

Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Herr Prof. Dr. med. H.- J. Möller

Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 durch
Phosphorylierung von Spleißfaktoren

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von
Annette M. Hartmann

aus
Koblenz

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Möller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. C. Haass

Prof. Dr. J. Herms

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Dan Rujescu

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2003

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE.....	9
2	ZUSAMMENFASSUNG	11
3	EINLEITUNG.....	12
3.1	Neurofilament Tau	13
3.1.1	Physiologische Rolle des Mikrotubuli- assoziierten Neurofilaments Tau	14
3.1.2	Genstruktur	14
3.1.3	Domänenstruktur und Funktion.....	15
3.1.3.1	Projektionsdomäne	16
3.1.3.2	Mikrotubuli- Bindungsdomäne	17
3.2	Tauopathien	17
3.2.1	Alzheimer Erkrankung	18
3.2.2	Kortikobasale Degeneration	21
3.2.3	Progressive supranukleäre Blickparese.....	22
3.2.4	Morbus Pick.....	23
3.2.5	FTDP- 17	23
3.3	Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10.....	27
3.4	Zusammenhang zwischen Spleißen und Krankheiten	28
3.5	Spleißen.....	30
3.5.1	Prä- mRNA Sequenzinformation.....	30
3.5.2	Spleißreaktion.....	31
3.5.3	Spleißosomformation	32
3.5.3.1	E- Komplex (commitment complex).....	32
3.5.3.2	A- Komplex	32
3.5.3.3	B- Komplex.....	33
3.5.3.4	C- Komplex.....	33
3.5.4	Alternatives Spleißen.....	34

3.5.5	Exon- Erkennung	35
3.5.5.1	Cis- und transregulatorische Elemente	36
3.5.5.2	SR- Proteine	37
3.5.5.3	hnRNP	40
3.5.6	Phosphorylierung	41
3.5.6.1	Protein Kinasen	42
3.6	Zielsetzung	46
4	MATERIAL UND METHODEN.....	48
4.1	Material	48
4.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	48
4.1.2	Geräte.....	49
4.1.3	Zelllinien	50
4.1.4	Bakterienstämme.....	50
4.1.5	Oligonukleotide	50
4.1.6	Plasmide	51
4.1.7	Antikörper	52
4.1.8	Minigene	52
4.1.9	Antibiotika	53
4.1.10	Nährmedien	53
4.2	Methoden	54
4.2.1	Zellkulturmethoden	54
4.2.1.1	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien.....	54
4.2.1.2	Erhaltung der Zelllinien	55
4.2.1.3	Transformation eukaryotischer Zelllinien	55
4.2.2	DNA- Methoden	57
4.2.2.1	Glycerinstammkulturen	57
4.2.2.2	KCM- kompetente E. coli Zellen	57
4.2.2.3	Transformation von KCM- kompetenten <i>E.coli</i> Zellen	57
4.2.2.4	Plasmidisolaton.....	58
4.2.2.5	Elektrophorese von DNA	60
4.2.2.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	60
4.2.2.7	PCR Amplifikation.....	61

4.2.3	RNA- Methoden	62
4.2.3.1	Isolierung von RNA.....	62
4.2.3.2	Reverse Transkription	62
4.2.3.3	Spleißassay	63
4.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	65
4.2.4.1	Immunpräzipitation	65
4.2.4.2	Denaturierende Gelelektrophorese (SDS- PAGE).....	66
4.2.4.3	Westernblot	67
5	ERGEBNISSE	69
5.1	Experimentelles Modell: Minigen- Spleißassay.....	69
5.2	Htra2- β ist ein Transfaktor für das alternative Spleißen von Tau	71
	Exon 10	71
5.3	Htra2- β1 induziert alternatives Spleißen in einem Clk2- Hintergrund.....	73
5.4	Proteinkinasen	75
5.4.1	Clk1- 4	75
5.4.1.1	mClk2 fördert den Ausschluss von Tau Exon 10 in einem heterologen Kontext.....	77
5.4.1.2	Abhängigkeit von der Kinaseaktivität.....	77
5.4.1.3	Selektivität der Spleißstellenerkennung durch Clk2.....	78
5.4.1.4	Der Effekt von Clk2 ist indirekt.....	79
5.4.2	SRPK1A.....	79
5.4.2.1	Regulation von Exon 10 durch SRPK1 und SRPK1a	80
5.4.3	CDK5	81
5.4.4	DYRK 1A	82
5.5	FTDP- 17 Mutationen	83
5.5.1	Spleißverhalten verschiedener FTDP- 17 Mutationen	83
5.5.2	Clk2 beeinflusst das Spleißverhalten verschiedener FTDP- 17 Mutationen	84
5.6	Neomycin.....	86

6	DISKUSSION	87
6.1	Experimentelles Modell: Transfektionsassay.....	87
6.2	Htra2- β Isoformen zeigen unterschiedlichen Einfluss auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10.....	88
6.3	Kinase Clk2 beeinflusst das alternative Spleißen von htra2- β Exons 2+3 und Tau Exon 10	90
6.4	Einfluss des genomischen Kontexts	91
6.5	Phosphorylierungsaktivität ist Voraussetzung für den Clk2 Effekt	91
6.6	Der durch Clk2 induzierte Ausschluss von Tau Exon 10 ist spezifisch..	92
6.6.1	Transfaktoren.....	92
6.6.2	Kinasen.....	93
6.7	FTDP- 17 Mutationen	93
6.7.1	Spleißverhalten verschiedener FTDP- 17 Mutationen	93
6.7.2	Clk2 beeinflusst das Spleißverhalten verschiedener FTDP- 17 Mutationen.....	94
6.8	Modell für die Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10	94
6.9	Fehlregulation alternativen Spleißens und Erkrankungen: Therapeutische Ansätze.....	96
7	LITERATURVERZEICHNIS	101
8	PUBLIKATIONEN	124
9	DANKSAGUNG	127
10	LEBENS LAUF	128

1 Abkürzungen und Fachbegriffe

Abkürzung	Erklärung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriophat
Blot	Transfer
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C- Terminus	Carboxy- Ende
cDNA	Komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
df	Degrees of freedom (Freiheitsgrade)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte (Enhanced) Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescen protein, verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EtBr	Ethidiumbromid
EST	Expressed sequence tag
FCS	Fötales Kälberserum
Flag	Aminosäuresequenz: MetAspTyrLysAspAspAspAspLys, wird durch <input type="checkbox"/> Flag Antikörper erkannt
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd- 3- phosphatdehydrogenase
GST	Gluthation- S- Transferase
HEPES	N- (2- Hydroxyethylpiperazin)- N´- (2- ethansulfonsäure)
H ₂ O	Wasser
hnRNP	Heteronukläres Ribonukleinpartikel
IP	Immunopräzipitation
kb	Kliobasenpaare
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilo- Dalton
LB	Luria- Bertani

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
M	Molar
mbp	Mega-Basenpaare
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
mRNA	Boten- RNA
MW	Mittelwert
N- Terminus	Amino- Ende
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p	Signifikanz, p- Wert
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Primer	DNA- Oligonukleotid
RLT- Puffer	RNA Lysis Tissue (Guadinium- Isothiocyanat haltiger Puffer)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase Inhibitor
rpm	Umdrehung pro Minute
RRM	RNA Erkennungsmotiv
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
RW- Puffer	RNA Waschpuffer
SAF- B	Scaffold attachment factor B
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS- PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese
snRNP	small nuclear ribonucleinparticle
SR- Protein	Serin- Arginin- reiches Protein
Superscript™	RNase H ⁻ Reverse Transkriptase
T	Thymin
TAQ	Thermostabile Polymerase
TBE	Tris- Borat- Na ₂ EDTA Puffer
TE	Tris- EDTA- Puffer
TEMED	N,N,N',N'- Tetratmethyldiamin
Tra	Transformer
U	Uracil
UV	Ultraviolett

2 Zusammenfassung

Tau ist ein Mikrotubuli- assoziiertes Protein, dessen Expression im Nervensystem des Menschen der Regulation durch alternatives Spleißen unterliegt. Das Exon 10 dieses Gens, welches für einen Teil der Mikrotubuli- bindenden Domäne kodiert, ist ein für Erwachsene spezifisches Kassettenexon. Mutationen, die den Einschluss von Exon 10 verstärken, resultieren in der Produktion von Tau- Protein, das vier Mikrotubuli- bindende Aminosäuresequenzwiederholungen enthält. Diese Mutationen scheinen in ursächlichem Zusammenhang mit der Frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus gekoppelt an Chromosom 17 (FTDP- 17) zu stehen. In dieser Arbeit konnte mittels Transfektionsexperimenten gezeigt werden, dass die Verwendung von Exon 10 durch ein komplexes Zusammenspiel der CDC- ähnlichen Kinase Clk2, einer SR- Proteinkinase, und des SR- ähnlichen Proteins humaner Transformer 2- β (Htra2- β) reguliert wird. Kotransfektionsexperimente legen den Schluss nahe, dass diese Regulation über mehrere ineinandergreifende Prozesse abläuft. Die Kinase Clk2 scheint dabei sowohl direkt durch Phosphorylierung bzw. Hyperphosphorylierung von Htra2- β als auch indirekt durch Einfluss auf die alternative Expression der Htra2- β Isoformen in den Regulationsmechanismus einzugreifen. Phosphorylierung von SR- Proteinen führt zu deren Freisetzung aus den nukleären Speicherkomponenten, den *speckles*, und damit zur Aktivierung der Spleißreaktion, während sowohl eine Hyper- als auch eine Hypophosphorylierung in der Regel einen hemmenden Einfluss auf Spleißen ausüben.

Kontrollierte Phosphorylierung scheint demnach zu einer regulierbaren Veränderung von prä- mRNA- Prozessierungswegen zu führen. Eine Interpretation dieser Resultate könnte als Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte verwendet werden.

3 Einleitung

Fehlregulation alternativen Spleißens ist ein Mechanismus, der als Ursache für Erkrankungen des Menschen in zunehmenden Maße an Bedeutung gewinnt [7;13;14]. Die Verwendung alternativer Exons kann durch die Zelle reguliert werden, beispielsweise durch entwicklungsabhängige, zelltyp- oder gewebespezifische Expression von regulatorischen Proteinen. Mutationen in den entsprechenden regulatorischen Elementen der alternativ gespleißten prä-mRNA führen häufig zu pathogenen Variationen in der Zusammensetzung, Konzentration oder Lokalisation von Proteinen. Reguliert wird alternatives Spleißen in der Zelle u.a. durch Signaltransduktionswege, die den Phosphorylierungsgrad regulatorischer Proteine verändern, sowie durch Relokalisation und Synthese von Spleißfaktoren [15]. Eine Aufklärung krankheitsspezifisch veränderter Mechanismen könnte zur Entwicklung von Therapien, bzw. zur Etablierung diagnostischer Marker gegen Erkrankungen, die durch Fehlspleißen hervorgerufen werden, verwendet werden.

So kann beispielsweise eine endgültige Diagnose vieler neurodegenerativer Erkrankungen, wie die der Alzheimer Erkrankung (AD), derzeit erst *post mortem* aufgrund neuropathologischer Kriterien gestellt werden. Für eine Reihe dieser Erkrankungen stellen Tau- positive filamentäre Läsionen ein diagnostisches Merkmal dar. Die Entwicklung neurofibrillärer Bündel zeigt bei der AD ein charakteristisches Muster, das zur Definierung neuropathologischer Stadien eingesetzt wird [16;17]. Neurodegenerative Erkrankungen mit Tau- Pathologie (Tauopathien) zeigen nicht nur phänotypische Heterogenität, sondern auch Unterschiede bezüglich betroffener Strukturen und Zusammensetzungen an Tau- Protein (Tab.1).

In der Regel finden sich diese Ablagerungen in den betroffenen Hirnarealen der entsprechenden Erkrankung. Sie bestehen zu einem hohen Prozentsatz aus hyperphosphoryliertem oder abnorm phosphoryliertem Tau- Protein. Eine biochemische Analyse dieser schwerlöslichen Aggregate mittels Westernblot weist je nach Erkrankung eine spezifische, voneinander unterschiedliche Tau- Protein Isoformkomposition auf. Demzufolge stellt sich die Frage, ob eine Veränderung im Regulationsmechanismus des alternativen Spleißens in ursächlichem Zusammenhang mit dem Auftreten der spezifischen Aggregate und somit der Neurodegeneration steht.

Tab.1: Tau-Pathologie in verschiedenen Erkrankungen

Erkrankung	Tau- Pathologie		Betroffene Regionen
	Glia- Zellen	Neurone	
Alzheimer Erkrankung	keine	NFT und Neuropilfäden PHF: Ø 10- 22nm, Periodizität: 80nm SF: Ø 20- 24nm	Große Pyramidenzellen des Hippokampus und entorhinalen Kortex, supragranuläre (II- III), infragranuläre (V- VI) Schichten der Assoziationskortex
Silberkorn-Krankheit	Dornenförmige und büschelförmige Astrozyten coiled bodies (Oligod.)	Silberkörner SF: Ø 9- 18nm SmF: Ø 25nm	Hippokampus (CA1), entorhinaler und transentorhinaler Kortex, Amygdala, lateraler, tuberaler Kern des Hypothalamus
Kortikobasale Degeneration	Astrozytische Plaques, dornenförmige Astrozyten, coiled bodies (Oligod.)	Achromatische aufgeblähte Neurone, Neuropilfäden, PHF: Ø 13- 18nm, Periodizität: 160- 200nm; SF	Extensive Akkumulation von Tau-immunoreaktiven Neuropilfäden in weißer und grauer Substanz
Morbus Pick	Büschelförmige Astrozyten, oligodendrogliale mikrotubuläre Masse (OMMs)	Aufgeblähte Neurone (Pickzellen), Pick Körperchen (Gallyas negativ, AT8 positiv)	Hippokampus: granuläre Zellen des Gyrus dentatus, CA1 Region, Subiculum, entorhinaler Kortex; Neokortex: Temporal- und Frontallappen (II- VI)
Progressive supranukleäre Blickparese	Dornenförmige und büschelförmige Astrozyten, coiled bodies (Oligod.)	NFTs und Neuropilfäden PHF: Ø 10- 24nm, Periodizität: 150- 300nm SF: Ø 15- 18nm	primärer Motokortex, Basalganglien, Hirnstamm, Cerebellum, perirhinaler inferiorer Temporallappen, Präfrontalkortex

SF- gerade Filamente, SmF- glatte Filamente, PHF- paarig helikale Filamente, NFT- neurofibrilläre Bündel

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Tau- Pathologie für die Alzheimer Erkrankung nach den β - Amyloid Ablagerungen eine sekundäre Rolle spielt. Dies änderte sich jedoch mit der Entdeckung von Mutationen im Tau- Gen, die in direktem Zusammenhang mit FTDP- 17 (Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus gekoppelt an Chromosom 17), einer erblichen Form der Frontotemporalen Demenz, stehen. Dadurch wurde erstmals deutlich, dass Veränderungen im Tau- Metabolismus unabhängig von β - Amyloid Ablagerungen zu Demenz führen können. Weitere Hinweise für die Bedeutung von Tau bei neurodegenerativen Erkrankungen ergaben sich durch die Assoziation eines erweiterten Tau- Haplotyps, sowie eines VNTR (variable number of tandem repeats)- Polymorphismus im Tau- Gen mit der Kortikobasalen Degeneration (CBD) [18], der progressiven supranukleären Blickparese (PSP) [19] und der Frontotemporalen Demenz (FTD) [18].

3.1 Neurofilament Tau

Das Tau- Gen kodiert für sechs hirnspezifische Proteinisofomern, die durch alternatives Spleißen der Kassettenexons 2, 3 und 10 entstehen [20;21]. Fehlregulation der Tau- Proteinphosphorylierung und Isoformzusammensetzung ist

möglicherweise für die Entwicklung der charakteristischen Tau- Filamente verantwortlich, die zur Neurodegeneration führen [22]. Im Hinblick auf den Ursprung einer Tauopathie sind Kaskaden von Bedeutung, die das alternative Spleißens regulieren, und so die Tau- Isoformkomposition beeinflussen können.

3.1.1 Physiologische Rolle des Mikrotubuli- assoziierten Neurofilaments Tau

Das Tau- Protein gehört zu den Mikrotubuli- assoziierten Proteinen (MAP) und findet sich in Tierarten, wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, Zebrafisch, Krallenfrosch, Nager, Rind, Ziege, Affe und Mensch. Es ist ein primär zytoplasmatisches Protein, das ursprünglich in axonalen Kompartimenten der Neurone detektiert wurde [23;24]. Spätere Untersuchungen ergaben, dass es in dephosphorylierter Form auch in Somatodentriten [25], sowie im Nukleus vorliegt [26;27]. Das Tau- Protein ist an der Polymerisation von Tubulindimeren in Mikrotubuli sowie an deren Stabilisierung beteiligt [28-30], wodurch ein neuronales Netz geschaffen wird, das mehrere Rollen erfüllen kann. Mikrotubuli sind nicht nur für die Aufrechterhaltung der Zellform und das zielgerichtete axonale Wachstum essentiell [31], sondern spielen auch beim Transport von Molekülen entlang der Axone eine Rolle. So werden Mikrotubuli- Bahnen geschaffen, die Motoproteinen, beladen mit Vesikeln oder Organellen, den Transport entlang der Mikrotubuli ermöglichen. Desweiteren sind Mikrotubuli an der Interaktion mit anderen zytoskelettalen Elementen beteiligt (zusammengefasst in [32]). Möglicherweise werden Funktionsänderungen durch verschiedene Signaltransduktionswege beeinflusst. Eine Kontrolle könnte entweder direkt, durch Phosphorylierung des Tau- Proteins, oder indirekt, über die Regulation des alternativen Spleißens und folglich der Isoformzusammensetzung, ausgeübt werden.

3.1.2 Genstruktur

Im Menschen wird Tau überwiegend in Neuronen exprimiert. Darüber hinaus sind auch kleinere Mengen in Astrozyten und Oligodendrozyten nachweisbar. Tau ist als Einzelkopie- Gen auf Chromosom 17q21 lokalisiert, enthält 16 Exons und umfasst ca. 100kb [33;34]. Durch alternatives Spleißens der Tau prä- mRNA können mindestens neun Proteinisoformen entstehen.

Transkripte mit 2kb, 6kb, und 9kb werden in Abhängigkeit von der neuronalen Entwicklung und dem Neuronentyp im Nervensystem differentiell exprimiert [35-38]. Das 2kb Tau- mRNA Transkript wird im Nukleus exprimiert, während das 9kb

Transkript, das Exon 4a enthaltende sogenannte *big Tau*, für peripheres Nervensystem und Rückenmark spezifisch ist [39;40].

Im ZNS treten sechs spezifische Isoformen mit einer Länge von 352 bis 441 Aminosäuren auf. Diese entstehen durch alternatives Spleißen der Kassettenexons 2, 3 (Expression von Exon 3 nur in Abhängigkeit von Exon 2) [41;42] und 10 [43]. Auf Proteinebene unterscheiden sich diese Isoformen durch An- bzw. Abwesenheit von

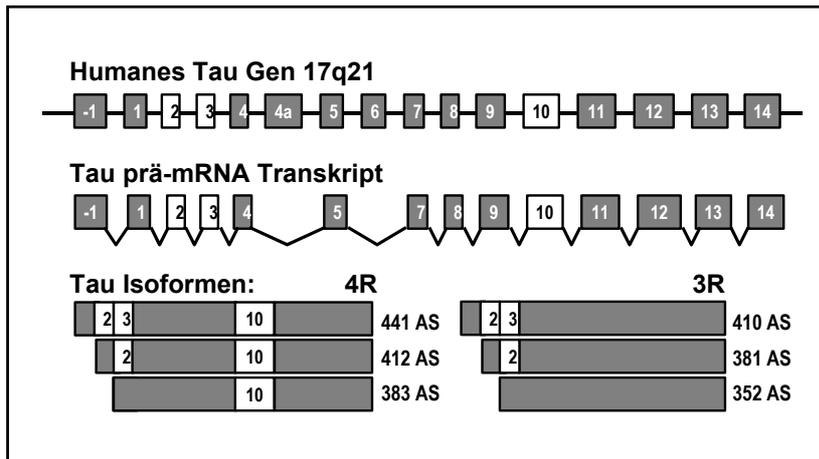


Abb. 1: Exon - Intronstruktur des Tau Gens

Die sechs hirnspezifischen Isoformen können in 3R (- Exon 10) und 4R (+Exon 10) Isoformen unterteilt werden. Boxen symbolisieren Exons, Striche Introns.

29 (Exon 2) oder 58 (Exon 2+3) Aminosäuren in der N-terminalen Hälfte und einer 31 Aminosäure langen Sequenz (Exon 10) im C-terminalen Bereich (Abb.1).

Die Expression dieser sechs Isoformen scheint sowohl gewebe- als auch

entwicklungsabhängig reguliert zu sein. Zum Beispiel findet man keine Tau- mRNA mit eingeschlossenem Exon 10 in den granulären Zellen des Gyrus dentatus [36]. Lediglich eine Isoform, charakterisiert durch den Ausschluss der N- terminalen Exons 2 und 3 und des C- terminalen Exons 10, wird während fötaler Stadien exprimiert, während im erwachsenen Gehirn alle sechs Isoformen detektierbar sind [36]. Dies führt zu der Annahme, dass jede Isoform eine distinkte physiologische Rolle und ein spezifisches Expressionsmuster hat.

3.1.3 Domänenstruktur und Funktion

Ausgehend von der längsten hirnspezifischen Tau- Isoform, charakterisiert durch den Einschluss der Exons 1- 5, 7 und 9- 13, kann das Tau- Protein anhand von biochemischen Merkmalen in zwei Hauptdomänen unterteilt werden, und zwar in die N- terminale Projektionsdomäne und die C- terminale Mikrotubuli- Bindungsdomäne (Abb.2).

3.1.3.1 Projektionsdomäne

Die Projektionsdomäne, benannt nach der Eigenschaft von der Oberfläche der Mikrotubuli aus zu projizieren, ist möglicherweise für Interaktionen mit anderen zytoskelettalen Proteinen oder der Plasmamembran verantwortlich [44;45]. Funktionen der Projektionsdomäne werden normalerweise mit einem Einfluss auf die Zusammensetzung des

Zytoskeletts in Zusammenhang gebracht. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Projektionsdomäne die Abstände axonaler Mikrotubuli zueinander bestimmt [46]. Da dieser Abstand von der Expression verschiedener Mikrotubuli-assoziiierter Proteine (MAP) und ihrer

Isoformen abhängt, könnte die Regulation des alternativen Spleißens von MAP- Tau zur Kontrolle des axonalen Durchmessers beitragen. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass Exon 4a nur im peripheren Nervensystem exprimiert wird, wo Axone mit großem Durchmesser zu finden sind [21;39]. Abgesehen von dieser Distanzbestimmenden Funktion, bindet die Projektionsdomäne an Aktin- und Spektrin-filamente sowie an Bestandteile der Plasmamembran. Dies weist auf eine Funktion bei der Stabilisierung der Mikrotubuli durch Interaktion mit anderen zytoskelettalen Bestandteilen hin und spricht für eine Rolle bei der Entwicklung der Zellpolarität. Hinweise für eine phosphorylierungsabhängige Regulation dieser Prozesse ergeben sich aus der Interaktion der Tau- SH3- Bindungsdomäne (in der prolinreichen Region des Proteins) mit der SH3 Domäne von Fyn (einem Mitglied der Src-Tyrosinkinasefamilie, Teil einer Signaltransduktionskaskade), sowie der Assoziation des Tau/ Fyn- Komplexes mit dem Aktinskelett [47]. Ebenso scheint die Kinase, Plc-γ ebenfalls mit Tau assoziiert zu sein [48].

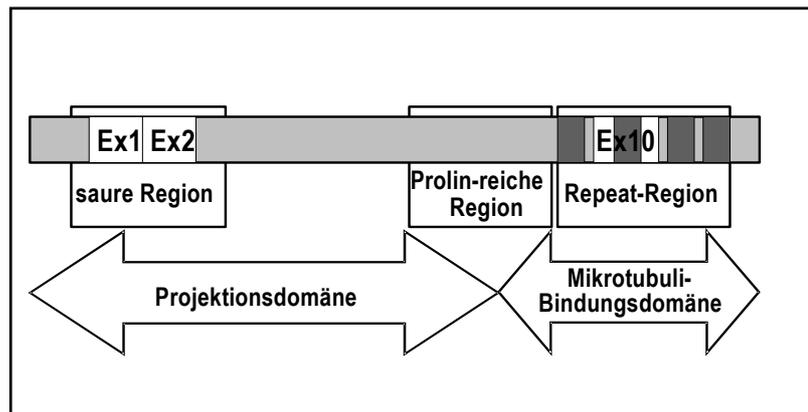


Abb.2: Domänenstruktur des Tau- Proteins

Die N- terminale Projektionsdomäne ist für die Interaktion mit Zellorganellen, Zellmembran und Zytoskelett verantwortlich. Am C- Terminus bestimmt die Anzahl der Aminosäuresequenzwiederholungen die Bindungskapazität an Mikrotubuli. Weiße Boxen: alternative Exons, dunkelgraue Boxen: Aminosäurerepeats

3.1.3.2 Mikrotubuli- Bindungsdomäne

Die Mikrotubuli- Bindungsdomäne befindet sich am carboxyterminalen Ende des Tau- Proteins und umspannt etwa 200 Aminosäuren. Je nach Isoform ist sie durch drei (3R) oder vier (4R) 18 Aminosäuren lange unvollständige Sequenzwiederholungen charakterisiert, die hoch konserviert sind. Diese repetitiven Sequenzen (R1- R4) werden von den Exons 9- 12 kodiert und sind durch weniger konservierte 13 oder 14 Aminosäuren lange Sequenzen verbunden. Die Aminosäure- Wiederholungsdomänen selbst binden nur schwach, während die flankierenden Regionen eine starke Bindungskapazität aufweisen. Nur eine Kombination aus den flankierenden Regionen und den Bindungsrepeats führt zu einer effektiven Bindung [49;50].

Zusätzlich konnte eine starke Mikrotubuli- bindende Aktivität in der prolinreichen Region festgestellt werden [51] und die Region iR1/ R2 (₂₇₄KVQIINKK₂₈₁) zwischen den Repeats R1 und R2 als Mikrotubuli- Bindungsstelle identifiziert werden. Diese Region wird von Exon 10 kodiert und ist daher erwachsenenspezifisch. Sie zeigt eine mehr als zweifach höhere Affinität als jede einzelne Repeatregion und erhöht die Affinität von 4R- Isoformen im Vergleich zu 3R- Isoformen um das 40fache [52].

3.2 Tauopathien

Durch Ein- bzw. Ausschluss von Tau Exon 10 lässt sich die Affinität von Tau an Mikrotubuli regulieren. Im Gehirn gesunder Erwachsener liegen die Tau- Isoformen in löslicher Form im Zytoplasma vor. Das Verhältnis der 3R (- Exon 10) : 4R (+Exon 10)- Isoformen entspricht dabei etwa 1:1. Analysen der stark unlöslichen Tau- Aggregate, die Hauptbestandteil der typischen Ablagerungen verschiedener Tauopathien sind, weisen ein dazu unterschiedliches krankheitsspezifisches biochemisches Profil auf (Abb.3). So lässt sich beispielsweise der Alzheimerschen Erkrankung (AD), der Kortikobasalen Degeneration (CBD) und der Progressiven supranukleären Blickparese (PSP), sowie der Pickschen Erkrankung (PiD) ein bestimmtes Bandenmuster zuweisen.

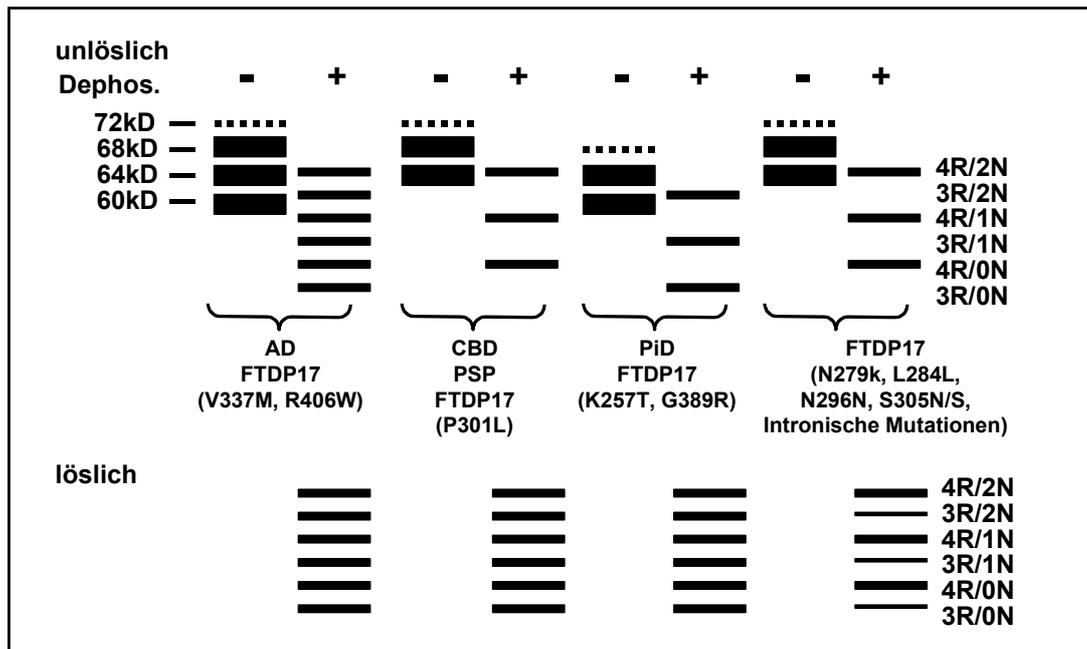


Abb.3: Schematische Darstellung des Westernblot- Bandenmusters von löslichem und unlöslichem Tau- Protein aus verschiedenen Tauopathien

Dargestellt ist das typische Bandenmuster von unlöslichem (vor und nach Dephosphorylierung) und löslichem Tau- Protein nach SDS- Page und Immunoblotting mit α - Tau Antikörpern. Charakteristische Bandenmuster finden sich für AD (Triplet aus 68, 64, 60kD), CBD, PSP (Duplett aus 68 und 64kD) und PiD (64 und 60kD). Für FTDP- 17 finden sich je nach Mutation unterschiedliche Varianten (nach [6]).

3.2.1 Alzheimer Erkrankung

Die von Alois Alzheimer erstmals 1906 beschriebene Erkrankung ist die am weitesten verbreitete progressive neurodegenerative Störung, die zu Demenz bei älteren Menschen führt. Der wohl wichtigste Risikofaktor für AD ist hohes Alter (> 65J.) [53].

Hauptsymptome sind Gedächtnisstörungen, insbesondere des Kurzzeitgedächtnisses, und Orientierungsstörungen in Raum und Zeit bis hin zur eigenen Person. Weitere häufig auftretende Störungen finden sich im Bereich der Aufmerksamkeit, Konzentration, Wortfindung und Sprache. Die Persönlichkeit bleibt relativ lange erhalten.

