimiert, verlagerte sich die Lokalisierung von V1-c-Src, ebenfalls unter Ausschluss der Nukleoli, in den Zellkern (Abb. 3.13). Gleichzeitig wurde dabei in den meisten Fällen auch die rekonstituierte Venus-Fluoreszenz nachgewiesen. In den statistischen Auswertungen der BiFC-Assays wurde deshalb sowohl das Auftreten der Venus-Fluoreszenz, als auch die Verlagerung der Lokalisierung von V1-c-Src in den Zellkern als ein Hinweis für eine Interaktion beider Proteine gewertet. Die Deletion der SH 3-Domäne in c-Src hatte *in vitro* keinen Einfluss auf die Interaktion mit GST-hnRNP K (Abb. 3.14, Abb. 3.27 Nr.2). V1-Src-Varianten, in denen die SH 3-Domäne fehlte oder das Tyrosin 416 modifiziert wurde (Y416F), interagierten wie V1-c-Src mit V2-hnRNP K.

In hnRNP K wurde der Bereich eingegrenzt, der die stabile und von der aktivierenden Wechselwirkung unabhängige Interaktion mit c-Src vermittelt. Die experimentellen Daten zeigen, dass diese Interaktion nicht durch die KH-Domänen oder die prolinreichen Sequenzen erfolgt (Abb. 3.17 bis Abb. 3.19, Abb. 3.27 Nr.3 und 7). Ein N-terminales Fragment von hnRNP K, welches nur die ersten zwei KH-Domänen repräsentiert (Aminosäuren 1 bis 218), interagiert weder *in vitro* noch im BiFC-Assay (26% Restinteraktion) mit c-Src (Abb. 3.17, Abb. 3.20, Abb. 3.21, Abb. 3.27 Nr.3 und 7).

Abb. 3.27 A

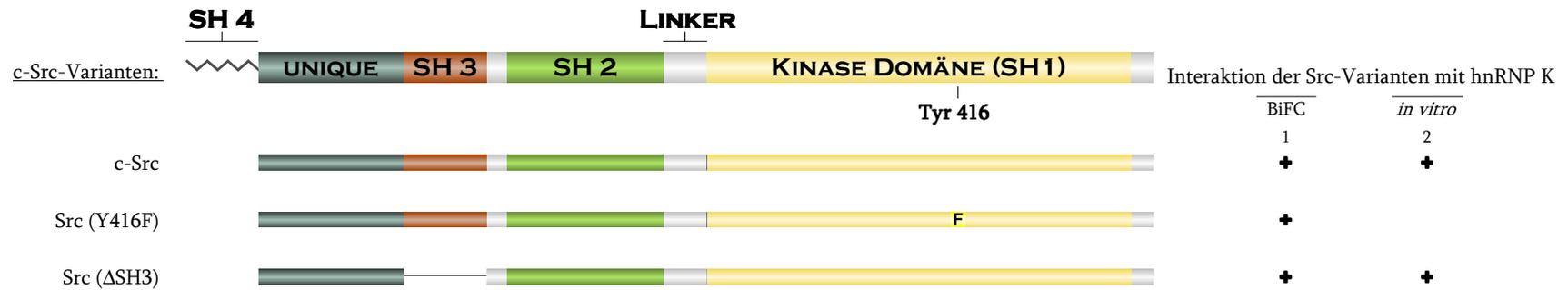


Abb.3.27: A) Übersicht zur Interaktion von c-Src-Varianten mit hnRNP K. B) Übersicht der Wechselwirkungen von hnRNP K-Varianten.

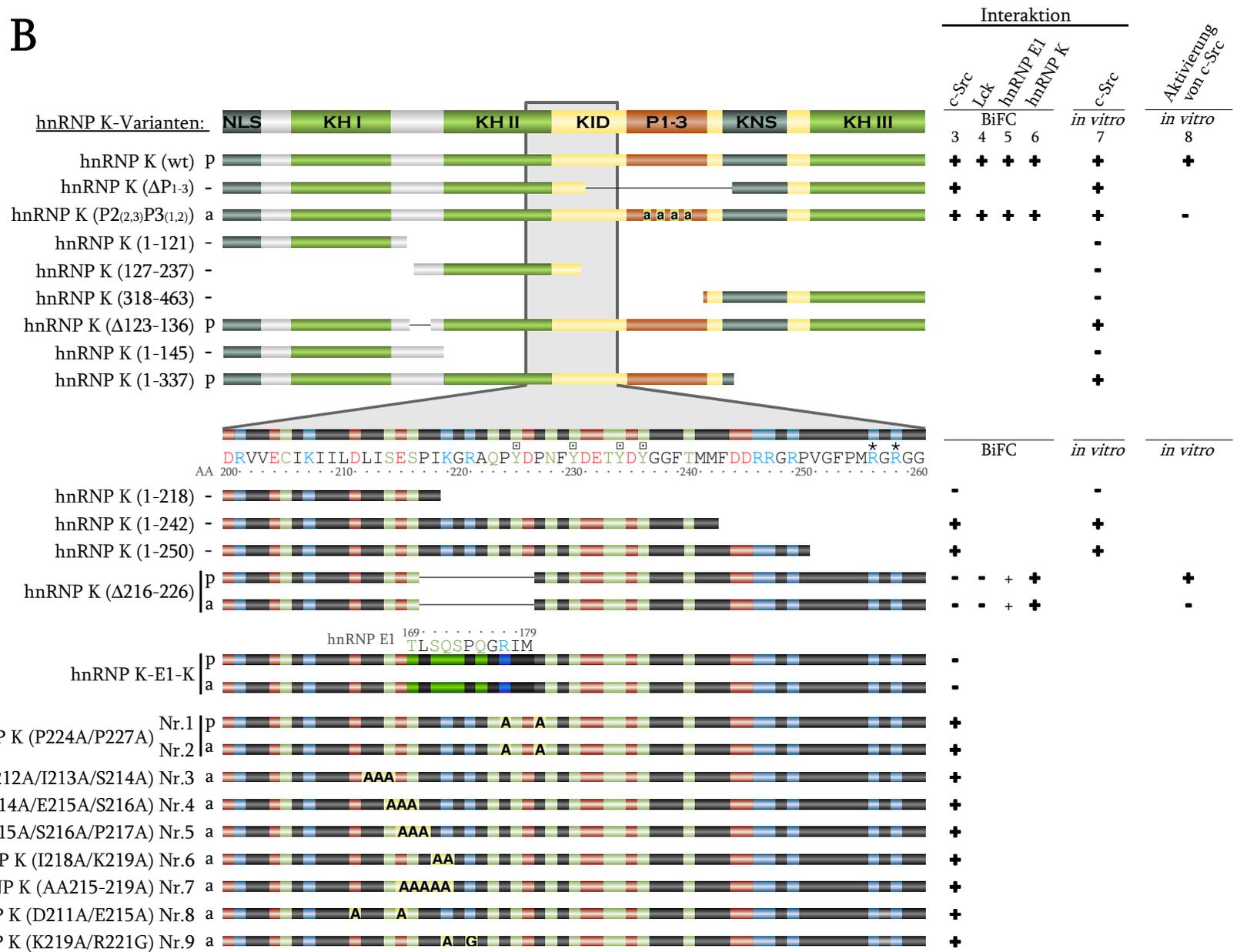
Aminosäurereste: **sauer** (D,E); **basisch** (R,K,H); **ungeladen und polar** (S,N,T,Q,C,Y); neutral (G,A,V,M,I,P,L,W,F); BiFC (Nr. 1, 3-6): Daten aus HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten mit bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation; *in vitro* (Nr. 2, 7, 8): Daten aus *in vitro* Protein-Interaktionsassay; SH = Src *homology* Domäne, KH = hnRNP K *homology* Domäne, NLS = *nuclear localisation signal*, P1-3 = prolinreiche Sequenzen 1-3, KNS = hnRNP K *nuclear shuttling signal*; P2_(2,3)P3_(1,2) : p= PxxP-Motive (Wildtyp), a= zu AxxA-Motiven verändert. Modifizierte Aminosäuren in den Sequenzen der c-Src- oder hnRNP K-Varianten wurden jeweils hervorgehoben.

☐ durch c-Src phosphorylierte Tyrosine; ★ durch PRMT1 methylierte Arginine.

Wechselwirkung: + vergleichbar mit dem Wildtyp; + deutlich schlechter als der Wildtyp; - keine

Sind keine Angaben vorhanden, wurde die Variante nicht getestet.

Abb. 3.27 B



Bereits geringfügige C-terminale Verlängerungen dieses N-terminalen hnRNP K-Fragments (Aminosäuren 1 bis 242 oder 1 bis 250), führten zu einer mit dem Wildtyp vergleichbaren c-Src-Interaktion. Wurden die Aminosäuren 216 bis 226 deletiert, die zwischen hnRNP K und hnRNP E1 differieren, zeigten nur noch 6% der transfizierten Zellen eine Interaktion mit V1-c-Src. Durch Austausch der Aminosäuren 216 bis 226 mit der entsprechenden hnRNP E1-Sequenz (hnRNP E1 Aminosäuren 169 bis 179), war nur eine Restinteraktion von maximal 19% nachweisbar. Die Modifizierung von Aminosäureresten in der Aminosäuresequenz 211 bis 221 oder eines in der Nähe lokalisierten PxxP-Motivs führte zu keiner eindeutigen Reduktion der Interaktion (Abb. 3.22, Abb. 3.27 Nr.3). HnRNP K-Varianten, in denen zusätzlich zu den aufgeführten Veränderungen noch die Polyprolin-Motive (P2_(2,3)P3_(1,2)) zu AxxA-Motiven abgewandelt wurden, zeigten ebenfalls keine Reduktion der Interaktion mit c-Src.

Wie sich die Deletion der Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K auf die weiteren Wechselwirkungen mit c-Src auswirken, wurde im *in vitro* Kinase-Aktivierungsassay überprüft (Abb. 3.23). Die Deletion hatte *in vitro* keinen Einfluss auf die Aktivierung von c-Src (Abb. 3.27 Nr.8). Waren die prolinreichen Sequenzen nicht verändert, wurde c-Src aktiviert. HnRNP K (Δ 216-226) wurde deutlich stärker phosphoryliert als hnRNP K. In BiFC-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der hnRNP K-Deletionsvarianten ohne die Aminosäuren 216 bis 226 mit der Tyrosinkinase Lck, unabhängig von den veränderten prolinreichen Sequenzen, nicht mehr möglich war (Abb. 3.24, Abb.3.27 Nr.4). Die Homodimer-Bildung der hnRNP K-Deletionsvarianten mit hnRNP K war uneingeschränkt möglich (Abb. 3.25, Abb. 3.27 Nr.6). Die Interaktion mit hnRNP E1 wurde jedoch durch die Deletion der Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K reduziert (Abb. 3.26, Abb. 3.27 Nr.5).

4 DISKUSSION

4.1 Aktivierung von c-Src durch hnRNP K

HnRNP K und die Tyrosinkinase c-Src werden in vielen Geweben höherer Organismen exprimiert (Brown und Cooper, 1996, Mikula *et al.*, 2006). Bei der Translationskontrolle der r15-LOX-mRNA sind beide Proteine maßgeblich beteiligt (Ostareck *et al.*, 1997, Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Es konnte durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden, dass hnRNP K von aktivem c-Src an den Tyrosinen 72, 225, 230, 234, 236, 380 phosphoryliert wird (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Erst später wurde gezeigt, dass auch das Tyrosin 458 in der KH-Domäne 3 durch c-Src phosphoryliert wird (Messias *et al.*, 2006). Ist das Tyrosin 458 phosphoryliert, bindet hnRNP K nicht mehr an das DICE in der 3'UTR der r15-LOX-mRNA und die Translationsinhibierung wird aufgehoben (Messias *et al.*, 2006). HnRNP K ist jedoch nicht nur Substrat von aktivem c-Src, es ist auch ein Aktivator der Tyrosinkinase (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Es war bereits bekannt, dass die isolierten SH 3-Domänen der Tyrosinkinasen c-Src, Lyn und Fyn mit hnRNP K *in vitro* interagieren und es wurde vermutet, dass die Interaktion der Tyrosinkinasen mit hnRNP K über deren SH 3-Domänen vermittelt wird (Taylor und Shalloway, 1994, Weng *et al.*, 1994, Van Seuning *et al.*, 1995). Liganden von SH 3-Domänen sind prolinreiche Sequenzen mit der Konsensussequenz PxxP (x steht hier für beliebige Aminosäuren), die eine linksgängige, helikale PP II Konformation einnehmen (Cicchetti *et al.*, 1992, Yu *et al.*, 1994, Mayer und Eck, 1995). Zusätzlich interagiert noch ein N- oder C-terminal gelegenes Arginin mit einem sauren Bereich in der SH 3-Domäne (Lim *et al.*, 1992, Feng *et al.*, 1994, Weng *et al.*, 1995). Liganden lassen sich dementsprechend einteilen in Klasse I-Motive mit der Sequenz RxxPxxP oder in Klasse II-Motive mit PxxPxR (Abb. 1.4, Mayer, 2001). In der inaktiven Konformation von c-Src ist die SH 3-Domäne mit dem Prolin 250 im Linker zwischen der SH 2-Domäne und der Kinase-Domäne verbunden, die eine helikale pseudo-PP II-Konformation besitzt (Xu *et al.*, 1997). Diese intramolekulare Interaktion kann durch die Wechselwirkung der SH 3-Domäne mit einem Liganden höherer Affinität aufgehoben werden, wodurch c-Src aktiviert wird (Brown und Cooper, 1996). Für das Protein Cas (*Crk-associated substrate*) konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Interaktion seiner prolinreichen Sequenz mit der SH 3-Domäne von c-Src die Tyrosinkinase aktiviert (Burnham *et al.*, 2000, Pellicena und Miller, 2001, Nasertorabi *et al.*, 2006). Die Deletion der SH 3-Domäne führt zu einer Aktivierung von Src (Seidel-Dugan *et al.*, 1992, Moarefi *et al.*, 1997). Das eng mit hnRNP K verwandte Protein hnRNP E1 aktiviert c-Src nicht (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Ein Sequenzvergleich beider Proteine ergab, dass hnRNP K einen Bereich mit prolinreichen

Sequenzen enthält (Aminosäuren 240 bis 337), der in hnRNP E1 nicht vorhanden ist (Abb. 1.6). Wurde dieser Bereich in der Variante hnRNP K (ΔP_{1-3}) deletiert, so war keine Aktivierung von c-Src nachweisbar (Abb. 1.7, Adolph *et al.*, 2007). Demzufolge ist die spezifische Aktivierung von c-Src durch hnRNP K auf den Bereich der prolinreichen Sequenzen in hnRNP K zurückzuführen.

In hnRNP K liegen drei prolinreiche Sequenzen vor, deren Wechselwirkung mit der SH 3-Domäne von c-Src eine Aktivierung der Tyrosinkinase bewirken könnte (Abb. 1.2). In diesen prolinreichen Sequenzen befinden sich sechs PxxP-Motive der Klasse I und II. Der Austausch von vier dieser PxxP-Motive ($P2_{(2)}$ - $P3_{(2)}$) durch AxxA-Motive hatte zur Folge, dass sowohl *in vitro*, als auch in HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten eine verminderte Aktivierung und dadurch ebenfalls eine reduzierte Substrat-Phosphorylierung durch c-Src auftrat (Abb. 3.2, Abb. 3.4). Die homogene Substrat-Phosphorylierung der hnRNP K-Varianten durch konstitutiv aktives Src (KP) (Abb. 3.1 A) zeigte, dass nicht die Substrat-Phosphorylierung aufgehoben war, sondern dass es sich um eine ineffiziente Aktivierung von c-Src handelte (Abb. 3.4). Auch die Phosphorylierung von c-Src an Tyrosin 416, die für die Aktivität von c-Src essentiell ist, war bei der Co-Expression dieser vier hnRNP K-Varianten deutlich reduziert (Abb. 3.4). Interessanterweise konnten beide Src-Varianten uneingeschränkt mit allen hnRNP K-Varianten interagieren und wurden mit diesen co-immunpräzipitiert (Abb. 3.4). Wurden mehrere der PxxP-Motive oder alle vier ($P2_{(2,3)}$ $P3_{(1,2)}$) ausgetauscht, war die Aktivierung von c-Src sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stark reduziert (Abb. 3.2, Abb. 3.4). Die isolierten drei prolinreichen Sequenzen in hnRNP K zeigten *in vitro* unterschiedliche Affinitäten zur isolierten SH 3-Domäne von c-Src (Van Seuning *et al.*, 1995). Die Sequenz P1 wies die schwächste Wechselwirkung mit der SH 3-Domäne auf (25mal schwächer als P3, Van Seuning *et al.*, 1995) und die Mutation des Motivs zeigte, dass sie keinen sichtbaren Einfluss auf die Aktivierung von c-Src ausübt (Abb. 3.2, Abb. 3.4). Die Interaktion der P2-Sequenz mit der SH 3-Domäne war etwa 5mal schwächer als die der Sequenz P3 (Van Seuning *et al.*, 1995) und für zwei der drei veränderten PxxP-Motive ($P2_{(2)}$ und $P2_{(3)}$) konnte eine reduzierte Aktivierung von c-Src festgestellt werden (Abb. 3.2, Abb. 3.4). Die prolinreiche Sequenz P3 wies die höchste Affinität zur SH 3-Domäne von c-Src auf. Wurden die beiden darin enthaltenen PxxP-Motive mutiert, so war eine stark eingeschränkte Aktivität von c-Src die Folge (Abb. 3.2, Abb. 3.4). Die Polyprolin-Motive $P2_{(2)}$, $P2_{(3)}$, $P3_{(1)}$ und $P3_{(2)}$ in hnRNP K sind folglich für die Aktivierung von c-Src sowohl *in vitro* als auch *in vivo* notwendig und weisen eine hohe Affinität zur SH 3-Domäne von c-Src auf (Abb. 3.2, Abb. 3.4, Van Seuning *et al.*, 1995). Die prolinreichen Sequenzen in hnRNP K sind jedoch nicht notwendig für die stabile Interaktion beider Proteine (Abb. 1.7, Abb. 3.4, Adolph *et al.*, 2007).

Weiterhin wurde untersucht, ob die Polyprolin-Motive in den prolinreichen Sequenzen P2 und P3 eine direkte Aktivierung von c-Src bewirken (Abb. 3.5). Dem *in vitro*

Kinase-Aktivierungsassay wurde hierfür neben c-Src und dem Substrat hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) unterschiedliche Mengen des Peptids P₂₋₃ zugesetzt, welches die Region der prolinreichen Sequenzen P2 und P3 in hnRNP K enthält (Aminosäuren 285 bis 318). 100ng P₂₋₃ (21,4pmol) bewirkten eine Aktivierung von c-Src, welche mit der durch 18pmol hnRNP K erzielten Aktivierung vergleichbar war. In Westernblot-Analysen war die Tyrosin-Phosphorylierung der Substrate in beiden Reaktionen vergleichbar (Abb. 3.5, Bahn 2 und 6). Dies bedeutet, dass c-Src allein durch die isolierten Polyprolin-Motive P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ in den prolinreichen Sequenzen P2 und P3 aktiviert werden kann. Alle weiteren Wechselwirkungen zwischen c-Src und hnRNP K verstärken oder vermindern die Aktivierung von c-Src nicht. Das zur Src-Tyrosinkinase-Familie gehörende Lck und ist ein bereits gut charakterisierter Interaktionspartner vom *tyrosine kinase interacting protein* (Tip) des Herpesvirus saimiri (Biesinger *et al.*, 1995, Weis *et al.*, 2006). Im Gegensatz zur Aktivierung von c-Src durch hnRNP K konnte gezeigt werden, dass für die Aktivierung von Lck durch Tip auch die stabile Interaktion der Proteine notwendig ist (Hartley *et al.*, 2000). Bisher konnte für keine Tyrosinkinase eine Aktivierung nachgewiesen werden, die allein durch die Wechselwirkung der SH 3-Domäne mit einem Polyprolin-Motive enthaltenden Peptid-Fragment verursacht wird. Dass in einem Protein mehrere Motive für die Wechselwirkung mit einer SH 3-Domäne vorliegen ist nicht ungewöhnlich. So wurden in der Untereinheit p85 der PI3-Kinase ebenfalls zwei Motive für die Interaktion mit c-Src gefunden, die eine langsamere Dissoziation der PI3-Kinase von c-Src bedingen (Wages *et al.*, 1992, Liu *et al.*, 1993). Die Affinität der SH 3-Domäne und ihres Liganden ist dabei durch wiederholte Erkennungssequenzen erhöht. Auch in Tip wurden mehrere Proline identifiziert, die bei der Interaktion mit Lck und dessen Aktivierung eine Rolle spielen (Hartley *et al.*, 2000). In hnRNP K liegen sechs potentielle PxxP-Motive vor, die unterschiedlich stark zur Interaktion mit der SH 3-Domäne und der Aktivierung von c-Src beitragen. Die Wiederholungen des PxxP-Motivs in hnRNP K tragen möglicherweise ebenfalls zu einer höheren Affinität der prolinreichen Sequenzen zur SH 3-Domäne von c-Src bei und gewährleisten damit die Aktivierung. Eine Präferenz für Polyprolin-Motive der Klasse I oder II war nicht erkennbar. Die für die Aktivierung von c-Src notwendigen und hinreichenden Motive in den prolinreichen Sequenzen P2 und P3 gehörten jeweils beiden Klassen an.

Die Methylierung von hnRNP K spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von c-Src (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Arginine 256, 258, 268, 296 und 299 in hnRNP K werden *in vivo* durch PRMT 1 asymmetrisch di-methyliert, wodurch eine Aktivierung von c-Src verhindert wird (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Arginine 296 und 299 sind zwischen der prolinreichen Sequenz P2 und P3 in hnRNP K lokalisiert, wobei Arg 296 zum Polyprolin-Motiv P2₍₃₎ gehört (Abb. 1.2). Die vier Methyl-Gruppen in unmittelbarer Umgebung der für die Aktivierung von c-Src notwendigen Polyprolin-Motive in hnRNP K könnten deren

Wechselwirkung mit der SH 3-Domäne von c-Src sterisch beeinflussen und dadurch die Aktivierung verhindern. hnRNP K wird außerdem durch die Serin-Kinase ERK post-translational modifiziert (Habelhah *et al.*, 2001). Interessanterweise wird auch Serin 284, welches sich direkt vor der zweiten prolinreichen Sequenz P2 befindet, durch ERK phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung dieses Serinrestes und eines weiteren Serins im KNS wird hnRNP K im Zytosol lokalisiert (Habelhah *et al.*, 2001). Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Phosphorylierung von Serin 284 in hnRNP K auch die Aktivierung von c-Src beeinflusst.

Für die Tyrosinkinase Lyn und Fyn wurde bereits *in vitro* eine Wechselwirkung ihrer SH 3-Domänen mit hnRNP K nachgewiesen (Taylor und Shalloway, 1994, Weng *et al.*, 1994, Van Seuning *et al.*, 1995). Für das Modell-Sequenzmotiv RLPxxP wurden sogar vergleichbare Affinitäten zu den SH 3-Domänen von c-Src, Lyn und Fyn gefunden (Alexandropoulos *et al.*, 1995). Von Zellefrow *et al.* (2006) zeigten jedoch, dass Modellpeptide mit vergleichbaren Affinitäten zur SH 3-Domäne von Hck *in vitro* nicht immer eine Aktivierung von Hck bewirken. Die Aktivierung einer Tyrosinkinase ist demnach nicht nur von der Affinität der SH 3-Domäne zum Liganden abhängig. In HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten konnte für Lyn und Fyn keine Interaktion mit hnRNP K nachgewiesen werden, die mit c-Src vergleichbar ist (Ostareck, unpublizierte Ergebnisse). In HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten wurde die Aktivierung der Tyrosinkinase c-Src, Lyn, Fyn oder Lck durch hnRNP K oder hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) und deren Interaktion überprüft (Abb. 3.6, Adolph *et al.*, 2007). Nur wenn c-Src und hnRNP K co-exprimiert wurden, war eine starke Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K und zellulären Proteinen nachweisbar. Eine Aktivierung durch hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) war für alle vier Tyrosinkinase nicht nachweisbar. Beide hnRNP K-Varianten interagierten sowohl mit c-Src als auch mit Lck, was durch Co-Immunpräzipitation der beiden Tyrosinkinase nachgewiesen wurde. Interessanterweise phosphoryliert aktives Lck hnRNP K *in vitro* (Ostrowski *et al.*, 2000). Die Interaktion beider hnRNP K-Varianten mit Lyn und Fyn war dagegen unter den selben Bedingungen nicht nachweisbar. Die *in vitro* nachgewiesene Interaktion der SH 3-Domänen von Lyn und Fyn mit hnRNP K (Taylor und Shalloway, 1994, Weng *et al.*, 1994, Alexandropoulos *et al.*, 1995, Van Seuning *et al.*, 1995) ist demnach nicht ausreichend, um bei fehlender stabiler Interaktion die Tyrosinkinase zu aktivieren und eine Substrat-Phosphorylierung zu ermöglichen (Abb. 3.6). hnRNP K kann nur c-Src spezifisch über seine prolinreichen Sequenzen aktivieren, eine stabile Interaktion ist jedoch auch mit Lck möglich. Die Aktivierung der Tyrosinkinase ist bei den Mitgliedern der Src-Familie von unterschiedlichen weiteren Faktoren abhängig. So aktiviert HIV-1 Nef zwar Hck, Lyn und c-Src jedoch nicht Fgr, Fyn, Lck und Yes (Moarefi *et al.*, 1997, Tribble *et al.*, 2006). Durch den Austausch einer Aminosäure im RT-*loop* von Fyn konnte die Tyrosinkinase jedoch auch durch HIV-1 Nef aktiviert werden (Lee *et al.*, 1995). Somit liegt möglicherweise der Grund für das

voneinander abweichende Aktivierungs-Verhalten der Tyrosinkinase in der unterschiedlichen Aminosäuresequenz des RT-loops in unmittelbarer Nähe zur SH 3-Domäne. Durch Mutation des RT-loops konnte auch für c-Src und Hck gezeigt werden, dass ein Teil der Spezifität der SH 3-Liganden-Wechselwirkung über den RT-loop vermittelt wird (Erpel *et al.*, 1995, Lee *et al.*, 1995). Wie spezifisch die Interaktionen der SH 3-Domänen sind, zeigte sich auch anhand der intramolekularen Interaktionen mit ihren Linkerregionen. Eine Variante von c-Src, in der die SH 3-Domäne durch die SH 3-Domäne von Fyn ausgetauscht war, ergab eine normale Regulation der Aktivität (Erpel *et al.*, 1995). Wurde jedoch die SH 3-Domäne von Lck eingesetzt, so konnte die Aktivität nicht mehr reguliert werden. Umgekehrt hatte der Austausch der c-Src-Linkerregion (Aminosäuren 245 bis 258) durch den Linker von Lck (Aminosäuren 246 bis 257) keinen Einfluss auf die Regulierung der Aktivität (Gonfloni *et al.*, 1997). Die SH 3-Domäne von Lck kann demnach nicht mit dem Linker von c-Src interagieren und die Tyrosinkinase inhibieren. Der Linker von Lck kann jedoch auch durch die SH 3-Domäne von c-Src gebunden werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die SH 3-Domäne von Lck, im Gegensatz zu c-Src, zusätzliche Wechselwirkungen mit einem Liganden eingehen muss, um eine effektive Interaktion zu ermöglichen. Das könnte sowohl erklären, warum Polyprolin-Motive in hnRNP K c-Src aktivieren, nicht jedoch Lck und warum HIV-Nef 1 Hck aber nicht Lck aktiviert (Lee *et al.*, 1995, Saksela *et al.*, 1995, Briggs *et al.*, 1997).

Werden Phospho-Tyrosinkinase in Bakterien exprimiert, akkumulieren diese meist in *inclusion bodies* (Gilmer und Erikson, 1981, McGrath und Levinson, 1982). Die Expression von c-Src mit einem N-terminalen His-tag (His-c-Src) in *E.coli* war unter optimierten Bedingungen nicht effizient (Abb. 3.7), jedoch mit α -His und α -Src Antikörpern nachweisbar. Die Reinigung erfolgte mit Magne HisTM Ni-Particles (Promega), da mit Ni-NTA nicht der gewünschte Reinigungseffekt erzielt werden konnte (Abb. 3.8).

Es wurde untersucht, ob die Aktivierung von nicht modifiziertem, aus *E.coli* gereinigtem His-c-Src ebenfalls durch die prolinreichen Sequenzen von hnRNP K reguliert wird (Abb. 3.9 B). Hierzu wurde mit His-c-Src zusammen mit hnRNP K (ΔP_{1-3}) oder mit hnRNP K und hnRNP K (ΔP_{1-3}) ein *in vitro* Kinase-Aktivierungsassay durchgeführt. His-c-Src phosphorylierte hnRNP K (ΔP_{1-3}) unabhängig davon, ob hnRNP K in der Reaktion enthalten war. Eine Aktivierung von His-c-Src durch die prolinreichen Sequenzen in hnRNP K war demzufolge nicht notwendig. Der Vergleich von überexprimiertem His-c-Src aus *E.coli* mit in HeLa-Zellen exprimiertem c-Src zeigt, dass His-c-Src aus *E.coli* nicht phosphoryliert ist (Abb. 3.9 A). Da in *E.coli* endogen keine Phospho-Tyrosinkinase exprimiert werden (Lindberg und Pasquale, 1991) kann auch Csk das Tyr 527 von His-c-Src nicht phosphorylieren. Die fehlende Tyrosin-Phosphorylierung an Tyr 527 hat zur Folge, dass keine intramolekulare Interaktion mit der SH 2-Domäne, die c-Src inhibiert, möglich ist. Unabhängig von der intramolekularen

Interaktion der SH 3-Domäne mit dem Prolin 250 der Linkerregion liegt His-c-Src demzufolge in einer geöffneten und aktivierten Konformation vor.

Die Aktivität von c-Src wurde durch die fusionierten Histidine, die Expression in *E.coli* oder die Reinigung mit Magne His™ Ni-Particles nicht beeinflusst. Die Erkennung von hnRNP K als Substrat (Abb. 3.9) und die Interaktion zwischen hnRNP K und His-c-Src (Daten nicht gezeigt) blieb unverändert. Studien zur Aktivierung wurden nicht angeschlossen, da durch die Expression in *E.coli* eine nicht an Tyrosin 527 phosphorylierte und somit aktive Tyrosinkinase vorlag.