Morphologische Untersuchungen an Gehirnen von Alzheimer Patienten lassen auf eine Atrophie des frontotemporalen und parietookzipitalen Kortex mit Verschmälerung der Hirnwindungen im mediobasalen Temporallappen bzw. Hippokampus und kompensatorischer Erweiterung der Liquorräume schließen, wobei die morphologische Differenzierung zwischen den Gehirnen von Alzheimer Patienten

und sehr alten Menschen aufgrund der z.T. nur graduellen Unterschiede problematisch sein kann [54].

Histopathologisch ist die Erkrankung durch abnorme Proteinablagerungen im Gehirn gekennzeichnet, die extrazellulär durch Ablagerungen des β - Amyloid Peptids (Amyloid- Plaques) und intrazellulär durch neurofibrilläre Bündel (neurofibrillary tangles: NFT) charakterisiert sind. Die Hauptkomponente der Plaques ist ein 40- 42 Aminosäure langes Proteinfragment, das sogenannte Amyloid- β - Peptid ($A\beta$). Während $A\beta_{40}$ auch im gesunden Gehirn gebildet wird, ist die übermäßige Ablagerung des neurotoxischen, stark zu Aggregation neigenden $A\beta_{42}$ ein hochgradig pathologischer Vorgang. Sowohl $A\beta_{40}$ als auch $A\beta_{42}$ entstehen durch zwei aufeinander folgende proteolytische Spaltungen des Amyloid- Vorläuferproteins (APP), vermittelt durch die β - Sekretase (BACE: β - site cleaving enzyme) [55-59] und γ - Sekretase (Multienzymkomplex aus Präsenilin1 und 2, Nicastrin, APH- 1, PEN- 2) (zusammengefasst in [60]). Die pathologischen Ablagerungen finden sich überwiegend in entorhinaler Rinde, Hippokampus, Großhirnrinde, später auch in Stammganglien, Kleinhirn und subkortikalen Strukturen. Ihre Lokalisation ist nur bedingt mit der der Tau- Ablagerungen vergleichbar.

Die intrazellulären Ablagerungen (NFTs und Neuropilfäden) finden sich in unterschiedlichen Regionen, häufig mit präfrontaler Dominanz. Sie sind neuronenspezifisch und bestehen hauptsächlich aus hyperphosphoryliertem bzw. abnorm phosphoryliertem Tau- Protein, das sich zu paarig helikalen Filamenten (PHF) mit einem Durchmesser von 10- 22nm und einer Periodizität von 80nm zusammenlagert. Daneben finden sich glatte Filamente (straight filaments: SF) mit einem Durchmesser von 20- 24nm.

Biochemisch können die NFTs (PHF und/ oder SF) durch Westernblot charakterisiert werden. Es existieren vier Hauptbanden (55, 64, 69 und 72kD), die aus allen sechs hirnspezifischen Isoformen in einem abnorm phosphorylierten Zustand bestehen (Abb.3, S.18). Neuronale Degeneration scheint die Folge einer Hyperphosphorylierung des Tau- Proteins mit sich anschließender Aggregation zu den charakteristischen NFTs zu sein, aufgrund dessen die Mikrotubuli-Polymerisation und Stabilisierung behindert und u.a. der axonale Transport gestört wird.

Diskussionen über die Hauptursache dieser neurodegenerativen Erkrankung verlaufen noch immer kontrovers, obwohl neuere Erkenntnisse für einen kausalen

Zusammenhang zwischen den beiden Ansichten sprechen [61]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in transgenen Mäusen β - Amyloid Ablagerung die Bildung von neurofibrillären Bündeln in Gehirnbereichen beeinflusst, die bei der Alzheimer Erkrankung betroffen sind [6;62;63]. Da verschiedene transgene Mauslinien trotz zahlreicher seniler Plaques nur wenig neuronalen Zellverlust zeigen [6;64], liegt die Vermutung nahe, dass die Ablagerung von β - Amyloid alleine keine ausreichende Erklärung für den Verlust von Neuronen liefert [64]. Andererseits konnte in transgenen Mausmodellen eine zunehmende Neurodegeneration in Verbindung mit Tau- NFTs nachgewiesen werden [65]. Weiterhin konnte in transgenen Fliegen, die Wildtyp oder Mutanten des Tau- Proteins überexprimieren, eine Akkumulierung von Tau- Protein in Verbindung mit dem Verlust von Neuronen in altersabhängiger Weise nachgewiesen werden [66].

NFT- Bildung und daran anschließende Neurodegeneration scheint durch genetische Faktoren wie Mutationen im APP- Gen und den Präsenilin- Genen, durch Komponenten der Phosphorylierungskaskade, die eine Hyperphosphorylierung des Tau- Proteins bewirken, sowie durch Mutationen im Tau- Gen und in Genen, die das alternative Spleißen von Tau regulieren, beeinflusst zu werden.

Kausale Ansätze zu Therapien beruhen auf der teilweisen Aufklärung der Prozessierungsschritte, die letztendlich zur Neurodegeneration führen (zusammengefasst in [67]). So versucht man z.B. über die Modulation der Sekretasen (Inhibition der β - bzw. γ - Sekretasen, Aktivierung der α - Sekretase) die Entstehung, oder durch spezifische Peptide die Aggregation des A β - Peptids zu verhindern. Ansätze zur Immunisierung mit A β zeigten in transgenen Mäusen vielversprechende Resultate, wie Verhinderung der Plaquebildung in jungen Mäusen und Reduktion der Plaques in älteren Mäusen, verbunden mit verbesserten Gedächtnisleitungen [68-72]. Klinische Studien mit aktiver A β - Immunisierung mussten jedoch nach Auftreten schwerwiegender Entzündungsreaktionen im ZNS gestoppt werden. Weitere Strategien sind die Inhibition der Cholesterolsynthese, Modulation der Tau- Hyperphosphorylierung, neuroprotektive und neurotrophe Agenzien, Hemmung der APP- Expression und A β degradierende Proteasen. Die zur Zeit stark symptomorientierte klinische Behandlung besteht u.a. darin, durch Gabe von Acetylcholinesterase- Hemmern das cholinerge Defizit zu verringern, das aufgrund des Neuronenverlustes entsteht (z.B. im Nukleus basalis Meynert bis zu 80%).

Die sichere Diagnose einer AD kann derzeit erst *post mortem* aufgrund neuropathologischer Befunde gestellt werden. Relativ hohe Sensivität (90%) und Spezifität (77%) liefert die Liquordiagnostik des Phospho- Tau- Spiegels kombiniert mit dem Gehalt an A β [73;74], sowie der Nachweis pathologischer Phospho- Tau- Proteine [74]. Weitere diagnostische Hilfsmittel sind Neuroimaging- Verfahren wie MRT, PET oder SPECT. Eine Kombination der verschiedenen Verfahren erlaubt eine relativ sichere Diagnosestellung.

3.2.2 Kortikobasale Degeneration

Die kortikobasale Degeneration (CBD) ist eine seltene, sporadisch auftretende Tauopathie mit sehr langsamem progredientem Verlauf. Sie ist gekennzeichnet durch eine asymmetrische frontoparietale Atrophie und Depigmentierung der Substantia nigra. Hauptsymptome sind extrapyramidal- motorische Dysfunktionen, wie Rigidität, einseitige Dystonie, Verlust der Feinmotorik und Akinesie [75]. Kognitive Einbußen (Aphasie, Apraxie) sowie eine moderate Demenz treten relativ spät auf [76]. Histopathologisch findet man Neuronenverlust mit Spongiosis und Gliosis in den betroffenen Regionen, sowie achromatische geschwollene (ballooned) Neurone in Kortex, Hirnstamm und subkortikalen Strukturen. Tau- Pathologie zeigt sich in Form von extensiver Akkumulation Tau- immunoreaktiver Neuropillfäden in der grauen und weißen Substanz. Neben neuronalen Tau- Ablagerungen (Neuropillfäden, Tau- Filamente und looped, coiled- Einschlüsse in grauer und weißer Substanz, Kortex, Hirnstamm und subkortikalen Strukturen) lassen sich auch gliale Ablagerungen (astrozytische Plaques, dornenförmige Astrozyten, coiled bodies in Oligodendrozyten) nachweisen (Tab.1, S.13). Biochemisch sind die Tau- Aggregate durch ein Duplett aus (72), 68, 64kD im Westernblot charakterisiert, das nach Dephosphorylierung nur 4R Isoformen enthält, während in der löslichen Fraktion alle sechs Isoformen detektiert werden können (Abb.3) [77-79].

Auf genetischer Ebene findet sich eine Assoziation zu dem erweitertem Tau- Haplotyp H1 [80], der 8 SNPs (I0a, I2c, I3a, E9(ATG), I11g, I13c), einen Dinukleotidrepeat (TG)_{11- 13}, I9) und eine Insertion (Insertion_{238bp}, I9) enthält, sowie eine Assoziation zu dem Allel A0 ((TG)₁₁ Dinukleotidrepeat: I9) (Abb.4). Eine Überlappung des biochemischen und genetischem Profils von CBD und progressiver supranukleärer Blickparese (PSP) legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um unterschiedliche Manifestationen des gleichen Krankheitsmechanismus handelt.

Diese Annahme wird gestützt durch klinische [81] und pathologische Übereinstimmungen [82].

3.2.3 Progressive supranukleäre Blickparese

Bei der progressiven supranukleären Blickparese (PSP) handelt es sich um eine subkortikale Demenz des Alters (Beginn mit ca. 60J.) [83] mit Atrophie der Basalganglien, des Subthalamus und Hirnstamms. Es konnten auch Degeneration in perirhinalem, inferiorem temporalem und präfrontalem Kortex festgestellt werden. Charakteristisch ist das namensgebende Symptom der vertikale Blickparese bis hin zu einer völligen Augenmuskellähmung.

Weitere wichtige Symptome sind Parkinson-ähnliche Symptome (akinetisch-rigide), Dysarthrie, Dysphagie, Instabilität der Körperhaltung und Fallneigung. Relativ früh stellen sich kognitive Störungen subkortikal-frontaler Prägung ein, wie

Verlangsamung des psychischen Tempos, verminderte Aufmerksamkeit und Wortflüssigkeit, sowie Veränderungen der Persönlichkeit (Reizbarkeit mit Antriebsverlust, emotionale Labilität). Eine Demenz entwickelt sich progressiv und ist ein wesentliches Merkmal späterer Stadien [84]. Histopathologische Kennzeichen sind Neuronenverlust mit Spongiosis und Gliosis. Tau-Pathologie findet sich in Gliazellen (dornenförmige und büschelförmige Astrozyten, coiled bodies in Oligodendrozyten, interfaszikuläre Fäden) und Neuronen (Neuropilfäden, runde oder globuläre NFTs) (Tab.1, S.13). Ebenso wie bei der CBD finden sich auch bei der PSP nur 4R Isoformen in den Tau-Aggregaten (Abb.3, S.18), wobei der Überschuss dieser Isoformen bereits auf mRNA-Ebene festgestellt werden kann. Assoziation zu

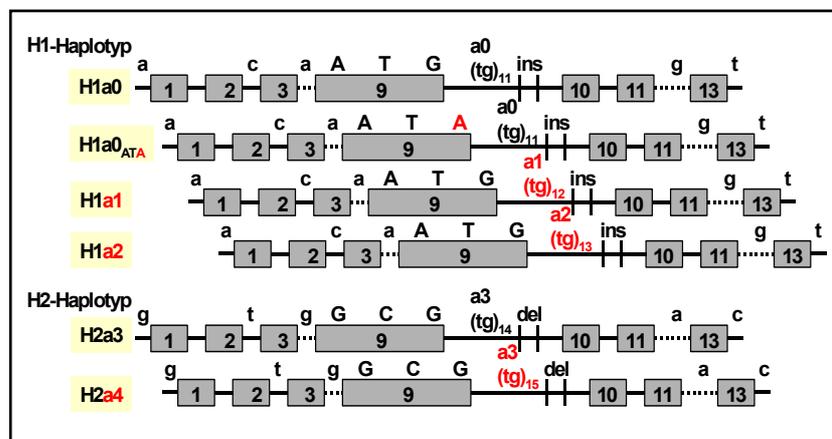


Abb.4: Erweiterter Tau Haplotyp

Schematische Darstellung der Genomstruktur von Tau mit den erweiterten Haplotypen H1 und H2 inklusive ihrer Untergruppen (für H1: a0, a0_{ATA}, a1, a2; für H2: a3, a4). Exons werden durch graue Boxen dargestellt, Introns durch Striche. Rote Beschriftung zeigt Unterschiede innerhalb der Haplotypen an. (aus: <http://perso.wanadoo.fr/adna/TauHaplotypes.html>)

dem erweiterten Haplotyp H1, sowie dem Allel A0 sind mit CBD identisch (Abb.4, S.22). Zusätzlich findet man eine Assoziation zu 2 *missense*- Mutationen in Exon 4a und eine negative Assoziation zu der Deletion_{238bp} in Intron 9 [85-88].

3.2.4 Morbus Pick

Dieser seltene, distinkt fortschreitende Demenzprozess mit schleichendem Beginn, der mit frontotemporaler Lobärotrophie und limbischer Atrophie einhergeht, wurde erstmals von Arnold Pick beschrieben [89]. Hauptsymptome sind Affektstörungen, Veränderungen der Persönlichkeit und zunehmende Sprachverarmung bis Mutismus. Räumliche Orientierung und praktische Fähigkeiten bleiben lange erhalten. Histopathologisch zeichnet sich die Picksche Erkrankung durch aufgeblähte Nervenzellen (Pickzellen), Tau- Pathologie in Glia (büschelförmige Astrozyten und OMMs: oligodendrogliale und mikrotubuläre Masse) und Neuronen (Pick Körperchen: intraneuronale, kugelförmige Einschlüsse) aus. Im Gegensatz zu PSP und CBD findet sich in Aggregatpräparationen ein charakteristisches Duplett aus (68), 64, 60kD, in dem nur 3R Tau- Isoformen enthalten sind (Abb.3, S.18) [77;79;90]. Pick Körperchen finden sich gehäuft in den granulären Neuronen des Gyrus dentatus, der keine 4R Tau- Isoformen exprimiert.

3.2.5 FTDP- 17

FTDP- 17 umfasst eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die mit autosomal- dominant vererbten Mutationen im Tau- Gen gekoppelt sind [91]. Charakteristisch für diese Störungen ist eine Atrophie des frontalen und temporalen Kortex, häufig verbunden mit degenerativen Veränderungen in subkortikalen Bereichen. Hauptsymptome entsprechen denen einer frontalen Demenz einschließlich Persönlichkeitsveränderungen, Verhaltensstörungen, wie Enthemmung, Verlust an Eigenantrieb bis zur Apathie, Verlust an Urteilsfähigkeit und Einsicht, sowie Sprachdefizite. In manchen Fällen treten Parkinsonismus oder Amyotrophie auf [92;93]. Die Neuropathologie ist durch deutlichen neuronalen Verlust in den betroffenen Gehirnregionen gekennzeichnet, verbunden mit glialer und neuronaler Tau- Pathologie (Pick Körperchen, AD- ähnliche bzw. PSP- ähnliche Tau- Pathologie) (Tab.1, S.13). β -Amyloid- Ablagerungen oder andere krankheitsspezifische Veränderungen sind nicht feststellbar.

Bis heute sind mindestens 29 distinkte pathogene Mutationen im Tau- Gen identifiziert worden, die meisten in Familien mit FTDP- 17. Achtzehn davon liegen in kodierenden Regionen, einschließlich der *missense*- Mutationen in den Exons 1, 9, 10, 12 und 13, vier stiller Mutationen und zweier Aminosäuredeletionen in Exon 10. Außerdem wurden neun Nukleotidaustausche in den Introns 9 und 10 gefunden (Abb.5, Tab.2, S.26) (zusammengefasst in [6;32]).

Diese Mutationen kann man anhand ihres unterschiedlichen Mechanismus, der zu Tau- Funktionsstörungen und so vermutlich zur Neurodegeneration führt, in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe umfasst Mutationen, die das alternative Spleißmuster von Tau Exon 10 verändern. Diese Mutationen sind in Exon 10 und den umgebenden Introns lokalisiert und beeinflussen wahrscheinlich regulatorische Elemente auf prä- mRNA Ebene (Abb.6, Tab.2, S.26).

Hinweise darauf liefern Untersuchungen an den um die 5'- Spleißstelle von Exon 10 geclusterten intronischen Mutationen, sowie an mehreren Mutationen innerhalb des Exons 10 (N279K, L284L, S305Ns und S305S). In Folge dieser Mutationen konnte eine relative Zunahme von Exon 10 enthaltender mRNA festgestellt werden, welches eine verstärkte Verwendung der 5'- Spleißstelle dieses Exons reflektiert. Dies könnte eine Folge veränderter regulatorischer Sequenzen des Tau- Gens sein, durch die Bindungsstellen für trans- regulierende Elemente variiert werden. Zum Beispiel wird durch die N279K- Mutation ein purinreicher Enhancer (PPE; Abb.6, S.25) verstärkt, der den Einschluss von Exon 10 fördert [43]. Deletion von K280 zerstört dieses regulierende Element und führt zu einem Überspringen von Exon 10. *In vitro*

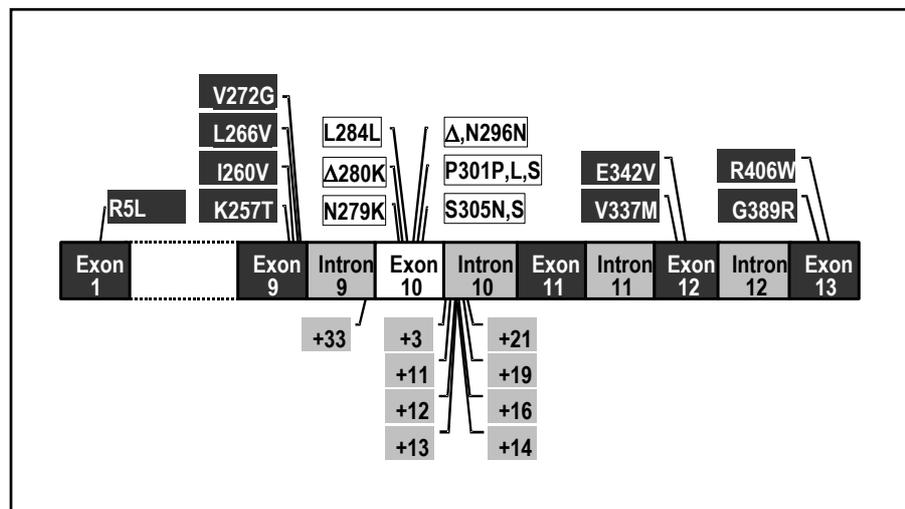


Abb.5: Schematische Darstellung aller bisher bekannten pathogenen Mutationen im Tau Gen

Die Mutationen treten gehäuft in und um das alternative Exon 10 auf. Schwarze Boxen stellen Exons bzw. die darin liegenden Mutationen dar, graue Boxen Introns, weiße Box alternatives Exon 10.

Experimente haben gezeigt, dass ein SR- Protein, der humane Transformer 2-β spezifisch an dieses regulatorische Element bindet und das alternative Spleißen in Abhängigkeit von der Stärke des Enhancers verändert [94]. Die stille L284L Mutation, durch die ein Einschluss von Exon 10 gefördert wird, verändert einen A/ C- reichen Enhancer, sodass der Einschluss von Exon 10 erleichtert wird. Schließlich

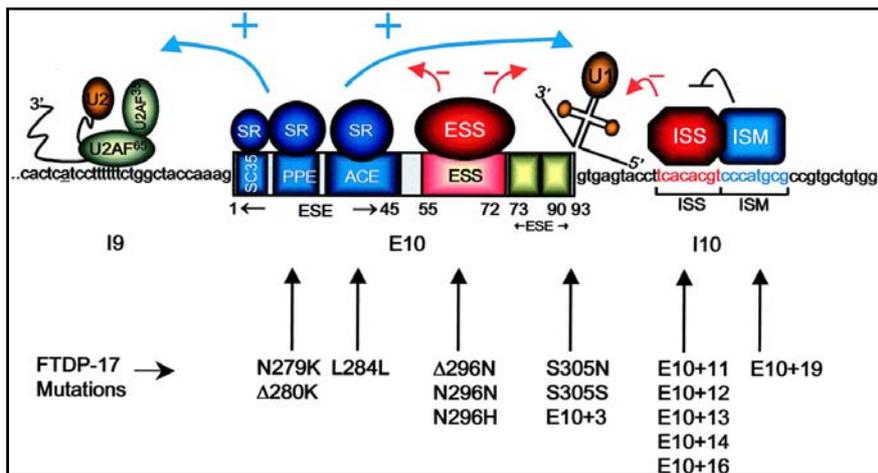


Abb.6: Regulatorische Sequenzen im Bereich um Tau Exon 10
 Mindestens 7 regulatorische Elemente wurden bisher identifiziert, die durch Mutationen in FTDP- 17 beeinflusst werden könnten. SC35-ähnlicher Enhancer, PPE: polypurinreicher Enhancer, ACE: A/ C reicher Enhancer, ESE: exonischer Spleißenhancer, ESS exonischer Spleißsilencer, ISS: intronischer Spleißsilencer, ISM: intronischer Spleißmodulator (nach [11;12])

verbessern die exonischen Mutationen in Kodon 305 das Einspleißen von Exon 10 durch Verstärkung der normalerweise schwachen 3' Spleißstelle und / oder durch Unterbrechung einer potentiell hemmenden prä-mRNA Stemloop-

struktur [95]. Auf diese Weise wird Exon 10 konstitutiv exprimiert und unterliegt nicht mehr der Regulation durch alternatives Spleißen.

Die Mechanismen, durch die diese Änderungen des Verhältnisses von 3R:4R- Tau-Isoformen zu neuronaler und glialer Dysfunktion und Zelltod führen, sind noch unklar. Ein spezifisches Verhältnis der Tau- Isoformen zueinander scheint jedoch für einen normalen Mikrotubuli- Aufbau notwendig zu sein. Ein verändertes Verhältnis und ein daraus folgender Überschuss einer Untergruppe von Isoformen könnte aufgrund veränderter Bindungseigenschaften zu einer Anreicherung an gelöstem Tau- Protein im Zytoplasma führen, was eine Aggregation zu Filamenten auslösen könnte.

Tab.2: Pathogene Mutationen im Tau- Gen

Tau-Gen Mutation	Lokalisation	Effekt auf das Spleißen von Exon 10	Proteinisoformen	Mikrotubuli-Bindung	Referenz
R5L	Ex1	kein Effekt	kein Effekt	vermindert	[96;97]
K257T	Ex9, R1	kein Effekt	Zunahme der 3R-Isoformen	vermindert	[98;99]
I260V	Ex9, R1	nb	nb	nb	[6]
L266V	Ex9, R1	Abnahme von -Ex10	keine Veränderung	vermindert	[100]
G272V	Ex9, R1	kein Effekt	keine Veränderung	vermindert	[95]
+33	In9	nb	nb	nb	[101]
N279K	Ex10, iR1/R2	verstärkt ESE	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[102]
Δ280K	Ex10, iR1/R2	zerstört ESE	keine 4R- Isoformen	vermindert	[101]
L284L	Ex10, iR1/R2	Zerstört ESS	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[103]
Δ296N	Ex10, R2	nb	nb	nb	[104]
N296N	Ex10, R2	Zunahme von +Ex10	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[105]
P301P	Ex10, R2	nb	nb	nb	[106]
P301L	Ex10, R2	kein Effekt	nb	vermindert	[95]
P301S	Ex10, R2	kein Effekt	nb	vermindert	[107;108]
S305N	Ex10, iR2/R3	besserer 5' Konsensus	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[103;109;110]
S305S	Ex10, iR2/R3	besserer 5' Konsensus	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[111]
+3	In10	besserer 5' Konsensus	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[112;113]
+11	In10	besserer 5' Konsensus	nb	kein Effekt	[114]
+12	In10	besserer 5' Konsensus	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[115]
+13	In10	besserer 5' Konsensus	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[95]
+14	In10	besserer 5' Konsensus	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[95]
+16	In10	besserer 5' Konsensus	Zunahme der 4R-Isoformen	kein Effekt	[95]
+19	In10	verändert ISM	Zunahme der 3R- Isoformen	nb	[116]
+21	In10	verändert ISM	Zunahme der 3R- Isoformen	nb	[116]
V337M	Ex12, iR3/R4	kein Effekt	kein Effekt	vermindert	[117]
E342V	Ex12, iR3/R4	nb	nb	nb	[118]
G389R	Ex13	nb	nb	vermindert	[119]
R406W	Ex13	kein Effekt	kein Effekt	vermindert	[95]

Ex- Exon , In- Intron , R- Mikrotubuli- Bindungsrepeat, iR- Interrepeatregion, nb- nicht bestimmt

Im Gegensatz zu obigen Mutationen kann bei einer anderen Gruppe von *missense*- Mutationen eine direkte Veränderung der Mikrotubuli- Bindungseigenschaften angenommen werden (Tab.2). Durch *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass G272V, Δ280K, P301L, P301S, V337M, G389R und R406W die Bindungsfähigkeit von Tau an Mikrotubuli vermindern und so zu einer Reduktion der durch Tau vermittelten Stabilität und Bildung der Mikrotubuli führen [109;117;119-121]. Ähnliche

Effekte konnten auch nach Expression von Tau in verschiedenen Zelllinien festgestellt werden [122-125]. Durch diese Daten wird nahe gelegt, dass die unterschiedlichen Mutationen die Funktion von Tau mittels verschiedener Mechanismen verändern.

3.3 Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10

Gemeinsam ist allen bisher identifizierten *missense*- Mutationen im Tau- Gen, dass sie zu Tau- Ablagerungen und Neurodegeneration führen, und zwar mit einer phänotypischen Bandbreite von FTD, CBD bis zu einer Multisystem-Neurodegeneration, z. T. in ein und demselben genetischen Hintergrund. Die Ursache dieser phänotypischen Variabilität innerhalb einer Genmutation ist nicht bekannt, es gibt jedoch sowohl eine Reihe von Faktoren, die in die Regulation des alternativen Spleißens von Tau involviert sind, als auch andere posttranskriptionale und - translationale Prozesse, die die Proteinstabilität oder Aggregation beeinflussen können. Inwieweit Fehlregulation des alternativen Spleißens von Tau, wie es für bestimmte Mutationen in dieser genetisch bedingten Erkrankung als Ursache anzunehmen ist, auch in sporadischen Tauopathien einen Rolle spielt bzw. wie das alternative Spleißens von Tau reguliert wird, ist noch unklar.

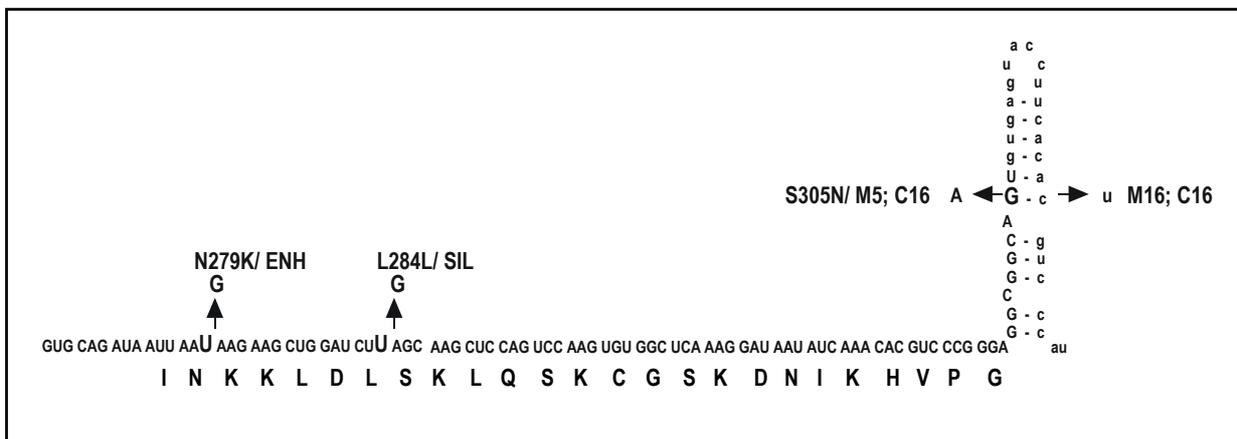


Abb.7: Tau Exon 10 – Sequenz und Mutationen

Sequenzabschnitt der humanen Tau prä- mRNA mit Exon 10 plus flankierende intronische Region. FTDP- 17 Mutationen sind angedeutet. C16 ist eine Doppelmutante [9].

Die Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 scheint dabei jedoch eine Schlüsselrolle einzunehmen. Experimente, in denen Expressionkonstrukte von Tau Exon 10 zusammen mit den am Spleißen beteiligten Proteinen ASF/SF2, SRp55, SRp75 und U2AF65 in Zellkultur exprimiert wurden, zeigten differenzielle

Regulation bezüglich des Ein- oder Ausschlusses von Exon 10. Zusätzlich führte eine Analyse von für FTDP- 17 spezifischen Mutationen (Abb.7) in Abhängigkeit von der eingeführten Mutation zu verändertem Spleißverhalten [12]. Dies weist darauf hin, dass diese Mutationen in regulatorischen prä- mRNA Sequenzen zu finden sind, durch deren Veränderung Interaktionsstellen zerstört werden oder neu entstehen, sodass es zu vermehrtem Ein- oder Ausschluss des alternativen Exons kommt. Die daraus resultierenden Veränderungen auf Proteinebene scheinen an einer Vielzahl genetisch determinierter Erkrankungen ursächlich beteiligt zu sein.

3.4 Zusammenhang zwischen Spleißen und Krankheiten

Wie wichtig die richtige Auswahl von Spleißstellen für den Organismus ist, belegen Krankheiten, bei denen hier Störungen vorliegen [7]. Etwa 15% aller menschlichen Erkrankungen, die durch Mutationen verursacht werden, sind auf Fehlspleißen zurückzuführen. Bisher wurden hauptsächlich Mutationen an den 5', 3'- Spleißstellen und dem Verzweigungspunkt untersucht. Bekannte Beispiele hierfür sind die β - Thalassämien, in denen Mutationen fehlerhafte Spleißstellen im β -Globin- Gen hervorrufen. In zunehmenden Maße werden auch Mutationen in Exon- Enhancern als Krankheitsursache erkannt (Tab.3, S.29). Diese Mutationen ändern oftmals nicht die vorhergesagte Aminosäuresequenz eines Proteins, sondern führen zu einem fehlerhaften alternativen Spleißen. Einige Erkrankungen werden mit Veränderungen der am Spleißen beteiligten Transfaktoren in Zusammenhang gebracht. Während sich beispielsweise der Knockout essentieller Spleißfaktoren als letal erwies [126], verursacht der Knockout eines RNA- Editing- Enzyms [127], sowie die Überexpression mutierter SR-Proteine in *Drosophila* [128] einen Phänotyp, der nicht auf die Mutation einer einzelnen mRNA zurückzuführen sein kann. Es scheint also möglich, dass eine Veränderung der Isoformexpression durch eine Konzentrationsverschiebung der diese prä mRNA prozessierenden Transfaktoren ausgelöst wird. So konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass das Spleißmuster mutierter Allele stark vom Zelltyp abhängt [129]. Dies weist darauf hin, dass Variationen im Bereich der Transfaktoren eine Ursache für die variable Penetranz bestimmter pathologischer Mutationen in Bevölkerungsgruppen mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund darstellen könnten [130].