4.2 Eine von der aktivierenden Wechselwirkung unabhängige Interaktion zwischen c-Src und hnRNP K

Die Interaktion von hnRNP K und c-Src basiert nicht nur auf der aktivierenden Wechselwirkung der Polyprolin-Motive P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ mit der SH 3-Domäne (Abb. 1.7, Abb. 3.4). Eine weitere Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen führt zu einer stabilen Interaktion, die durch Co-Immünpräzipitation nachgewiesen werden konnte. Für die Interaktionen zwischen c-Src und Cas (Nasertorabi *et al.*, 2005) oder Lck und Tip (Jung *et al.*, 1995, Lund *et al.*, 1996, Hartley *et al.*, 2000) wurden ebenfalls zwei unterschiedliche Wechselwirkungen innerhalb der Interaktionspartner gefunden.

Die Interaktion von hnRNP K und c-Src wurde mit dem *in vitro* Protein-Interaktionsassay (Medenbach *et al.*, 2004, Müller, 2006) untersucht, wobei c-Src keine unspezifischen Wechselwirkungen mit der GSH-Sepharose, dem GST-tag oder mit hnRNP E1 zeigte (Abb. 3.11). Die Interaktion *in vivo* wurde in HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten durch BiFC untersucht (Hu *et al.*, 2002, Hu und Kerppola, 2003). Das Fluoreszenz-Chromophor Venus, eine optimierte Form des YFP, wurde dazu in einen N-terminalen (V1) und einen C-terminalen Teil (V2) aufgespalten, welche jeweils mit einem der potentiellen Interaktionspartner fusioniert wurden. Interagieren die Proteine, so werden die Fragmente V1 und V2 zum Chromophor Venus rekonstituiert. Diese Venus-Rekonstitution hat eine Halbwertszeit von 60 Sekunden, weshalb aus instabilen kurzzeitigen Wechselwirkungen der Interaktionspartner keine Venus-Fluoreszenz resultiert (Hu *et al.*, 2002). Die exprimierten Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz in den Zellen detektiert (Kapitel 2.9) und die Ergebnisse anhand repräsentativer Zellen veranschaulicht (Abb. 3.12). Die V1- bzw. V2-Fusionsproteine wurden jeweils einzeln in HeLa-Zellen exprimiert, wobei deren Lokalisierung innerhalb der Zelle vergleichbar war mit der von Proteinen ohne fusionierte Venusanteile (Abb. 3.3) oder der Lokalisierung endogener Proteine einer humanen Adenokarzinom-Dickdarm-Krebszelllinie

(CaCo2, Daten nicht gezeigt). Der C-terminale Teil von Venus (V2) wurde N-terminal (V2-hnRNP K) oder C-terminal (hnRNP K-V2) an hnRNP K fusioniert. Beide Varianten wurden unter Ausschluss der Nukleoli im Zellkern lokalisiert, eine Interaktion mit V1-c-Src konnte jedoch nur für V2-hnRNP K nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Beide hnRNP K-Varianten werden funktionell exprimiert, da die Bildung eines Heterodimers mit V1-hnRNP E1 nachweisbar war. Eine mögliche Ursache für das unterschiedliche Interaktionsverhalten könnte darin bestehen, dass der Bereich der Interaktion mit c-Src durch die C-terminale Fusion von V2 beeinflusst wurde und die Interaktion von hnRNP K und c-Src verhinderte. Geht man jedoch davon aus, dass hnRNP K und c-Src noch miteinander interagierten, könnte die räumliche Entfernung der beiden Venusfragmente zu groß für eine Rekonstituierung des Chromophors sein, wodurch Rückschlüsse auf die Positionierung der N- und C-Termini von hnRNP K und c-Src möglich wären. Besonders auffällig bei der Interaktion von V1-c-Src oder V1-hnRNP E1 mit V2-hnRNP K war die Verlagerung von V1-c-Src oder V1-hnRNP E1 in den Zellkern. Wurde V1-c-Src einzeln exprimiert, konnte ausschließlich eine Lokalisierung im Zytoplasma direkt an der Zellkern- und perinukleären Membran detektiert werden, jedoch nie innerhalb des Zellkerns. V1-hnRNP E1 hingegen war einzeln exprimiert über die Zelle verteilt. Interagierende V1-c-Src mit V2-hnRNP K oder V1-hnRNP E1 mit beiden hnRNP K-Varianten, so war neben der Venus-Fluoreszenz im Zellkern auch stets der größte Teil von V1-c-Src und V1-hnRNP E1 in den Zellkern verlagert. Werden interagierende Proteine ohne die Venus-Fragment (His-hnRNP K und c-Src) in HeLa-Zellen exprimiert, kann diese Verlagerung von c-Src in den Zellkern nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.3). In CaCo2-Zellen ist endogen exprimiertes c-Src ebenfalls nicht im Zellkern lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Bei der Rekonstituierung von Venus erfolgt eine kovalente Verknüpfung der beiden Venus-Fragmente und es entsteht ein Komplex bestehend aus c-Src/hnRNP E1-Venus-hnRNP K. Das NLS und das KNS von hnRNP K sind in der Lage, den gesamte Komplex in den Zellkern zu transportieren. Die Verlagerung von V1-c-Src und V1-hnRNP E1 in den Zellkern ist demzufolge keine natürliche Co-Lokalisierung, sondern ist auf die Interaktion mit V2-hnRNP K und die Chromophor-Rekonstituierung zurückzuführen.

Zu Beginn der Interaktionsstudien wurde überprüft, welchen Einfluss die SH3-Domäne von c-Src auf die Interaktion mit hnRNP K hat. Im *in vitro* Protein-Interaktionsassay interagierten c-Src und Src (Δ SH 3) unvermindert mit GST-hnRNP K (Abb. 3.14). Die im BiFC-Assay untersuchten Varianten V1-c-Src, V1-Src (Y416F) und V1-Src (Δ SH 3) interagierten in über 95% der Fälle mit V2-hnRNP K (Abb. 3.15, Abb. 3.16). In früheren Untersuchungen wurde eine reduzierte Interaktion zwischen der Variante Src (Δ SH 3) und hnRNP K gefunden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002), im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen bestätigte sich dieses Ergebnis jedoch weder *in vitro* noch *in vivo*. Die inaktive Variante Src (Y416F) zeigt

keine Beeinträchtigung der Interaktion mit hnRNP K im BiFC-Assay wie dies bereits in früheren Untersuchungen nachgewiesen wurde (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Aktivität von c-Src ist dementsprechend keine Voraussetzung für die Ausbildung der stabilen Interaktion zwischen c-Src und hnRNP K. Im BiFC-Assay fiel die ungewöhnliche Lokalisierung der SH 3-Deletionsvariante innerhalb der Zelle auf (Abb. 3.15). Es war kein Kontakt mit der Kernmembran nachweisbar, was für alle anderen Src-Varianten der Fall war. Die V1-Src-Varianten tragen wahrscheinlich keine Myristoylgruppe an ihrer SH 4-Domäne, welche nach David-Pfeuty *et al.* (1993) Tyrosinkinasen an Membranen verankert. Die Verknüpfung der Myristoylgruppe erfolgt in der Regel mit der zweiten Aminosäure der Tyrosinkinase unter Abspaltung des Start-Methionins (Towler *et al.*, 1988, Brown und Cooper, 1996). Durch die N-terminale Fusion von V1 könnte jedoch das Signal zur Myristoylierung oder die Myristoylierungsreaktion gestört sein. Die SH 2- und SH 3-Domänen haben ebenfalls Einfluss auf die Lokalisierung der Tyrosinkinase innerhalb der Zelle, möglicherweise indem sie bestimmte Interaktionspartner binden (Kaplan *et al.*, 1990). Die SH 2- und die SH 3-Domäne sind für die Assoziation von c-Src an die Plasma- und perinukleäre Membran verantwortlich (Kaplan *et al.*, 1990). Dies könnte der Grund dafür sein, dass V1-Src (Δ SH 3) nicht mehr wie V1-c-Src und V1-Src (Y416F) mit der Kernmembran bzw. der perinukleären Membran interagiert. Die Interaktion der Variante Src (Δ SH 2) mit hnRNP K wurde mit BiFC-Analysen und *in vitro* untersucht (Daten nicht gezeigt). Die Variante zeigte eine eingeschränkte Interaktion mit hnRNP K, jedoch konnten die Ergebnisse nicht eindeutig ausgewertet werden, da Kreuzreaktionen in den Kontrollreaktionen vorlagen. Für eine C-terminal verkürzte Src-Variante, die sowohl die Linkerregion als auch die SH 2-, SH 3- und SH 4-Domänen enthielt (Aminosäuren 1 bis 226), wurde bereits eine stabile Interaktion mit GST-hnRNP K im *in vitro* Protein-Interaktionsassay nachgewiesen (Müller, 2006). Die zusätzliche Deletion der SH 3-Domäne in dieser Src-Variante (Aminosäuren 1-226/ Δ 87-137) führte jedoch zu einem fast vollständigen Verlust der Interaktion. Um auszuschließen, dass durch die zusätzliche Deletion der SH 3-Domäne die korrekte Faltung des Proteins erschwert wird, wäre es interessant, die Interaktion von Src (1-266) mit hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) oder hnRNP K (Δ P1-3) zu untersuchen. Eine Interaktion mit der SH 3-Domäne sollte hier ebenfalls nicht möglich sein. Erste Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Protein β -Arrestin 1 eventuell mit der Linkerregion zwischen der SH 2- und der Kinase-Domäne von c-Src interagiert (Miller *et al.*, 2000). Möglicherweise ist dies auch bei hnRNP K und c-Src der Fall und die Deletion der SH 2-Domäne stört die korrekte Faltung der Linkerregion und somit die stabile Interaktion mit hnRNP K. Allerdings könnte durch die erschwerte Faltung der Src-Varianten auch die beobachteten Kreuzreaktionen in den Kontrollreaktionen erklärt werden. Eventuell könnten hier CD-spektroskopische Untersuchungen von Src (Δ SH 2) weitere Hinweise zu dieser Problematik liefern.

Eine stabile Interaktion von hnRNP K und c-Src wäre auch über die Wechselwirkung eines phosphorylierten Tyrosins in hnRNP K mit der SH 2-Domäne von c-Src denkbar. Für das Protein Cas konnten beispielsweise zwei separate Interaktionen mit der SH 3- und der SH 2-Domäne von c-Src nachgewiesen werden, wodurch unter anderem auch die prozessive Tyrosin-Phosphorylierung von Cas ermöglicht wird (Nakamoto *et al.*, 1996, Pellicena und Miller, 2001). Auch für Abl wurde gezeigt, dass die Interaktion der SH 2-Domäne zu einer prozessiven Tyrosin-Phosphorylierung beiträgt (Mayer *et al.*, 1995). Für konstitutiv aktives Lck ließ sich sogar eine höhere Affinität zu bereits phosphoryliertem hnRNP K nachweisen, was eine Wechselwirkung der SH 2-Domäne mit einem phosphorylierten Tyrosin nahe legt (Ostrowski *et al.*, 2000). Da die Substrat-Phosphorylierung eine Folge der Kinaseaktivität ist, kann diese jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion von hnRNP K und c-Src haben. Würde die stabile Interaktion durch die SH 2-Domäne von c-Src vermittelt, so wäre die Interaktion von hnRNP K mit Src (Y416F) nicht möglich, diese ist jedoch nicht eingeschränkt (Abb. 3.16). Die stabile Interaktion zwischen c-Src und hnRNP K kann somit nicht über die SH 2-Domäne vermittelt werden, auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie eine Rolle bei der Prozessivität der Tyrosin-Phosphorylierung spielt. Für die stabile Interaktion zwischen Lck und Tip konnte ebenfalls ein Einfluss der SH 2-Domäne von Lck ausgeschlossen werden (Hartley *et al.*, 2000). Eine N-terminal verkürzte Variante von Lck, die nur noch Teile der SH 2-Domäne und alle nachfolgenden Strukturen beinhaltete, interagierte ohne Beeinträchtigung mit Tip.

Zur Eingrenzung des Interaktionsbereichs mit c-Src wurden verschiedene hnRNP K-Varianten untersucht, in denen bestimmte Aminosäuresequenzen fehlten. Im *in vitro* Protein-Interaktionsassay zeigte sich, dass die drei KH-Domänen keinen Einfluss auf die Interaktion mit c-Src besitzen (Abb. 3.17). Das C-terminal verkürzte hnRNP K (1-337), in dem lediglich die KH-Domäne 3 fehlt, interagiert mit c-Src. Die Wechselwirkung der KH-Domäne 3 mit dem DICE in der 3'UTR der r15-LOX-mRNA wird durch die Phosphorylierung des Tyr 458 reguliert (Messias *et al.*, 2006). Die stabile Interaktion mit c-Src wird jedoch nicht durch diesen Bereich in hnRNP K vermittelt. Die Deletion beziehungsweise die Variation der Polyprolin-Motive in hnRNP K (ΔP_{1-3}) und hnRNP K ($P_{2(2,3)}P_{3(1,2)}$) hatte, wie bereits gezeigt wurde (Abb. 1.7, Adolph *et al.*, 2007), keinen Einfluss auf die Interaktion mit c-Src. Auch die Deletion der Aminosäuresequenz zwischen der ersten und zweiten KH-Domäne (Aminosäuren 123 bis 136) blieb ohne Auswirkungen auf die Interaktion. Die Untersuchung verschiedener C-terminal verkürzter hnRNP K-Varianten, denen die prolinreichen Sequenzen P1 bis P3, das KNS und die KH-Domäne 3 fehlten, ergab interessante Resultate: Die Varianten hnRNP K (1-250) und hnRNP K (1-242) interagierten mit c-Src, wohingegen die Verkürzung um einige weitere Aminosäuren (hnRNP K (1-218)) zu einem vollständigen Verlust der Interaktion führte

(Abb. 3.17). Im BiFC-Assay wurde gezeigt, dass die prolinreichen Sequenzen ebenfalls keinen Einfluss auf die Interaktion mit c-Src haben (Abb. 3.18, Abb. 3.19). HnRNP K (ΔP_{1-3}) und hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) interagierten in über 93% der Fälle mit c-Src. Der *in vitro* Protein-Interaktionsassay (Abb. 3.17) zeigt, dass die C-terminal verkürzten Varianten hnRNP K (1-242) und hnRNP K (1-250) mit c-Src interagieren (>95%), die Variante hnRNP K (1-218) jedoch nicht (<28%) (Abb. 3.20, Abb. 3.21). Auffällig hierbei war die Lokalisierung dieser C-terminal verkürzten Varianten im Zellkern, obwohl die Sequenz kein KNS mehr enthielt. Für den Transport in den Zellkern ist das NLS am N-Terminus ausreichend. Vergleicht man in hnRNP K und hnRNP E1 die auf die KH-Domäne 2 folgenden Aminosäuresequenzen, kann dieser Bereich in zwei Sektoren aufgeteilt werden (Abb. 1.6). An die KH-Domäne 2 schließt sich in beiden Proteinen eine Sequenz an (hnRNP K: Aminosäuren 216 bis 226, hnRNP E1: Aminosäuren 169 bis 179), die in hnRNP K gegenüber hnRNP E1 verlängert ist (Aminosäuren 227 bis 242). Wurde dieser zweite Bereich in hnRNP K deletiert (Daten nicht gezeigt) zeigten BiFC-Untersuchungen eine uneingeschränkte Interaktion mit c-Src. Waren jedoch die Aminosäuren 216 bis 226 deletiert oder durch die Aminosäuren 169 bis 179 aus hnRNP E1 ersetzt, so lag kaum noch eine Interaktion mit c-Src vor. Auch in diesen Untersuchungen hatte die zusätzliche Modifizierung der Polyprolin-Motive P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ keinen sichtbaren Einfluss auf die Interaktion mit c-Src. Der Austausch eines PxxP-Motivs (P224A/P227A) oder verschiedener Aminosäuren in der Aminosäuresequenz 211 bis 221 zusätzlich zur (P2_(2,3)P3_(1,2))-Mutation in hnRNP K beeinflusste die Interaktion nicht, alle Varianten interagierten in über 85% der Fälle mit c-Src (Abb. 3.22). Für die Aminosäuresequenz 216 bis 226 in hnRNP K konnte keine spezifische Faltung oder Struktur berechnet werden, die für die Interaktion mit c-Src verantwortlich sein könnte (Vorhersagen nach Bairoch *et al.*, 1997 und Karplus *et al.*, 1998). Durch die Wechselwirkung zweier Proteine kann eine Proteinfaltung jedoch induziert werden (Iakoucheva *et al.*, 2002, Dyson und Wright, 2005, Krokowski *et al.*, 2005), was möglicherweise auch bei der stabilen Interaktion von hnRNP K und c-Src der Fall ist. Für die Interaktion des Transkriptionsfaktors CREB mit einem unstrukturierten Bereich des CREB *binding proteins* (CPB) wurde gezeigt, dass erst durch die Bindung des Liganden eine definierte Struktur entsteht (Radhakrishnan *et al.*, 1997).

Die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K-Deletionsvarianten wurde *in vitro* untersucht (Abb. 3.23). Zu einer Aktivierung von c-Src und einer Substrat-Phosphorylierung kam es nur, wenn die prolinreichen Sequenzen in hnRNP K vorhanden waren, unabhängig davon, ob eine stabile Interaktion beider Proteine möglich war. HnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) wird durch konstitutiv aktives Src (KP) oder durch c-Src, das durch das Peptid P2-3 aktiviert wurde, als Substrat erkannt und phosphoryliert (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Erste Untersuchungen (Daten nicht gezeigt) deuten darauf hin, dass hnRNP K-Varianten ohne Polyprolin-Motive und ohne stabile Interaktion nicht mehr von aktivem c-Src phosphoryliert werden können. Demzufolge wäre für die Erkennung

von hnRNP K als Substrat von c-Src nur mindestens eine der beiden Wechselwirkungen notwendig, entweder die stabile Interaktion oder die aktivierende Wechselwirkung der Polyprolin-Motive mit der SH 3-Domäne. Für die Interaktion von Lck mit Tip konnte *in vivo* gezeigt werden, dass zwei Interaktionen für die Aktivierung der Tyrosinkinase essentiell sind (Hartley *et al.*, 2000). Die stabile Interaktion der beiden Proteine wird jedoch auch in diesem Fall nicht über die Wechselwirkung der Polyprolin-Motive in Tip mit der SH 3-Domäne von Lck vermittelt. Die Sequenz EDLQSFLEKY in Tip vermittelt die zweite Interaktion, welche möglicherweise mit der Kinase-Domäne von Lck interagiert. Wurden sowohl die Proline für die Wechselwirkung mit der SH 3-Domäne, als auch die Aminosäuren SFL in Tip mutiert, konnte keine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die spezifische Erkennung eines Substrats durch c-Src und Lck scheint von mindestens einer der beiden Interaktionen mit dem Substratprotein abzuhängen. Da Lck und hnRNP K ebenfalls interagieren (Abb. 3.6), würde dies auch erklären, weshalb aktives Lck in der Lage ist hnRNP K zu phosphorylieren (Ostrowski *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung von hnRNP K (Δ 216-226) ist stärker, als die von hnRNP K (Abb. 3.23), obwohl in hnRNP K (Δ 216-226) das Tyr 225 fehlt, das nach Ostareck-Lederer *et al.* (2002) durch c-Src phosphoryliert wird. Eventuell werden durch die zweite Interaktion von hnRNP K und c-Src spezifisch die Tyrosine in der unmittelbaren Umgebung dieser Interaktionsstelle phosphoryliert (Tyr 225, 230, 234 und 236). Fehlt diese Interaktion zwischen den beiden Proteinen, so werden möglicherweise unspezifisch andere Tyrosine in hnRNP K phosphoryliert. Die zweite Interaktion könnte so zur spezifischen Phosphorylierung an Tyr 225, 230, 234 und 236 und dadurch zur Regulierung von Signalwegen über die Interaktion mit SH 2-Domänen Proteinen beitragen. Für die Sequenzmotive, in denen diese vier Tyrosine lokalisiert sind, wurde jedoch keine Übereinstimmung mit bekannten SH 2-Erkennungsmotiven gefunden (Songyang *et al.*, 1993, Songyang *et al.*, 1994, Lupher *et al.*, 1997, Rodriguez *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2006). Mikula *et al.* (2006) untersuchten hnRNP K auf mögliche Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Massenspektrometrische Untersuchungen von Zell-Lysat (HTC-IR-Zellen) oder von *in vitro* durch *casein-kinase* (CK) 1 oder CK 2 phosphoryliertem hnRNP K ergaben dabei, dass Serin 214 oder Serin 216 phosphoryliert ist. Die funktionalen Auswirkungen, die diese Tyrosin- und Serin-Phosphorylierungen möglicherweise auf hnRNP K haben, wurden jedoch noch nicht geklärt. Es gibt Hinweise, dass Proteine die ubiquitinyliert werden phosphoryliert sein müssen (Glickman und Ciechanover, 2002). Möglicherweise wird durch die Phosphorylierungen die Ubiquitinylierung von hnRNP K und dessen Abbau während der erythroiden Reifung gesteuert. Diese Frage ist Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen.

Der Einfluss der mutierten Polyprolin-Motive P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ oder der deletierten Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K auf die Interaktion mit anderen Proteinen wurde ebenfalls untersucht. In HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten mit anschließender

Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von hnRNP K und Lck unabhängig von den veränderten Polyprolin-Motiven ist (Abb. 3.6). Untersuchungen der Interaktion von hnRNP K mit Lck im BiFC-Assay ergaben, dass die Interaktion unabhängig von den Polyprolin-Motiven P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ in hnRNP K verläuft (Abb. 3.24). Lck wird wie c-Src durch die kovalente Bindung der Venusfragmente bei der Interaktion mit hnRNP K in den Zellkern verlagert. Im Gegensatz zu c-Src konnten jedoch geringe Mengen an Lck bereits bei Einzeltransfektionen im Zellkern nachgewiesen werden. Die Deletion der Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K hatte wie bei c-Src den Effekt, dass Lck die hnRNP K-Variante nicht mehr binden konnte (Abb. 3.20). Die Aminosäuresequenz 216 bis 226 in hnRNP K könnte nicht nur für die Bildung der stabilen Interaktion mit c-Src und Lck verantwortlich sein, sondern vermittelt womöglich auch die Interaktion mit weiteren Tyrosinkinasen. In BiFC-Untersuchungen wurden die hnRNP K-Deletionsvarianten auf Homodimerisierung und Heterodimer-Bildung mit hnRNP E1 untersucht. Kim *et al.* (2000) zeigten in *yeast-two-hybrid* und Co-Immunpräzipitations-Studien, dass hnRNP K, E2, L und I sowohl Homodimere, als auch Heterodimere bilden. Bei hnRNP E2 und hnRNP K waren dafür die N-Termini mit den KH-Domänen 1 und 2 (Aminosäuren 1 bis 288) notwendig (Kim *et al.*, 2000). hnRNP E2 weist eine hohe Sequenzidentität mit hnRNP E1 auf und bildet ebenfalls Heterodimere mit hnRNP K (Abb. 3.13). Zunächst wurde der Einfluss auf die Homodimer-Bildung von hnRNP K untersucht (Abb. 3.25). Der Nachweis einer Co-Expression in den HeLa-Zellen war erschwert, da der gleiche Antikörper sowohl V1-hnRNP K als auch die V2-hnRNP K-Varianten erkennt. Unabhängig davon, ob die Polyprolin-Motive P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ verändert wurden, die Aminosäuren 216 bis 226 deletiert wurden oder beide Modifikationen vorlagen, war die Bildung eines Dimers nachweisbar. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wäre die Untersuchung der Dimerbildung von hnRNP K-Varianten eines einzigen Typs interessant. Die Heterodimer-Bildung der hnRNP K-Varianten mit V1-hnRNP E1 war ebenfalls Gegenstand von Untersuchungen (Abb. 3.26). Die veränderten Polyprolin-Motive hatten keine Auswirkung auf die Interaktion mit hnRNP E1. Waren jedoch die Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K deletiert, so war die Venus-Fluoreszenz als Zeichen für eine Interaktion mit hnRNP E1 deutlich abgeschwächt. Möglicherweise haben die Aminosäuren 216 bis 226 auch auf die Interaktion von hnRNP K mit hnRNP E1 einen Einfluss. An der Regulierung der r15-LOX-mRNA Translation über das DICE in der 3'UTR sind sowohl hnRNP K als auch hnRNP E1 beteiligt (Ostareck *et al.*, 1997). Wird hnRNP K am Tyrosin 458 durch c-Src phosphoryliert, kann die Inhibierung der Translation nicht mehr vermittelt werden (Messias *et al.*, 2006). Wenn die Interaktion von hnRNP K sowohl mit c-Src als auch hnRNP E1 über die gleiche Region erfolgt, wäre es denkbar, dass die Interaktion von c-Src mit hnRNP K den Komplex aus hnRNP K und hnRNP E1 am DICE der mRNA destabilisiert. Die Phosphorylierung von Tyr 458 in der an das DICE gebundenen KH-Domäne 3 könnte hierdurch erst ermöglicht werden. Eine andere Option wäre,

dass die Bindung von c-Src an hnRNP K durch die bereits bestehende Interaktion von hnRNP K mit hnRNP E1 verhindert oder erschwert wird und damit das frühzeitige Ablösen der Proteine von der mRNA verhindert werden kann. Interessant wären hierzu Untersuchungen, die Aufschluss über den bevorzugten Interaktionspartner von hnRNP K geben und ob eines der Proteine das andere, bereits an hnRNP K gebundene, verdrängen kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Protein-Tyrosinkinase c-Src und hnRNP K sind in vielen Geweben höherer Organismen exprimiert. Beide Proteine sind an verschiedenen Signalwegen in der Zelle beteiligt. Die Src-Tyrosinkinase-Familie besteht aus den Mitgliedern c-Src, Lyn, Fyn, Lck, Hck, Yes, Yrk, Blk und Fgr. Tyrosinkinasen liegen in der Zelle meist in einer inaktiven Konformation vor, in der die SH 3-Domäne mit dem Linker und die SH 2-Domäne mit einem phosphorylierten Tyrosin am C-Terminus assembliert sind. Die Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosins, die Interaktion von externen SH 3-Domänen-Liganden mit Polyprolin-Motiven oder die Interaktion von SH 2-Domänen-Liganden mit phosphorylierten Tyrosinen führen zur Aktivierung der Tyrosinkinasen. Nach einer Autophosphorylierung *in trans* sind die Tyrosinkinasen dann in der Lage, eine Vielzahl von Substratmolekülen, durch die Übertragung eines γ -Phosphats von ATP auf spezifische Tyrosinreste, zu phosphorylieren. HnRNP K kann mit c-Src interagieren und ist sowohl Aktivator als auch Substrat der Tyrosinkinase. Der Einfluss der Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K auf die Translationskontrolle der r15-LOX-mRNA wurde bereits eingehend untersucht. Insbesondere die Phosphorylierung von Tyrosin 458 in der KH-Domäne 3 hebt die Bindung von hnRNP K an das DICE in der 3'UTR der r15-LOX-mRNA und somit deren Translationsinhibierung auf.

In der vorliegenden Arbeit konnten durch *in vitro* Kinase-Aktivierungsstudien und HeLa-Zell-Transfektionsstudien vier Polyprolin-Motive in hnRNP K identifiziert werden, die für die spezifische Aktivierung von c-Src notwendig und hinreichend sind. Durch *in vitro* Interaktionsstudien und BiFC wurde die Interaktion von hnRNP K und c-Src untersucht, welche unabhängig von der aktivierenden Wechselwirkung beider Proteine ist. Durch die Untersuchung verschiedener Deletion- und Insertionsvarianten von hnRNP K konnte ein Bereich in hnRNP K eingegrenzt werden, der diese Interaktion vermittelt.

- * Frühere Untersuchungen ergaben, dass die Aminosäuren 240 bis 337 in hnRNP K für die Aktivierung von c-Src notwendig sind. In diesem Bereich befinden sich drei prolinreiche Sequenzen mit insgesamt sechs Polyprolin-Motiven. HnRNP E1, strukturell eng mit hnRNP K verwandt, besitzt keine vergleichbare Aminosäuresequenz und kann c-Src weder aktivieren noch damit interagieren. Durch *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte jetzt gezeigt werden, dass die vier Polyprolin-Motive P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ für die Aktivierung von c-Src notwendig sind.

- * HnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)), in dem die vier Polyprolin-Motive verändert wurden, konnte c-Src weder *in vitro* noch *in vivo* aktivieren. Nachgewiesen wurde dies über eine reduzierte Phosphorylierung des Tyrosin 416 in c-Src und die eingeschränkte Substrat-Phosphorylierung durch c-Src.
- * HnRNP K-Varianten, in denen die einzelnen oder vier Polyprolin-Motive mutiert waren, wurden *in vitro* und *in vivo* unverändert durch aktive Src-Formen als Substrate erkannt und phosphoryliert. Die Interaktion der hnRNP K-Varianten mit c-Src wurde nicht beeinflusst. Es konnte bereits gezeigt werden, dass hnRNP K *in vitro* und *in vivo* durch PRMT 1 asymmetrisch di-methyliert wird, wodurch die Aktivierung von c-Src verhindert wird. Die methylierten Arginine 296 und 299 befinden sich direkt zwischen den für die Aktivierung von c-Src notwendigen Polyprolin-Motiven. Ihre Methylierung könnte die Wechselwirkung mit der SH 3-Domäne sterisch behindern, was erklären würde, weshalb c-Src durch methyliertes hnRNP K nicht aktiviert werden kann.
- * Ein Peptid, welches die Aminosäuren 285 bis 318 repräsentiert, ist ebenfalls in der Lage c-Src *in vitro* zu aktivieren. Die Aktivierung von c-Src benötigt somit keine zusätzliche Interaktion und die Polyprolin-Motive P2₍₂₎, P2₍₃₎, P3₍₁₎ und P3₍₂₎ in hnRNP K sind nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für eine Aktivierung von c-Src.
- * Die Polyprolin-Motive P2₍₂₎, und P3₍₁₎ gehören zur SH 3-Liganden Klasse I (RxxPxxP) wohingegen P2₍₃₎ und P3₍₂₎ zur Klasse II (PxxPxR) gehören. Eine Präferenz von c-Src für eine bestimmte Klasse konnte nicht nachgewiesen werden.
- * Untersuchungen zur Interaktion und Aktivierung der Tyrosinkinase c-Src, Lyn Fyn und Lck mit hnRNP K ergaben, dass lediglich c-Src durch hnRNP K aktiviert wird, wofür möglicherweise spezifische Wechselwirkungen zwischen dem RT-*loop* von c-Src und hnRNP K ausschlaggebend sind. Eine stabile Interaktion mit hnRNP K, die nicht über die Polyprolin-SH 3-Wechselwirkung vermittelt wird, konnte sowohl für c-Src als auch Lck *in vivo* nachgewiesen werden.
- * Die C-terminal verkürzten hnRNP K-Varianten (1-242) und (1-250) nicht jedoch (1-218) interagieren mit c-Src *in vitro* und *in vivo*. Der Bereich für die stabile Interaktion mit c-Src in hnRNP K konnte durch BiFC-Untersuchungen auf die Aminosäuren 216 bis 226 im direkten Anschluss an die KH-Domäne 2 eingegrenzt werden, die sich von hnRNP E1 unterscheiden. Wurden diese Aminosäuren durch die entsprechende Sequenz aus hnRNP E1 ersetzt (Aminosäuren 169 bis 179), so war in weniger als 19% der Fälle eine Interaktion mit c-Src zu detektieren. Der Austausch eines PxxP-Motivs (P224A/P227A) oder verschiedener Aminosäuren im Bereich 211 bis 221 in hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2)) hatte jedoch *in vivo* keinen Einfluss auf die Interaktion, da alle Varianten in über 85% der Fälle mit c-Src interagierten.