Tab.3 Krankheitsauslösende Mutationen regulatorischer Sequenzelemente

Störung/Gen	Mutation	Effekt	Phänotyp
Spinale muskuläre Atrophie (SMA) <u>SMN2</u>	stiller C>T Austausch in Exon7	unterbricht ESE	Degeneration von Motoneuronen des Vorderhorns im Rückenmark und progressive Muskelatrophie
Sandhoff-J.-Syndrom <u>β-hexamidase β-Untereinheit</u>	Exon11 P417L, C>T Austausch bei Nukleotid 8 Intron 10 A>G Austausch bei Position -17	unterbricht ESE, bewirkt Verwendung einer kryptischen Spleißstelle bei Nukleotid+112 kryptische Spleißstelle bei Position -37, unterbricht ESI u. mutmaßlichen Verzweigungspunkt	Anreicherung von GM2 Gangliosiden in Neuronen
Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (FTDP 17) <u>Tau</u>	Intron10: +13 A>G, +14 C>T, +16 C>T, IVS 10+3 G>A Exon10 : L284L T>C, S305S T>C, S305N G>A N279K T>G, del280K (AAG-Deletion)	unterbricht ISI IVS10+3 G>A verbessert Spleißstellen-Konsensus unterbricht ESI, S305N G>A verbessert Spleißstellen-Konsensus Unterbricht ESE	Neurodegenerative Erkrankung mit frontotemporaler Demenz, Parkinsonismus und Zeichen für Degeneration des ersten Motoneurons
Porphyria acuta intermittens <u>Porphobilinogen deaminase</u>	R28R C>G	Überspringen von Exon3	Akute Episoden von neuropathischen und abdominalen Symptomen auch Krampfanfälle, Psychosen etc.
Glanzmann-Naegli-Syndrom <u>Integrin GPIIIa</u>	+16 C>A, +134 G>A (in Exon9)	Überspringen von Exon9	Blutungsstörung bei Thrombozytopathie
Hereditäre Tyrosinämie Typ1 <u>Fumarylacetoacetat hydrolase</u>	N232N C>T	Überspringen von Exon8	Metabolische Erkrankung mit Beteiligung von Leber, Niere und peripheren Nerven sowie Risiko für hepatozelluläres Karzinom
Leigh-Enzephalomyelopathie <u>Pyruvat dehydrogenase (E1α)</u>	Stiller S>G Austausch	Fehlerhaftes Spleißen von Exon6	Spongiforme Läsionen im Hirnstamm und in den Basalganglien mit psychomotorischer Retardation, intermittierenden respiratorischen Rhythmusstörungen, Ataxie
Menkes Syndrom <u>MNK</u>	G>R, G>A	Überspringen von Exon8	Multifokale Demyelinisierung im zentralen Nervensystem und adrenokortikale Insuffizienz
Schwerer kombinierter Immundefekt (SCID) <u>Adenosin Deaminase</u>	R142X G>A und C>T im gleichen Kodon	Überspringen von Exon5	Dysfunktion von B und T Lymphozyten, mit gestörter zellulärer Immunität und erniedrigter Produktion von Immunoglobulinen
Metachromatische Leukodystrophie <u>Arylsulfatase A</u>	T409I C>T	aktiviert eine kryptische Spleißstelle	Zerebrosidsulfatspeicherung in den Markscheiden des Nervensystems, klinisch spastische Lähmungen, Optikusatrophie und Demenz
Marfan Syndrom <u>Fibrillin 1</u>	Stiller C>T Austausch in Exon51	Überspringen von Exon51	Bindegewebserkrankung mit okulärer, skeletaler und kardiovaskulärer Beteiligung, Aortenaneurysmen
Xanthomatose <u>CYP27</u>	G112G G>T in Exon2	schafft eine kryptische Spleißstelle und bewirkt Überspringen von Exon2	Lipidspeichererkrankung mit zerebellarer Ataxie, Beteiligung des Rückenmarks und Pseudobulbär-paralyse, Atherosklerose, Katarakt
Beta Thalassämie <u>β-Globin</u>	T>G Transversion bei Position 705 von Intron2	Aktiviert kryptische 3'Spleißstelle in Intron2	Anämie, Hepatosplenomegalie
Dystrophia myotonica <u>DMPK</u>	Ausgeweitete (CUG)>40 Wiederholungen in der 3'UTR	Entweder Sequestrierung oder Veränderung der Verwendung des alternativen Exons	Klinisch u.a. Myotonie, Muskeldystrophie, Katarakt, Hypogonadismus und EKG Veränderungen

Der Name des betroffenen Gens befindet sich unter dem Krankheitsnamen und ist unterstrichen. Punktmutationen, die Spleißstellen verändern, können unter www.cookie.imcb.osaka-u.ac.jp/nakai/asdb.html nachgesehen werden (aus [3]).

3.5 Spleißen

Das Genom von Eukaryoten liegt in einer Exon- Intronstruktur vor. Dabei bilden Introns mit ca. 95% der chromosomalen DNA den Hauptanteil, lediglich 5% enthalten tatsächlich in Protein umsetzbare Information. Fast alle für Protein kodierenden Bereiche der Primärtranskripte der RNA Polymerase II werden durch intronische Sequenzen unterbrochen, die in einem als Spleißen bezeichneten Prozess entfernt werden. Diese Reaktion findet im Nukleus, und dort im Spleißosom statt und erfolgt ko- bzw. posttranskriptionell. In höheren Eukaryoten variiert die Anzahl der Introns von intronlos bis zu über fünfzig Introns für eine prä- mRNA, ihre Länge kann mehr als 200.000 Nukleotide betragen. Die Existenz dieser intervenierenden Sequenzen und die Verwendung alternativer kodierender Bereiche in einem einzelnen Gen liefern die Möglichkeit, der erhöhten Variabilität des Proteoms (bis zu 250.000 Proteine [131]) im Vergleich zum Genom (ca. 23.000 - 40.000 Gene [132;133]) Rechnung zu tragen.

3.5.1 Prä- mRNA Sequenzinformation

Die wichtigsten für die Entfernung der Introns notwendigen Sequenzelemente markieren die Exon/ Intron Grenzen. Man unterscheidet drei essentielle Sequenzelemente [134]:

1. 5'- Spleißstellen- Konsensus: YRG/ GURRGU, wobei in 1% aller Introns GC statt GU zu finden ist [135] (die Spleißstelle ist mit einem Querstrich markiert, i.d.R. invariante Nukleotide sind unterstrichen, R=Purin, Y=Pyrimidin, N= Nukleotid)
2. Dem 3'- Spleißstellen- Konsensus Y₁₂NYAG/ geht in den meisten Vertebraten eine Folge von Polypyrimidinnukleotiden voraus.
3. Das dritte essentielle Element ist der Verzweigungspunkt (branchpoint) YNCURAY. Meistens liegt er etwa 18- 40 Nukleotide 5'- der 3'- Spleißstelle, kann aber auch bis zu 200 Nukleotide entfernt sein.

Außer dieser Hauptgruppe von GU- AG Introns findet man noch eine seltenere Form, die sogenannten ATAC Introns. Sie sind durch andere Konsensussequenzen gekennzeichnet (5'- Spleißstelle: /AUAUCUU, 3'- Spleißstelle: CAC/ , Verzweigungspunkt: UCCUUAAC) und werden durch ein separates Spleißsystem prozessiert [136;137].

Weitere, für das Spleißen wichtige Sequenzabschnitte der prä- mRNA sind die sogenannten Enhancer (Verstärker) und Silencer (Inhibitor), kurze schwach konservierte Bereiche, die sowohl in Introns als auch in Exons zu finden sind.

3.5.2 Spleißreaktion

Die Entwicklung eines *in vitro* Spleißsystems war Voraussetzung für Aufklärung der grundlegenden Spleißreaktion. Aus Studien mit radioaktiv markierter prä- mRNA als

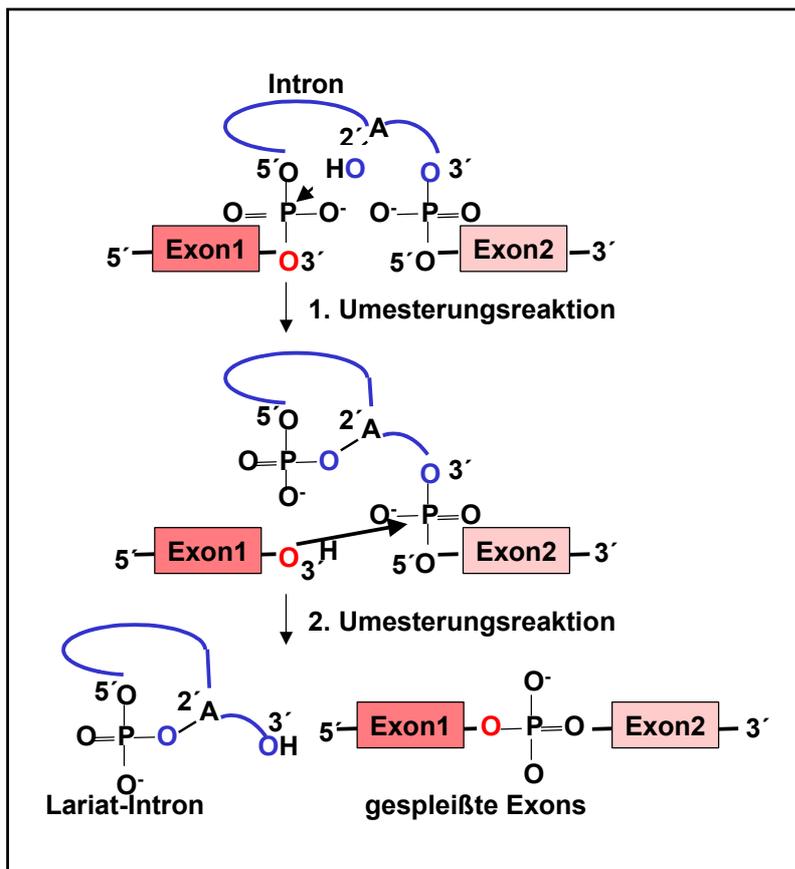


Abb.8: Umesterungen der Spleißreaktion

O- rot: 3'-Sauerstoff von Exon 1

O- blau: 2'-Sauerstoff des Verzweigungspunkts, 3'-Sauerstoff des Introns

Resultat der beiden Umesterungsreaktionen der Spleißreaktion sind das Lariat- Intron und die ligierten Exons.

Substrat, die mit nukleärem Extrakt aus HeLa Zellen inkubiert wurde, weiß man, dass die Entfernung der Introns und das anschließende Religieren der Exons in 2 distinkten Schritten abläuft (Abb.8). Es handelt sich hierbei um zwei Umesterungsreaktionen. Die Reaktionen werden durch einen nukleophilen S_{N2} -Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des Adenosins am Verzweigungspunkt auf die 3', 5'- Phosphodiesterbindung an der 5'- Spleißstelle eingeleitet. Zeitgleich mit der

Spaltung bindet die 5'- terminale Phosphatgruppe des intronischen Guanosins an das Adenosin des Verzweigungspunktes in einer 2', 5'- Phosphodiesterbindung. Die so entstandenen Intermediate sind das abgesplattene 5'- Exon und das Intron - 3'- Exon in einer lassoähnlichen Konformation („Lariatstruktur“). Im zweiten Schritt erfolgt die Freisetzung des Lariat- Introns und die Verbindung der beiden

benachbarten Exons durch den Angriff der freien 3'-Hydroxylgruppe des 5'-Exons auf die Phosphodiesterbindung der 3'-Spleißstelle.

3.5.3 Spleißosomformation

Die oben beschriebene Spleißreaktion wird durch das Spleißosom katalysiert, einer dynamischen spleißkompetenten Struktur. Ein Spleißosom sedimentiert mit 50-60S und enthält damit eine ähnlich komplexe Struktur wie Ribosomen. Notwendig zur Bildung des katalytischen Zentrums des Spleißosoms sind die kleinen nukleären RNAs (snRNAs) U1, U2, U4/ U6 und U5, die mit verschiedenen Proteinen zu Partikeln assoziiert sind (snRNPs) [138]. Die Primärstruktur der snRNAs variiert zwischen unterschiedlichen Spezies, während die Sekundärstruktur hoch konserviert ist. Das Zusammenfügen der Spleißosomkomponenten zu einem Komplex sowie die Spleißreaktion erfolgen über vier Zwischenstadien, wobei der Übergang zwischen den einzelnen Stadien ATP-abhängig und mit signifikanten strukturellen Veränderungen verbunden ist (Abb.9, S.33).

3.5.3.1 E- Komplex (commitment complex)

Der erste spezifische Schritt bei der Zusammenlagerung des Spleißosoms ist die Bindung der U1-snRNA an die 5'-Spleißstelle der prä-mRNA durch Basenpaarung des 5'-Endes der U1-snRNA mit der konservierten Sequenz an der 5'-Spleißstelle. Die Bindung des U1-snRNP an die 5'-Spleißstelle erleichtert die Erkennung des Polypyrimidintrakts und der 3'-Spleißstelle durch den Hilfsfaktor U2AF [139;140]. Interaktion von Spleißfaktor 1 (SF1) mit U2AF führt zur Erkennung des Verzweigungspunktes.

3.5.3.2 A- Komplex

Die Bildung des prä-Spleißkomplexes A wird durch Bindung des U2-snRNPs an den Verzweigungspunkt eingeleitet. Die Basenpaarung zwischen einer internen Region der U2-snRNA und dem Verzweigungspunkt resultiert in der Formation einer kurzen Helix, welche das konservierte Adenosin hervorwölbt. Durch diese Interaktion wird das Adenosin für den nukleophilen Angriff der ersten Umesterungsreaktion zugänglich.

3.5.3.3 B- Komplex

Durch Interaktion der U4/ U6- und U5- snRNPs in Form eines U4/ U6- U5 tri- snRNP-Komplexes mit dem A- Komplex wird der Spleißkomplex B gebildet.

3.5.3.4 C- Komplex

Konformationsänderungen innerhalb des B- Komplexes führen zur Bildung des katalytisch aktiven C- Komplexes. Eine der Folgen dieser strukturellen Veränderungen ist die Destabilisierung der extensiven Basenpaarung zwischen U4-

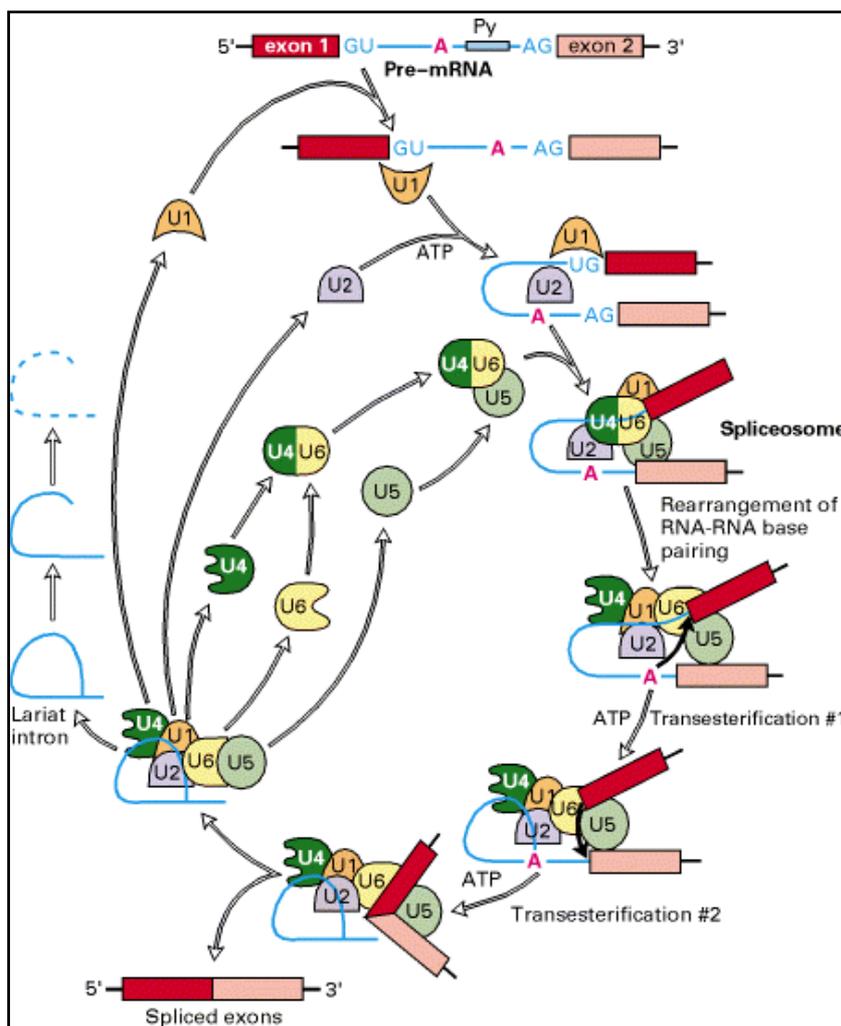


Abb.9: Spleißosom
Schematische Darstellung der Intermediate der Spleißosomformation und Reorganisation während der Spleißreaktion [4].

und U6- snRNA und die Bildung einer RNA- RNA- Duplex zwischen U5- und U6- snRNA. Durch die Ausbildung der nun möglichen Basenpaarung zwischen U2- und U6- snRNA und der Paarung der U5- snRNA mit den konservierten Sequenzen der beiden flankierenden Exons kommen die 5'- Spleißstelle, sowie der Verzweigungspunkt, als auch die 3'- Spleißstelle in räumliche Nähe [141;142]. Die Umesterungsreaktionen werden während oder im direkten Anschluss an die

strukturelle Umorganisation initiiert. Die freigesetzten Introns bleiben mit den U2-, U5- und U6- snRNAs assoziiert, während die gespleißte RNA aus dem Spleißosom als niedermolekularer Komplex freigesetzt wird. Das Lariat- Intron wird im Anschluss enzymatisch abgebaut und die snRNPs stehen für weitere Reaktionen zur Verfügung.

3.5.4 Alternatives Spleißen

Neben dem konstitutiven Spleißen, kann die Erkennung der 5'- oder 3'- Spleißstellen

auch alternativ erfolgen, so dass aus derselben prä- mRNA

verschiedene mRNA- Isoformen entstehen können [143]. Dies stellt einen der wichtigsten

Mechanismen zur Generation des auf ca. 250.000 Proteine geschätzten Proteoms dar

[132;144]. So geht man davon aus, dass 59% der 245 Gene auf Chromosom 22 alternativ

gespleißt werden [145]. Alternatives Spleißen kann eine

erstaunliche Vielfalt an Isoformen innerhalb eines Gens bewirken. Aus

Vergleichen exprimierter Sequenzabschnitte (EST) mit der Sequenz des menschlichen Genoms

lässt sich abschätzen, dass 47% aller Gene alternativ gespleißt werden [146]. Das

Muster, mit dem alternative Exons in die reife mRNA ein- oder ausgeschlossen werden variiert (Abb.10). Auf Proteinebene kann dies zu erheblichen Konsequenzen

führen. 1. In vielen Fällen wird durch den Gebrauch alternativer Exons ein Stopkodon eingeführt. Das auf diese Weise entstehende Protein weist einen veränderten

Carboxyterminus auf. So können lösliche statt membrangebundene Rezeptoren entstehen [147-152], sowie Proteine mit veränderten

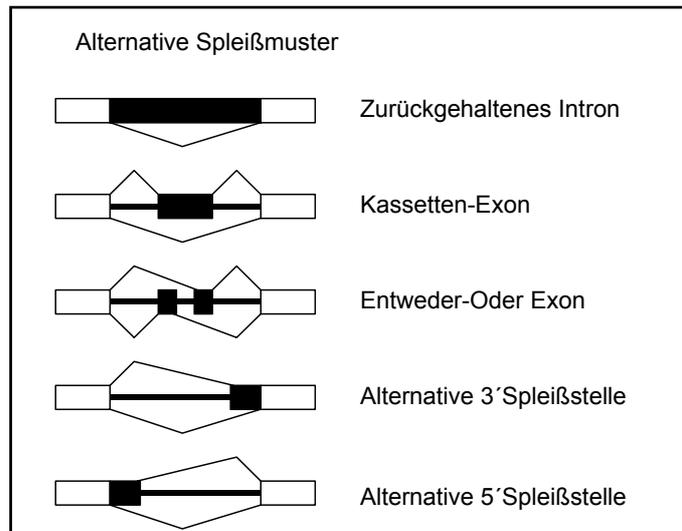


Abb.10: Alternatives Spleißmuster

Schwarze Rechtecke kennzeichnen alternative, weiße Rechtecke konstitutive Exons. Dicke Linien symbolisieren Introns, einfache Linien stehen für beim Spleißen entstehende mögliche Exonverbindungen.

Ligandenbindungseigenschaften [153-155] und verkürzte Proteine mit veränderter oder aufgehobener Funktion [156-158] gebildet werden.

2. Der Ein- bzw. Ausschluss von Exons kann zur Entstehung zusätzlicher Proteinmodule führen oder sie deletieren, so dass veränderte Ligandenaffinitäten entstehen [159;160], Enzymaktivität moduliert wird [161], unterschiedliche Hormone entstehen [162] oder Leitungseigenschaften von Ionenkanälen verändert werden [163;164].
3. Viele Transkriptionsfaktoren unterliegen dem alternativen Spleißen, so dass dieser Mechanismus auch zur Kontrolle der Genexpression beiträgt [165;166].

Ein Großteil der alternativ gespleißten Exons zeigt gewebespezifische bzw. zelltypspezifische Expressionsmuster [167;168] und/ oder wird entwicklungsabhängig oder in Folge externer Stimuli reguliert. So wird beispielsweise der Einschluss des alternativen Exons 11 des Insulinrezeptors durch Gabe von Insulin beeinflusst [169]. Neuronale Aktivität verändert das alternative Spleißmuster der leichten Kette von Clathrin B, des NMDA- R1 Rezeptors und von c- fos [15;170].

3.5.5 Exon- Erkennung

Die Konsensussequenzen, die für die Erkennung der Exon/ Intron- Grenzen erforderlich sind, sind aufgrund ihrer schwachen Konservierung und Kürze nicht ausreichend, um eine 100%ige Erkennung zu gewährleisten. Dennoch ist der Spleißapparat in der Lage, kurze Exons von knapp 100bp von Introns mit Längen von mehreren Megabasenpaaren zu unterscheiden.

Es bedarf daher noch zusätzlicher Faktoren, um eine zuverlässige Spleißreaktion durchzuführen. Diese Aufgabe wird von einer ganzen Reihe von Cis- und Transfaktoren und Reaktionen übernommen (Abb.11, S.36). Zu der Gruppe der für diese Aufgabe spezifischen Proteine (Transfaktoren) zählen die SR- und SR-ähnlichen Proteine, sowie die heteronukleären Ribonukleinpartikel (hnRNP). Zusätzliche regulatorische Sequenzelemente auf prä- mRNA Ebene (Cisfaktoren) sind intronische und exonische Enhancer- bzw. Silencer- Sequenzen.

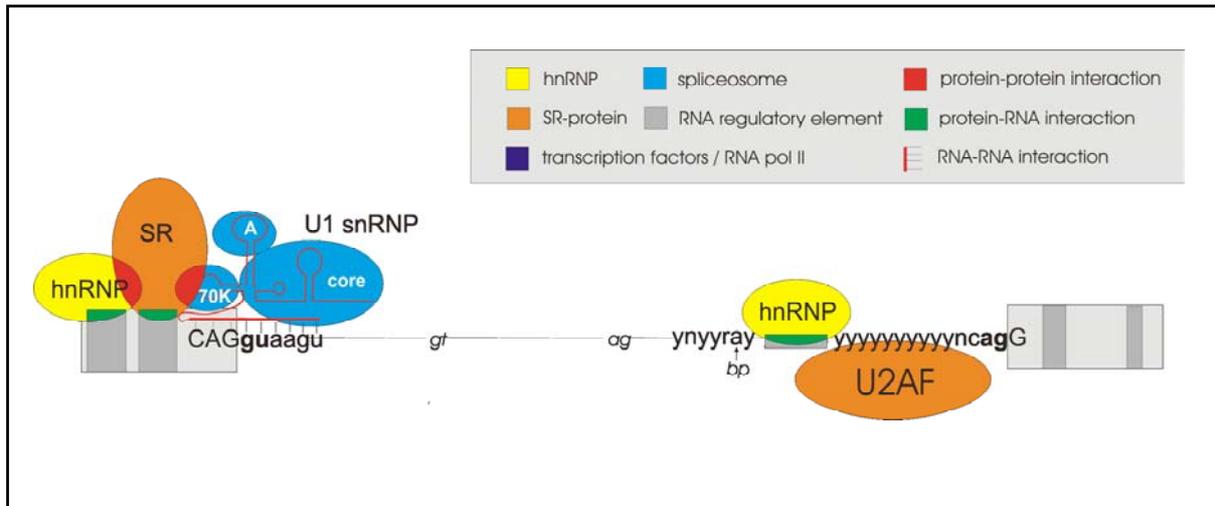


Abb.11: Faktoren, die alternatives Spleißen regulieren

Exons sind als hellgraue Rechtecke, Introns als Linien gezeichnet. Regulatorische Elemente (Enhancer oder Silencer) sind als dunkelgraue Banden in Exons oder Introns dargestellt. Die 5'-Spleißstelle (CAGguaagu) und die 3'-Spleißstelle (y)₁₀ncagG, sowie der Verzweigungspunkt (bp) (ynnyray) sind schematisch eingezeichnet (y=c oder u; n=a, c, g, oder u). Nukleotide, die mit Großbuchstaben gekennzeichnet sind, verbleiben in der reifen mRNA. Zwei Hauptklassen von Proteinen, hnRNPs (gelb) und SR- Proteine (orange) binden an die regulatorischen Elemente der prä- mRNA. Zusätzlich interagieren diese Proteine miteinander. Die Bindung von Protein an RNA ist mit grün, Protein: Protein Wechselwirkung mit rot markiert. Der Proteinkomplex, der sich um einen exonischen Enhancer bildet, stabilisiert die Bindung des U1 snRNPs an die 5'- Spleißstelle, da SR-Proteine mit der RS- Domäne von U1- 70K wechselwirken können (rot). Hierdurch wird die Bindung der U1 snRNA (rote Linie) an die 5'- Spleißstelle stabilisiert. Die Bildung eines Multi- Protein- RNA Komplexes erlaubt die Unterscheidung zwischen tatsächlichen Spleißstellen (fett) und fehlerhaften Spleißstellen (gu/ag), die häufig in der prä- mRNA vorkommen [7].

3.5.5.1 Cis- und transregulatorische Elemente

Studien zur Regulation der Spleißreaktion durch cis- agierende Elemente wie exonische bzw. intronische Enhancer- (ESE, ISE) und Silencersequenzen (ESS, ISS) haben gezeigt, dass Spleißen in einem generellen Hintergrund von Repression erfolgt [171] und durch Enhancer- Sequenzen stimuliert werden kann. Unter Verwendung von SELEX konnte gezeigt werden, dass die von SR- bzw. SR- ähnlichen Proteinen (Transfaktoren) erkannten exonischen Enhancer sehr kurz (5- 8bp) und stark degeneriert sind [172-176], so dass keine Auswirkung auf die kodierende Sequenz besteht. Ähnlich wie bei den konstitutiven Erkennungssequenzen besitzen aber auch diese wenig Informationsgehalt, so dass man von einer kooperativen Interaktion ausgeht [177-181]. Diese kooperative und konzentrationsabhängige Bindung mehrerer und unterschiedlicher SR- und SR- ähnlicher Proteine in räumlicher Nähe erlaubt eine Stabilisierung der Bindung durch Protein- Protein Wechselwirkungen. Der dadurch entstehende Komplex markiert das entsprechende Exon.

Oft sind verschiedene SR- und SR- ähnliche Proteine aufgrund ihrer relativ unspezifischen Bindungsstellen und der Degeneration der Enhancer- bzw. Silencersequenzen am Spleißen desselben Exons beteiligt. Dies impliziert eine gewisse funktionelle Redundanz. Während entsprechend dieser Hypothese in *C. elegans* der Knockout eines SR- Proteins durch andere kompensiert werden kann [182;183], wodurch nur ein milder Phänotyp zu beobachten ist, scheint dies für Säuger nicht der Fall zu sein. So ist beispielsweise ein nicht- konditionaler Knockout von SRp20 in Mäusen embryonisch letal [184], während ein konditionaler Knockout von SC35 die Weiterentwicklung von T- Zellen blockiert [185].

3.5.5.2 SR- Proteine

SR- und SR- ähnliche Proteine sind durch Dipeptidwiederholungen der Aminosäuren Serin (S) und Arginin (R) charakterisiert und weisen strukturelle und funktionelle

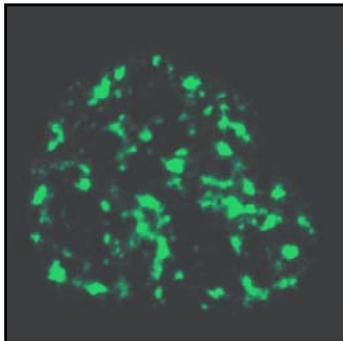


Abb.12 Speckles
 Dargestellt ist die konfokale Aufnahme eines Zellkerns der Zelllinie BHK, transfiziert mit SC35- pEGFP. Grün: speckles [8]

Ähnlichkeiten auf [186]. Ihre Klassifikation erfolgt in Übereinstimmung mit Zahler et al. [186;187] nach der Eigenschaft, durch den mAB104 Antikörper mit einem Epitop aus einer Folge von phosphorylierten SR- Dipeptiden detektiert zu

werden bzw. nach biochemischen Eigenschaften wie der Fähigkeit, *in vitro* einen spleißdefizitären S100 Extrakt komplementieren zu können [188-190]. SR- Proteine besitzen eine oder zwei Kopien eines RNA- Erkennungsmotivs (RRM) und eine carboxyterminale SR- Domäne. Das Vorkommen dieser SR- reichen Domäne ist nicht auf die SR- Proteine im engeren Sinne beschränkt, sondern findet sich auch in anderen Familien wie SR- ähnlichen Proteine, hnRNPs, snRNP- Proteinen und SR- Proteinkinasen. Man geht daher mittlerweile davon aus, dass dieses Motiv charakteristisch für Proteine ist, die in die Prozessierung von prä- mRNA involviert sind. Die SR- Domäne ist als Proteininteraktionsdomäne für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen, für die RNA Bindung und die nukleäre Lokalisation in den sogenannten *speckles* verantwortlich (Abb.12), wobei diese Interaktionen durch reversible Phosphorylierung der Serinreste reguliert werden kann.