- * Die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K *in vitro* wird ausschließlich durch die Polyprolin-Motive bewirkt, unabhängig davon, ob die stabile Interaktion der beiden Proteine gestört war. Auch wenn die stabile Interaktion zwischen hnRNP K und c-Src unterbunden wurde, konnte hnRNP K weiterhin phosphoryliert werden. Wurden beide Interaktionen verhindert, so war keine spezifische Substrat-Phosphorylierung mehr nachweisbar.
- * HnRNP K (Δ 216-226), das keine stabile Interaktion mit c-Src eingeht, jedoch die Polyprolin-Motive enthält, wurde durch c-Src stärker phosphoryliert als hnRNP K. Die stabile Interaktion könnte für die Phosphorylierung der direkt angrenzenden Tyrosine 225, 230, 234 und 236 in hnRNP K erforderlich sein.
- * Die Interaktion von Lck mit hnRNP K hängt ebenfalls von den Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K ab und ist unabhängig von den Polyprolin-Motiven. Die Homodimer-Bildung von hnRNP K wurde durch die Deletion der Aminosäuren 216 bis 226 oder die veränderten Polyprolin-Motive *in vivo* nicht gestört. Die Interaktion mit hnRNP E1 ist *in vivo* ebenfalls unabhängig von den Polyprolin-Motiven, wird jedoch deutlich eingeschränkt, wenn die Aminosäuren 216 bis 226 in hnRNP K deletiert sind.

Die Polyprolin-Motive P2⁽²⁾, P2⁽³⁾, P3⁽¹⁾ und P3⁽²⁾ in hnRNP K sind für die spezifische Aktivierung von c-Src notwendig und ausreichend. Interessanterweise konnte diese aktivierende Wechselwirkung von einer stabilen Interaktion der Proteine separiert werden. In hnRNP K konnte hierfür die Aminosäuren 216 bis 226 identifiziert werden. Eine stabile Interaktion über die Aminosäuren 216 bis 226 kann zwischen hnRNP K und c-Src oder Lck ausgebildet werden, jedoch nicht mit Lyn oder Fyn. Möglicherweise trägt die stabile Interaktion auch dazu bei, dass vier Tyrosine, die sich direkt neben dieser Aminosäuresequenz befinden, spezifisch phosphoryliert werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adolph, D., Flach, N., Mueller, K., Ostareck, D.H. and Ostareck-Lederer, A.** (2007) Deciphering the cross talk between hnRNP K and c-Src: the c-Src activation domain in hnRNP K is distinct from a second interaction site. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1758-1770.
- Alexandropoulos, K. and Baltimore, D.** (1996) Coordinative activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein, Sin. *Genes Dev.* 10, 1341-1355.
- Alexandropoulos, K., Cheng, G. and Baltimore, D.** (1995) Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.* 92, 3110-3114.
- Backe, P.H., Messias, A.C., Ravelli, R.B.G., Sattler, M. and Cusack, S.** (2005) X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure* 13, 1055-1067.
- Bairoch, A., Bucher, P. and Hofmann, K.** (1997) The PROSITE database, its status. *Nucl. Acids Res.* 25, 217-221.
- Bakker, W.J., Blazquez-Domingo, M., Kolbus, A., Besooyen, J., Steinlein, P., Beug, H., Coffey, P.J., Löwenberg, B., von Lindern, M. and van Dijk, T.B.** (2004) FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J. Cell Biol.* 164, 175-184.
- Bedford, T.M., Frankel, A., Yaffe, M.B., Clarke, S., Leder, P. and Richards, S.** (2000) Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J. Biol. Chem.* 275, 16030-16036.
- Biesinger, B., Tsygankov, A.Y., Fickenscher, H., Emmrich, F., Fleckenstein, B., Bolen, J.B. and Broker, B.M.** (1995) The product of the Herpesvirus saimiri open reading frame 1 (tip) interacts with T cell-specific kinase p56lck in transformed cells. *J. Biol. Chem.* 270, 4729-4734.
- Bjorge, J.D., Pang, A. and Fujita, D.J.** (2000) Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 275, 41439-41446.
- Boffa, L.C., Karn, J., Vidali, G. and Allfrey, V.G.** (1977) Distribution of N^G,N^G-dimethylarginine in nuclear protein fractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 969-976.
- Boggon, T.J. and Eck, M.J.** (2004) Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918-7927.
- Bomsztyk, K., Denisenko, O. and Ostrowski, J.** (2004) hnRNP K: One protein multiple processes. *Bioessays* 26, 629-638.

- Bougeret, C., Delaunay, T., Romero, F., Jullien, P., Sabe, H., Hanafusa, H., Benarous, R. and Fischer, S.** (1996) Detection of a physical and functional interaction between Csk and Lck which involves the SH2 domain of Csk and is mediated by autophosphorylation of Lck on tyrosine 394. *J. Biol. Chem.* 271, 7465-7472.
- Braddock, D.T., Baber, J.L., Levens, D. and Clore, G.M.** (2002) Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. *EMBO J.* 21, 3476-3485.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Branscombe, T.L., Frankel, A., Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z.Z., Pestka, S. and Clarke, S.** (2001) PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 32971-32976.
- Briggs, S.D., Sharkey, M., Stevenson, M. and Smithgall, T.E.** (1997) SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* 272, 17899-17902.
- Brown, M.T. and Cooper, J.A.** (1996) Regulation, substrates and functions of Src. *Biochem. Biophys. Acta* 1287, 121-149.
- Brugge, J.S. and Erikson, R.L.** (1977) Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* 269, 346-348.
- Burnham, M.R., Bruce-Staskal, P.J., Harte, M.T., Weidow, C.L., Ma, A., Weed, S.A. and Bouton, A.H.** (2000) Regulation of c-Src activity and function by the adaptor protein CAS. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5865-5878.
- Castoldi, G.L. and Beutler, E.** (1988) Erythrocyte. In: Atlas of blood cells. Function and Pathology. Zucker-Franklin, D., Graves, M.F., Grossi, C.E. and Marmont, A.M., editors. Edi-Ermes, Milano and Lea und Febiger, Philadelphia, 49-80.
- Chiou, Y.-Y., Lin, W.-J., Fu, S.-L. and Lin, C.-H.** (2007) Direct mass-spectrometric identification of Arg296 and Arg299 as the methylation sites of hnRNP K protein for methyltransferase PRMT1. *The Prot. J.* 26, 87-93.
- Chong, J.P., Mulhern, T.D., Zhu, H.J., Fujita, D.J., Bjorge, J.D., Tantiogco, J.P., Sotirellis, N., Lio, D.S.S., Scholz, G. and Cheng, H.C.** (2004) A novel non-catalytic mechanism employed by the C-terminal Src-homologous kinase to inhibit Src-family kinase activity. *J. Biol. Chem.* 279, 20752-20766.
- Cicchetti, P., Mayer, B.J., Thiel, G. and Baltimore, D.** (1992) Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* 257, 803-806.
- Cohen, G.B., Ren, R. and Baltimore, D.** (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80, 237-248.

- Collier, B., Goobar-Larsson, L., Sokolowski, M. and Schwartz, S.** (1998) Translational inhibition *in vitro* of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogeneous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 273, 22648-22656.
- Cook, J.R., Lee, J.H., Yang, Z.H., Krause, C.D., Herth, N., Hoffmann, R. and Pestka, S.** (2006) FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginin residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 472-481.
- Cooper, J.A.** (1990) in Peptides and Protein Phosphorylation (ed. Kemp. B.E.) 85-114, *CRC Press Boca Raton. FL.*
- Cooper, J.A. and MacAuley, A.** (1988) Potential positive and negative autoregulation of p60c-src by intermolecular autophosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4232-4236.
- Cooper, J.A., Gould, K.L., Cartwright, C.A. and Hunter, T.** (1986) Tyr527 is phosphorylated in pp60c-Src: implication for regulation. *Science* 231, 1431-1434.
- Côté, J., Boisvert, F.-M., Boulanger, M.-C., Bedford, M.T. and Richard, S.** (2003) Sam68 RNA binding protein is an *in vivo* substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol. Biol. Cell* 14, 274-287.
- Courtneidge, S.A.** (1985) Activation of the pp60c-src kinase by middle T antigen binding or by dephosphorylation. *EMBO J.* 4, 1471-1477.
- Courtneidge, S.A., Levinson, A.D. and Bishop, J.M.** (1980) The protein encoded by the transforming gene of avian sarcoma virus (pp60^{src}) and a homologous protein in normal cells (pp60^{proto-src}) are associated with the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3783-3787.
- Craig, D., Howell, M.T., Gibbs, K., Hunt, T. and Jackson, R.J.** (1992) Plasmid cDNA protein synthesis in a coupled eukaryotic *in vitro* transcription-translation system. *Nucl. Acids Res.* 20, 4987-4995.
- David-Pfeuty, T. and Nouvian-Dooghe Y.** (1990) Immunolocalization of the cellular src protein in interphase and mitotic NIH c-src overexpresser cells. *J. Cell Biol.* 111, 3097-3116.
- David-Pfeuty, T., Bagrodia, S. and Shalloway, D.** (1993) Differential localization patterns of myristoylated and nonmyristoylated c-Src proteins in interphase and mitotic c-Src overexpresser cells. *J. Cell Sci.* 105, 613-628.
- Dejgaard, K. and Leffers, H.** (1996) Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains: Different properties of different domains. *Eur. J. Biochem.* 241, 425-431.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. and Kataoka, N.** (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 195-205.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S. and Burd, C.G.** (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 289-321.

- Du, Q., Melnikova, I.N. and Gardner, P.D.** (1998) Differential effects of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K on Sp1- and Sp3-mediated transcriptional activation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor promoter. *J. Biol. Chem.* 273, 19877-19883.
- Dyson, H.J. and Wright, P.E.** (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 197-208.
- Eck, M.J., Shoelson, S.E. and Harrison, S.C.** (1993) Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56lck. *Nature* 362, 87-91.
- Erpel, T. and Courtneidge, S.A.** (1995) Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr. Biol.* 7, 176-182.
- Erpel, T., Superti-Furga, G. and Courtneidge, S.A.** (1995) Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions. *EMBO J.* 14, 963-975.
- Evans, J.R., Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Ostrowski, J., Bomsztyk, K., Ostareck, D.H and Willis, A.E.** (2003) Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 22, 8012-8020.
- Feng, S., Chen, J.K., Simon, J.A. and Schreiber, S.L.** (1994) Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* 266, 1241-1247.
- Feng, S., Kasahara, C., Rickles, R.J. and Schreiber, S.L.** (1995) Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12408-12415.
- Fleming, J., Thiele, B.-J., Chester, J., O'Prey, J., Janetzky, S., Aitken, A., Anton, I.A., Rapoport, S.M. and Harrison, P.R.** (1989) The complete sequence of rabbit erythroid cell-specific 15-lipoxygenase mRNA: comparison of the predicted amino acid sequence of the erythroid lipoxygenase with other lipoxygenases. *Gene* 79, 181-188.
- Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T.L., Clarke, S. and Bedford, M.T.** (2002) The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 277, 3537-3543.
- Gey, G.O., Coffman, W.D. and Kubicek, M.T.** (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-265.
- Gibson, T.J., Thompson, J.D. and Heringa, J.** (1993) The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Lett.* 324, 361-366.
- Gilmer, T.M. and Erikson, R.L.** (1981) Rous sarcoma virus transforming protein p60^{src}, expressed in E.coli, functions as a protein kinase. *Nature* 294, 771-773.

- Glickman, M.H. and Ciechanover, A.** (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373-428.
- Gonfloni, S., Frischknecht, F., Way, M. and Superti-Furga, G.** (1999) Leucine 255 of Src couples intramolecular interactions to inhibition of catalysis. *Nature* 6, 760-764.
- Gonfloni, S., Williams, J.C., Hattula, K., Weijland, A., Wierenga, R.K. and Superti-Furga, G.** (1997) The role of the linker between the SH2 domain and the catalytic domain in the regulation and function of Src. *EMBO J.* 16, 7261-7271.
- González, L., Agulló-Ortuño, M.T., Garcia-Martinez, J.M., Calcabrini, A., Gamallo, C., Palacios, J., Aranda, A. and Martin-Pérez, J.** (2006) Role of c-Src in human MCF7 breast cancer cell tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 281, 20851-20864.
- Graham, F.L. and Van der Eb, A.J.** (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus V DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Gray, N. and Hentze, M.W.** (1994) Iron regulatory protein prevents binding of the 43S pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *EMBO J.* 13, 3882-3891.
- Grüllich, C., Duvoisin, R.M., Wiedmann, M. and van Leyen, K.** (2001) Inhibition of 15-Lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte. *FEBS Lett.* 489, 51-54.
- Guillonau, F., Guieysse, A.L., Le Caer, J.P., Rossier, J. and Praseuth, D.** (2001) Selection and identification of proteins bound to DNA triple helical structures by combination of 2D-electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* 29, 2427-2436.
- Habelhah, H., Shokat, K. Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A.L., Hentze, M.W. and Ronai, Z.** (2001) Erk phosphorylation is required for nuclear export of hnRNP K and subsequent inhibition of mRNA. *Nature Cell Biology* 3, 325-330.
- Hamaguchi, I., Yamaguchi, N., Suda, J., Iwama, A., Hirao, A., Hashiyama, M., Aizawa, S. and Suda, T.** (1996) Analysis of Csk homologous kinase (CHK/HYL) in hematopoiesis by utilizing gene knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 172-179.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T.** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
- Harrison, S.C.** (2003) Variation of an Src-like theme. *Cell* 112, 737-740.
- Hartley, D.A., Amdjadi, K., Hurley, T.R., Lund, T.C., Medveczky, P.G. and Sefton, B.M.** (2000) Activation of the Lck tyrosine protein kinase by the Herpesvirus saimiri Tip protein involves two binding interactions. *Viol.* 276, 339-348.
- Höhne, M., Thiele, B.-J., Prehn, S., Giessmann, B., Nack, B. and Rapoport, S.M.** (1988) Activation of translationally inactive lipoxygenase mRNA particles from rabbit reticulocytes. *Biomed. Biochem. Acta* 47, 75-78.