Für alle Mitglieder der SR- Proteinfamilie und einige der SR- ähnlichen Proteine konnte eine Aktivierung des Spleißprozesses *in vitro* nachgewiesen werden. Sie erleichtern die Formation des E, A und B- Komplexes durch eine Reihe von Protein: Protein und Protein: RNA Interaktionen (zusammengefasst in [134]).

Verschiedene Arten dieser Interaktionen konnten beobachtet werden. SR- Proteine interagieren mit Cis- Elementen der prä- mRNA in sequenzabhängiger Form [175;191]. Sie sind an der Rekrutierung von U2AF65 und U2AF35 an die 3'-Spleißstelle beteiligt [192;193], ebenso wie an der des U1- snRNP an die 5'-Spleißstelle [193-195] und des U2- snRNP an den Verzweigungspunkt [137].

Für die Unterscheidung von Exons und Introns durch das Spleißosom gibt es zwei verschiedene Modelle, das Exon- Überbückungsmodell und das Intron-Erkennungsmodell. Für beide Modelle lassen sich Indizien anführen. So können SR- Proteine Exons durch Interaktion sowohl mit U1- 70K (Komponente des U1- snRNP) als auch dem U2AF65/ 35- Heterodimer überbrücken [193]. Der SRm160/ 300- Koaktivorkomplex interagiert direkt mit verschiedenen SR- Proteinen und dem U2- snRNP, sowie indirekt mit dem U1- snRNP und kann auf diese Weise die Bildung einer Exonbrücke induzieren [196-199].

Durch Interaktion untereinander und mit den Kernkomponenten des Spleißosoms können SR- und SR- ähnliche Proteine unabhängig von ihrer RNA-Bindungskapazität Introns überbrücken [181;200;201]

3.5.5.2.1 Transformer 2- β

Transformer 2 (Tra2) wurde erstmals bei *Drosophila* als Teil der Geschlechtsdeterminationskaskade beschrieben [202]. Die zwei menschlichen Homologe Htra2- α und Htra2- β [203;204], weisen eine ähnliche Struktur auf, bestehend aus einer zentralen RNA- Bindungsdomäne, die von zwei RS- Domänen flankiert wird. Beide Proteine sind an der Regulation des alternativen Spleißens in konzentrationsabhängiger Form beteiligt. Das auf Chromosom 3q26.2- q27 lokalisierte humane Transformer 2- β - Gen (htra2- β) umfasst 21kb, bestehend aus 10 Exons, von denen 2 alternativ gespleißt werden [205]. Durch alternatives Spleißen und Verwendung alternativer Promotoren und Polyadenylierungsstellen können fünf verschiedene mRNAs gebildet werden (Abb.13). Die daraus resultierenden Isoformen Htra2- β 1 und Htra2- β 3 unterscheiden sich durch Anwesenheit (Htra2- β 1) bzw. Abwesenheit (Htra2- β 3) der ersten SR- Domäne. Aufgrund eines

Stopkodons in Exon 2 werden weder htra2- β2, noch htra2- β4 translatiert. Für die htra2- β5 mRNA, deren Protein zu Htra2- β3 identisch wäre, konnte bislang keine Translation nachgewiesen werden.

Die Isoform Htra2- β1 beeinflusst das alternative Spleißmuster in verschiedenen Transfektionsexperimenten, und zwar von der leichten Kette von Clathrin B (CLB) [206] htra2- β [1], Survival of Motorneuron 2 (SMN2) [207;208] und Amyloid-

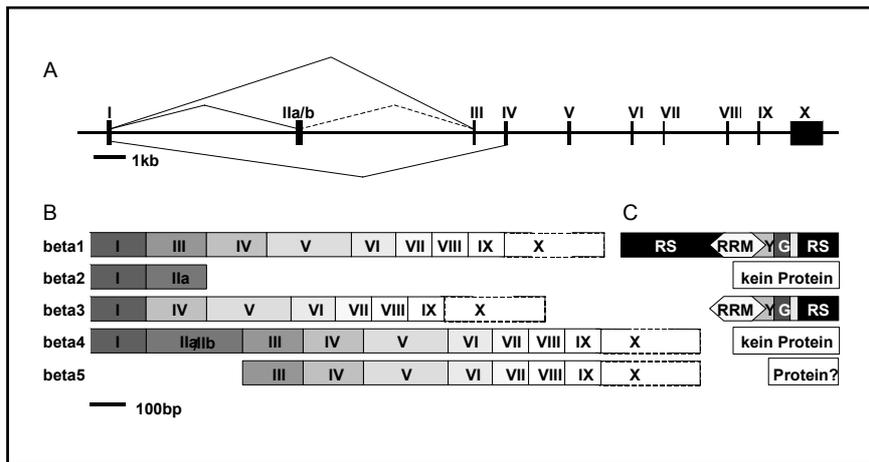


Abb.13: htra2- β: Genstruktur und Isoformen

A) Die Exon (schwarze Boxen)- Intron - Struktur ist maßstabsgetreu wiedergegeben. Linien deuten alternatives Spleißmuster an.

B) Mögliche mRNA- Transkripte; Rechtecke schematisieren verwendete Exons.

C) Proteinstruktur, RS: SR- Domäne, RRM: RNA Erkennungsmotiv, Y: tyrosinreiche Region, G: glycinreiche Region (nach [1]).

Precursor- Protein (APP) [209]. Für die Isoform Htra2- β3 konnte dagegen bisher kein derartiger Effekt festgestellt werden. Tra2- β1 reguliert seine Konzentration in einer Autoregulationsschleife durch Bindung an vier exonische Enhancer (ESE) in

Exon 2 des htra2- β- Gens, wodurch dieses Exon 2 vermehrt eingeschlossen und die Bildung von Htra2- β1 Protein reduziert wird (Abb.14). Die Bindung an das ESE-Motiv in Exon 2 ist zwar unabhängig von der SR- Domäne des Tra2- β- Proteins, in der SR- Domäne phosphoryliertes Tra2- β- Protein zeigt jedoch verminderte Bindungskapazität. Das Bindungsmotiv ist stark degeneriert und basiert auf der Konsensussequenz: **GMVVGANR** (fett - konservierte AS, unterstrichen - Präferenz für Purin [1;210]). Demnach ist eine Autoregulationsschleife, die zur Bildung nicht funktionaler mRNA- Isoformen führt, für die strenge Konzentrationseinstellung des Htra2- β- Proteins verantwortlich.

Interaktoren, wie hnRNP- G, SF2/ ASF, SRp30c, YT521- B und SAF- B unterdrücken wahrscheinlich durch Sequestrierung des Tra2- β- Proteins den Einschluss von htra2- β- Exon 2.

Phosphorylierung führt zu einer stark reduzierten Bindungskapazität von Htra2- β 1 an Exon 2. Durch einen noch unbekanntem Mechanismus verhindert Proteinphosphorylierung (u.a. durch die Kinase Clk2) den Einschluss von Exon 2 und 3 und führt so zur Synthese des trunkierten Proteins Htra2- β 3.

Das Htra2- β 3 Protein ist in Säugern nachweisbar, die Generierung der mRNA wird durch Phosphorylierung regulatorischer Proteine reguliert.

htra2- β 3 ist in der Ratte hauptsächlich im Gehirn, Testis und Leber exprimiert und wird im Laufe der Entwicklung verstärkt exprimiert [205]. Bisher konnte im Gegensatz zur Vollängeniso-

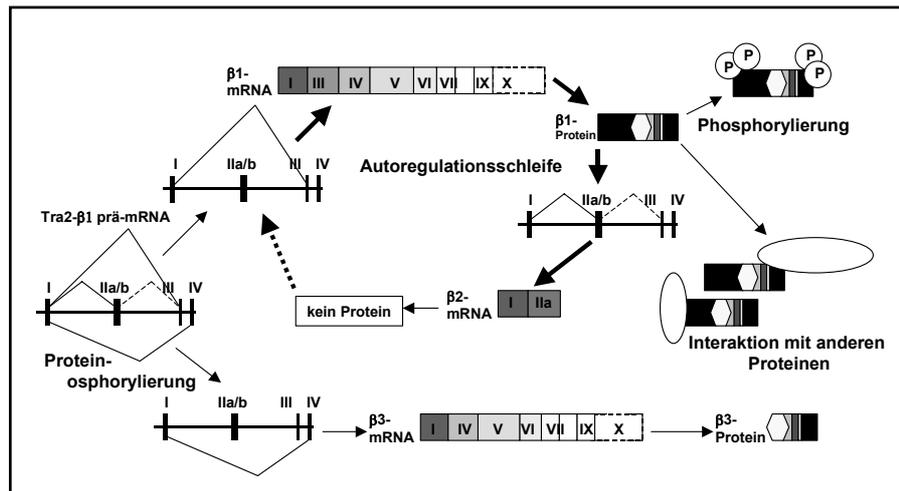


Abb.14: Regulation des alternativen Spleißens des htra2- β Gens

Das menschliche htra2- β - Protein verwendet eine autoregulatorische Schleife um den eigenen Proteinlevel zu kontrollieren. Es bindet an 4 regulatorische Motive in Exon 2 und induziert dessen Einschluss. Dieses Exon führt zu einer Unterbrechung des Leserasters durch Einführung eines Stopkodons, die entsprechende mRNA wird nicht translatiert. Interaktion mit anderen Proteinen führen i.d.R. zu einer Sequestrierung von htra2- β 1 (nach [2]).

form Htra2- β 1 für die verkürzte Isoform Htra2- β 3 kein Einfluss auf alternative Spleißmuster festgestellt werden.

Clk- Kinasen interagieren mit verschiedenen SR- Proteinen und phosphorylieren sie [5;211]. Insbesondere Clk2 unterdrückt den Einschluss von htra2- β Exon 2 und in höherer Konzentration von Exon 3 und führt so zur Synthese der hirnspezifischen Isoform Htra2- β 3. Neuronale Stimulation führt im Hippokampus der Ratte zu einer Hemmung und im Kortex zu einer Induktion der htra2- β 3 Expression, während das Expressionsniveau der β 1- Isoform davon unberührt bleibt.

3.5.5.3 hnRNP

Eine weitere wichtige Gruppe für die Erkennung der Spleißstellen sind die heteronukleären Ribonukleoproteine (hnRNP: zusammengefasst in [212-214]).

Ursprünglich als Hauptgruppe der Chromatin- assoziierten RNA- Bindungsproteine beschrieben [215] assoziieren die Mitglieder der hnRNP- Familien A, B und C in einem regulären Muster von 20- 25nm Partikeln an die prä- mRNA. Die Bindung zeigt eine gewisse Präferenz für bestimmte Sequenzen, die der Verpackung der prä- mRNA dienen könnten. Durch Blockierung des Zugangs zu bestimmten Spleißstellen sind hnRNPs auf diese Weise in der Lage die Auswahl der Spleißstellen zu beeinflussen. Im allgemeinen wirken hnRNPs und SR- bzw. SR- ähnliche Proteine antagonistisch hinsichtlich ihrer Funktion innerhalb des Spleißvorgangs, z.B. durch Konkurrenz um Bindungsstellen an der Ziel- RNA.

3.5.6 Phosphorylierung

Sowohl die Aktivität von SR- und hnRNP- Proteinen bzw. Faktoren, die mit diesen Proteinen interagieren, als auch ihre intrazelluläre Lokalisation wird durch Proteinphosphorylierung beeinflusst (Abb.15).

Wahrscheinlich werden alle RS- Domänen enthaltenden Proteine posttranslational

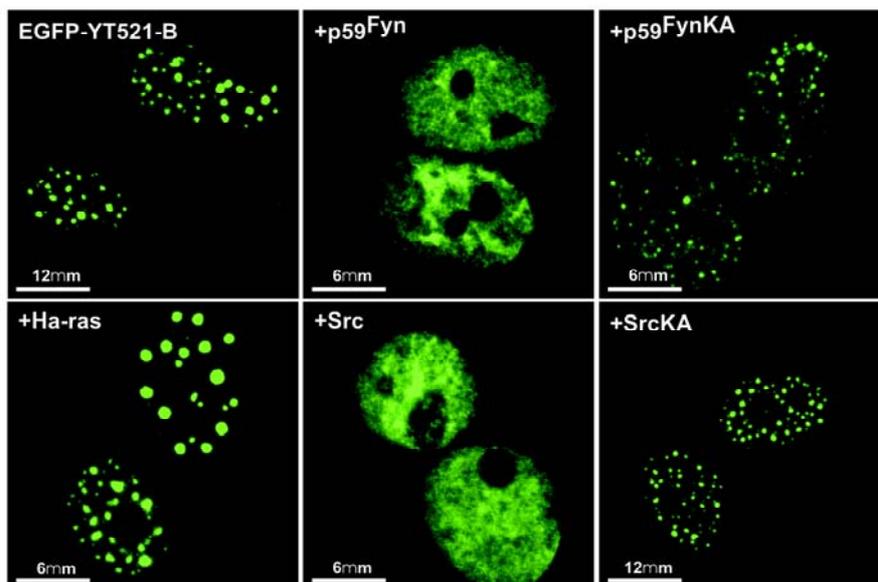


Abb.15: Phosphorylierung beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation von spleißregulatorischen Proteinen

Transient transfiziertes YT521-B (grün) wird nach Phosphorylierung aus den nukleären YT-Körperchen freigesetzt.

YT521-B: spleißregulatorisches Protein; P59^{fyn}, src: Kinasen; p59^{fynKA}, src^{KA}: inaktive Varianten der Kinasen.

durch Phosphorylierung modifiziert. Reversible Phosphorylierung wurde als essentieller Regulationsmechanismus beim Spleißen nachgewiesen. So waren beispielsweise keine Spleißkomplexe in nukleären Extrakten nach

Behandlung mit der Phosphatase PP1 (Haupttarget: SR- Proteine) detektierbar [216].

Daher könnten Proteinkinasen, die an der Phosphorylierung dieser Faktoren beteiligt

sind, eine wichtige Rolle als Bindeglied zwischen der Regulation des alternativen Spleißens und zellulärer Stimuli spielen.

3.5.6.1 Protein Kinasen

Als Proteinkinasen wird eine Familie von Enzymen bezeichnet, die die Phosphorylierung von Proteinen katalysieren und nach der Aminosäure, die den Phosphatakzeptor darstellt, klassifiziert werden.

3.5.6.1.1 DYRK / MNB

„Minibrain“ (MNB) ist eine *Drosophila*- Mutante, die eine spezifische und deutliche Reduktion des optischen Lobus und der zentralen Hemisphäre des adulten Gehirns aufweist [217]. Das MNB- Gen kodiert für einen Serin/ Threonin- Proteinkinase [218], die eine YXY Sequenz in der Aktivierungsschleife (activation loop) besitzt. Mindestens 7 eng verwandte Homologe konnten in Säugern isoliert werden und bilden eine neue Untergruppe von Proteinkinasen, die mit dualer Spezifität Tyrosin phosphorylierenden und regulierenden Kinasen (DYRK) [219;220]. DYRKs besitzen sowohl Serin/ Threonin- Phosphorylierungsaktivität als auch Autophosphorylierungsaktivität an Tyrosinresten, was eine duale Spezifität und Regulation über Autophosphorylierung vermuten lässt [221].

Tab.4: Lokalisation der Kinasegene

Gen	Chromosomale Lokalisation
DYRK / MNB	21q22.2
SRPK1/ 1a	6p21.3- p21.2
SRPK2	7q22- q31.1
Cik1	2q33
Cik2	1q21
Cik3	15q24
Cik4	5q35

Die Kinaseaktivität ist abhängig vom YXY- Motiv in der Aktivierungsschleife, wodurch die Existenz eines phosphorylierungsabhängigen Aktivierungsmechanismus mittels übergeordneter Kinasen vermutet werden kann. Die DYRK- Kinasen weisen sowohl unterschiedliche Lokalisation (DYRK 1 ist eine nukleäre, DYRK 2 und 3 sind zytoplasmatische Kinasen) als auch unterschiedliche Substratspezifitäten auf [222]. Das Gen für die menschliche Kinase DYRK 1A umspannt 150kb auf 17 Exons und liegt interessanterweise in der für Down Syndrom (DS) kritischen Region auf Chromosom 21 (Tab.4). Innerhalb dieser Region befindet sich der Sequenzbereich, der bei an Chromosom 21 gekoppelten Mikrozephalus mindestens deletiert ist [223], so dass es als Kandidatengen für Mikrozephalus infolge Monosomie 21, sowie für die mentale

Retardierung von Trisomie 21 bei Down Syndrom Patienten in Frage kommt [224;225]. Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang liefert auch die Tatsache, dass DYRK 1- mRNA im fötalen DS- Gehirn überexprimiert wird [226]. *In vitro* phosphorylieren sowohl DYRK 1A als auch DYRK 2 das Mikrotubuli- assoziierte Protein Tau an Thr²¹², einer Aminosäure, die bei fötalem Tau- Protein phosphoryliert und in Tau- Filamenten von Alzheimer Patienten hyperphosphoryliert vorliegt. Dies schafft die Voraussetzung für eine weitere Phosphorylierung von Tau an Ser²⁰⁸ durch GSK3 [227]. Es konnte gezeigt werden, dass Tau- Proteinspiegel in DS und AD- Gehirnen höher sind als in vergleichbaren älteren nicht dementen Personen [228;229]. Von *Drosophila* bis zum Menschen scheinen die DYRK / MNB Kinasen, wie auch konventionelle MAP- Kinasen, eine Schlüsselrolle als Regulator des Wachstums neuronaler Zellen zu besitzen.

3.5.6.1.2 SR- Proteinkinasen

Proteinkinasen verschiedener Familien besitzen die Fähigkeit SR- Proteine *in vitro* zu phosphorylieren. Einen Einfluss auf SR- Proteinaktivität und Spleißen *in vitro* und *in vivo* konnte jedoch bisher nur für die sogenannten LAMMER- Kinasen nachgewiesen werden. LAMMER- Kinasen zeigen einen ähnlichen Aufbau in nicht- katalytischen N- terminalen Bereichen und ähnliche Abstände in den katalytischen Subdomänen. Die katalytischen Subdomänen, die für den Phosphotransfer und die Substratinteraktion essentiell sind, sind innerhalb dieser Gruppe stark konserviert. Teil dieser katalytischen Domäne ist das sogenannte LAMMER- Motiv (Aminosäuresequenz EHLAMMERILG), welches in allen Familienmitgliedern zu fast 100% identisch ist.

Da durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente distinkte Substratpräferenzen für intakte Proteine festgestellt werden konnten, geht man davon aus, dass diese Kinasen auch *in vivo* unterschiedliche Substrate besitzen, d.h. potentiell unterschiedliche Funktionen erfüllen [211].

Zwei Familien konnten bisher identifiziert werden, die SR- Protein spezifischen Kinasen (SRPK) und die CDC2- ähnlichen (like) Kinasen (Clk). Beide Proteinfamilien zeigen unterschiedliche Substratspezifitäten und sind differentiell exprimiert [230-233]. Die SRPK- und Clk/ Sty- Kinasen weisen eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation auf. Während Clk/ Sty nur im Zellkern zu finden ist [156;234], können SRPKs sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma detektiert werden [235]. Die Existenz verschiedener SR- Protein Kinasen mit spezifischer Substratspezifität und

Lokalisation in Säugerzellen legt die Vermutung nahe, dass reversible Phosphorylierung der RS- Domänen Proteine einer zeitlich und räumlich koordinierten Regulation unterliegt und so deren Interaktionen gesteuert werden können.

3.5.6.1.3 SRPK1 und 2

SRPK1 (menschliches Homolog zu Dsk1 aus *C.elegans*; Sky1p Homolog aus *S. Pombe*) konnte basierend auf seiner SC35- Phosphorylierungsaktivität kloniert werden. Diese SR- Proteinkinase wird im Zellzyklus reguliert [236].

SRPK2 wurde aufgrund seiner Homologie zu SRPK1 und Dsk1 mittels RT- PCR aus Gehirngewebe der Maus isoliert. Northernblot- Analyse zeigte gewebespezifische Expression mehrerer SRPK2- Transkripte in Gehirn, Lunge und Testis. Das Maus SRPK1- Protein ist zu 58% bzw. 32% identisch mit humanem SRPK1 bzw. Hefe Dsk1 Protein [237]. Für SRPK1 sind zwei Isoformen bekannt, SRPK1 und SRPK1a, die sich hinsichtlich Substrat- und Gewebespezifität kaum unterscheiden. SRPK1a weist jedoch stärkere Phosphorylierungsaktivität auf und scheint im Gegensatz zu SRPK1 mit einem S/ MAR bindenden Protein (SAF- B) zu interagieren [232].

Sowohl SRPK1 als auch SRPK2 phosphorylieren SR- Proteine, induzieren die Auflösung der *speckles* in permeabilisierten Zellen und inhibieren Spleißen *in vitro* [231;237], zeigen jedoch eine differentielle Expression in verschiedenen menschlichen Geweben [233].

3.5.6.1.4 CDC2/ CDC28 ähnliche Kinasen (Clk)

Die Familie der CDC- ähnlichen Kinasen (CLK) gehören zu einer evolutionär konservierten Gruppe von Enzymen mit dualer Substratspezifität. Sie sind in der Lage Proteinsubstrate an Serin, Threonin und Tyrosinresten zu phosphorylieren. Der Prototyp der Clk- Kinasen, die Kinase Clk1 wurde ursprünglich anhand ihrer Autophosphorylierungsaktivität an Tyrosinresten identifiziert [238;239]. Die Familie enthält Mitglieder aus verschiedenen Organismen wie Hefe, *Drosophila*, *Arabidopsis*, Tabak, Maus, Ratte und Mensch, und zeigt hohe Homologie untereinander und zwischen den verschiedenen Spezies (Abb.16, S.45). Bis heute wurden vier verschiedene humane CLKs charakterisiert, CLK1- 4 (Tab.4, S.43) [240], die zwar ubiquitär, jedoch gewebespezifisch in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert zu sein scheinen [5].

Die Kinasen Clk1- 4 sind nukleäre Proteine, deren subnukleäre Lokalisation durch ihren Phosphorylierungsstatus reguliert wird [241]. Gemeinsam ist den Kinasen das

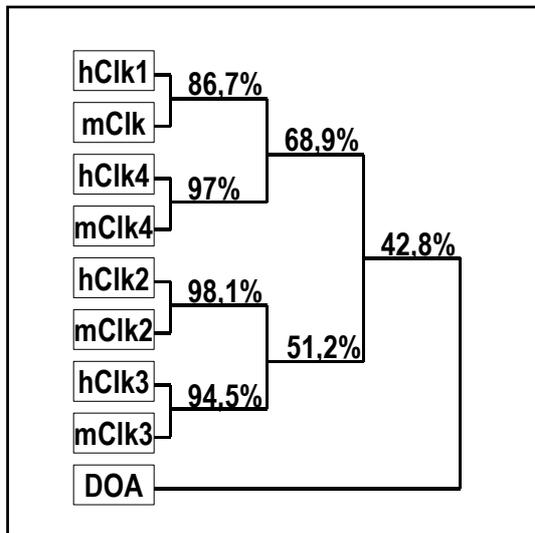


Abb.16: Vergleich der Kinasen Clk1- 4
Phylogenetischer Stammbaum der Kinasen Clk1- 4 aus Maus und Mensch, sowie des *Drosophila*- Homologs DOA. Erstellt mit Higgins- Sharp Algorithmus (CLUSTAL4). Prozentzahlen geben Sequenzidentität an (nach [5]).

alternative Exon EB, dessen Abwesenheit zu einer Leserasterverschiebung und so zur Einführung eines Stopkodons führt, wodurch eine trunkierte, inaktive Isoform generiert wird [240]. Diese akkumuliert in den *speckles*, während die aktive Isoform diffus im Nukleus verteilt ist.

Die physiologische Funktion dieser Proteinfamilie ist noch unklar, sie könnten jedoch eine wichtige Rolle in der prä-mRNA Prozessierung sowie bei der Signaltransduktion der Zelle spielen. Untersuchungen mit dem *Drosophila* Homolog DOA weisen auf eine kritische Rolle in der Entwicklung hin. Fliegen, die eine geringe Menge an mutiertem DOA exprimierten, zeigten ausgeprägte

neuronale Veränderungen, Homozygote für das DOA null- Allel waren embryonisch letal [242].

Im Hinblick auf eine Beteiligung an der Regulation der prä- mRNA Prozessierung konnte gezeigt werden, dass CLK1- CLK4 SR- Proteine *in vitro* und *in vivo* phosphorylieren [5;230;234]. Die auf diese Weise induzierte Phosphorylierung der SR- Proteine führt zu deren Freisetzung aus den potentiellen Speicherkompartimenten, den *speckles* [234;243], sodass man einen regulierenden Einfluss auf die verfügbare Menge an aktiven, in den Spleißprozess eingreifenden SR- Proteinen annimmt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der durch Clk vermittelte Phosphorylierungsstatus der SR- Proteine einer engen Kontrolle unterliegen muss, da sowohl deren Hyperphosphorylierung als auch Hypophosphorylierung *in vitro* Spleißen inhibiert [244].

Obwohl die Konsensussequenz für eine optimale Phosphorylierungsstelle bei diesen Kinasen für kurze Peptide bemerkenswert ähnlich ist, finden sich distinkte Substratpräferenzen für intakte Proteine [211;245;245].

3.6 Zielsetzung

Alternatives Spleißen ist wahrscheinlich an einer Vielzahl von Erkrankungen ursächlich beteiligt. Schätzungen zufolge liegt ca. 15% aller genetischen Erkrankungen, die auf Punktmutationen beruhen, eine Fehlregulation des alternativen Spleißens zugrunde.

Dies ist der Fall für eine seltene familiäre Form der Frontotemporalen Demenz, der frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus gekoppelt an Chromosom 17 (FTDP-17). Für diese genetische Erkrankung sind mittlerweile mindestens 29 Mutationen beschrieben, von denen etwa zwei Drittel das alternative Spleißen von Exon 10 des Tau- Gens beeinflussen. Diese Fehlregulation führt zu einem pathologisch verändertem Verhältnis der hirnspezifischen Isoformen.

Ziel dieser Arbeit ist, das Verhalten von Mutationen im Tau- Gen, die in bestimmten Familien mit FTDP- 17 detektiert wurden, in einem Zellkultursystem zu untersuchen. Dies sind insbesondere Mutationen, die das alternative Spleißen von Tau Exon 10 beeinflussen. Kotransfektionsexperimente mit potentiellen Transfaktoren, die in die Regulation des alternativen Spleißens involviert sind, sollen zeigen, ob ein spezifisches Subset an regulatorischen Proteinen existiert, welches für die Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 essentiell ist. Auf diese Weise könnten Teile des Regulationsmechanismus, der zum alternativen Spleißen von Tau Exon 10 führt, aufgeklärt werden.

Besseres Verständnis der grundlegenden Abläufe dieses Regulationsmechanismus, bzw. der Komponenten, die hier regulierend eingreifen, könnte zur Entwicklung neuer Therapieansätze führen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tab.5: Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Reagenz	Hersteller	Reagenz	Hersteller
Acrylamidlösungen	Roth	Glycogen	Merck
Agar	Gibco BRL	Hefeextrakt	Gibco BRL
Agarose	Gibco BRL	HEPES	Sigma
Ammoniumperoxidsulfat	Sigma	Hybond ECL Nitrozellulosemembran	Amersham
Ammoniumacetat	Merck	Isoamylalkohol	Merck
Ampicillin	Sigma	Isopropanol	Merck
Aprotinin	Sigma	Kaliumacetat	Merck
β- Mercatoethanol	Sigma	Kaliumchlorid	Merck
Borsäure	Merck	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Bromphenolblau	Sigma	di- Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Chloramphenicol	Sigma	Calciumchlorid	Merck
Dextrose	Serva	Kanamycinsulfat	Sigma
DMEM- Medium	Gibco BRL	Leupeptin	Sigma
dNTP	Amersham	Luminol	Sigma
Dimethylsulfoxid	Merck	Magnesiumchlorid	Fluka
Di- Natriumhydrogenphosphat	Sigma	Magnesiumsulfat	Sigma
Dithiothreitol	Merck	Maxi- Kit, Plasmidisolierung	Qiagen
ECL- Detektionssystem	Amersham	Methanol	Merck
EDTA, Natriumsalz	Sigma	Mineralöl	Sigma
Essigsäure, p.a.	Merck	Molekulargewichtsmarker (DNA):	New England Biolabs
Ethanol	Merck	lamda BstEII	
Ethidiumbromid	Sigma	pBR322Mspl	
Fötales Kälberserum	Gibco BRL	100bp Leiter	
Gelatine	Sigma	Molekulargewichtsmarker (Protein)	Amersham
Gelextraktionskit	Qiagen	Natrium- Deoxychelat	Sigma
Glucose	Biomeda	Natriumchlorid	Merck
Glutathionsepharose	Amersham	Natriumcitrat	Fluka
Glycerin	Sigma	Natriumacetat	Baker
Glycin	Serva	Natriumdihydrogenphosphat	Merck

Material und Methoden

Reagenz	Hersteller	Reagenz	Hersteller
β- Glycerolphosphat	Serva	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumfluorid	Fluka	Röntgenfilm	Fuji
Natriumhydroxid	Serva	Salzsäure	Serva
Natriumorthovanadat	Sigma	Mineralöl	Sigma
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schüll	MOPS	Fluka
Nonidet P 40	Sigma	TEMED	Serva
Parafilm	American National	(N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)	
PEG (Polyethylenglycol) 3500	Serva	Tris- Base	Roth
Pepstatin	Sigma	Tetracyclin	Sigma
p-Iodophenol	Sigma	Triton- X- 100	Roth
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma	Trypsin	Gibco BRL
RNase A	Sigma	Trypton	Gibco BRL
RNase Inhibitor	Gibco BRL	Whatman- Papier	Schleicher & Schüll
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Xylencyanol	Sigma
Roscovitin	Calbiochem		

4.1.2 Geräte

Tab.6: Geräte

Gerät	Hersteller	Gerät	Hersteller
Acrylamid- Minigelsystem	BioRad	Spannungsquellen	BioRad
Agarosegelelektrophorese- Apparatur	BioRad	Speed- Vac DNA 110	Savant
Autoklav	Vasidav	Spektrophotometer Ultraspec3000	Pharmacia
Film- Entwicklermaschine	MS- Laborgeräte	Sterilbank	Heraeus
Glasware	Schott	UV- Transilluminator	Bachhofer
Messzylinder	Hirschmann	Vortex	Bender und Hobein
Mikrowelle	Privileg	Westernblot Transfer Fastblot	BioRad
Milli- Q Wasseraufbereitungsanlage	Millipore	Zellkulturinkubatoren	Heraeus
Polyallomer- Zentrifugenröhrchen	Beckmann	Zentrifugen:	Sorval
pH- Meter	Bachhofer	RC- 5B	
PCR- Apparatur	Biometra	Eppendorf 5417R	Eppendorf
Pipetten	Gibson/ Eppendorf	Eppendorf 5415C	Eppendorf
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific	Varifuge 3.0R	Heraeus
Schüttelheizblock Thermomixer 5436	Eppendorf	GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler	Perkin Elmer

4.1.3 Zelllinien

Tab.7: Zelllinien

Zelllinie	Merkmal
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (Human embryo kidney cells)
HeLa	Epithelähnliche Adenocarcinomazellen
HN10	Hippokampale Neuroblastomazellen aus Maus

Die aufgelisteten Zelllinien wurden von ATCC (American Type Culture Collection) bezogen. Die Kultivierung erfolgte gemäß den Standardprotokollen [246].

4.1.4 Bakterienstämme

Tab.8: *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
BL21 (DE3)	hsdS gal (lclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5- T7gene1)	[247]6)
XL1 blue	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA2 lac ⁻ F ['] [proAB ⁺ lac1 ^q lacZDM15 Tn10 (tet)]	[248]7)

4.1.5 Oligonukleotide

Tab.9: Oligonukleotide

Name	Orientierung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
INS 1	sense	cag cta cag tcg gaa acc atc agc aag cag	SV 9- 10L- 11 + Varianten
INS 3	antisense	cac ctc cag tgc caa ggt ctg aag gtc acc	SV 9- 10L- 11 + Varianten
tau beacon tamra	sense	cgc gag cga cta ttt gca cct tcc cgc tcg cgZ	SV 9- 10L- 11 + Varianten, Lightcycler
tau beacon fluorescein	antisense	cag cgc aag atc cag ctt ctt att aat tgc gct gZ	SV 9- 10L- 11 + Varianten, Lightcycler
pSL3- f	sense	cga gct cgc ttg ttc act cat cct ttt t	pSL3- wt + Varianten
pSL3- r	antisense	cga gct cgc agt gtc cgc aag tgt a	pSL3- wt + Varianten

Die hier aufgelisteten Oligonukleotide wurden für Sequenzierungen, RT- PCR und PCR verwendet. Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde gemäß der sogenannten 2+4 Regel bestimmt, wonach einer AT Basenpaarung 2°C und einer G-C Basenpaarung 4°C zugeordnet werden. Die Oligonukleotide wurden am Max-Planck Institut für Biochemie von Frau Schimanko synthetisiert.

4.1.6 Plasmide

Tab.10: Plasmide

Name	Vektor	Beschreibung	Referenz
ASF/ SF2- c2	pEGFP	SR- Protein	[5;241]
CDK5- gfp	pEGFP	Kinase CDK5	E. Mandelkow
DYRK - gfp	pEGFP	Kinase DYRK	B. Lutz
rhnG- fl- c2	pEGFP	hnRNP- G, kodierende Region	S. Stamm
mClk1- 6his	pcDNA	Kinase mCLK1, 6xHis- tag	[5;241]
mClk1- c2	pEGFP	Kinase mCLK1	[5]
mClk1- flag	pcDNA	Kinase mCLK1, flag tag	[5]
mClk1- pcDNA	pcDNA	Kinase mCLK1	[5]
mClk2 KR- c2	pEGFP	Kinase mCLK2	[5]
mClk2- 6his	pcDNA	Kinase mCLK2, 6xHis- tag	[5]
mClk2- c2	pEGFP	Kinase mCLK2	[5]
mClk2- flag	pcDNA	Kinase mCLK2, flag tag	[5]
mClk2- pcDNA	pcDNA	Kinase mCLK2	[5]
mClk3- 6his	pcDNA	Kinase mCLK3, 6xHis- tag	[5]
mClk3- c2	pEGFP	Kinase mCLK3	[5]
mClk3- flag	pcDNA	Kinase mCLK3, flag tag	[5]
mClk3- pcDNA	pcDNA	Kinase mCLK3	[5]
mClk4- 6his	pcDNA	Kinase mCLK4, 6xHis- tag	[5]
mClk4- c2	pEGFP	Kinase mCLK4	[5]
mClk4- flag	pcDNA	Kinase mCLK4, flag tag	[5]
mClk4- pcDNA	pcDNA	Kinase mCLK4	[5]
p25	pcDNA	Aktivator von CDK5	E. Mandelkow
p35	pcDNA	Aktivator von CDK5	E. Mandelkow
p62- c2	pEGFP	2Hybrid Interaktor zu YT521- B	O. Stoss
pCG	pcG		S. Stamm
pCR3.1	pCR3.1	amp ^R , kan ^R , CMV- Promotor	Invitrogen
pEGFP- c2	pEGFP	CMV- Promotor, Neo ^R , Kan ^R	Clontech
rSLM1- c2	pEGFP	2Hybrid Interaktor zu YT521- B	O. Stoss
rSLM2- c2	pEGFP	2Hybrid Interaktor zu YT521- B	[249]
rSAF- B- c2	pEGFP	Scaffold attachment factor B	[250]
SRp55- c2	pEGFP	SR- Protein	S. Stamm
SRp55- pcG	pcG	SR- Protein	S. Stamm
SRp75- c2	pEGFP	SR- Protein	S. Stamm
SRp75- pcG	pcG	SR- Protein	S. Stamm
SRPK1	pEGFP	Kinase SRPK1	[251]

Name	Vektor	Beschreibung	Referenz
SRPK1- 2a	pEGFP	Kinase SRPK1- Ser51 mutiert zu Ala	T. Giannakouros
SRPK1a	pEGFP	Kinase SRPK1a- alternative Isoform	[232;251]
SRPK1- 2a555	pEGFP	Kinase SRPK1- Ser51 und Ser55 mutiert zu Ala	T. Giannakouros
SRPK1- 555	pEGFP	Kinase SRPK1- Ser 555 mutiert zu Ala	T. Giannakouros
SRPK1- 555e	pEGFP	Kinase SRPK1- Ser555 mutiert zu Glu	T. Giannakouros
SRPK1- 2aD+555e	pEGFP	Kinase SRPK1- Ser51 zu Asp, Ser55 zu Glu	T. Giannakouros
tau3- pCR3.1	pCR3.1	tau exon 9- 10- 11, kloniertes PCR- Produkt	Sequenzverifizierung
htra2β1- c2	pEGFP	SR- ähnliches Protein htransformer 2beta	[203]
YT521- B- c2	pEGFP	YT521- B	[252]

Präfixe zu den Klontypen weisen auf den Ursprungsorganismus hin (m für Maus, r für Ratte, h für human).

4.1.7 Antikörper

Tab.11: Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung (WB)	Referenz
α- GFP (green fluorescent protein)	Maus	1:2000	Boehringer Mannheim
α- His (5)	Maus	1:1000	Qiagen
α- SR	Kaninchen	1:2000	S. Stamm
α- Maus, gekoppelt an Meerrettichperoxidase	Ziege	1:10.000	Amersham
α- Kaninchen, gekoppelt an Meerrettichperoxidase	Ziege	1:10.000	Amersham

4.1.8 Minigene

Tab.12: Minigene

Minigen	Mutation	Position	Referenz	Minigen	Mutation	Position	Referenz
SV 9- 10L- 11	Wildtyp		[12]	pSLP wt	Wildtyp		[253]
ENH	T>G	6	[12]	pSLP N279K	T>G	6	[254]
SIL	T>G	21	[12]				
M5	G>A	83	[12]	pSLP S305N	G>A	83	[255]
M16	g>t	+16	[12]	pSLP 16	g>t	+16	[256]
C16	G>A g>t	83 +16	[12]				

4.1.9 Antibiotika

Tab.13: Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung			Arbeitslösung		
	Konzentration	Lösungsmittel	Aufbewahrung	Stringent	Relaxed	Platten
Ampicillin	50mg/ ml	H ₂ O	4°C	20µg/ ml	60µg/ ml	50µg/ ml
Kanamycin	10mg/ ml	H ₂ O	4°C	10µg/ ml	50µg/ ml	50µg/ ml
Tetracyclin	5mg/ ml	Ethanol	- 20°C	10µg/ ml	50µg/ ml	12,5µg/ ml
Chloramphenicol	34mg/ ml	Ethanol	- 20°C	25µg/ ml	170µg/ ml	100µg/ ml

4.1.10 Nährmedien

Tab.14: Nährmedien

LB Medium		LB- Agarplatten
10% (w/ v)	Trypton	wie Flüssigmedien
10% (w/ v)	NaCl	Zusatz von 10g Agar/ l
5% (w/ v)	Hefeextrakt	
pH 7,4	in H ₂ O	

Die angegebenen Wachstumsmedien wurden für 20min bei 121°C und 1bar Überdruck im Autoklaven sterilisiert. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurden die entsprechenden Antibiotika steril zugegeben. Die verwendete Antibiotikaendkonzentration betrug 50µg/ ml für Ampicillin, 20µg/ µl für Kanamycin und 12,5µg/ µl für Tetracyclin.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkulturmethoden

4.2.1.1 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien

Tab.15: Einfriermedium

Einfriermedium	
Menge	Chemikalie
90%	FCS
10%	DMSO
sterilfiltriert	

Zum Einfrieren eukaryotischer Zellen wurden Platten mit einem Durchmesser von 10cm mit 8×10^5 Zellen besät und im Inkubator bis zur mittleren logarithmischen Phase (bei einer Konfluenz von ca. 75%) angezogen. Die Zellen wurden für ca. 1-5min bei 37°C trypsinisiert (1ml Trypsin/ EDTA pro 10cm Kulturschale), in 10ml vorgewärmten DMEM/ BSA- Medium aufgenommen und bei Raumtemperatur für 5min und 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1ml Einfriermedium gründlich resuspendiert, sofort in 2ml Kryoröhrchen überführt und mit 1°C/ min auf -80°C abgekühlt. Die längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Hierbei wurde die gefrorene Zellsuspension mit 1ml vorgewärmten DMEM/ FCS versetzt und das Auftauen der Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren der Suspension beschleunigt. Die Zellen wurden sodann in 5ml vorgewärmtem DMEM/ FCS verdünnt und abzentrifugiert (5min, RT, 1500rpm). Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 5ml Medium auf einer 10cm Kulturschale ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert.

4.2.1.2 Erhaltung der Zelllinien

Tab.16: Kulturbedingungen für Zelllinien

Zelllinie	Medium	Temperatur	CO ₂ - Gehalt
HEK293	90% DMEM/ 10% FCS	37°C	5% CO ₂
HeLa	90% DMEM/ 10% FCS	37°C	5% CO ₂
HN10	90% DMEM/ 10% FCS	37°C	5% CO ₂

Sobald die Kulturschalen (15cm) konfluent bewachsen waren, wurden die in monomolekularer Schicht wachsenden Zellen mittels 2ml Trypsin/ EDTA pro 15cm Platte verdaut, bis eine Einzelzellsuspension entstand. Die Zellen wurden in DMEM aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren gründlich resuspendiert anschließend 1/ 5 - 1/ 10 dieser Suspension auf neue Kulturschalen ausgebracht und mit 7- 10ml des entsprechenden Wachstumsmediums verdünnt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

4.2.1.3 Transformation eukaryotischer Zelllinien

4.2.1.3.1 Kalziumphosphat- Methode

Tab.17: Zelltransfektion

Schale [cm]	HEK293 [Anzahl]	HN10 [Anzahl]	Medium [ml]	Präzipitat [µl]	DNA [µg]
3,5	3x10 ⁵	4,5x10 ⁵	2	200	4
6	8x10 ⁵	1,2x10 ⁶	4	400	8
10	1x10 ⁶	1,5x10 ⁶	8	800	16
15	1,5x10 ⁶	2,3x10 ⁶	16	1600	32

Die Methode beruht auf einem Protokoll von Chen und Okayama [257] und wurde für HEK293 und HN10 Zellen angewandt. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit einer von der Zelllinie abhängigen Dichte ausgesät und über Nacht bis zu einer Dichte von 50% (HEK293) bzw. 70% (HN10) angezogen (37°C, 5% CO₂).

Für die Transformation wurden 1- 4µg des gewünschten Expressionsplasmids mit 10µl 2,5M CaCl₂ gemischt und mit Wasser auf 100µl aufgefüllt. Unter ständigem Rühren (Vortex) wurde tropfenweise die gleiche Menge an 2x HBS zugegeben. Für die Formung des Präzipitats folgte eine Inkubation bei RT (20min). Anschließend wurde die Suspension tropfenweise in die Kulturschalen gegeben, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und die Zellen zur Expression des transfizierten Plasmids für 24h in den Inkubator (37°C, 3% CO₂) gestellt. Für längere Inkubationszeiten wurde

nach 24h das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24- 36h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Tab.18: Transfektionsreagenzien für Ca₂(PO)₄- Methode

2xHBS		MgCl ₂	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
280mM	NaCl	2,5M	MgCl ₂
10mM	KCl	Sterilfiltriert	
1,5mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Lagertemperatur - 20°C/ 4°C	
12mM	Dextrose		
50mM	Hepes		
pH 6,96			
Sterilfiltriert			
Lagertemperatur - 20°C/ 4°C			

4.2.1.3.2 Lipofektinmethode

Die Transfektion mit Lipofektin beruht auf der Tatsache, dass ein kationisches Lipid, das mit der negativ geladenen DNA einen Komplex ausbildet, durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden kann [258]. Als Lipidreagenz wurde Superfect (Qiagen) verwendet.

Die Transfektion erfolgte in 3cm Schalen bei einer Zellkonfluenz von ca. 40%. Dazu wurden 2µg DNA mit serumfreiem DMEM auf ein Gesamtvolumen von 100µl eingestellt, mit 5- 7µl Superfect- Reagenz versetzt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Während der Inkubation (10min) zur Komplexformation (RT) wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen. Die Komplexlösung wurde mit 600µl DMEM (angereichert mit 10% FCS) gemischt, die Waschlösung von den Zellen abgesaugt und die Transfektionslösung direkt auf die Zellen getropft. Nach einer Inkubation von 1- 4h bei 37°C und 5% CO₂ (je nach Zelllinie, verwendet wurde diese Methode für BHK und HeLa Zellen) wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen, mit frischem serumhaltigen Medium versetzt und für weitere 24h inkubiert.

4.2.2 DNA- Methoden

4.2.2.1 Glycerinstammkulturen

Aus einer frischen *E.coli* Übernachtskultur (1,5ml) wurden 800µl der Bakteriensuspension mit 200µl 80%igem Glycerin versetzt und bei -20°C eingefroren. Die Lebensdauer beträgt ca. 1- 2Jahre.

Für längerandauernde Aufbewahrung (>2 Jahre) werden 400µl Bakteriensuspension mit 600µl 80%igem Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80°C gelagert.

4.2.2.2 KCM- kompetente E. coli Zellen

Tab.19: TSB- Puffer

Menge	Chemikalie
10%	PEG 3500
5%	DMSO
10mM	MgCl ₂
10mM	MgSO ₄
in LB- Medium, pH 6,1	sterilfiltriert

5ml einer gesättigten Übernachtskultur (1/ 50 des Endvolumens) des Bakterienstammes *E.coli* XL1 *blue* wurden zur Inokulation von 250ml LB- Medium verwendet und bis zu einer Dichte von OD600=0,3- 0,6 bei 37°C und konstantem Schütteln angezogen. Die sich in logarithmischer Wachstumsphase befindenden Bakterien wurden auf Eis gekühlt und anschließend mit 2500rpm bei 4°C für 10min sedimentiert. Der Bakterienniederschlag wurde in 1/ 10 Volumen eiskaltem TSB- Puffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und für 10min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in 0,2 -0,4ml Aliquots abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.2.2.3 Transformation von KCM- kompetenten E.coli Zellen

Tab.20: 5xKCM

Menge	Chemikalie
500mM	KCl
150mM	CaCl ₂
250mM	MgCl ₂
in H ₂ O lösen	

Für die Transformation wurden 20µl KCM- Lösung mit 80µl einer wässrigen Plasmidlösung (1µg Plasmid DNA) gemischt und mit 100µl auf Eis aufgetauter kompetenter *E.coli*- Suspension vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 20min auf Eis wurden die Bakterien einem Temperaturschock von 10min bei Raumtemperatur ausgesetzt. Einer Regeneration von 1h bei 37°C unter konstantem Schütteln in 1ml LB- Medium folgte entweder eine Konzentration der Suspension durch Abzentrifugieren, Resuspension in 100µl LB- Medium und Ausplattieren auf entsprechendem Selektivmedium (i.d.R. bei Klonierungen) oder die Anzucht einer gesättigten Übernachtskultur zwecks Plasmidpräparation.

4.2.2.4 Plasmidisolation

Plasmidpräparationen wurden in kleinem (2- 4ml; Minipräp) oder großem (200- 400ml; Maxipräp) Maßstab durchgeführt und folgen im Wesentlichen dem Verfahren von Birnboim und Doly [259].

4.2.2.4.1 Maxipräp (Qiagen Plasmid Maxi Kit)

Für die Präparation in großem Maßstab wurde die gesättigte Bakterienkultur bei 4°C mit 5000rpm für 10min zentrifugiert und das Sediment in 10ml Puffer P1 gründlich resuspendiert. Vorsichtiges Mischen der Bakteriensuspension mit 10ml P2 und Inkubation für 10min bei Raumtemperatur führt zur Lyse der Zellmembranen sowie Denaturierung der Proteine. Anschließend erfolgte die Fällung mit Puffer P3, ebenfalls nach sanftem Mischen für 10min auf Eis. Durch das darin enthaltene Natriumacetat wurde die Lösung neutralisiert und die Salzkonzentration erhöht, so dass Proteine und genomische DNA ausfielen. Durch zweimalige Zentrifugation bei 4°C (30min bzw. 15min) mit 14.000rpm wurden ausgefällte Bestandteile entfernt und der Überstand auf eine mit Puffer QBT equilibrierte Säule aufgetragen. Verunreinigungen wurden durch dreimaliges Waschen mit 10ml Puffer QC entfernt und die Plasmid DNA anschließend in 15ml Hochsalzpuffer QF eluiert. Die Fällung der DNA wurde durch Mischung mit Isopropanol ($\frac{3}{4}$ des Eluatvolumens) erzielt. Die abzentrifugierte DNA (30min, 4°C, 14.000rpm) wurde nach Waschen mit 70% Ethanol bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet und in 500µl H₂O aufgenommen.

4.2.2.4.2 Minipräp

Tab.21: Minipräp Puffer

Puffer P1		Puffer QBT		Puffer QC	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
50mM	Tris/ HCl	750mM	NaCl	1M	NaCl
10mM	EDTA	50mM	MOPS	50mM	MOPS
100g/ ml	RNase A	15%	EtOH	15%	EtOH
pH 8,0		0,15%	Triton X- 100	pH 7,0	
		pH 7,0			
Puffer P2		Puffer QF		TE+ RNase	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
200mM	NaOH	1,25M	NaCl		1xTE
1%	SDS	50mM	Tris/ HCl	100µg/ µl	RNase A
		15%	EtOH	10min	100°C
		pH 8,5		Aufbewahrung bei 4°C	
Puffer P3:					
Menge	Chemikalie				
3M	KAc				
pH 5,5					

Die Präparation in kleinem Maßstab (Minipräp) erfolgte aus 1,5- 3ml einer gesättigten Übernachtskultur. Nach Abzentrifugieren des Anzuchtmediums (5min, 14.000rpm, RT) wurden die sedimentierten Bakterien in 200µl Puffer P1 resuspendiert, mit 200µl Puffer P2 (RT) gemischt, im Anschluss mit 200µl P3 für 5min auf Eis inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation (RT, 14.000rpm, 10min) wurde der Überstand mit 450µl Isopropanol versetzt und für 10min auf Eis belassen. Die ausgefällte DNA wurde abzentrifugiert (15- 30min, 14.000rpm, 4°C), mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Für Sequenzierungen bzw. Zellkulturexperimente schloss sich ein Aufreinigungsschritt an. Die luftgetrocknete DNA wurde in 40µl TE+ RNase gelöst, für 20min bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 50µl 7,5M Ammoniumacetat pH7,6 und 150µl Isopropanol für 30min bei - 20°C gefällt. Nach Zentrifugation und Waschen mit 70%igem Ethanol wurde sie luftgetrocknet und in 40µl H₂O aufgenommen.

4.2.2.5 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration und Reinheit von wässrigen Nukleinsäuren wurde mittels Spektrophotometer durch Messung der Absorption im Bereich 260–320nm in Quarzküvetten bestimmt.

Tab.22: Nukleinsäurekonzentration

	Nukleinsäure
1 A ₂₆₀	50µg doppelsträngige DNA
1 A ₂₆₀	33µg einzelsträngige DNA
1 A ₂₆₀	40µg RNA

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde anhand des A260/ A280 Quotienten ermittelt und sollte für reine Nukleinsäurelösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.2.2.6 Elektrophorese von DNA

Tab.23: Elektrophorese Puffer

1xTBE Puffer		6xGelladepuffer	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
90mM	Tris- Borat	0,25%	Bromphenolblau
20mM	EDTA	0,25%	Xylencyanol
		30%	Glycerin

DNA wurde auf 2%igen Agarosegelen in 1xTBE Puffer aufgetrennt. Die Elektrophorese [260] wurde für 45min bei 100V durchgeführt. Die Gele wurden in einem 0,5mg/ ml Ethidiumbromidbad für 5min gefärbt und der unspezifische Hintergrund anschließend in H₂O für 10min entfärbt. Die gefärbte DNA wurde unter UV Licht bei $\lambda=260\text{nm}$ sichtbar gemacht.

4.2.2.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Individuelle DNA Banden wurden aus einem mit Ethidiumbromid gefärbten (Färbung im Gel, nicht im Ethidiumbromidbad) Agarosegel mit einem Skalpell unter UV Licht ausgeschnitten, wobei die Exposition im UV- Licht möglichst kurz gehalten wurde. Die DNA wurde aus den Agaroseblöcken mit Hilfe des Qiagen Gel Extraction Kit nach Anleitung des Herstellers isoliert.

4.2.2.8 PCR Amplifikation

Ein Standardansatz zur Amplifikation von Plasmid DNA enthielt in der Regel folgende Komponenten:

Tab.24: PCR Standardansatz

Ansatz	Menge
Plasmid DNA	1- 10ng
Sense Primer	0,5µM
Antisense Primer	0,5µM
dNTPs	200µM
Taq- Polymerase Puffer	1x
MgCl ₂	1,5mM
Taq- Polymerase	1U

Die Amplifikation wurde für verschiedene Volumina in unterschiedlichen Maschinen durchgeführt:

Tab.25: PCR Maschinen

Endvolumen	PCR Maschine
50µl	Biometra
25µl	GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler

PCR- Amplifikationen in der Biometra Maschine wurden mit Silicaöl überschichtet.

Je nach Primerpaar wurde die Annealingtemperatur entsprechend der Schmelztemperatur angeglichen, die Elongation wurde mit 1min/ kbp angesetzt. Die abschließende Elongation wurde mit 5- 20min durchgeführt, um eine vollständige Amplifikation aller Produkte zu gewährleisten.

Die PCR wurde in einem standardisierten Setting durchgeführt:

Tab.26: PCR Programm

Reaktion	Dauer	
Initiale Denaturierung:	94°C	5min
30 Zyklen mit:		
	Denaturierung	94°C 30s
	Annealing	55°C 1min
	Elongation	72°C 1min
Abschließende Elongation	72°C	10min
Abkühlung auf 4°C		

4.2.3 RNA- Methoden

4.2.3.1 Isolierung von RNA

Eukaryotische Zellen (als einfache Zellschicht in Kultur) wurden zunächst mit 1xPBS gewaschen und die komplette RNA anschließend mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll extrahiert, wobei die Lyse der Zellen direkt in den Zellkulturplatten auf Eis erfolgte. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber zusammengesoben, mit 70%igem Ethanol versetzt und auf die Säulen pipettiert. Bei einer Zellzahl von mehr als 3×10^5 Zellen wurde vor der Ethanolzugabe eine Homogenisierung durch eine QiaShreddersäule (Qiagen) durchgeführt. Die RNA wurde in 30µl RNase freiem Wasser eluiert.

4.2.3.2 Reverse Transkription

Tab.27: RT- Ansatz

Ansatz	Konzentration	Menge
RNA	200ng/ µl	2µl
Primer	10pM/ µl	0,5µl
DTT	100mM	1µl
dNTP	10mM	1µl
RT Puffer	5x	2µl
H2O		3µl
RNase Inhibitor	40u/ µl	0,25µl
reverse Transkriptase	200u/ µl	0,25µl

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und eines reversen Primers (komplementär zum kodierenden Strang) kann aus RNA die entsprechende cDNA gewonnen werden.

Dazu wurden 400ng RNA (200ng/ µl) mit 5pmol eines genspezifischen reversen Primers (optional: oligo dT₁₂₋₁₈), 10mM DTT, 1mM dNTP, in 1xRT Puffer gemischt, mit 3u RNase Inhibitor und 40u H- Superscript MMLV reverse Transkriptase versetzt und für 45min bei 42°C inkubiert.

Der Ansatz wurde sofort auf Eis gekühlt und direkt in einer PCR amplifiziert.

Eine Kombination aus reverser Transkription und PCR lässt eine semiquantitative Bestimmung der ursprünglichen RNA- Menge zu, sofern sich die PCR im logarithmischen Bereich bewegt. Typischerweise wurde 1/ 5 der reversen Transkription (2µl) in einem 50µl PCR- Ansatz amplifiziert.

Die PCR wurde in einem standardisierten Ansatz durchgeführt:

Tab.28: PCR- Ansatz zur RT

Ansatz	Konzentration	Menge
RT- Reaktion		2µl
10pM forward Primer	0,2pM	1µl
10pM reverse Primer	0,2pM	1µl
10mM dNTP	0,2mM	1µl
PCR- Puffer	10x	5µl
20mMMgCl ₂	2mM	0,1µl
Taq- Polymerase (Perkin Elmer)	10u/ µl	1u

Tab.29: PCR Programm zur RT

Reaktion	Dauer	
Initiale Denaturierung:	94°C	2min
30 Zyklen mit:		
Denaturierung	94°C	30s
Annealing	55°C	1min
Elongation	72°C	1min
Abschließende Elongation	72°C	20min
Abkühlung auf 4°C		

4.2.3.3 Spleißassay

Tab.30: Expressionsplasmide

Expressionsplasmide	Anhang
pEGFP	Enhanced green fluorescent protein
His6x	6x Histidin
pcDNA- flag	flag

Um die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen des untersuchten Proteins auf das alternative Spleißen der Minigen prä- mRNA zu untersuchen, wurde am nächsten Tag aus den Zellen mit einer ähnlichen Transformationsrate die Gesamt-RNA isoliert und diese mit Minigen- spezifischen Primern (Tab.9) in einer RT- PCR analysiert. Die Bedingungen der PCR wurden so gewählt, dass ausschließlich die gespleißten, reifen mRNA- Isoformen detektiert wurden. Die entsprechenden amplifizierten cDNA- Isoformen wurden im Anschluss in einem 2% Agarosegel mit Hilfe der Gelelektrophorese voneinander getrennt und mit Ethididumbromid gefärbt.

Zur statistischen Analyse eines Effekts auf das alternative Spleißen wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Bandenintensitäten der Isoformen mit dem Herolab EASY System quantifiziert. Der Prozentsatz an Exon-Einschluss (bzw. Ausschluss) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Einschluss} = \frac{\text{Isoform mit alternativem Exon}}{\text{Isoform mit alternativem Exon} + \text{Isoform ohne alternatives Exon}}$$

oder

$$\% \text{ Veränderung} = \frac{\text{Isoform mit alternativem Exon}}{\text{Isoform ohne alternatives Exon}}$$

Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mit dem Computer Software Programm SPSS 11.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS, Inc., Chicago, 2001).

4.2.4 Proteinbiochemische Methoden

4.2.4.1 Immunpräzipitation

Tab.31: IP- Puffer

RIPA Puffer		RIPA- Rescue Puffer		HNTG Puffer	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
1%	Nonidet P40	20mM	NaCl	50mM	Hepes, pH 7,5
10mM	Na- Phosphat, pH 7,2	10mM	Na- Phosphat, pH 7,2	150mM	NaCl
5mM	β- Glycerolphosphat	5mM	β- Glycerolphosphat	10%	Glycerin
150mM	NaCl	1mM	NaF	1mM	EDTA
1%	Na- Deoxychelate			0,10%	Triton- X- 100
2mM	EDTA				
0,10%	SDS				
50mM	NaF				
frisch zugeben:		frisch zugeben		frisch zugeben	
4mM	Na ₃ VO ₄	2mM	Na ₃ VO ₄	2mM	Na ₃ VO ₄
1mM	PMSF	1mM	PMSF	1mM	PMSF
2µg/ µl	Aprotinin	10µg/ µl	Aprotinin	2µg/ µl	Aprotinin
2µg/ ml	Pepstatin	2µg/ ml	Pepstatin	100mM	NaF
1µg/ µl	Leupeptin	1µg/ µl	Leupeptin	20mM	Glycerinphosphat
1mM	DTT	1mM	DTT		
10xPBS					
Menge	Chemikalie				
1,4mM	NaCl				
27mM	KCl, pH7,3				
18mM	KH ₂ PO ₄				
100mM	Na ₂ HPO ₄				

Bei einer Immunpräzipitation wird in einem Zelllysat ein bestimmtes Protein mit Hilfe des dafür spezifischen Antikörpers präzipitiert. Das Präzipitat wird in einem Westernblot anschließend detektiert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C und 14.000rpm in einer Eppendorf Kühlzentrifuge; alle verwendeten Reagenzien waren auf Eis gekühlt. Transformierte eukaryotische Zellen (HEK293) wurden zunächst mit 1xPBS gewaschen, dann mit RIPA Puffer (200µl/ 3cm Schale) für 30min auf Eis aufgeschlossen (gelegentlich geschwenkt). Das Lysat wurde für 15min zentrifugiert und 50µl des Überstands

eingefroren. Der restliche Überstand (150µl) wurde in 600µl RIPA- Rescuepuffer aufgenommen, mit der entsprechenden Menge an Antikörper versetzt (z.B. 1µl α-EGFP, Boehringer) und für 30min bei 4°C rotiert. Nach Zugabe von 50µl Protein A - Sepharose/ Sepharose 4B (1:1) wurde das Gemisch über Nacht bei 4°C rotiert. Am nächsten Tag erfolgte die Sedimentierung bei 4°C und 4000rpm. Die Sepharose wurde dreimal mit 500µl HNTG gewaschen. Die pelletierte Sepharose wurde in 25-50µl 1x Laemmlipuffer für 5min bei 95°C erhitzt und der Überstand auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen. Es folgte die Westernblotanalyse mit einem Antikörper gegen das präzipitierte Protein.