- Hu, C.-D. and Kerppola, T.K.** (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotech.* 21, 539-545.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K.** (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* 9, 789-798.
- Hubbard, S.R.** (1999) Src autoinhibition: let us count the ways. *Nature* 6, 711-714.
- Hubbard, S.R. and Till, J.H.** (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 373-398.
- Huse, M. and Kuriyan, J.** (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-282.
- Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., DICTENBERG, J., Lorenz, M., Meng, X.H., Bassell, G.J., Condeelis J. and Singer, R.H.** (2005) Spatial regulation of b-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438, 512-515.
- Iakoucheva, L.M., Brown, C.J., Lawson, J.D., Obradović, Z. and Dunker, A.K.** (2002) Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol. Biol.* 323, 573-584.
- Jackson, R.J. and Hunt, T.** (1983) Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Meth Enzymol.* 96, 50-74.
- Jones, N., Blasutig, I.M., Eremina, V., Ruston, J.M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S.S., Takano, T., Quaggin S.E., Pawson T.** (2006) Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440, 818-823.
- Jove, R. and Hanafusa, H.** (1987) Cell transformation by the viral src oncogene. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 31-56.
- Jung, J.U., Lang, S.M., Friedrich, U., Jun, T., Roberts, T.M., Desrosiers, R.C., Biesinger, B.** (1995) Identification of Lck-binding elements in Tip of Herpesvirus saimiri. *J. Biol. Chem.* 270, 20660-20667.
- Kamps, M.P., Buss, J.E. and Sefton, B.M.** (1986) Rous sarcoma virus transforming protein lacking myristic acid phosphorylates known polypeptide substrates without inducing transformation. *Cell* 45, 105-112.
- Kaplan, J.M., Varmus, H.E. and Bishop, J.M.** (1990) The src protein contains multiple domains for specific attachment to membranes. *Mol. Cell Biol.* 10, 1000-1009.
- Kaplan, K.B., Swedlow, J.R., Varmus, H.E. and Morgan, D.O.** (1992) Association of p60c-src with endosomal membranes in mammalian fibroblasts. *J. Cell Biol.* 118, 321-333.
- Karplus, K., Barrett, C. and Hughey, R.** (1998) Hidden markov models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics* 14, 846-856.

- Kato, J.Y., Takeya, T., Grandori, C., Iba, H., Levy, J.B. and Hanafusa, H. (1986) Amino acid substitutions sufficient to convert the nontransforming p60c-src protein to a transforming protein. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4155-4160.
- Kay, B. K., Williamson, M. P. and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14, 231-241.
- Kiledjian, M., Wang, X. and Liebhaber, S.A. (1995) Identification of two KH domain proteins in the α -globin mRNP stability complex. *EMBO J.* 14, 4357-4364.
- Kim, J.H., Hahm, B., Kim, Y.K., Choi, M. and Jang, S.K. (2000) Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 298, 395-405.
- Kim, S., Merrill, B.M., Rajpurohit, R., Kumar, A., Stone, K.L., Papov, V.V., Schneiders, J.M., Szer, W., Wilson, S.H., Paik, W.K. and Williams, K.R. (1997) Identification of N^G-methylarginine residues in human RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochem.* 36, 5185-5182.
- Klinghoffer, R.A., Sachsenmaier, C., Cooper, J.A. and Soriano, P. (1999) Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* 18, 2459-2471.
- Kmieciak, T.E. and Shalloway, D. (1987) Activation and suppression of pp60^{c-src} transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* 49, 65-73.
- Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F. Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. and Sowadski, J.M. (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 251, 407-414.
- Krokowski, D., Tchorzewski, M., Boguszewska, A., Grankowski, N. (2005) Acquisition of a stable structure by yeast ribosomal P0 protein requires binding of P1A-P2B complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1724, 59-70.
- Krueger, J.G., Garber, E.A. and Goldberg, A.R. (1983) Subcellular localization of pp60src in RSV-transformed cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 107, 51-124.
- Kühn, U., Nemeth, A., Meyer, S. and Wahle, E. (2003) The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 278, 16916-16925.
- Kurowski, M.A. and Bujnicki, J.M. (2003) GeneSilico protein structure prediction meta-server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3305-3307.
- Kussick, S.J. and Cooper, J.A. (1992a) Phosphorylation and regulatory effects of the carboxy terminus of a drosophila src homolog. *Oncogene* 7, 1577-1586.
- Kussick, S.J. and Cooper, J.A. (1992b) Overexpressed drosophila src64B is phosphorylated at its carboxy-terminal tyrosine, but is not catalytically repressed, in cultured drosophila cells. *Oncogene* 7, 2461-2470.
- Kypta, R.M., Goldberg, Y., Ulug, E.T. and Courtneidge, S.A. (1990) Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell* 62, 481-492.

- Lang, S.M., Iafate, A.J., Stahl-Hennig, C., Kuhn, E.M., Nisslein, T., Kaup, F.-J., Haupt, M., Hunsmann, G., Skowronski, J. and Kirchhoff, F.** (1997) Association of simian immunodeficiency virus Nef with cellular serine/threonine kinases is dispensable for the development of AIDS in rhesus macaques. *Nat. Med.* 3, 860-865.
- Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z.-H., Mirochnitchenko, O., Gunderson, S.I., Felix, A.M., Herth, N., Hoffmann, R. and Pestka, S.** (2005) PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *J. Biol. Chem.* 280, 3656-3664.
- Lee, C.H., Leung, B., Lemmon, M.A., Zheng, J., Cowburn, D., Kuriyan, J. and Saksela, K.** (1995) A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J.* 14, 5006-5015.
- Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S. and Bedford, M.T.** (2005) PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family *J. Biol. Chem.* 280, 32890-32896.
- Levin, V.A.** (2004) Basis and importance of Src as a target in cancer. *Cancer Treat. Res.* 119, 89-119.
- Li, S.S.-C.** (2005) Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem. J.* 390, 641-653.
- Lim, W.A., Richards, F.M. and Fox, R.O.** (1994) Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* 372, 375-379.
- Lin, W.-J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S. and Herschman, H.R.** (1996) The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine *N*-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 271, 15034-15044.
- Lindberg, R.A. and Pasquale, E.B.** (1991) Isolation of cDNA clones that encode active protein tyrosine kinases using antibodies against phosphotyrosine. *Methods Enzymol.* 200, 557-564.
- Liu, Q. and Dreyfuss, G.** (1995) *In vivo* and *in vitro* arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2800-2808.
- Liu, X., Marengere, L.E., Koch, C.A. and Pawson, T.** (1993) The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5225-5232.
- Lund, T., Medveczky, M.M., Neame, P.J. and Medveczky, P.G.** (1996) A herpesvirus saimiri membrane protein required for interleukin-2 independence forms a stable complex with p56lck *J. Virol.* 70, 600-606.
- Lupher, M.L. Jr., Songyang, Z., Shoelson, S.E., Cantley, L. C. and Band, H.** (1997) The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 272, 33140-33144.

- Lynch, M., Chen, L., Ravitz, M.J., Mehtani, S., Korenblat, K., Pazin, M.J. and Schmidt, E.V.** (2005) hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6436-6453.
- Martin, S.G.** (2001) The hunting of the Src. *Nature* 2, 467-475.
- Matsuda, M., Mayer, B.J., Fukui, Y. and Hanafusa, H.** (1990) Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science* 248, 1537-1539.
- Mayer, B.J.** (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell Sci.* 114, 1253-1263.
- Mayer, B.J. and Eck, M.J.** (1995) SH3 domains: minding your p's and q's. *Curr. Biol.* 5, 364-367.
- Mayer, B.J., Hirai, H. and Sakai, R.** (1995) Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinases. *Curr. Biol.* 5, 296-305.
- McGrath, J.P. and Levinson, A.D.** (1982) Bacterial expression of an enzymatically active protein encoded by RSV *src* gene. *Nature* (London) 295, 423-425.
- Medenbach, J., Schreiner, S., Liu, S., Lührmann, R. and Bindereif, A.** (2004) Human U4/U6 snRNP recycling factor p110: mutational analysis reveals the function of the tetratricopeptide repeat domain in recycling. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7392-7401.
- Messias, A.C., Harnisch, C., Ostareck-Lederer, A., Sattler, M. and Ostareck, D.H.** (2006) The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src mediated tyrosin phosphorylation. *J. Mol. Biol.* 361, 470-481.
- Miau, L.-H., Chang, C.-J., Shen, B.-J., Tsai, W.-H. and Lee, S.-C.** (1998) Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP K) as a repressor of C/EBP β -mediated gene activation. *J. Biol. Chem.* 273, 10784-10791.
- Michael, W.M., Choi, M. and Dreyfuss, G.** (1995) A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83, 415-422.
- Michael, W.M., Eder, P.S. and Dreyfuss, G.** (1997) The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.* 16, 3587-3598.
- Michelotti, E.F., Michelotti, G.A., Aronsohn, A.I. and Levens, D.** (1996) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol Cell. Biol.* 16, 2350-2360.
- Mikula, M., Dzwonek, A., Karczmarski, J., Rubel, T., Dadlez, M., Wyrwicz, L.S., Bomsztyk, K. and Ostrowski, J.** (2006) Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. *Proteomics* 6, 2395-2406.

- Miller, W.E., Maudsley, S., Ahn, S., Kahn, K.D., Lutrell, L.M. and Lefkowitz, R.J.** (2000) Beta-arrestin 1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-Src. Role of beta-arrestin 1-dependent targeting of c-Src in receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 275, 11312-11319.
- Miranda, T.B., Miranda, M., Frankel, A. and Clarke, S.** (2004) PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 279, 22902-22907.
- Moarefi, I., Lafevre-Bernt, F., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.-H., Kuriyan, J. and Miller, W.T.** (1997) Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650-653.
- Molina, T.J., Kishihara, K., Siderovskid, D.P., Van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C.J., Hartmann, K.-U., Veillette, A., Davidson, D. and Mak, T.W.** (1992) Profound block in thymocyte development in mice lacking p56^{lck}. *Nature* 357, 161-164.
- Muckenthaler, M., Gray, N.K. and Hentze, M.W.** (1998) IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol. Cell* 2, 383-388.
- Müller, K.** (2006). Untersuchungen zur Charakterisierung der hnRNP K-Interaktionsdomäne in der Tyrosin-Kinase c-Src. *Halle/Saale, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Diplomarbeit.*
- Musacchio, A., Noble, M., Pauptit, R., Wierenga, R. and Saraste, M.** (1992) Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature* 359, 851-855.
- Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione Morelli, M.A., Nilges, M., Gibson, T.J. and Pastore, A.** (1996) Three-dimensional structure and stability of the KH domain: Molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell* 85, 237-245.
- Naarmann, I.S., Harnisch, C., Flach, N., Kremmer, E., Kühn, H., Ostareck, D.H. and Ostareck-Lederer, A.** (2007) mRNA silencing in human erythroid cell maturation: hnRNP K controls the synthesis of its regulator c-Src. *Mol Cell Biol.* Eingereicht zur Publikation.
- Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J.A. and Nakagawa, H.** (1991) Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60^{c-src}. *Nature* 351, 69-72.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A.** (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology* 20, 87-90.
- Nakamoto, T., Sakai, R., Ozawa, K., Yazaki, Y. and Hirai, H.** (1996) Direct binding of C-terminal region of p130cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 8959-8965.

- Nasertorabi, F., Alonso, A., Rogers, S.W., Mustelin, T., Vuori, K., Liljasc, L. and Elya, K.R.** (2005) Crystallization of the SH2-binding site of p130Cas in complex with Lck, a Src-family kinase. *Acta Cryst.* F61, 174-177.
- Nasertorabi, F., Tars, K., Becherer, K., Kodandapani, R., Liljas, L., Vuori, K. and Ely, K.** (2006) Molecular basis for regulation of Src by the docking protein p130Cas. *J. Mol. Recognit.* 19, 30-38.
- Noble, M.E., Musacchio, A., Saraste, M., Courtneidge, S.A. and Wierenga, R.K.** (1993) Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin. *EMBO J.* 12, 2617-2624.
- Okada, M. and Nakagawa, H.** (1989) A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60^{c-src} function. *J. Biol. Chem.* 264, 20886-20893.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N. and Hentze, M.W.** (2001) Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 104, 281-290.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.-J., Mann, M. and Hentze, M.W.** (1997) mRNA silencing in erythroid maturation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell* 89, 597-606.
- Ostareck-Lederer, A. and Ostareck, D.H.** (2004) Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: the function of hnRNPs K and E1/E2. *Biol. Cell* 96, 407-411.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H. and Hentze, M.W.** (1998) Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNP K and hnRNP E1/E2. *Trends Biochem. Sci.* 23, 409-411.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G. and Hentze, M.W.** (2002) c-Src mediated phosphorylation of hnRNP K drives translation activation of specifically silenced mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4535-4543.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Rücknagel, K.P., Schierhorn, A. Moritz, B., Hüttelmaier, S., Flach, N., Handoko, L. and Wahle, E.** (2006) Asymmetric arginine dimethylation of hnRNP K by PRMT1 inhibits its interaction with c-Src. *J. Biol. Chem.* 281, 11115-11125.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Standart, N.M. and Thiele, B.-J.** (1994) Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *EMBO J.* 13, 1476-1481.
- Ostrowski, J., Schullery, D.S., Denisenko, O.N., Higaki, Y., Watts, J., Aebersold, R., Stempka, L., Gschwendt, M. and Bomsztyk, K.** (2000) Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. *J. Mol. Chem.* 275, 3619-3628.

- Ostrowski, J., Sims, J.E., Sibley, C.H., Valentine, M.A., Dower, S.K., Meier, K.E. and Bomsztyk, K. (1991) A serine/threonine kinase activity is closely associated with a 65-kDa phosphoprotein specifically recognized by the kappa B enhancer element. *J. Biol. Chem.* 266, 12722-12733.
- Parsons, J.T. and Weber, M.J. (1989) Genetics of src: structure and functional organization of a protein tyrosine kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 147, 79-127.
- Pawson, T. and Nash, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445-452.
- Pellicena, P. and Miller, W.T. (2001) Processive phosphorylation of p130Cas by Src depends on SH 3-polyproline interactions. *J. Biol. Chem.* 276, 28190-28196.
- Persson, P.B., Skalweit, A., Mrowka, R. and Thiele, B.J. (2003) Control of renin synthesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R491-R497.
- Qui, C., Chang, J., Zhu, Y., Yeldani, A.V., Rao, S.M. and Zhu, Y.-J. (2002) Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor α . *J. Biol. Chem.* 277, 28624-28630.
- Radhakrishnan, I., Pérez-Alvarado, G.C., Parker, D., Dyson, H.J., Montminy, M.R. and Wright, P.E. (1997) Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions. *Cell* 91, 741-752.
- Rameh, L.E., Chen, C.-S. and Cantley, L.C. (1995) Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* 83, 821-830.
- Rapoport, S.M. and Schewe, T. (1986) The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 864, 471-495.
- Ritchie, S.A., Pasha, M.K., Batten, D.J.P., Sharma, R.K., Olson, D.J.H., Ross, A.R.S. and Bonham, K. (2003) Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (Spy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription. *Nucleic Acids Res.* 31, 1502-1513.
- Rodriguez, M., Li, S.S., Harper, J.W. and Songyang, Z. (2004) An oriented peptide array library (OPAL) strategy to study proteinprotein interactions. *J. Biol. Chem.* 279, 8802-8807.
- Rohrschneider, L.R. (1980) Adhesion plaques of Rous sarcoma virus-transformed cells contain the src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 77, 351-358.
- Roskoski, R.Jr. (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1155-1164.
- Roskoski, R.Jr. (2005) Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1-14.

- Rous, P.** (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13, 397-411.
- Roussel, R.R., Brodeur, S.R., Shalloway, D. and Laudano, A.P.** (1991) Selective binding of activated pp60c-src by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60c-src. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10696-10700.
- Rusanescu, G., Qi, H., Thomas, S.M., Brugge, J.S. and Halegoua, S.** (1995) Calcium influx induces neurite growth through a Src-Ras signaling cassette. *Neuron* 15, 1415-1425.
- Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y. and Hirai, H.** (1994) A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes *in vivo* with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* 13, 3748-3756.
- Saksela, K., Cheng, G. and Baltimore, D.** (1995) Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef-viruses but not for down-regulation of CD4. *The EMBO J.* 14, 484-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.*
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sic. USA* 12, 5463-5467.
- Schewe, T., Rapoport, S.M. and Kühn, H.** (1986) Enzymology and physiology of reticulocyte 15-lipoxygenase: Comparison with other lipoxygenases. *Adv. Enzymol.* 58, 191-272.
- Schullery, D.S., Ostrowski, J., Denisenko, O.N., Stempka, L., Shnyreva, M., Suzuki, H., Gschwendt, M. and Bomsztyk, K.** (1999) Regulated interaction of protein kinase C δ with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein. *J. Biol. Chem.* 274, 15101-15109.
- Schurter, B.T., Koh, S.S., Chen, D., Bunick, G.J., Harp, J.M., Hanson, B.L., Henschen-Edman, A., Mackay, D.R., Stallcup, M.R. and Aswad, D.W.** (2001) Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochem.* 40, 5747-5756.
- Seidel-Dugan, C., Meyer, B.E., Thomas, S.M. and Brugge, J.S.** (1992) Effects of SH2 and SH3 deletions on the functional activities of wild-type and transforming variants of c-Src. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1835-1845.
- Shenoy, S., Chackalaparampil, I., Bagrodia, S., Lin, P.H. and Shalloway, D.** (1992) Role of p34cdc2-mediated phosphorylations in two-step activation of pp60c-src during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 7237-7241.
- Shnyreva, M., Schullery, D.S., Suzuki, H., Higaki, Y. and Bomsztyk, K.** (2000) Interaction of two multifunctional proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 15498-15503.
- Sicheri, F. and Kuriyan, J.** (1997) Structures of the Src-family tyrosine kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 777-785.
- Sicheri, F., Moarefi, I. and Kuriyan, J.** (1997) Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602-609.

- Sigal, E., Craik, C.S., Highland, E., Grunberger, D., Costello L.L., Dixon, R.A.F. and Nadel, J.A.** (1988) Molecular cloning and primary structure of human 15-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 157, 457-464.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M. and Dreyfuss, G.** (1993) The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucl. Acids Res.* 21, 1193-1198.
- Skalweit, A., Doller, A., Huth, A., Kahne, T., Persson, P.B. and Thiele, B.J.** (2003) Posttranscriptional control of renin synthesis: identification of proteins interacting with renin mRNA 3' untranslated region. *Circ. Res.* 92, 419-427.
- Smart, J.E., Oppermann, H., Czernitofsky, A.P., Purchio, A.F., Erikson, R.L. and Bishop, J.M.** (1981) Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of rous sarcoma virus (pp60^{v-src}) and its normal cellular homologue (pp60^{c-src}). *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 78, 6013-6017.
- Smith, J.J., Rücknagel, K.P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder, M., Hershman, H.R. and Wahle, E.** (1999) Unusual sites of arginine methylation in poly(A)-binding protein II and *in vitro* methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J. Biol. Chem.* 274, 13229-13234.
- Snyder, M.A., Bishop, J.M., McGrath, J.P. and Levinson, A.D.** (1985) A mutation at the ATP-binding site of pp60^{v-src} abolishes kinase activity, transformation, and tumorigenicity. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1772-1779.
- Songyang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M.F., Piwnica-Worms, H. and Cantley, L.C.** (1994) Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr. Biol.* 4, 973-982.
- Songyang, Z., Carraway, K.L. 3rd, Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Smith, D.P., Eng, C., Lorenzo, M.J., Ponder, B.A.J., Mayer, B.J. and Cantley, L.C.** (1995) Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373, 536-539.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., Nell, B.G., Birge, R.B., Fajardo, J.E., Chou, M.M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B. and Cantley, L.C.** (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778.
- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R. and Bradley, A.** (1991) Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64, 693-702.
- Spencer, D.M., Graef, I., Austin, D.J., Schreiber, S.L. and Crabtree, G.R.** (1995) A general strategy for producing conditional alleles of src-like tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9805-9809.
- Stein, P.L., Vogel, H. and Soriano, P.** (1994) Combined deficiencies of Src, Fyn and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev.* 8, 1999-2007.

- Stöhr, N., Lederer, M., Reinke, C., Meyer, S., Hatzfeld, M., Singer, R.H. and Hüttelmaier, S.** (2006) ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J. of Cell. Biol.* 175, 527-534.
- Sun, G., Ramdas, L., Wang, W., Vinci, J., McMurray, J. and Budde, R.J.** (2002) Effect of autophosphorylation on the catalytic and regulatory properties of protein-tyrosine kinase Src. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 11-17.
- Superti-Furga, G. and Courtneidge, S.** (1995) Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *Bioessays* 17, 321-330.
- Superti-Furga, G., Fumagalli, S., Koegl, M., Courtneidge, S. and Daretta, G.** (1993) Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src. *EMBO J.* 12, 2625-2634.
- Takimoto, M., Tomonaga, T., Matunis, M., Avigan, M. and Krutzsch, H.** (1993) Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro. *J. Biol. Chem.* 268, 18249-18258.
- Tang, J., Gary, J.D., Clarke, S. and Herschman, H.R.** (1998) PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* 273, 16935-16945.
- Tang, J., Kao, P.N. and Herschman, H.R.** (2000) Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *J. Biol. Chem.* 275, 19866-19876.
- Taylor, S.J. and Shalloway, D.** (1994) An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature* 368, 867-871.
- Thomas, S.M. and Brugge, J.S.** (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513-609.
- Towler, D.A., Gordon, J.L., Adams, S.P. and Glaser, L.** (1988) The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 69-97.
- Trible, R.P., Emert-Sedlak, L. and T. Smithgall** (2006) HIV-1 NEF selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction. *J. Biol. Chem.* 281, 27029-27038.
- Tsien, R.Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu.Rev.Biochem.* 67, 509-544.
- Valentini, S.R., Weiss, V.H. and Silver, P.A.** (1999) Arginine methylation and binding of Hrp1p to the efficiency element for mRNA 3[prime prime or minute]-end formation. *RNA* 5, 272-280.
- Van Leyen, K., Duvoisin, R.M., Engelhardt, H. and Wiedmann, M.** (1989) A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature* 395, 392-395.

- Van Seuning, I., Ostrowski, J., Bustelo, X.R., Sleath, P.R. and Bomsztyk K.** (1995) The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. *J. Biol. Chem.* 270, 26976-26985.
- Wages, D.S., Keefer, J., Rall, T.B. and Weber, M.J.** (1992) Mutations in the SH3 domain of the src oncogene which decrease association of phosphatidylinositol 3'-kinase activity with pp60v-src and alter cellular morphology. *J. Virol.* 66, 1866-1874.
- Waksman, G. and Kuriyan., J.** (2004) Structure and specificity of the SH2 domain. *Cell* 116, S45-S48.
- Waksman, G., Shoelson, S.E., Pant, N., Cowburn, D. and Kuriyan, J.** (1993) Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell* 72, 779-790.
- Wei, C.C., Zhang, S.L., Chen, Y.W., Guo, D.F., Ingelfinger, J.R., Bomsztyk, K. and Chan, J.S.** (2006) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K modulates angiotensinogen gene expression in kidney cells. *J. Biol. Chem.* 281, 25344-25355.
- Weis, D.D., Kjellen, P., Sefton, B.M. and Engen, J.R.** (2006) Altered dynamics in Lck SH3 upon binding to the LBD1 domain of Herpesvirus saimiri Tip. *Prot. Sci.* 15, 2402-2410.
- Weng, Z., Rickles, R.J., Feng, S., Richard, S., Shaw, A.S., Schreiber, S.L. and Brugge, J.S.** (1995) Function-structure analysis of SH3 domains: SH3 binding specificity altered by single amino acid substitution. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5627-5634.
- Weng, Z., Thomas, S.M., Rickles, R.J., Taylor, J.A., Brauer, A.W., Seidel-Dugan, C., Michael, W.M., Dreyfuss, G. and Brugge, J.S.** (1994) Identification of Src, Fyn and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. *Mol. Cell Biol.* 14, 4509-4521.
- Williams, J.C., Weijland, A., Gonfloni, S., Thompson, A., Courtneidge, S.A., Superti-Furga, G. and Wierenga, R.K.** (1997) The 2.35Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J. Mol. Biol.* 274, 757-775.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J. and Harrison, S.C.** (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell.* 3, 629-638.
- Xu, W., Harrison, S.C. and Eck, M.J.** (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602.
- Yamaguchi, H. and Hendrickson, W.A.** (1996) Structural basis for activation of human lymphocyte kinase upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 384, 484-489.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.H., Brauer, A.W. and Schreiber, S.L.** (1994) Structural basis for binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76, 933-945.

- Yu, H., Rosen, M.K., Shin, T.B., Seidel-Dugan, C., Brugge, J.S. and Schreiber, S.L.** (1992) Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science* 258, 1665-1668.
- Yun, C.Y. and Fu, X.-D.** (2000) Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 150, 707-717.
- Zellefrow, C.D., Griffiths, J.S., Saha, S., Hodges, A.M., Goodman, J.L., Paulk, J., Kritzer, J.A. and Schepartz, A.** (2006) Encodable activators of Src family kinases. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 16506-16507.
- Zheng, J., Trafny, E.A., Knighton, D.R., Xuong, N.-H., Taylor, S.S., Ten Eyck, L.F. and Sowadski, J.M.** (1993) 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Cryst. D* 49, 362-365.
- Zheng, X.M., Resnick, R.J. and Shalloway, D.** (2000) A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTP α . *EMBO J.* 19, 964-978.
- Zheng, X.M., Wang, Y. and Pallen, C.J.** (1992) Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 359, 336-339.
- Zrihan-Licht, S., Lim, J., Keydar, I., Sliwkowski, M.X., Groopman, J.E. and Avraham, H.** (1997) Association of Csk-homologous kinase (CHK) (formerly MATK) with HER-2/ErbB-2 in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 272, 1856-1863.

7 ANHANG

7.1 Primer

Tabelle 7.1: Primer für Mutagenesen.

Nr. Sequenz der Primer (Oligonukleotid) in 5' → 3' Richtung

1	GGTCGGGGTGGGCGTGCCATGCCTGCATCTAGAAGAGATTAT
2	ATAATCTCTTCTAGATGCAGGCATGGCACGCCCACCCCGACC
3	AGCCCTCGTCGAGGAGCACCTCCCGCTCCTCCCGGACGAGGC
4	GCCTCGTCCGGGAGGAGCGGGAGGTGCTCCTCGACGAGGGCT
5	CCTCGTCGAGGAGCAGCTCCCCCTGCTCCCGGACGAGGCGGC
6	GCCGCCTCGTCCGGGAGCAGGGGAGCTGGTCCTCGACGAGG
7	CGTCGAGGACCACCTGCCCTCCTGCCGGACGAGGCGGCCGG
8	CCGGCCGCCTCGTCCGGCAGGAGGGGCAGGTGGTCCTCGACG
9	AGAGCTCGGAATCTTGCTCTTCTGCACCACCACCACCTAGA
10	TCTAGGTGGTGGTGGTGCAGGAAGAGCAAGATTCCGAGCTCT
11	AATCTTCCTTCTCCTGCACCACCAGCACCTAGAGGGGGAGAC
12	GTCTCCCCCTCTAGGTGCTGGTGGTGCAGGAAGAGGAAGATT
13	CCAGCTGCCCTGCTGCCGGACGAGGCGG
14	CCGCCTCGTCCGGCAGCAGGGGCAGCTGG
15	GCTCTTCCTGCACCACCAGCACCTAGAGGGGGAGAC
16	GTCTCCCCCTCTAGGTGCTGGTGGTGCAGGAAGAGC
17	GGGAATTCCATATGGGGAGCAGCAAGAGCAA
18	CGCGGATCCCTATAGGTTCTCTCCAGGCTG
19	CCGGAATTCGTGGAAACTGAACAGCCAGAAGAAACC
20	TTTTCTTTTTCGCGCCGCTTAGAAAACTTTCCAGAATACTGCTTCACAC
21	TTTTCTTTTTCGCGCCGCTTACGCAGTCAAAGTCACTTCCTTTATAGTG
22	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAGATGGGAGACTCAGATATAAGATCAAGGATGATCTTTATGC
23	TTTTCTTTTTCGCGCCGCTTACATCATTGTAAAACCACCATAATCATAGG
24	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTATGGGCGTCCGCGACGGTCATCAAACATC
25	GCAGTTGCCATCACCCACTGCAACCAGCCAGCACTATAAAGGAAGTGACTTTGACTGCGAGTTGAG GCTGTTG
26	CAACAGCCTCAACTCGCAGTCAAAGTCACTTCCTTTATAGTGCTGGCTGGTTGCAGTGGGTGATGG CAACTGC
27	GAGTGCATAAAGATCATCCTTGATCTTATATCTGAGCCCAATTTTTACGATGAAACCTATGATTATGG
28	CCATAATCATAGGTTTCATCGTAAAAATTGGGCTCAGATATAAGATCAAGGATGATCTTTATGCACTC
29	GCAGTCGACGGTACCGTGGGGAGCAGC
30	CGCGGATCCTAGGTTCTCTCCAGGCTG
31	GCAGTCGACGGTACCGTGGGCTGTGTCTGCAGCTCAAACCC
32	TTTTCTTTTTCGCGCCGCTCAAGGCTGGGGCTGGTACTGGCCC
33	GCAGTCGACGGTACCGTGAAACTGAACAGC
34	CGGGGTACCGTGGATGCCGGTGTGACTGAAAGTGGAATAAATGTG

35 CGGGGTACCCTAGCTGCACCCCATGCCCTTCTCAGAGG
 36 GATCTTATATCTGAGTCTCCCATCAAAGGAACAATGATGTTTGTATGACCGTCGCGG
 37 CCGCGAXGGTCATCAAACATCATTGTTCTTTGATGGGAGACTCAGATATAAGATC
 38 ACGCTCTCCAGTCTCCGCAAGGGAGAGTCATGCCCAATTTTTACGATGAAACCTATGAT
 39 CATGACTCTCCCTTGGGAGACTGGGAGAGCGTCTCAGATATAAGATCAAGGATGATCTT
 40 CCATCAAAGGACGTGCACAGGCTTATGATGCCAATTTTTACGATGAAACC
 41 GGTTTCATCGTAAAAATTGGCATCATAAGCCTGTGCACGTCCTTTGATGG
 42 CTTATATCTGAGTCTCCCGCCGACAGGACGTGCACAGCCTTATGATCCC
 43 GGGATCATAAGGCTGTGCACGTCCTGCGGCGGGAGACTCAGATATAAG
 44 GCATAAAGATCATCCTTGATGCTGCAGCTGAGTCTCCCATCAAAGGACG
 45 CGTCCTTTGATGGGAGACTCAGCTGCAGCATCAAGGATGATCTTTATGC
 46 GCATAAAGATCATCCTTGCTCTTATATCTGCGTCTCCCATCAAAGGACG
 47 CGTCCTTTGATGGGAGACGCAGATATAAGAGCAAGGATGATCTTTATGC
 48 CTTATATCTGAGTCTCCCATCGCAGGAGGTGCACAGCCTTATGATCCC
 49 GGGATCATAAGGCTGTGCACCTCCTGCGATGGGAGACTCAGATATAAG
 50 GATCATCCTTGATCTTATAGCTGCGGCTCCCATCAAAGGACGTGC
 51 GCACGTCCTTTGATGGGAGCCGCAGCTATAAGATCAAGGATGATC
 52 CATCCTTGATCTTATATCTGCGGCTGCCATCAAAGGACGTGCACAGCC
 53 GGCTGTGCACGTCCTTTGATGGCAGCCGCAGATATAAGATCAAGGATG
 54 CTTATATCTGCGGCTGCCGCCGACAGGACGTGCACAGCCTTATGATCCC
 55 GGGATCATAAGGCTGTGCACGTCCTGCGGCGGCAGCCGCAGATATAAG
 56 GCAGTCGACGGTACCATGGAACTGAACAGC
 57 TTTTCCTTTTGGCGCCGCAAAAAAATTTCCAGAATACTGCTTCACAC

7.2 Konstrukte

Tabelle 7.2: pSG5-Transfektionsplasmide.