4.2.4.2 Denaturierende Gelelektrophorese (SDS- PAGE)

Tab.32: SDS- PAGE

Trenngel (10ml)	7,50%	12%	15%	Sammelgel (10ml)	4%
Chemikalie	Menge	Menge	Menge	Chemikalie	Menge
dH ₂ O	4,85ml	3,5ml	2,5ml	dH ₂ O	6,1ml
1,5M Tris- HCL, pH8,8	2,5ml	2,5ml	2,5ml	0,5M Tris- HCL, pH6,8	2,5ml
10% SDS	100µl	100µl	100µl	10% SDS	100µl
30% Acrylamid/ Bisacracrylamid	2,5ml	4ml	5ml	30% Acrylamid/ Bisacracrylamid	1,3ml
10% Ammoniumperoxidsulfat	100µl	100µl	100µl	10% Ammoniumperoxidsulfat	100µl
TEMED	10µl	10µl	10µl	TEMED	10µl
3x Lämmli-puffer:			SDS Laufpuffer		
Chemikalie	Menge		Chemikalie	Menge	
Glycerin	20%		Glycin	14,4g	
SDS	3%		Tris- Base	3g	
EDTA	10mM		SDS	1%	
Bromphenolblau	0,05%		H ₂ O	ad 1l	
frisch zugeben (1x):					
β- Mercaptoethanol	0,05%				

Die elektroforetische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (0,5% SDS) mittels einer eindimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese [261]. Das Trenngel hatte in der Regel in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine eine Konzentration von 7,5- 15% Acrylamid, das Sammelgel von 4%. Die Proteine wurden vor dem Laden mit Ladepuffer gemischt, für 5min gekocht und auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese

wurde bei 100V für 2h in SDS Laufpuffer durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Proteintransfer (Westernblot) auf eine Nitrocellulosemembran.

4.2.4.3 Westernblot

Tab.33: Puffer für Westernblot

Transferpuffer		Lösung 1		Filterstrip- Lösung	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
192mM	Glycin	4,5mM	Luminol	100mM	β- Mercaptoethanol
25mM	Tris Base	4,3mM	p- Iodophenol	62,5mM	Tris- HCl pH 6,8
20%	Methanol	100mM	Tris- HCl, pH 9,5	2%	SDS
NET- Gelatine		Lösung 2			
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie		
150mM	NaCl	0,003%	H ₂ O ₂		
5mM	EDTA	100mM	Tris- HCl, pH 9,5		
50mM	Tris- HCl, pH 7,5				
0,05%	Triton- X- 100				
0,25%	Gelatine				

Der Westernblot dient der Identifizierung eines spezifischen Antigens durch einen monoklonalen oder polyklonalen primären Antikörper. Die Detektion erfolgt über einen sekundären Antikörper, der eine konservative Domäne des primären Antikörpers erkennt. Der zweite Antikörper ist an Meerrettichperoxidase gekoppelt und dadurch über eine Chemolumineszenzreaktion nachweisbar. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine in einer Transferapparatur geblottet. Dazu wurde auf drei mit Transferpuffer angefeuchtete Lagen Whatman Papier die zugeschnittene Nitrocellulosemembran (ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet) auf die Blotapparatur gelegt, das Gel transferiert, mit 3 weiteren Lagen feuchten Whatmanpapiers bedeckt und die Apparatur geschlossen. In Abhängigkeit von der Größe des Gels ($0,001\text{mA}/\text{cm}^2$) wurde die Stromstärke eingestellt und für 3- 4h geblottet. Danach wurde die Membran zur Kontrolle der Transfereffektivität in Ponceau- S gefärbt. Die Färbung wurde mit Wasser entfernt und die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran für mindestens 1h in NET- Gelatine blockiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in NET- Gelatine unter leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C. Die unspezifisch gebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit NET- Gelatine (je 10min) entfernt. Der an Peroxidase gekoppelte zweite Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 in NET-

Gelatine eingesetzt und für 1h bei RT mit der Membran geschwenkt. Die Membran wurde erneut dreimal je 20min gewaschen. Der Nachweis des zweiten gebundenen Antikörpers erfolgte mit einem ECL- Detektionssystem. Hierbei wurden gleiche Mengen der Lösungen 1 und 2 kombiniert und die Membran für 2min inkubiert. Die Membran wurde dann auf einem Röntgenfilm (zwischen 15s und 30min) exponiert und entwickelt.

Um auf der gleichen Membran eine Westernblot Analyse mit einem anderen Antikörper durchzuführen, müssen die gebundenen Antikörper zuvor entfernt (gestrippt) werden. Dies erfolgt durch Schütteln der Membran in Filterstrip- Lösung für 30min bei 50°C und abschließendes zweimaliges Waschen (30min) in NET-Gelatine.

5 Ergebnisse

5.1 Experimentelles Modell: Minigen- Spleißassay

Zur Identifizierung potentieller Transfaktoren, die bei der Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 eine Rolle spielen, wurde ein Transfektionssystem in Zelllinien [10] etabliert, in welchem der Effekt bekannter, am Spleißen beteiligter Faktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf den der Exon 10 Inklusion/ Exklusion zugrundeliegenden Mechanismen untersucht werden kann (Abb.17). Diese Technik beruht auf dem sogenannten Exon - Trapping. Für diese schnelle und effiziente Methode zur Identifizierung exprimierter DNA Sequenzen in einer genomischen Sequenz ist ein spezieller Vektor notwendig, der folgende Komponenten enthält:

1. einen viralen Replikationsursprung, sowie einen starken Promotor, z.B. aus Simianvirus 40 (SV40)
2. zwei benachbarte spleißkompetente Exons eines bekannten Gens, inkl. Teilen des davon eingeschlossenen Introns. Innerhalb dieser intronischen Sequenz liegt eine multiple Klonierungsstelle (MCS).
3. eine (SV40) Polyadenylierungsstelle

Um unbekannt funktionelle Spleißstellen in genomischer DNA aufzuspüren, wird rekombinante DNA in eine Restriktionsschnittstelle der MCS kloniert und der so entstehende, als Minigen bezeichnete Vektor, transient in Zelllinien exprimiert. Ist innerhalb der inklonierten rekombinanten DNA eine Spleißstelle vorhanden, so kann sie durch RT- PCR mit Minigen- spezifischen Primern aufgrund des Größenunterschieds zur ungespleißten Variante detektiert werden (Abb17).

Verwendet man als rekombinante DNA ein alternativ gespleißtes Exon, wie z.B. Tau Exon 10, so gibt das Verhältnis des ungespleißten zum gespleißten RT- PCR- Produkt an, wie effizient die alternativen Spleißstellen in dem gegebenen System erkannt werden.

Wird zusätzlich zum Minigen ein Expressionsplasmid transfiziert, das für ein am Spleißvorgang beteiligtes Protein kodiert, so kann anhand eines veränderten Verhältnisses von Exoneinschluss zu - ausschluß auf die Stärke des Einflusses des verwendeten Transfaktors auf das Minigen geschlossen werden. Dabei wird durch Zugabe von leerem Vektor die Plasmidkonzentration für alle Proben konstant gehalten. Die Transkription erfolgt vom SV40 Promotor aus und die RNA wird unter

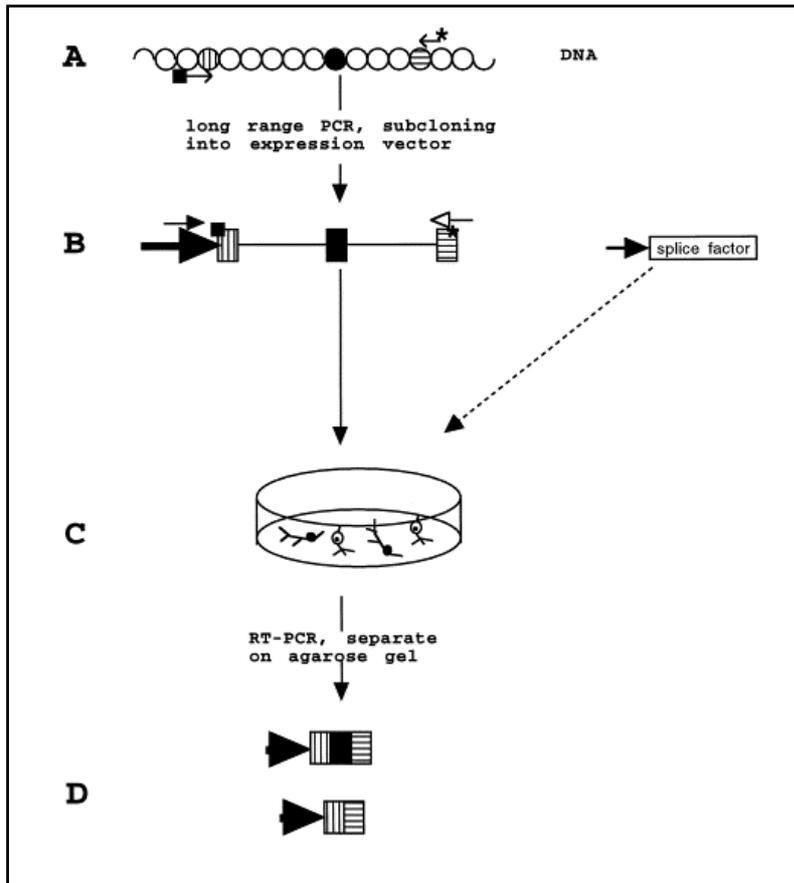


Abb.17: Minigen-Spleißassay

A) Mittels *long-range* PCR werden das alternativ gespleißte Exon (schwarzer Kreis) und seine flankierenden konstitutiven Exons (gestreifte Kreise), sowie dazwischenliegende intronische Bereiche (weiße Kreise) von einem genomischen DNA-Klon amplifiziert. Restriktionsschnittstellen werden durch die PCR-Primer eingeführt (dargestellt als Stern bzw. Rechteck).

B) Nach Subklonierung in einen geeigneten TOPO-Vektor wird das Minigen in die durch PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen eines eukaryotischen Expressionsvektors kloniert. Der eukaryotische Promotor ist als dicker Pfeil dargestellt, Exons als Rechtecke, Introns als Linien. Nach Transfektion wird die resultierende RNA mittels RT-PCR analysiert. Verwendet werden ein *antisense*-Primer gegen das stromabwärts gelegene flankierende Exon (gestrichelter Pfeil) und ein *sense*-Primer gegen eine vom Vektor abgeleitete Sequenz (durchgezogener Pfeil).

C) Das Minigen kann mit potentiellen Spleißfaktoren kotransfiziert werden, um deren Transfaktoreigenschaften zu testen, oder es kann in verschiedenen Zelllinien exprimiert werden, um seine Spleißkompetenz zu testen.

D) Die entstehenden PCR-Produkte können anhand ihrer Größe oder Hybridisierungsmuster unterschieden werden (Einschluss oder Ausschluss des alternativen Exons) [10].

Kontrolle der Spleißmaschinerie der Wirtszelle sowie unter Einfluss des zusätzlich transfizierten Interaktors in konzentrationsabhängiger Form gespleißt.

Ausgangspunkt für unsere Überlegungen war der bereits publizierte Effekt essentieller Spleißfaktoren wie SF2/ASF, SRp55 und SRp75 auf das Tau-Minigen SV10-pSVIRB [12]. Erste

Versuche beschäftigten sich demnach mit der Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse in unserem System, in dem abgesehen von einer anderen Zelllinie (HEK293 und HN10 statt Cos7) und der entsprechenden Transfektionsmethode (Calciumphosphat im Gegensatz zu Lipofektin) auch ein

erweitertes Minigenkonstrukt verwendet wurde (Abb. 18). Das im Labor von Andreadis et al. verwendete Konstrukt SV10 pSVIRB beinhaltet Tau Exon 10 und die proximalen Teile der flankierenden Introns (117bp aufwärts und 90bp abwärts von

Exon 10). Demgegenüber enthält das ebenfalls dort konstruierte Minigen SV9- 10L- 11- pSVIRB zusätzlich zu vergrößerten flankierenden intronischen Bereichen von Exon 10 noch Teile der Exons 9 und 11 sowie der angrenzenden Introns, so dass die Erfassung regulatorischer Sequenzen in intronischen Bereichen gewährleistet ist. In

nicht neuro-
nalen Zellen
(COS7), Neu-
roblastoma-
zellen (NT2)
und Tetra-
karzinomzellen
(SKN) ist das
Spleißmuster

für das SV10-
Minigen ein
Einschluss von
Exon 10,

während bei dem SV9- 10L- 11 Minigen zu ca. 20- 30% auch ein Ausschluss von Exon 10 detektierbar ist. Demzufolge kann ein verstärkter Ausschluss von Tau Exon 10 mit beiden Minigenen, ein verstärkter Einschluss jedoch nur mit dem SV9- 10L- 11 Minigen festgestellt werden. Gao et al. [12] konnten zeigen, dass ein Einfluss auf alternatives Spleißen von Tau Exon 10 durch SRp75, SRp55, SF2/ ASF und SWAP für beide Minigenkonstrukte erfolgte.

Ein weiteres Minigen (pSLP wt) verwendet einen anderen Spleißkontext. Hier wurde das alternative Exon 10 inklusive kurzer angrenzender intronischer Bereiche (Abb.18) zwischen tat- Exons kloniert [109].

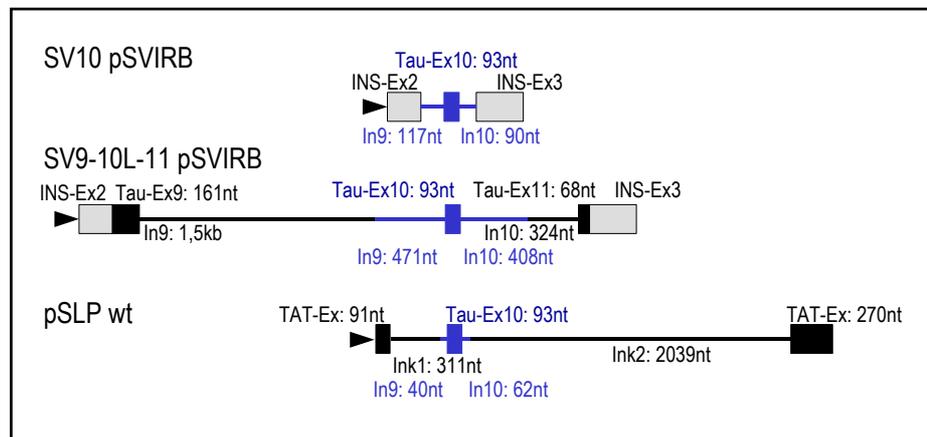


Abb.18: Vergleich der Tau- Minigene (schematisch)

Exons sind als Boxen dargestellt, Introns als Striche. INS – Insulin, Ex – Exon, In – Intron. Die Zeichnung wurde maßstabsgerecht angefertigt.

5.2 Htra2- β ist ein Transfaktor für das alternative Spleißen von Tau Exon 10

Eine Analyse der Sequenz von Tau Exon 10 sowie der flankierenden intronischen Bereiche führte zur Identifikation von mindestens sechs regulatorischen Elementen auf der prä- mRNA [11]. Für den 5'gelegenen purinreichen Enhancer (PPE, Abb.6, S.25) konnte nachgewiesen werden, dass ein SR- ähnliches Protein, der humane Transformer- 2 β , in Abhängigkeit von der Stärke des Enhancers dort spezifisch

bindet und somit den Einschluss von Tau Exon 10 *in vitro* verstärkt [94]. Diese Versuche wurden mit dem Volllängenprotein durchgeführt, für das in artifiziiellen Systemen bereits ein Einfluss auf alternative Spleißvorgänge gezeigt werden konnte. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass Htra2- β 1 den Ausschluss von Exon 8 des App- Minigens [209], sowie den von Exon 4 des CLB- Minigens verstärkt [206], während beim SMN2- Minigen der Einschluss von Exon 7 [207;208] und beim tra- Minigen der Einschluss von Exon 2 verstärkt wurde [1]. Ein Einfluss auf das Tau- Minigen SV10- pSVIRB konnte nicht festgestellt werden. Dieses Minigen erlaubt jedoch nur die Detektion eines verstärkenden Einflusses auf den Ausschluss von Tau Exon 10, ein umgekehrter Effekt wäre nicht erkennbar.

Erster Schritt dieser Arbeit war demnach eine Verifikation der *in vitro* Ergebnisse hinsichtlich des verstärkten Einschlusses von Tau Exon 10 durch die Htra2- β 1

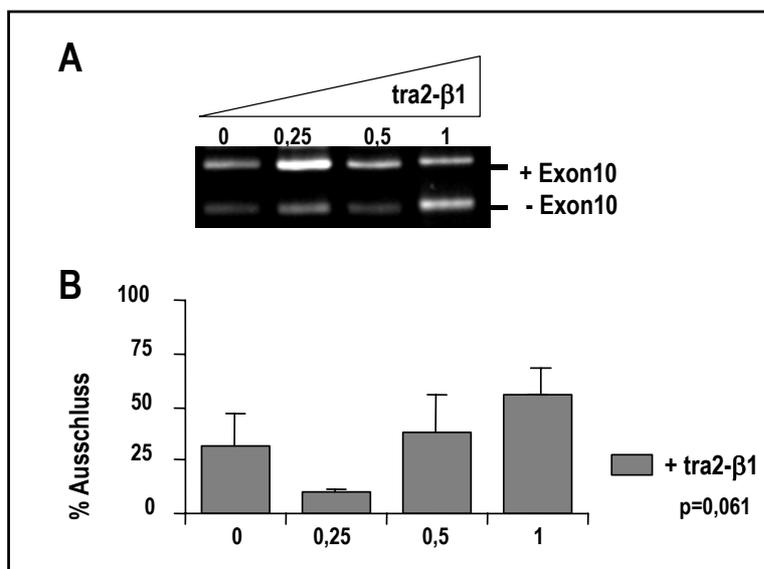


Abb.19: Einfluss von htra2- β 1 (Volllängenprotein) auf das alternative Spleißen von Tau Exon

- A. Ein Mikrogramm des Tau Minigens SV9- 10L- 11- pSVIRB wurde mit zunehmender Konzentration an htra2- β 1- pEGFP- c2 kotransfiziert, die RNA nach 18h extrahiert und mittels RT- PCR und genspezifischer Primer amplifiziert. Die Kontrolltransfektion erfolgte mit pEGFP- c2. Die Spleißprodukte haben eine Größe von 336bp (- Exon 10) und 429bp (+ Exon 10).
- B. Statistische Auswertung von mindestens drei Experimenten

Volllängenisoform unter Verwendung des Minigens SV9- 10L- 11- pSVIRB. Eine konstante Menge des Minigens wurde zusammen mit einer ansteigenden Menge an htra2- β 1, gekoppelt an EGFP (enhanced green fluorescent protein) in HEK293 Zellen transfiziert. Anhand der grünen Fluoreszenz ließ sich die Transfektionseffizienz optisch abschätzen. Es wurden nur Versuchsreihen mit durchgehend gleicher

Effizienz in die Auswertung miteinbezogen. Das Htra2- β 1 Volllängenprotein zeigte einen verstärkenden Einfluss auf den Einschluss von Tau Exon 10. Dieser Effekt war nur bei geringen Plasmidkonzentrationen feststellbar, während höhere

Konzentrationen einen eher hemmenden Effekt auszuüben schienen. Die statistische Auswertung von mindestens drei unabhängigen Experimenten blieb knapp unterhalb des Signifikanzniveaus ($F=3,314$; $df=3$; $p=0,061$; Abb.19, S.71).

Effekte der alternativen Isoform Htra2- β_3 , der eine Protein:Protein-Interaktionsdomäne, die N-terminale SR- Domäne, fehlt, konnten bislang nicht nachgewiesen werden [1].

Eine Analyse des Spleißverhaltens der trunkierten Htra2- β_3 Isoform in einem geeigneten Transfektionssystem zeigte einen von der Vollängenisoform abweichenden Effekt.

Während bei dieser ein verstärkter Einschluss von Tau Exon 10 festgestellt werden konnte, führte die Htra2- β_3 - Isoform zu einem signifikant erhöhten Ausschluss dieses alternativen Exons ($F=5,213$; $df=3$, $p=0,013$; Abb.20).

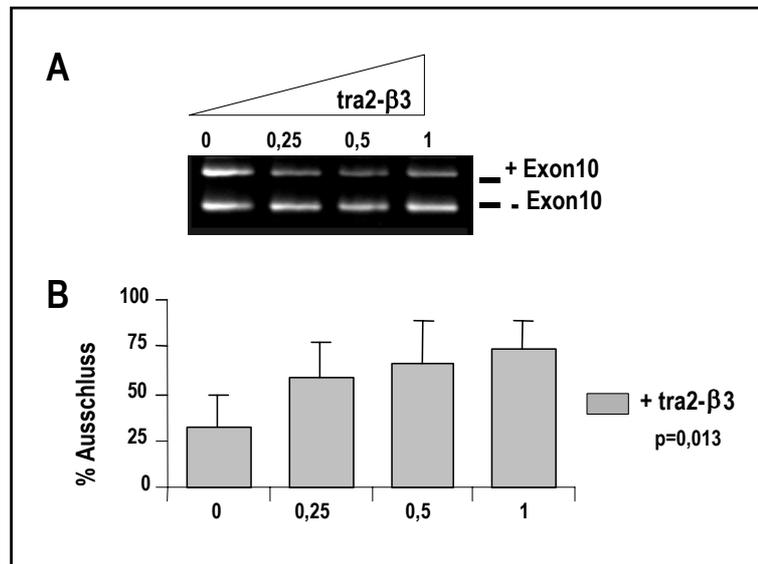


Abb.20: Einfluss von htra2- β_3 (Δ SR1- Isoform) auf das alternative Spleißen von Tau Exon

- A. Ein Mikrogramm des Tau Minigens SV9- 10L- 11 wurde mit zunehmender Konzentration (angegeben in [μg]) an htra2- β_3 - pEGFP- c2 kotransfiziert. Die Kontrolltransfektion erfolgte mit pEGFP- c2. Die Spleißprodukte haben eine Größe von 336bp (- Exon 10) und 429bp (+ Exon 10). M- Marker.
- B. Statistische Auswertung von mindestens drei Experimenten: htra2- β_3 erhöht den Ausschluss von Tau Exon 10 signifikant.

5.3 Htra2- β_1 induziert alternatives Spleißen in einem Clk2-Hintergrund

Die Kinase Clk2 phosphoryliert nachweislich SR- Proteine *in vitro* und in Zellkulturexperimenten und reguliert auf diese Weise deren Aktivität. Aus Transfektionsexperimenten in Zelllinien ist bekannt, dass Überexpression von Clk2 zu einem veränderten Spleißmuster des tra2- Minigens und damit zu verändertem Verhältnis der Tra2- β - Isoformen führt. Durch steigende Konzentrationen an Clk2 wurde verstärkt die Expression der tra2- β_2 mRNA induziert, die aufgrund eines prämaturnen Stopkodons nicht als Protein translatiert wird, sondern wahrscheinlich

dem *nonsense mediated decay* unterliegt. Höhere Konzentrationen an Clk2 induzieren zusätzlich auf noch ungeklärte Weise die Expression der trunkierten Isoform htra2- β 3. Ein weiterer Mechanismus, über den Clk2 in die Regulation der Tra- Funktion eingreifen könnte, ist die Hyperphosphorylierung dieses Proteins, die

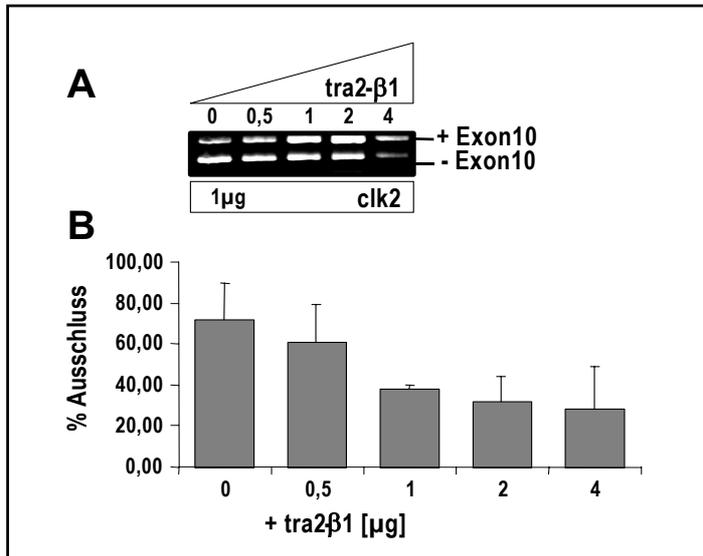


Abb.21: Alternatives Spleißen von Tau Exon 10 in einem Clk2 Hintergrund

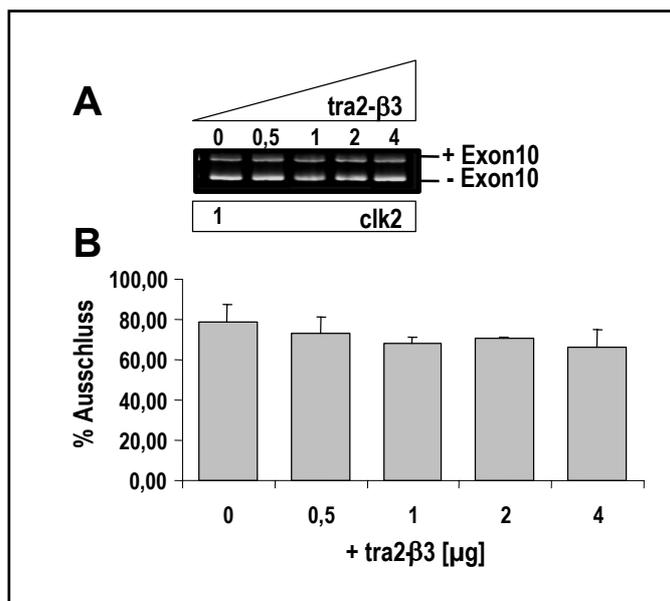
- Ein Mikrogramm des Tau Minigens SV9- 10L- 11 wurde mit konstanter Konzentration an mClk2 pEGFP (0,125μg) und zunehmender Konzentration an htra2- β 1- pEGFP- c2 kotransfiziert. Die Spleißprodukte haben eine Größe von 336bp (-Exon 10) und 429bp (+ Exon 10).
- Statistische Auswertung von mindestens drei Experimenten: In einem Hintergrund von Clk2 (Tau Exon 10 Ausschluss bei ca. 70%) führt Transfektion von htra2- β 1 zu signifikant verstärktem Einschluss von Tau Exon 10 (df=4, F=4,49, p=0,025).

zu einer verminderten Bindungskapazität an exonische Enhancersequenzen führen könnte, wie dies für den ESE in Exon 2 der tra2- β prä- mRNA bereits gezeigt wurde. Ob sich ein Einfluss der Kinase Clk2 auf das durch Htra2- β induzierte Spleißverhalten des Exons 10 im Tau- Gen nachweisen lässt, war Gegenstand des nachfolgenden Spleißassays. Dazu wurden eine konstante Menge des Tau- Minigens und des mClk2- Expressionsplasmids zusammen mit ansteigender Konzentration des jeweiligen htra- Konstrukts in HEK293 Zellen kotransfiziert

und das Verhältnis der Tau- Isoformen zueinander untersucht. Für die Voll-längenisiform Htra2- β 1 lässt sich in diesem Setting ein verstärkter Einschluss des Exons 10 ermitteln (F=4,493; df=4; p=0,025; Abb.21), während die kürzere Isoform Htra2- β 3 zu keiner weiteren Steigerung des Ausschlusses von Exon 10 führt (F=1,495; df=4; p=0,28; Abb.22, S.74).

Abb.22 Alternatives Spleißen von Tau Exon 10 in einem Clk- Hintergrund

- A. Ein Mikrogramm des Tau Minigens SV9- 10L- 11 wurde mit konstanter Konzentration an mClk2 pEGFP (0,125µg) und zunehmender Konzentration an htra2- β3- pEGFP- c2 kotransfiziert. Die Spleißprodukte haben eine Größe von 336bp (- Exon 10) und 429bp (+ Exon 10).
- B. Statistische Auswertung von mindestens drei Experimenten: In einem Hintergrund von Clk2 (Tau Exon 10 Ausschluss bei ca. 70%) führt Transfektion von htra2- β3 zu keiner signifikanten Veränderung.



5.4 Proteinkinasen

5.4.1 Clk1- 4

Die SR- Proteinkinasen CLK (CDC like kinase) gehören zur Gruppe der LAMMER Kinasen und zeichnen sich durch eine duale Substratspezifität aus. Sie agieren entweder als Serin/ Threonin- oder als Tyrosinkinase [262]. Clk- Kinasen enthalten eine SR- Domäne und werden in Überexpressionssystemen und *in vitro* an Tyrosin-, Serin- oder Threoninresten autophosphoryliert [5;238;239;263]. Alle bisher identifizierten Mitglieder der Clk- Familie (Clk1- 4) phosphorylieren SR- Proteine *in vitro* [230;234]. Zusätzlich ist für Clk2 auch eine *in vivo* Phosphorylierung des SR- Proteins ASF/ SF2 gezeigt worden [5]. Sowohl eine Hyperphosphorylierung als auch eine Hypophosphorylierung von ASF/ SF2 und SC35 inhibiert Spleißen *in vitro* [244]. Mitglieder der Clk- Familie können demnach SR- Proteinaktivität regulieren und so einen Einfluss auf das alternative Spleißen nehmen. Weitere Unterstützung erhält dieses Modell durch den Nachweis, dass überexprimiertes CLK1/ Sty, humanes Clk2 und humanes Clk3 in der Lage sind, das alternative Spleißen des E1A- Minigens zu beeinflussen [243;264].

Die Kinasen Clk1- 4 sind potentiell in das alternative Spleißen von Tau Exon 10 involvierte regulierende Faktoren und wurden in Transfektionsexperimenten in HEK293 Zellen getestet (Abb.23).

Ohne die Zugabe einer Kinase (control) wurde Exon 10 in ca. 30% der vom Minigen abgeleiteten RNA ausgeschlossen (Abb.23a,c). Dieser Prozentsatz stieg in der Anwesenheit von Clk1 und Clk4 auf etwa 45% ($p=0,056$ bzw. $p=0,062$) und war für

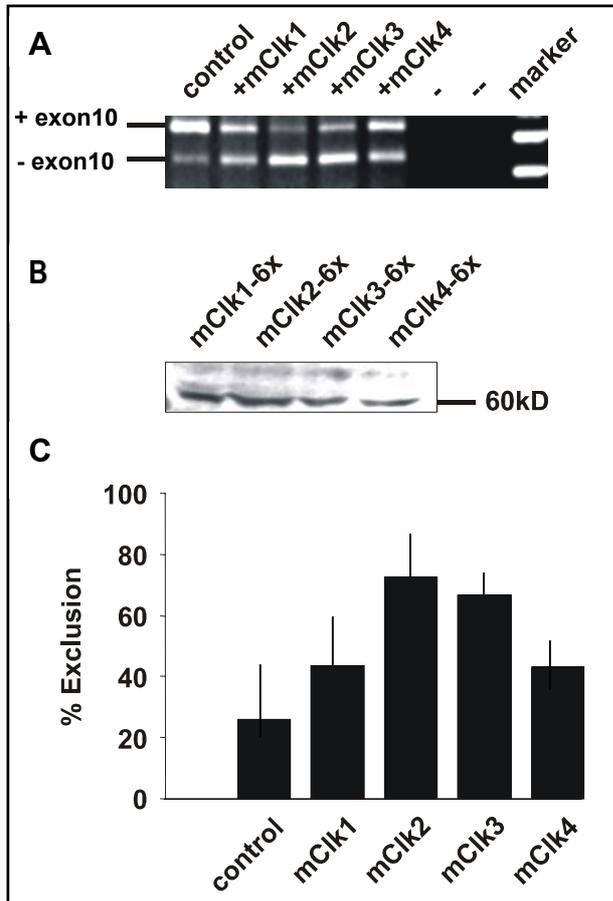


Abb.23: Einfluss der Clk Kinasen auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10

A. Ein Mikrogramm des Tau Minigens SV9- 10L- 11 wurde mit 0,5 μ g der entsprechenden Maus Clk Kinase (mClk1- 4) kotransfiziert, die RNA nach 18h extrahiert und mittels RT- PCR und genspezifischer Primer amplifiziert. Die Kontrolltransfektion erfolgte mit pEGFP- c2. Die Spleißprodukte haben eine Größe von 336bp (- Exon 10) und 429bp (+ Exon 10). - und -- sind Kontrollreaktionen ohne cDNA Template bzw. ohne RNA.

B. Westernblot zur Demonstration vergleichbarer Proteinmengen von mClk1- 4 Protein. 50 μ l Proteinlysate nach Transfektion mit 6x Histidin markierten mClks 1- 4 wurde mittels Ni- HPRT (Qiagen) analysiert.

C. Statistische Auswertung von mindestens 4 voneinander unabhängigen Versuchen. Prozentsatz des Ausschlusses von Exon 10 wurde berechnet. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens vier Experimenten.

Clk2 mit ca. 75% am höchsten ($p<0,0001$) gefolgt von Clk3 (ca. 70%, $p<0,01$). Um auszuschließen, dass dieser Effekt ein Resultat unterschiedlich starker Proteinexpression der Kinasen war, wurden Proteinlysate eines parallelen Transfektionsansatzes immunpräzipitiert und die Expression mit einem Westernblot analysiert (Abb.23b). Hierbei konnte eine vergleichbare Proteinexpression für alle vier Kinasen festgestellt werden. Die Kinasen Clk1- 4 sind offenbar in der Lage, den Ausschluss von Tau Exon 10 zu verstärken. Dieser Effekt ist unabhängig von dem verwendeten Clk- Konstrukt und der verwendeten Zelllinie. Sowohl für die Konstrukte Clk- pEGFP, Clk- 6xHis- pcDNA, Clk- flag- pcDNA, als auch für die unterschiedlichen Zelllinien HN10, HeLa und HEK293 konnte der gleiche Einfluss nachgewiesen werden.

5.4.1.1 mClk2 fördert den Ausschluss von Tau Exon 10 in einem heterologen Kontext

Wie bereits früher gezeigt werden konnte, sind beide flankierenden Exons 9 und 11 an der Feinregulation des Spleißprozesses von Exon 10 beteiligt [12]. Es ergab sich daher die Frage, ob die Clks ihren Einfluss auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 auch in einem heterologen Kontext ausüben. Um dies zu testen, wurde ein Minigenkonstrukt eingesetzt, bei dem Tau Exon 10 von zwei tat- Exons flankiert wird (Abb.18, S.70, [109]).

Wie in Abb.24a zu erkennen, verstärkt Clk2 auch in diesem Zusammenhang den Ausschluss von Tau Exon 10 ($F=19,84$; $df=2$; $p=0,002$). Der Effekt, ein vermehrter Ausschluss von 25 auf 45% ($p=0,03$, Abb.24b), ist relativ klein verglichen mit dem Effekt des Minigens, das die natürlich vorkommenden flankierenden Regionen enthält (Abb.23c, S.75). Außerdem musste eine größere Menge an Clk2 ($2\mu\text{g}$ im Vergleich zu $0,5\mu\text{g}$) transfiziert werden, um diesen Effekt zu erzielen (Abb.24a,b). Versuche mit den anderen Clks (1, 3 und 4) und Minigenkonstrukten, die von konstitutiven Exons flankiert wurden, lieferten ähnliche Resultate. Daher ist anzunehmen, dass die Clks den Ausschluss von Tau Exon 10 unabhängig vom genomischen Kontext induzieren. Die natürlich vorkommenden flankierenden Sequenzen verstärken jedoch diesen Effekt.

5.4.1.2 Abhängigkeit von der Kinaseaktivität

Wie bereits gezeigt werden konnte, phosphorylieren die Kinasen Clk1- 4 SR- Proteine *in vitro* und in Transfektionsexperimenten. Transfiziertes ASF/ SF2- pEGFP zeigte bei gleichzeitiger Überexpression von Clk1- 4 in Cos7- Zellen nach Analyse im Westernblot eine verringerte Mobilität. Dies weist darauf hin, dass eine

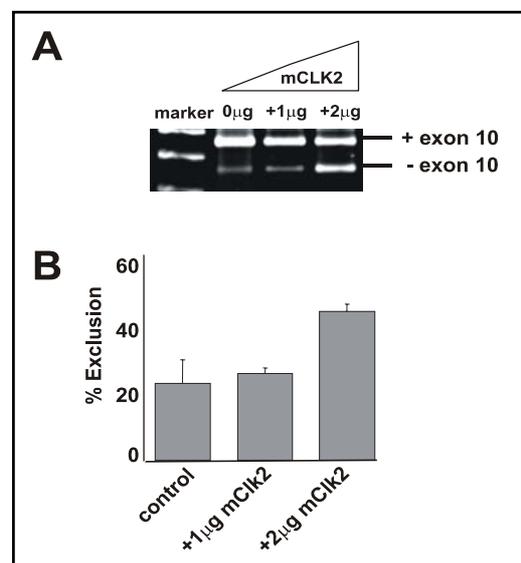


Abb.24: Einfluss von mClk2 auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 in einem heterologen Kontext

- A. $1\mu\text{g}$ des pSPL3wt Minigens (enthält Exon 10 flankiert von tat-Exons) wurde mit zunehmenden Konzentrationen an mCLK2 Expressionskonstrukt in HEK293 Zellen kotransfiziert.
- B. Statistische Auswertung von mind. 3 unabhängigen Experimenten. Der Prozentsatz an Exon 10 Ausschluss ist angegeben.

Phosphorylierung stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu konnte dieser Mobilitätsunterschied nach Überexpression der katalytisch inaktiven Clk- Konstrukte, bei der die innerhalb der Kinasedomäne liegende Aminosäure Lysin₁₉₀ zu Arginin mutiert wurde, nicht festgestellt werden. Zum Teil konnte sogar ein Verringerung der molekularen Masse von ASF/ SF2 festgestellt werden, was auf einen dominant-

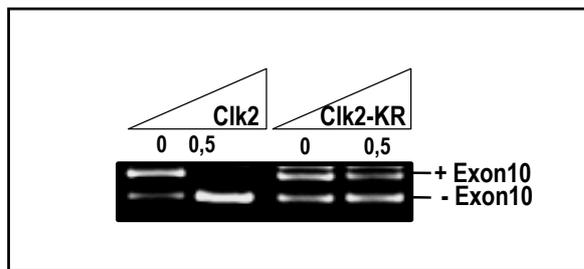


Abb.25: Vergleich des Einflusses von Clk2 und Clk2- KR in Tau Exon 10 Spleißassays

1µg des SV9- 10L- 11 pSVIRB Mings wurde mit 0,5µg Clk2- pEGFP bzw. Clk2- KR- pEGFP in HEK293 Zellen kotransfiziert. Die aktive Kinase Clk2 verstärkt den Ausschluss von Tau Exon 10, während die inaktive Variante Clk2- KR keine Effekt zeigt.

negativen Effekt hinweist [5]. Um nachzuweisen, ob der Einfluss von Clk2 auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 phosphorylierungsabhängig erfolgt, oder eher die Folge einer Protein-sequestrierung durch Clk ist, wurde der Einfluss von Clk2 mit dem der inaktiven Variante Clk2- KR in einem Transfektionsexperiment verglichen. Wie man aus Abb.25 entnehmen kann, zeigt die inaktive Variante keinen Effekt auf den Ein- bzw. Ausschluss

von Tau Exon 10, während die aktive Kinase den schon beobachteten verstärkten Ausschluss von Tau Exon 10 bewirkt, so dass man von einer phosphorylierungsabhängigen Reaktion ausgehen kann.

5.4.1.3 Selektivität der Spleißstellenerkennung durch Clk2

Überexpression von Clk2 ließ bei einer Reihe anderer Minigene keinen Einfluss auf das alternative Spleißmuster erkennen. So zeigte sich keine Veränderung in Experimenten mit dem alternativen 24nt Exon von GABA_Aγ2 [265], Exon EN der leichten Kette von Clathrin B [206;266], Exon 11 des Insulinrezeptors [267] und Exon 2A des SWAP Gens [268]. Ein moderater Effekt war für das Minigen X16/ SRp20 Exon 4, sowie das E1A- Minigen festzustellen [10].

Sowohl Clk1 als auch Clk2 blockieren den Einschluss von Exon 2 im htra2- β Mingen. In höheren Konzentrationen blockiert Clk2 zusätzlich den Einschluss von Exon 3, so dass hier die hirnspezifische Isoform Htra2- β3 verstärkt gebildet wird, der die N- terminale SR- Domäne fehlt [1].

5.4.1.4 Der Effekt von Clk2 ist indirekt

Da Clks keine bekannten RNA- Bindungsmotive aufweisen und offenbar nicht an RNA binden, ist davon auszugehen, dass der Effekt auf das alternative Spleißen indirekt über die Phosphorylierung anderer Proteine führt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden bekannte *in vitro*- Targets der Kinase Clk2 hinsichtlich ihres Effekts auf das alternative Spleißen des Tau- Minigens in Transfektionsassays überprüft und mit dem der Kinase Clk2 verglichen. Gleichzeitig lässt sich eine Aussage über die Spezifität des Minigens treffen. Für die SR- Proteine SRp20, SRp30, SRp40 und SC35 konnte kein Einfluss auf das Spleißmuster festge-

stellt werden [12]. Transfektion der Expressionskonstrukte SRp55, SRp75, SAF- B und hnRNP- G führte zu einer moderaten Stimulation des Exon 10 Ausschlusses. Der Anstieg des Exon 10 Ausschlusses lag bei Transfektion von 0,5µg des entsprechenden Expressionsplasmids bei 33% (SRp75, SRp55, SAF- B), 60% (hnRNP- G) und 66% (Htra2- β3, Abb.20, S.72) und damit immer unter dem, der für Clk2 (79%) (Abb.23, S75) zu beobachten war (Abb.26).

5.4.2 SRPK1A

Eine weitere SR- Proteinkinase, die SR- Proteine *in vitro* phosphoryliert und an der Regulierung des Aufbaus des Spleißosoms sowie der intranukleären Verteilung von Spleißfaktoren beteiligt ist, ist SRPK1 [231;269]. Im Gegensatz zu Clk hat SRPK1 eine höhere spezifische Aktivität in Bezug auf die Phosphorylierung von ASF/ SF2. Des weiteren phosphoryliert SRPK1 bevorzugt Serin- Argininreste, während für Clk

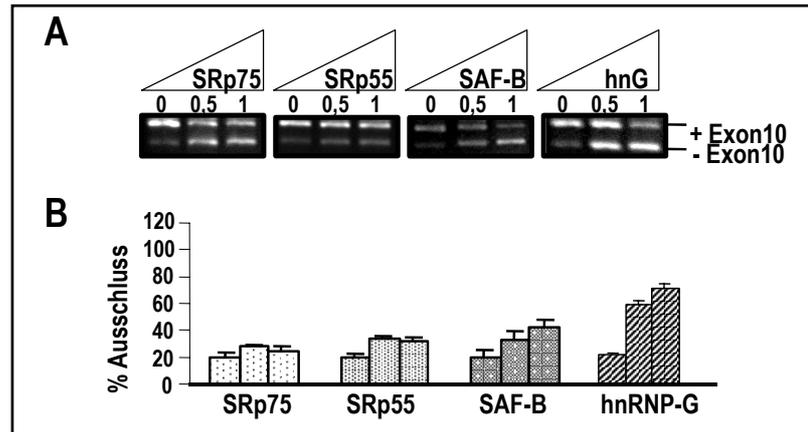


Abb.26: Einfluss verschiedener spleißrelevanter Proteine im Transfektionsassay

- A. Es wurden jeweils 0,5 bzw. 1µg des Expressionsplasmids mit dem SV9- 10L- 11- pSVIRB in HEK293 Zellen kotransfiziert.
 B. Die Grafik stellt den Mittelwert aus je 3 unabhängigen Experimenten dar.

keine Präferenz zwischen Serin- Arginin-, Serin- Lysin- und Serin- Prolinresten erkennbar ist [230]. Die alternative Spleißvariante SRPK1a, die ein 513bp Insert zwischen Exon 1 und Exon 2 enthält, zeigt bezüglich ihrer Substratspezifität und intrazellulären Lokalisation (primär im Zytoplasma, aber auch im Nukleus) keinen Unterschied zu SRPK1. Die gewebespezifische mRNA- Expression ist für beide Isoformen ähnlich, wobei der Expressionsgrad für SRPK1 höher zu sein scheint, umgekehrt ist Aktivität von SRPK1a in Phosphorylierungsexperimenten 2- 3mal höher [232]. Ein weiterer Unterschied zwischen den Isoformen besteht in der Interaktion von SRPK1a mit dem Scaffold Attachment Factor B (SAF- B), einem an die nukleäre Matrix assoziiertem Protein [232].

5.4.2.1 Regulation von Exon 10 durch SRPK1 und SRPK1a

Um festzustellen, ob die durch SRPK1/ 1a vermittelte Phosphorylierung von

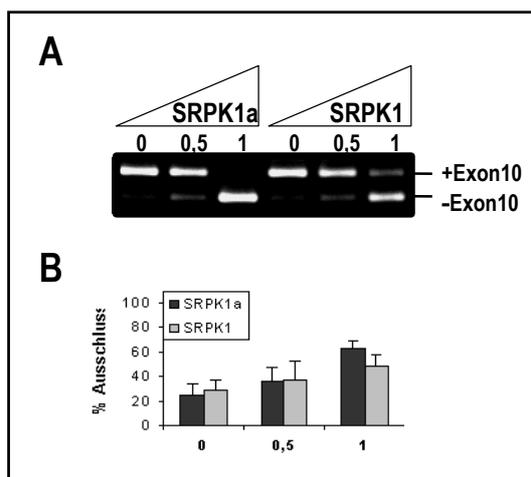


Abb.27: Einfluss von SRPK1 und SRPK1a auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10

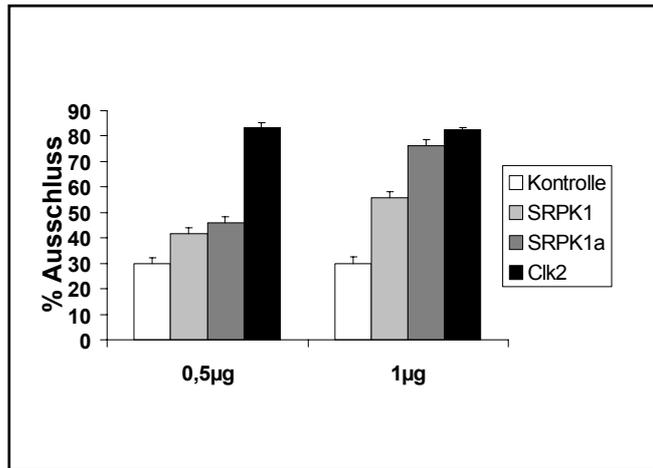
- A. HEK293 Zellen wurden mit 1µg SV9- 10L- 11 Minigen und einer steigenden Menge (0; 0,5; 1µg) SRPK1- flag bzw. SRPK1a- flag kotransfiziert. Die alternativ gespleißten Produkte haben eine Größe von 336bp (- Exon 10) und 429bp (+Exon 10).
- B. Statistische Auswertung von mind. 3 unabhängigen Experimenten. Der Prozentsatz an Exon 10 Ausschluss ist angegeben.

Spleißfaktoren einen ähnlichen Effekt auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 hat, wie die Kinasen Clk1- 4, wurde der bereits beschriebene Transfektionsassay mit dem SV9- 10L- 11- Minigen durchgeführt. Wie in Abb.27 dargestellt, stimulieren sowohl SRPK1 als auch SRPK1a den Ausschluss von Tau Exon 10 (SRPK1: $F=9,112$, $df=2$, $p=0,01$, SRPK1a: $F=29,75$, $df=2$, $p<0,001$). Für geringe Konzentrationen an transfiziertem Kinasekonstrukt (Kinase: Minigen=1:2) ist die Induktion des Ausschlusses von Tau Exon 10 sowohl für SRPK1 als auch für die Variante SRPK1a vergleichbar mit der Wirkung von Clk1 bzw. 4 (ca. 45%), jedoch geringer als die von Clk2 bzw. 3 (ca. 70- 75%). Bei höheren Kinasekonzentrationen (Kinase: Minigen= 1:1) ist die

durch SRPK1a (ca. 70%) im Gegensatz zu SRPK1 (ca. 60%) bewirkte Verstärkung des Exon 10 Ausschlusses fast ebenso hoch wie für Clk2 (75%) (Abb.28).

Abb.28: Vergleich des Effekts auf das alternative Spleißen (Tau Exon 10) von SRPK1/ 1a mit mClk2

Die statistische Auswertung von mind. drei unabhängigen Experimenten zeigt bei niedriger Konzentration einen deutlich stärkeren Effekt für mClk2 (SRPK1 und SRPK1a liegen dabei auf etwa gleichem Niveau). Bei höherer Konzentration (1µg), die für mClk2 keine weitere Veränderung bewirkt, steigt der Ausschluss von Tau- Exon 10 durch SRPK1 auf ca. 60% und für SRPK1a auf ca. 70% ansteigt (mClk: ca.75%).



5.4.3 CDK5

mClk2 ist eine nukleäre Kinase. Ihre subnukleäre Lokalisation sowie ihre Aktivität wird durch Phosphorylierung von Serin 141, welches bei allen Mitgliedern der Clk-Familie konserviert ist, reguliert [241]. Wahrscheinlich ist dieser Serinrest Angriffsort noch nicht determinierter vorgeschalteter Kinasen. Vor kurzem ergaben sich Hinweise, dass CDK5 (oder nClk), die wichtigste Cyclin- abhängige Kinase im Gehirn, in von der Alzheimerkrankheit befallenen Neuronen konstitutiv aktiv ist [270]. Für die Aktivierung muss CDK5 mit seiner regulatorischen Untereinheit p35 assoziieren. Patrick et al. stellten fest, dass im Gehirn von Alzheimer- Patienten eine trunkierte weitgehend degradationsresistente Form dieser regulatorischen Untereinheit, p25, in befallenen Neuronen akkumuliert, wobei eine Korrelation zu einem Anstieg der Kinaseaktivität festzustellen war. Die pathologische Prozessierung von p35 zu p25 in Alzheimergehirnen wird möglicherweise durch die neuronale Protease Calpain aktiviert [271]. CDK5 kontrolliert andere Proteine wie z.B. DARPP-32, von dem gezeigt werden konnte, dass es Serin/ Threoninkinasen und Serin/ Threoninphosphatasen reguliert [272]. CDK5 findet sich auch in hyperphosphorylierten Neurofilamenten in der Parkinsonerkrankung [273]. Obwohl CDK5 in der Regel mit der Phosphorylierung des Tau- Proteins in Zusammenhang gebracht wird, stellte sich uns aufgrund seiner multiplen zellulären Substrate und strukturellen Ähnlichkeit zu Clk2 die Frage, ob ein Einfluss von CDK5 auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 festgestellt werden kann [272;274]. Dazu untersuchten wir CDK5 zusammen mit seinen Aktivatoren p25 und p35 in einem Spleißassay. Wie Abb.29 zeigt, hatte die Transfektion von CDK5 alleine (F=0,124,

df=2, p=0,886) oder zusammen mit p35 (F=0,937, df=2, p=0,442) keinen signifikanten Effekt auf die Verwendung von Tau Exon 10. In Anwesenheit des konstitutiven Aktivators, p25 bzw. des Komplexes CDK5/ p25 konnte ein moderater

Effekt in Richtung eines verstärkten Ausschlusses von Tau Exon 10 festgestellt werden (F=5,184, df=2, p=0,049). Dieser Effekt war jedoch wesentlich schwächer als der durch mClk2 induzierte (CDK5: ca. 45%, mClk2: ca. 75%), obwohl eine bis zu 8fache Menge an DNA transfiziert wurde.

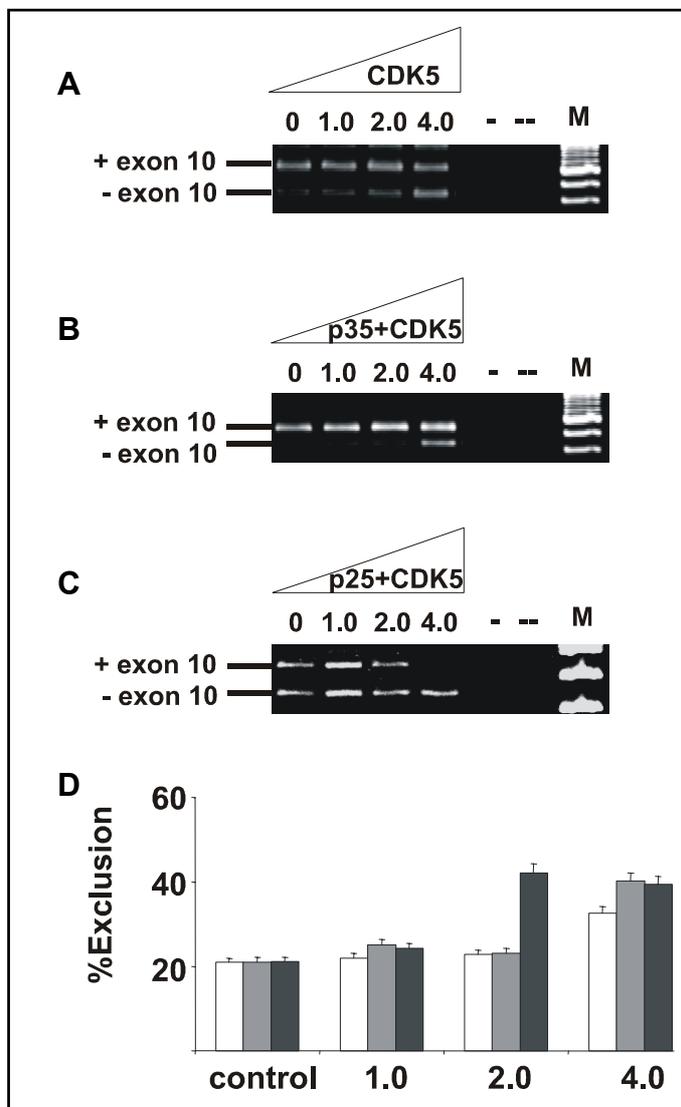


Abb.29: Einfluss von CDK5 auf Exon 10
 In HEK293 Zellen wurde eine Kotretransfektion durchgeführt. 1µg des SV9- 10L- 11 Minigens wurde transfiziert zusammen mit ansteigender Konzentration an:
 A. CDK5- pGFP
 B. CDK5- pGFP und 1µg p35- Expressionskonstrukt
 C. CDK5- pGFP und 1µg p25- Expressionskonstrukt
 D. Statistische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten: weiße Balken: CDK5, graue Balken: p35 + CDK5, schwarze Balken: p25 + CDK5

5.4.4 DYRK 1A

Für die Kinase DYRK 1A wird eine Beteiligung an pathologischen Mechanismen von Tauopathien diskutiert. Aufgrund ihrer chromosomalen Lokalisation in einem mit AD [275], Down Syndrom und Mikrozephalus infolge Monosomie 21 gekoppelten Bereich (Chromosom 21q22.2), sowie der Überexpression in von Down Syndrom betroffenen fötalen Gehirnen, ist diese Kinase ein potentieller Kandidat für bestimmte Tauopathien. Ein weiterer Hinweis ergibt sich aus der Beobachtung, dass das Tau-Protein ein *in vitro*- Substrat dieser Kinase darstellt. Ob die Phosphorylierungsaktivität von DYRK 1A ebenso wie die von Clk2 bereits auf

Ebene des prä- mRNA Spleißens eingreift, sollte mit einem Transfektionsassay nachgewiesen, sowie mit dem Effekt von Clk2 verglichen werden. Dazu wurde das Minigen SV9- 10L- 11- pSVIRB verwendet. Wie man in Abb.30 erkennen kann, konnte für eine Konzentration von 0,5µg DYRK 1A- Expressionsplasmid kein signifikanter Effekt festgestellt werden, während der verstärkte Ausschluss von Exon 10 unter Einfluss von Clk2 für die gleiche Konzentration signifikant ist und schon bei wesentlich geringeren Konzentrationen (0,1µg) reproduzierbar festzustellen ist.

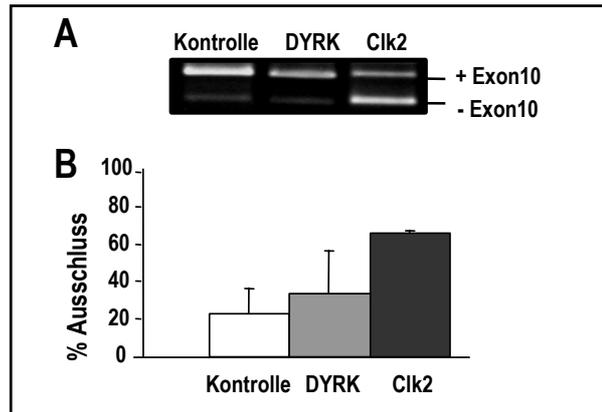


Abb.30: Einfluss von DYRK 1A auf Exon 10

- A. In HEK293 Zellen wurde eine Koftransfektion von 1µg des SV9- 10L- 11 Minigens zusammen mit 0,5µg pEGFP-c2, DYRK 1A- c2, und mClk2- c2 durchgeführt.
- B. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

5.5 FTDP- 17 Mutationen

5.5.1 Spleißverhalten verschiedener FTDP- 17 Mutationen

Da die meisten der bisher bekannten FTDP- 17 auslösenden Mutationen im Tau Gen in oder um Exon 10 lokalisiert sind und nachweislich die Expression der Tau- Isoformen bezüglich des Ein- bzw. Ausschlusses von Exon 10 beeinflussen, ist es naheliegend, diese Mutationen in ein Minigen einzuführen und das Spleißverhalten in Zellkultur zu untersuchen. Da die flankierenden Exons 9 und 11 an der Regulation des alternativen Spleißens von Exon 10 beteiligt sind, wurden das SV9- 10L- 11- pSVIRB Minigen verwendet, um das Verhalten einiger Mutationen, die bei FTDP- 17 mit verändertem Spleißen in Verbindung gebracht werden, in Transfektionsassays zu untersuchen. All diese Mutationen veränderten exonische oder intronische Sequenzelemente, die in Spleißvorgang involviert sind. Untersucht wurden die Mutationen N279K, welche einen purinreichen Enhancer verstärkt, L284L eine stille Mutation, die einen A/ C reichen Enhancer verändert, S305N, eine Mutation, die die Bindung der U1 snRNA am 3'- Ende des Exons erleichtert und zu einer Destabilisierung eines potentiellen Stemloops führen könnte und schließlich die

intronische Mutation M16, sowie ihre kompensatorische Mutation C16, die zur Zerstörung bzw. Wiederherstellung der potentiellen Stemloopstruktur führen könnten. Die durchgeführten Spleißassays zeigten, dass alle untersuchten Mutationen den

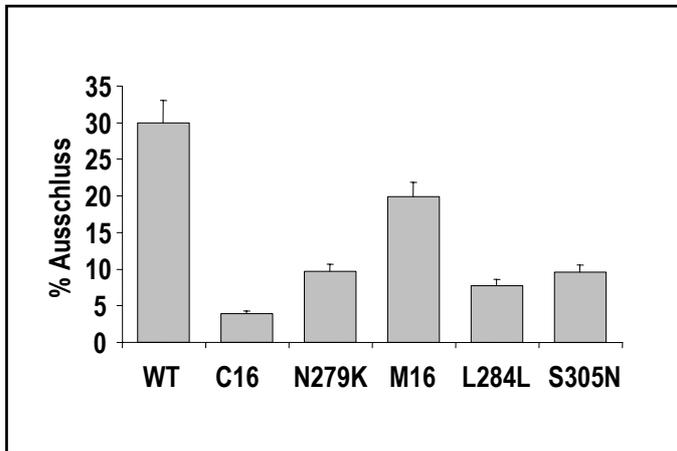


Abb.31: Alternatives Spleißen von Tau Exon 10 bei verschiedenen FTDP- 17 Mutationen

In HEK293 Zellen wurde eine Transfektion von je 1µg der unterschiedlichen Minigenmutanten in pSVIRB- Hintergrund durchgeführt.

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Der Ausschluss von Tau Exon 10 ist in allen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp vermindert.

Einschluss des Exons 10 verstärkten, und zwar in Abhängigkeit von der Lokalisation der Mutation unterschiedlich stark (Abb.31).

5.5.2 Clk2 beeinflusst das Spleißverhalten verschiedener FTDP- 17 Mutationen

Im nächsten Schritt gingen wir der Frage nach, ob sich diese FTDP- 17 Mutationen, die einen verstärkten Einschluss von Tau Exon 10 in Zellkultur bewirken, durch die Kinase Clk2 beeinflussen lassen. Wie wir schon zeigen konnten, erhöht Clk2 in Spleißassays den Ausschluss von Tau Exon 10 und hat so im Vergleich zu den untersuchten Mutationen einen gegensätzlichen Effekt. Aufgrund seiner Aktivität als SR- Proteinkinase ist es ein potentieller Kandidat für die Regulierung des in den Mutationen auftretenden Fehlspleißens. Untersucht wurden die in Abb.7 (S.27) aufgeführten Mutationen unter Einfluss von Clk2 und Clk2- KR in Kotransfektionsexperimenten.