Konstrukt	PCR-Primer	Ausgangsplasmid	Ligation über die Schnittstellen	
			5'	3'
PSG5-His-hnRNP K		pSG5-His-hnRNP K		
P1	1 und 2	wt		
P2 ₍₁₎	3 und 4	wt		
P2 ₍₂₎	5 und 6	wt		
P2 ₍₃₎	7 und 8	wt		
P3 ₍₁₎	9 und 10	wt		
P3 ₍₂₎	11 und 12	wt		
P2 _(2,3)	13 und 14	P2 ₍₂₎		
P3 _(1,2)	15 und 16	P3 ₍₂₎		
P2 _(2,3) P3 ₍₂₎	11 und 12	P2 _(2,3)		
P2 _(2,3) P3 _(1,2)	15 und 16	P2 _(2,3) P3 ₍₂₎		

Tabelle 7.3: pET16b-Expressionsplasmide.

Konstrukt	PCR-Primer	Ausgangsplasmid	Ligation über die Schnittstellen	
			5'	3'
pET16b-His-hnRNP K		pET16b-His-hnRNP K		
P1	1 und 2	wt		
P2 ⁽¹⁾	3 und 4	wt		
P2 ⁽²⁾	5 und 6	wt		
P2 ⁽³⁾	7 und 8	wt		
P3 ⁽¹⁾	9 und 10	wt		
P3 ⁽²⁾	11 und 12	wt		
P2 ^(2,3)	13 und 14	P2 ⁽²⁾		
P3 ^(1,2)	15 und 16	P3 ⁽²⁾		
P2 ^(2,3) P3 ⁽²⁾	11 und 12	P2 ^(2,3)		
P2 ^(2,3) P3 ^(1,2)	15 und 16	P2 ^(2,3) P3 ⁽²⁾		
(Δ 216-226)		wt + pV2-hnRNP K (Δ 216-226)	XhoI/SalI*	BamHI
(Δ 216-226)(P2 ^(2,3) P3 ^(1,2))		wt + pV2-hnRNP K [(Δ 216-226)(P2 ^(2,3) P3 ^(1,2))]	XhoI/SalI*	BamHI
pET16b-His-c-Src	17 und 18	pSG5-c-Src	NdeI	BamHI

* die Schnittstellen sind für weitere Klonierungen nicht mehr verwendbar

Tabelle 7.4: pGEX 4T-1-Expressionsplasmide.

Konstrukt	PCR-Primer	Ausgangsplasmid	Ligation über die Schnittstellen	
			5'	3'
pGEX-hnRNP K		pSG5-His-hnRNP K		
P2 ^(2,3) P3 ^(1,2)	19 und 20	P2 ^(2,3) P3 ^(1,2)	EcoRI	NotI
Δ P ₁₋₃	19 und 20	Δ P ₁₋₃	EcoRI	NotI
1-145	19 und 21	wt	EcoRI	NotI
1-218	19 und 22	wt	EcoRI	NotI
1-242	19 und 23	wt	EcoRI	NotI
1-250	19 und 24	wt	EcoRI	NotI
Δ 123-136	19 und 20 25 und 26	wt	EcoRI	NotI

* die Schnittstellen sind für weitere Klonierungen nicht mehr verwendbar

Tabelle 7.5: pVenus-Transfektionsplasmide.

Konstrukt	PCR-Primer	Ausgangsplasmid	Ligation über die Schnittstellen	
			5'	3'
V1-				
c-Src	29 und 30	pSG5-c-Src	KpnI	BamHI
Src (Y416F)	29 und 30	pSG5-c-Src (Y416F)	KpnI	BamHI
Src (Δ SH 2)	29 und 30	pSG5-c-Src (Δ SH 2)	KpnI	BamHI

Src (Δ SH 3)	29 und 30	pSG5-c-Src (Δ SH 3)	KpnI	BamHI
Lck	31 und 32	pUC-Lck	KpnI	NotI/SmaI*
hnRNP K wt	37 und 20	pSG5-His-hnRNP K wt	KpnI	NotI/SmaI*
hnRNP E1 wt	34 und 35	pGEX-hnRNP E1	KpnI	KpnI
V2- hnRNP K				
wt	33 und 20	pSG5-His-hnRNP K wt	KpnI	NotI/SmaI*
P2 _(2,3) P3 _(1,2)	33 und 20	pSG5-His-hnRNP K (P2 _(2,3) P3 _(1,2))	KpnI	NotI/SmaI*
Δ P1-3	33 und 20	pSG5-His-hnRNP K (Δ P1-3)	KpnI	NotI/SmaI*
1-218		pGEX-hnRNP K (1-218)	BamHI	NotI/ KspAI*
1-242		pGEX-hnRNP K (1-242)	BamHI	NotI/ KspAI*
1-250		pGEX-hnRNP K (1-250)	BamHI	NotI/ KspAI*
Δ 221-239	33 und 20 36 und 37	pSG5-His-hnRNP K wt	KpnI	NotI/SmaI*
(Δ 221-239)(P2 _(2,3) P3 _(1,2))	33 und 20 36 und 37	pSG5-His-hnRNP K (P2 _(2,3) P3 _(1,2))	KpnI	NotI/SmaI*
Δ 216-226	33 und 20 27 und 28	pSG5-His-hnRNP K wt	KpnI	NotI/SmaI*
(Δ 216-226)(P2 _(2,3) P3 _(1,2))	35 und 20 27 und 28	pSG5-His-hnRNP K (P2 _(2,3) P3 _(1,2))	KpnI	NotI/SmaI*
K-E1-K	33 und 20 38 und 39	pSG5-His-hnRNP K wt	KpnI	NotI/SmaI*
K-E1-K (P2 _(2,3) P3 _(1,2))	35 und 20 38 und 39	pSG5-His-hnRNP K (P2 _(2,3) P3 _(1,2))	KpnI	NotI/SmaI*
P224A/P227A	40 und 41	pV2-hnRNP K wt		
(P224A/P227A) (P2 _(2,3) P3 _(1,2))	40 und 41	pV2-hnRNP K (P2 _(2,3) P3 _(1,2))		
V2- hnRNP K (P2_(2,3)P3_(1,2))		pV2-hnRNP K (P2 _(2,3) P3 _(1,2))		
I218A/K219A	42 und 43			
L212A/I213A/S214A	44 und 45			
D211A/E215A	46 und 47			
K219A/R221G	48 und 49			
S214A/E215A/S216A	50 und 51			
E215A/S216A/P217A	52 und 53			
E215A/S216A/P217A/ I218A/K219A	54 und 55	E215A/S216A/P217A		
hnRNP K-V2	56 und 57	pSG5-His-hnRNP K wt	KpnI	NotI/SmaI*

* die Schnittstellen sind für weitere Klonierungen nicht mehr verwendbar

7.3 Auszählungen der BiFC-Ergebnisse für die Statistik

Tabelle 7.6: Auszählung der BiFC-Studien. Daten aus drei bis fünf unabhängigen HeLa-Zell-Transfektionsexperimenten. Zellen, die nicht exakt zugeordnet werden konnten, sind mit „Src?“ oder „Venus?“ gekennzeichnet und sind als Fehlerbalken in der Statistik aufgeführt.

Konstrukte		Ausgewertete Zellen					Prozentualer Anteile an transfizierten HeLa-Zellen			
V1-c-Src	V2-hnRNP K	Src	Venus	Src?	Venus?	Zellen	Src [%]	Venus [%]	Src? [%]	Venus? [%]
wt	-	0	0	2	0	222	0	0	0,9	0
wt	wt	220	225	8	3	229	96,07	98,25	3,49	1,31
Y416F	wt	148	147	0	4	153	96,73	96,08	0	2,61
Δ SH 2	wt	147	167	16	12	286	51,4	58,39	5,59	4,2
Δ SH 3	wt	300	285	0	13	300	100	95	0	4,33
wt	Δ P1-3	157	161	3	0	161	97,52	100	1,86	0
wt	P2(2,3)P3(1,2)	142	141	4	3	152	93,42	92,76	2,63	1,97
wt	1-218	51	48	5	8	184	27,72	26,09	2,72	4,35
wt	1-242	191	185	0	6	194	98,45	95,36	0	3,09
wt	1-250	150	150	0	0	150	100	100	0	0
wt	Δ 221-239	134	136	8	8	150	89,3	90,7	5,3	5,3
wt	(Δ 221-239) P2(2,3)P3(1,2)	140	150	5	0	150	93,3	100	3,3	0
wt	Δ 216-226	17	13	12	20	276	6,16	4,71	4,35	7,25
wt	(Δ 216-226) P2(2,3)P3(1,2)	7	13	4	21	248	2,82	5,24	1,61	8,47
wt	K-E1-K	25	31	7	9	193	12,95	16,06	3,63	4,66
wt	K-E1-K P2(2,3)P3(1,2)	34	33	4	10	184	18,48	17,93	2,17	5,43
wt	P224/P227	241	245	3	0	249	96,79	98,39	1,2	0
wt	(P224/P227) P2(2,3)P3(1,2)	151	160	4	3	165	91,52	96,97	2,42	1,82
wt	212-214 P2(2,3)P3(1,2)	267	267	0	2	277	96,39	96,39	0	0,72
wt	214-216 P2(2,3)P3(1,2)	148	150	0	0	157	94,27	95,54	0	0
wt	215-217 P2(2,3)P3(1,2)	145	146	0	4	154	94,16	94,81	0	2,6
wt	218-219 P2(2,3)P3(1,2)	152	152	0	0	155	98,06	98,06	0	0
wt	215-219 P2(2,3)P3(1,2)	180	184	6	6	212	84,91	86,79	2,83	2,83
wt	211 & 215 P2(2,3)P3(1,2)	143	148	6	2	164	87,2	90,24	3,66	1,22
wt	219 & 221 P2(2,3)P3(1,2)	139	139	1	5	152	91,45	91,45	0,66	3,29

DANKSAGUNG

Meinen Mentoren Frau Dr. Antje Ostareck-Lederer und Herr PD Dr. Dirk Ostareck danke ich für die Überlassung des überaus interessanten wie auch ergiebigen Themas, ihre intensive persönliche Betreuung und Unterstützung in den letzten Jahren.

Bei Professor Dr. Elmar Wahle möchte ich mich herzlich für sein Interesse an meiner Arbeit, sowie seine hilfreichen Ratschläge bedanken.

Dr. Stefan Hüttelmaier möchte ich sehr für die freundliche Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie und seine sachkundige Unterstützung bei der Auswertung und Diskussion der BiFC-Studien danken.

Mein besonderer Dank gilt Nadine Flach, für eine harmonische Zusammenarbeit, aber auch für viele angenehme Mittagspausen.

Für viele interessante Diskussionen und Gespräche danke ich Dipl. Biochemikerin Katharina Müller.

Der Abteilung allgemeine Biochemie danke ich für ein angenehmes und kollegiales Arbeitsklima, ganz besonders Marina Schulze und Cornelia Herrmann.

Den GRK-Mitgliedern danke ich für die freundliche Aufnahme und ihr interessantes Feedback.

Der Forschergruppe von Dr. Hüttelmaier möchte ich für die jederzeit bereitwillige Überlassung des Fluoreszenzmikroskops und ihren technischen Beistand danken.

Für ihr stetes Interesse an meiner Arbeit und ihre Unterstützung möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken.

Ich danke Dipl. Biochemiker Felix Stehle für viele ergiebige Diskussionen. Ganz besonders möchte ich ihm jedoch auch für die moralische Unterstützung und Liebe in den vergangenen Jahren danken.

Der DFG danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen außer den angegebenen Hilfsmitteln verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere weiterhin, dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat.

Halle (Saale), den 17.9.2007

Lebenslauf

Dörte Adolph
Diplom-Biochemikerin
geboren am 4.11.1978
in Esslingen am Neckar
ledig

- 10/2003 – 09/2007 Promotionsarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Gruppe „Allgemeine Biochemie“: „Charakterisierung der c-Src Interaktions- und Aktivierungsdomäne in hnRNP K“
- 03/2005 – 09/2006 Assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg 1026 „Conformational transitions in macromolecular interactions“
- 11/2002 – 09/2003 Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Gruppe „Enzymologie“: „Isolierung und Charakterisierung des Isoenzym Pyruvatdecarboxylase 5 aus einer haploiden *Saccharomyces cerevisiae* Mutante“
- 10/1998 – 09/2003 Studiengang Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 08/1989 – 07/1998 Abitur am Raichberg Gymnasium in Ebersbach/Fils
- 08/1985 – 07/1989 Albert Schweitzer Grundschule in Albershausen

Halle (Saale), den 17.9.2007

Publikationsliste

- 03/2007 Adolph *et al.* (2007) *Mol. Cell. Biol.* 27, 1758-1770.
„Deciphering the Cross Talk between hnRNP K and c-Src: the c-Src Activation Domain in hnRNP K is Distinct from a Second Interaction Site”.
- 09/2003 Diplomarbeit: „Isolierung und Charakterisierung des Isoenzym
Pyruvatdecarboxylase 5 aus einer haploiden *Saccharomyces cerevisiae*
Mutante“.