Mit Ausnahme der Mutation S305N führte eine Expression dieser Konstrukte in Anwesenheit von Clk2 zu einem verstärktem Ausschluss von Tau Exon 10, ähnlich wie er für das Wildtyp Tau- Minigen SV9- 10L- 11- pSVIRB festzustellen war. Im Gegensatz dazu hatte die katalytisch inaktive Variante Clk2- KR keinen Effekt, was darauf hinweist, dass der Ausschluss von Tau Exon 10 über Phosphorylierungsprozesse vermittelt wird. Clk2 hatte den stärksten Effekt auf die L284L Mutation, durch die ein A/ C- reicher Enhancer verändert wird. Hier wurde der Ausschluss von Tau Exon 10 annähernd zu WT- Niveau wiederhergestellt. Die

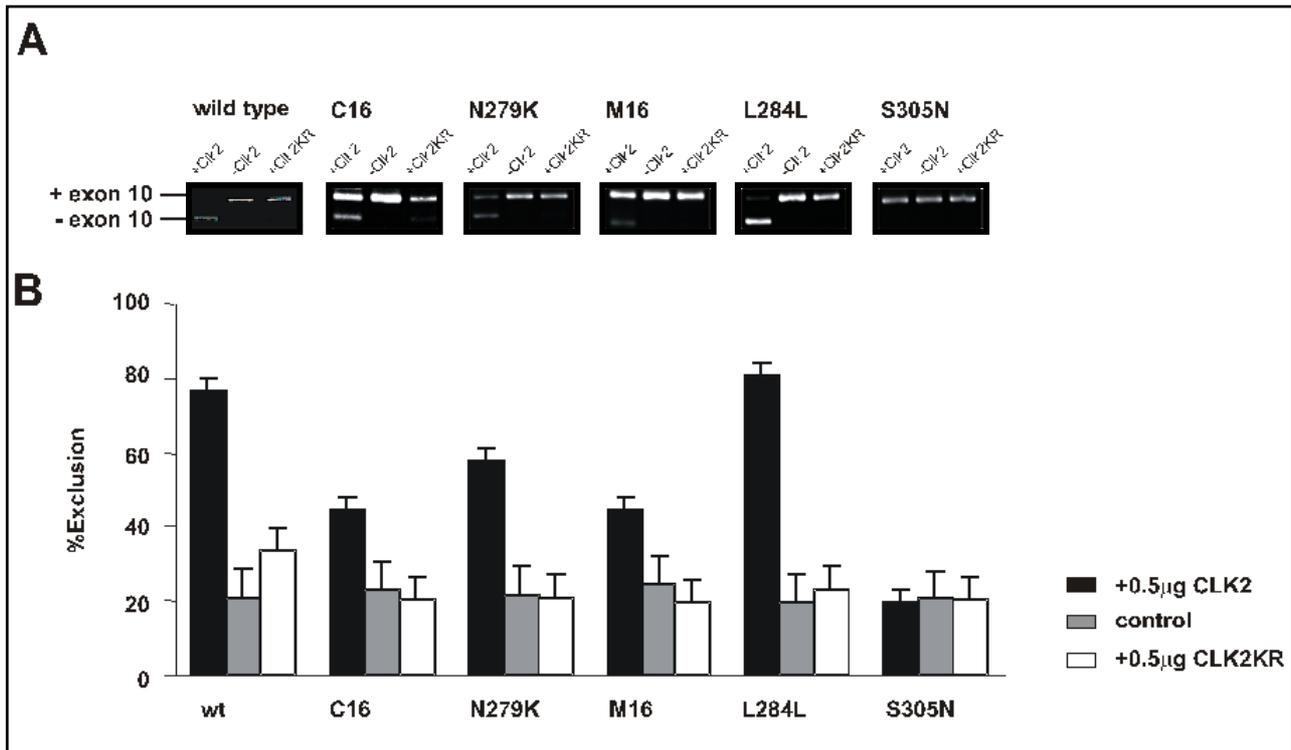


Abb.32: Einfluss von mClk2 auf Exon 10 Mutanten

- A. 1µg des SV9- 10L- 11 Minigens (wt) mit den entsprechenden Mutationen wurde mit 0,25µg des Clk2 Expressionskonstrukts in HEK293 Zellen transfiziert. Die Sequenz der Mutationen ist in Abb.7 (S.27) dargestellt. Als Kontrolle wurde 0,25µg Clk2- KR verwendet. Clk2- KR ist durch einen Austausch von Lysin zu Arginin an der ATP- Bindungsstelle katalytisch inaktiv.
- B. Statistische Auswertung von mindestens 3 Experimenten. Schwarze Balken zeigen Ausschluss von Tau Exon 10 (in Prozent) in Gegenwart von 0,25µg Clk2, graue Balken stellen Exon 10 Ausschluss in Abwesenheit von Clk2 dar und weiße Balken den Ausschluss von Exon 10 nach Transfektion mit der katalytisch inaktiven Variante Clk2- KR. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

einzigste der untersuchten Mutationen, die keine Veränderung des Spleißmusters als Folge einer Clk2 Expression zeigte, war die Mutation S305N ($F=0,02$; $df=2$; $p=0,980$), die zu einer verbesserten 5'- Spleißstelle des Exons 10 führt. (Abb.32). Auch eine Transfektion mit 4µg Clk2 induzierte keinen Ausschluss von Exon 10. Die Mutation liegt an der Position -2 der 5'- Spleißstelle von Exon 10, an der nur selten ein Guaninrest zu finden ist [167;168]. Die so optimierte 5'- Spleißstelle scheint zu einer konstitutiven Expression des Exons zu führen, das nun nicht mehr regulierbar ist. Ähnliche Effekte konnten nach Verbesserung der Spleißstellen in anderen neuronalen Exons beobachtet werden [266;276].

Durch Clk2 induzierte Phosphorylierung kann demnach Defekte in regulatorischen Elementen von Tau Exon 10 kompensieren, so lange das Exon alternativ reguliert werden kann. Eine Veränderung im Spleißmuster ist sehr wahrscheinlich ein Resultat von Phosphorylierungsaktivität und nicht Folge einer Sequestrierung von Proteinen durch Clk2, da die Clk2- KR Mutante keinen Effekt zeigt.

5.6 Neomycin

Die essentielle Rolle die RNA in vielen biologischen Prozessen wie z.B. bei der Progression neurodegenerativer Erkrankungen spielt, unterstreicht die Bedeutung der Forschung nach niedermolekularen Substanzen, die spezifisch an RNA binden und so einen Weg zu neuen Therapien darstellen. Bisher war eines der größten Probleme, dass das Prinzip unbekannt war, wie chemische Substanzen, die eine Wirkung auf RNA ausüben, mit dieser interagieren bzw. an diese binden [277]. Die Aufklärung der Kristallstrukturen verschiedener RNA- Aminoglykosid-Komplexe liefert jedoch erste Hinweise zum Verständnis der strukturellen Basis von RNA- Drug- Erkennung [278-281]. Mittels NMR konnten Varani et al. [282] nachweisen, dass das Aminoglykosidantibiotikum Neomycin B an regulatorische Sequenzen der Tau prä-mRNA bindet, und zwar im sogenannten *major groove*. Auf Ebene der Sekundärstruktur bildet die prä- mRNA in diesem Bereich, der für das 5'- Ende des alternativen Exons 10 bzw. das anschließende Intron kodiert, möglicherweise einen Stemloop aus. Interessanterweise ist dies ein Sequenzabschnitt, in dem mit FTDP- 17 assoziierte Mutationen gehäuft auftreten. Es stellte sich die Frage, inwieweit sich diese Ergebnisse auf das *in vivo* Spleißsystem übertragen lassen. Ein Spleißassay mit konstanter Menge an Tau- Wildtypminigen (1µg SV9- 10L- 11- pSVIRB) und zunehmender Konzentration an Neomycin B (zwischen 50 und 400µg/ml) bei gleicher Inkubationsdauer (18h) wurde in HEK293 Zellen durchgeführt. Mit ansteigender Konzentration an Neomycin B konnte eine verstärkte Zunahme des Ausschlusses von Tau Exon 10 beobachtet werden (Abb.33), wie sie durch Bindung von Neomycin B in dem *major groove* der Tau prä- mRNA und der dadurch bewirkten Stabilisierung des möglichen Stemloops zu erwarten gewesen wäre.

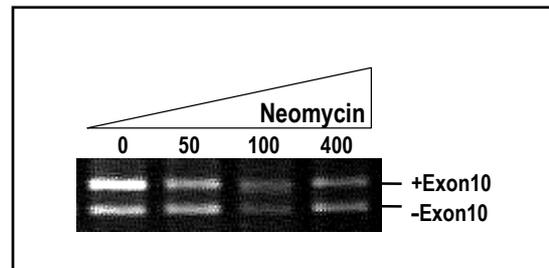


Abb.33: Einfluss zunehmender Konzentration an Neomycin B auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10: Agarosegelelektrophorese der alternativen Tau Exon 10 Isoformen, amplifiziert mit RT- PCR, zeigt eine verstärkte Intensität der -Exon 10 Bande nach Behandlung der HEK293 Zellen mit Neomycin.

6 Diskussion

Fehlspleißen von Tau Exon 10 ist mit etwa der Hälfte aller bekannten Mutationen in FTDP- 17 [105] und mit der Pathologie verschiedener anderer neurodegenerativer Erkrankungen assoziiert [283]. Mehrere mit FTDP- 17 assoziierte Mutationen, durch die es zu einer Förderung des Einschlusses von Tau Exon 10 kommt, sind bereits beschrieben worden. Da Exon 10 für eine der vier Aminosäuresequenzwiederholungen innerhalb der Mikrotubuli- Bindungsdomäne kodiert und Isoformen, die alle vier Wiederholungen enthalten, eher zu Aggregation und Formation von filamentösen Läsionen neigen [109], ist es denkbar, dass durch eine Veränderung des alternativen Spleißmusters und dem daraus resultierenden veränderten Isoformverhältnis ein Überschuss an Isoformen einer Kategorie entsteht, der hyperphosphoryliert und anschließend in Tauaggregaten abgelagert wird. Der Pathomechanismus würde dementsprechend bereits auf prä- mRNA Ebene einsetzen. Die Faktoren, die einen regulierenden Einfluss auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 ausüben, müssten pathologische Veränderungen aufweisen, die sich beispielsweise in veränderter Lokalisation, in Konzentrationsverschiebungen oder in einem verschobenen Verhältnis zueinander darstellen lassen.

6.1 Experimentelles Modell: Transfektionsassay

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob am Tau- Spleißen beteiligte Faktoren in verschiedenen Tauopathien tatsächlich verändert vorliegen, müssen diese erst identifiziert und der molekulare Aktionsmechanismus aufgeklärt werden. Ein Ansatz zur Identifikation potentieller Transfaktoren, die bei der Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 eine Rolle spielen, ist das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Transfektionssystem in Zelllinien [10]. In diesem System ist es möglich, den Effekt bekannter, am Spleißen beteiligter Faktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf die der Exon 10 Inklusion/ Exklusion zugrundeliegenden Mechanismen zu untersuchen. Kandidaten für diese Faktoren sind u.a. die SR- Proteine, bei denen für eine Gruppe (SF2/ ASF, SRp55 und SRp75) bereits Effekte nachgewiesen wurden [12]. Erste Versuche zeigten eine gute Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse in unserem System, das sich primär durch die Wahl der Zelllinien und des verwendeten Minigens unterschied. Die Verwendung dieses Zellkultursystems stellt einen ersten

Schritt für eine Verbindung zwischen reinen *in vitro* Daten und den tatsächlichen *in vivo* Gegebenheiten dar.

6.2 Htra2- β Isoformen zeigen unterschiedlichen Einfluss auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10

Von SR- Proteinen ist bekannt, dass sie durch Interaktion mit spleißosomalen Komponenten, sowie Bindung an prä- mRNA Sequenzen sowohl das konstitutive, als auch das alternative Spleißen in konzentrationsabhängiger Weise beeinflussen. Von einer der mindestens zwei Proteinisoformen des humanen Transformer 2- β , der Vollängenisoform Htra2- β 1, konnte bisher nachgewiesen werden, dass sie in das alternative Spleißen verschiedener Minigene involviert ist. Dieser Einfluss war sowohl *in vitro* als auch in Zellkultur detektierbar. Vor kurzem wurde beschrieben, dass Htra2- β 1 spezifisch an ein Cis- Element (ESE) in Tau Exon 10 bindet und in Abhängigkeit von der Stärke dieses Enhancers das alternative Spleißen des Exons 10 *in vitro* verändert. Für FTDP- 17 sind zwei Mutationen bekannt, die diesen Enhancer betreffen, und zwar die Mutation Δ 280K, die den Enhancer zerstört, und die Mutation N279K, die den gegensätzlichen Effekt, nämlich eine Verstärkung des Enhancers zur Folge hat. Der Einfluss dieser Mutationen spiegelt sich auch in der Tau- Isoformkomposition von betroffenen Patienten wider. Patienten mit Δ 280K weisen keine Exon 10 enthaltenden Tau- Isoformen (4R) in betroffenen Hirnregionen auf, während bei Patienten mit N279K eine Verschiebung des Isoformverhältnisses zugunsten der 4R- Isoformen zu finden ist. Ein am Spleißen beteiligtes Protein, das spezifisch an diesen Sequenzabschnitt des Exons 10 bindet, kann als Kandidat für eine regulierende Funktion auch *in vivo* betrachtet werden. Nachdem sich unsere Vermutung bestätigte, dass sich der verstärkende Effekt Htra2- β 1 auf den Einschluss von Tau Exon 10 auch in unserem Zellkultursystem nachweisen ließ, stellten wir Beobachtungen über die alternative Isoform Htra2- β 3 an. Da dieser Isoform eine der beiden SR- Domänen (Protein:Protein- Interaktionsdomänen) fehlt, war es naheliegend, unterschiedliche Interaktionspartner bzw. Funktionen anzunehmen. Ergebnissen aus Zwei- Hybrid- und IP- Experimenten zufolge scheint dies zumindest für die Interaktionspartner nicht zuzutreffen. In Bezug auf ihre Funktion scheinen jedoch Unterschiede zu bestehen. So konnte für die trunkierte Isoform bisher z.B. kein Einfluss auf alternatives Spleißen nachgewiesen werden. Dies änderte sich mit der Untersuchung des Tau- Minigens. Hier verstärkt Htra2- β 3

deutlich den Ausschluss des Exons 10. Es könnte sich hierbei um Sequestrierungseffekte, evtl. auf der Basis einer Konkurrenz um die Bindung an die Cis-Elemente der Tau prä-mRNA, handeln (Abb.34).

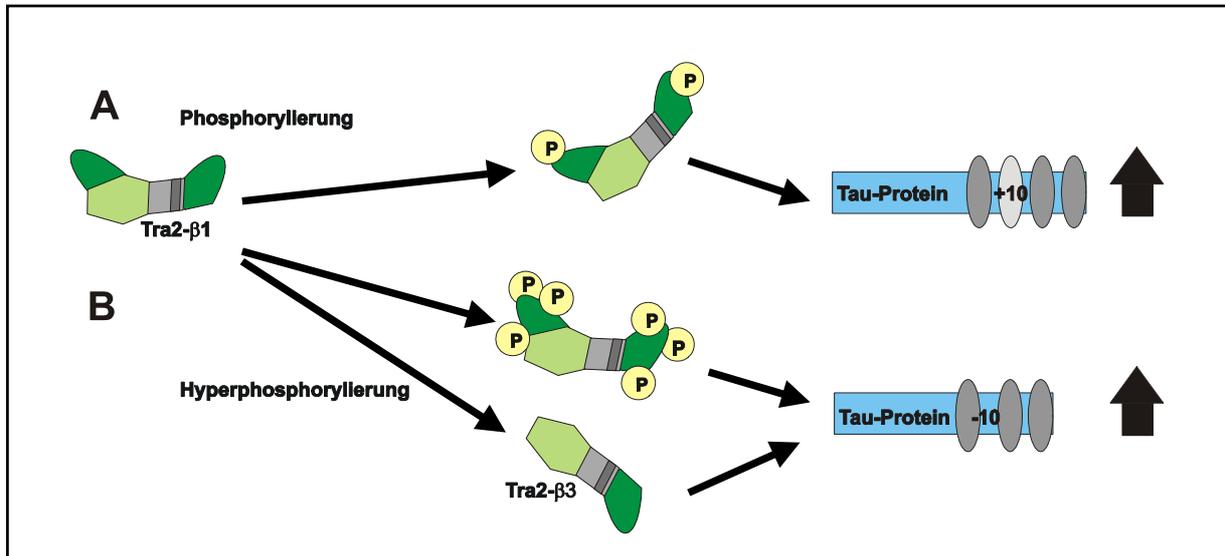


Abb.34: Modell für den Einfluss der Tra-Isoformen auf Tau-Exon 10- Spleißen

- A. Phosphorylierung von Tra2-β1 führt zur Freisetzung aus den *speckles*, Tra2-β1 bindet an regulatorische Sequenzen in Tau Exon 10, das Exon wird eingeschlossen.
- B. Hyperphosphorylierung von Tra2-β1 führt einer Veränderung des Spleißmusters des tra-Gens, es wird vermehrt tra2-β3 gebildet. Sowohl Tra2-β3 als auch hyperphosphoryliertes Tra2-β1 führen zu verstärktem Ausschluss von Tau Exon 10, entweder durch Sequestrierung oder durch verminderte Bindungskapazität für die regulatorischen Sequenzen in Tau Exon 10.

Beide Isoformen von Htra2- β sind neuronenspezifische Proteine, weisen jedoch Unterschiede in der gewebespezifischen Expression auf. Während die Vollängenisoform in der Ratte ubiquitär exprimiert zu sein scheint, wird die Tra2- β3 Isoform sowohl entwicklungspezifisch reguliert (nimmt im Verlauf der Embryonalentwicklung zu) als auch gewebespezifisch exprimiert. So findet sich beispielsweise im Gegensatz zum Hippokampus im Kortex der Ratte keine tra2- β3 Expression. Veränderungen in der Expression der unterschiedlichen tra2- β Isoformen, die offenbar ein verändertes Spleißmuster des Tau- Gens nach sich ziehen, müssen demnach hirnrregionspezifisch interpretiert werden. So könnte eine Verschiebung der Htra2- β Isoformen im Kortex andere Auswirkungen haben als im Hippokampus. Berücksichtigt man zusätzlich, dass für die granulären Körnerzellen des Gyrus dentatus (Teil der Hippokampusformation) keine oder nur sehr geringe Mengen an 4R Tau- Protein im Menschen nachgewiesen werden können, sowie für das Gehirn der Ratte eine im Vergleich zum Kortex drastisch höhere Expression der Htra2- β3 Isoform, die in Zellkulturexperimenten eine verstärkte Expression der 3R

Tau- Varianten begünstigt, so ist es denkbar, dass Htra2- β einen Teil der Regulationskaskade des alternativen Spleißens von Tau darstellt. Untersuchungen an *post mortem* Gewebe von Patienten mit Tauopathien, in denen spezifisch Hirnregionen betroffen sind, für die eine differentielle Genexpression von htra2- β und Tau zu erwarten ist (Pickersche Erkrankung - nur 3R- Isoformen in Aggregaten, hauptsächlich in Gyrus dentatus; PSP – nur 4R- Isoformen in Aggregaten, bereits auf mRNA- Ebene detektierbar), könnten Hinweise darauf liefern, ob sich ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression der Htra2- β Isoformen und der von Tau- Isoformen herstellen lässt.

6.3 Kinase Clk2 beeinflusst das alternative Spleißen von htra2- β Exons 2+3 und Tau Exon 10

Wie bereits nachgewiesen, unterdrückt eine Überexpression der Serin/ Threonin Kinase Clk2 den Einschluss der htra2- β Exons 2+3 in einem Zellkultursystem. Eine Abnahme des Einschlusses eines alternativen Exons induziert durch die SR- Proteinkinase Clk2, ebenso wie durch weitere Mitglieder der Clk- Familie, Clk1, 3 und 4, ließ sich auch für Exon 10 des Tau- Minigens feststellen. Dabei war der Effekt für Clk2 (70- 80% Ausschluss) am Stärksten. Es konnte unabhängig vom verwendeten Expressionskonstrukt und von der verwendeten Zelllinie eine Steigerung des Ausschlusses von Tau Exon 10 um mehr als das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (30% Ausschluss) nachgewiesen werden. Transfektionsexperimente mit Htra2- β 1 bzw. Htra2- β 3 als transagierenden Faktoren beim alternativen Spleißen des Tau- Minigens in einem Hintergrund genereller Clk2 Phosphorylierungsaktivität zeigte, dass das Eintitrieren von Htra2- β 1 einen verstärkten Einschluss von Tau Exon 10 zur Folge hat. Durch Clk2 hyperphosphoryliertes Htra2- β 1 ist demnach nicht in der Lage, den Einschluss von Tau Exon 10 zu fördern. Dies bestätigt Ergebnisse von P. Stoilov [1], denen zufolge die Bindung von Htra2- β an einen exonischen Enhancer in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus des Tra2- β Proteins erfolgt. Für die Tra2- β 3 Isoform konnte dagegen kein verstärkter Ausschluss von Tau Exon 10 festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte in der Wahl der experimentellen Bedingungen zu suchen sein, da eine Überexpression bereits geringer Konzentrationen der Kinase Clk2 in der verwendeten Zelllinie zu einem starken Ausschluss von Tau Exon 10 führt, so dass

der Effekt von Htra2- β 3 (ebenfalls eine Verstärkung des Ausschlusses von Tau Exon 10) möglicherweise dadurch verdeckt wird.

6.4 Einfluss des genomischen Kontexts

Wir konnten feststellen, dass der Effekt für Clk2 im natürlichen Kontext wesentlich stärker war als in einem heterologen Kontext. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen [12] und weist darauf hin, dass das alternative Spleißen von Tau Exon 10 durch mehr Elemente als bisher angenommen beeinflusst wird [11;103]. Eine Abhängigkeit der Regulation alternativer Exons von den flankierenden Exons konnte auch in anderen Systemen beobachtet werden, wie z.B. bei den Exons 6 und 7 des Topomyosin [284], Tau Exon 6 [285], Fibronektin [286] und der leichten Kette von Myosin [287]. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine ausschließliche Analyse der Tau Exon 10 Varianten in Exon- Trap- Vektoren fehlerhafte Ergebnisse erzielen könnte, da geringere Auswirkungen auf das alternative Spleißen des Exons 10 auf Grund der fehlenden positiv verstärkenden Sequenzen der flankierenden Exons unter die Nachweisgrenze sinken könnten.

6.5 Phosphorylierungsaktivität ist Voraussetzung für den Clk2 Effekt

Da eine Verwendung von Clk Konstrukten, bei denen durch Mutation von Lysin₁₉₀ zu Arginin innerhalb der Kinasedomäne eine inaktive Variante hergestellt wurde, in parallelen Ansätzen keinen Einfluss auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 zeigte, während die aktive Kinase zu einer prominenten Unterdrückung des Exons führte, ist von der Voraussetzung auszugehen, dass der Einfluss von Clk von seiner Phosphorylierungsaktivität abhängt.

Da die Clks nicht in der Lage sind, RNA zu binden, ist der Effekt höchstwahrscheinlich indirekt. Beispielsweise könnten sie Spleißfaktoren, wie den humanen Transformer 2- β phosphorylieren und so aus den *speckles*, in denen dieser und andere spleißrelevante Proteine gespeichert sind, freisetzen. Es konnte gezeigt werden, dass Clks die intranukleäre Lokalisation von SR- Proteinen regulieren [241;243] und dass eine Phosphorylierung in der SR- Domäne notwendig ist, damit SR- Proteine die Transkriptionsstellen ansteuern [288;289].

6.6 Der durch Clk2 induzierte Ausschluss von Tau Exon 10 ist spezifisch

Der genaue molekulare Mechanismus der Clk- Aktivität ist noch unbekannt. Die Aktivität der Clks hinsichtlich der Auswahl von Spleißstellen ist jedoch selektiv, da das alternative Spleißen in den Mingenen Tau Exon 10, SRp20 Exon 4 [10] und htra2- β Exon 2+3 und E1a, nicht aber in drei anderen getesteten Minigenen (SRC, CD44 Exon 5, CLB) beeinflusst wurde.

6.6.1 Transfaktoren

Um zu testen, ob der vermutete indirekte Effekt der Clks über die Phosphorylierung eines einzelnen spezifischen SR- Proteins abläuft, haben wir den Einfluss verschiedener Proteine, die *in vitro* durch die Kinasen Clk1- 4 phosphoryliert werden mit dem Effekt von Clk2 auf die Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 verglichen. Die getesteten Faktoren (SRp55, SRp75, SAF- B, hnRNP- G und Htra2- β 3) induzierten zwar einen Ausschluss von Tau Exon 10, es war jedoch notwendig, eine höhere Konzentration an entsprechendem Expressionsplasmid zu transfizieren. Dennoch konnte kein vergleichbar starker Effekt erzielt werden. Quantifizierung zeigte, dass Clk2 den stärksten Effekt auf die Regulation von Tau Exon 10 hatte.

Da keines der getesteten SR- Proteine einen ähnlich starken Einfluss auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 aufweist wie Clk2, vermuten wir, dass mehrere unterschiedliche SR- Proteine in den Prozess involviert sind. Hauptkandidaten dafür sind auf Grund des stärksten Effekts Htra2- β und hnRNP- G. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sowohl Tra2- β 1 als auch hnRNP-G den Einschluss von Exon 7 des SMN2- Minigens in Zellkultur stimulieren [290].

Für die Isoform Htra2- β 3 konnte analog zum Tau Exon 10- Minigen kein Effekt auf das alternative Spleißen des SMN2- Minigens festgestellt werden. Geht man von einer generell antagonistischen Funktion der Tra2- β Isoformen aus, wie sie sich im Tau Exon 10 Minigensystem andeutet, ist dieser Effekt in dem verwendeten System möglicherweise nicht detektierbar, da auch hier das Spleißmuster einen grundlegend starken Ausschluss des Exons (85%, bei Tau Exon 10: 70%) zeigt.

6.6.2 Kinasen

Eine Reihe von Kinasen, die mit Tauopathien in Zusammenhang gebracht werden, wurden auf ihren Einfluss bezüglich des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 in Zellkulturexperimenten untersucht. Zum Teil waren dies Kinasen, durch deren Funktion - die Phosphorylierung von SR- Proteinen - ein Einfluss auf alternative Spleißentscheidungen gegeben war (Clk1- 4, SRPK1/ 1a), anderen Kinasen, wie CDK5, DYRK wird eher eine Funktion als Tau- Proteinkinase zugesprochen. Für alle untersuchten Kinasen konnte eine Induktion des Ausschlusses von Tau Exon 10 nachgewiesen werden. Es waren jedoch z. T. wesentlich höhere Konzentrationen (bis zu 4µg für aktiviertes CDK5) an transfiziertem Expressionsplasmid erforderlich, um einen moderaten Effekt zu erzielen. Der starke Effekt von Clk2 auf den Ausschluss von Exon 10 wurde von keiner anderen getesteten Kinase erreicht. Lediglich SRPK1a konnte in höheren Konzentrationen (1µg) einen ähnlichen Effekt aufweisen. Der Unterschied zwischen SRPK1 und ihrer alternativen Isoform SRPK1a beruht wahrscheinlich auf ihrer unterschiedlichen Phosphorylierungsaktivität [232]. Ob dies auch für die Unterschiede innerhalb der Clk Kinasen bzw. zwischen SRPK1/ 1a und Clk zutrifft, ist nicht bekannt.

Mittels Quantifizierung der Ergebnisse konnte demonstriert werden, dass Clk2 die Kinase mit dem stärksten Einfluss auf Tau Exon 10 Regulation ist. Dies weist darauf hin, dass Kinasen mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften *in vitro* unterschiedliche Substratspezifitäten als *in vivo* aufweisen können. Durch welche Mechanismen diese bestimmt werden, ist derzeit noch unklar.

6.7 FTDP- 17 Mutationen

6.7.1 Spleißverhalten verschiedener FTDP- 17 Mutationen

Mutationen im Tau- Gen, die eine potentielle Änderung des alternativen Spleißmusters von Exon 10 mit sich bringen, bestätigten in Transfektionsassays mit entsprechend modifizierten Minigenkonstrukten diese Hypothese. So konnte gezeigt werden, dass Mutationen, die exonische Enhancersequenzen verstärken (N279K, L284L), oder den Spleißstellenkonsensus verbessern (S305N) zu einer vermehrten Erkennung der Exon / Intronengrenzen um Exon 10 führen und in einem vermehrten Einschluss des alternativen Exons resultieren, während eine Abschwächung von Enhancersequenzen den gegenteiligen Effekt hat (Δ 280K, [94]). Die *in vivo* Situation

lässt sich demnach durch dieses System gut darstellen und kann als Ausgangspunkt für weitere funktionelle Untersuchung genutzt werden. Auf diese Weise ist es möglich, im Tau- Gen auftretende Mutationen bei Patienten hinsichtlich ihres Einflusses auf regulatorische Sequenzen in und um Exon 10 zu testen und so einen ersten Hinweis auf den Krankheitsmechanismus zu erhalten. Des Weiteren bietet das System die Möglichkeit, nach Faktoren zu suchen, die diese Fehlregulation des alternativen Spleißens positiv zu beeinflussen vermögen.

6.7.2 Clk2 beeinflusst das Spleißverhalten verschiedener FTDP- 17 Mutationen

Wir konnten zeigen, dass durch Überexpression der Serin/ Threonin Kinasen Clk1- 4 das alternative Spleißen von Tau Exon 10 in einem Zellkultursystem in Richtung Exon 10- Ausschluss verschoben werden kann. Wesentlich ist in diesem Zusammenhang, dass veränderte RNA- Prozessierungsabläufe bei Mutationen in exonischen Elementen in Richtung eines Exon- Ausschlusses beeinflusst werden können. Die hier untersuchten Mutationen hatten alle eine verbesserte Erkennung der Exon / Intron Grenzen und daher einen vermehrten Einschluss von Tau Exon 10 zur Folge. Durch zusätzliche Expression der SR- Proteinkinase Clk2 konnte diese mutationsbedingte Verschiebung des Isoformverhältnisses von Tau Exon 10 reguliert werden. Ausnahme dazu bildet die Mutation S305N, bei der die 5'- Spleißstelle des Exons 10 verbessert wird und eine potentielle Stemloop- Struktur destabilisiert wird. Hier verhält sich Exon 10 wie ein konstitutives Exon und kann nicht mehr alternativ reguliert werden.

6.8 Modell für die Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10

Die Kinase Clk2 könnte ein spezifisches Subset an Proteinen, die regulierend in den Spleißprozess eingreifen, aus den *speckles* freisetzen, und zwar in einer Zusammensetzung und/ oder einem Phosphorylierungsstatus [244], der für den Ein- bzw. Ausschluss von Tau Exon 10 optimal ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Clk2 das Verhältnis von Spleißfaktorisoformen zueinander verändert, die einen unterschiedlichen Einfluss auf die Auswahl von Spleißstellen nehmen. Beispielsweise produziert SRp20 Isoformen, die durch An- oder Abwesenheit der SR- Domäne gekennzeichnet sind [291;292]. Clk2 verstärkt hier die Expression der SR- Domäne enthaltenden Isoform [10]. Ähnlich wird durch Clk2 die Bildung der alternativen

Htra2- β Isoformen beeinflusst, wobei die dadurch bewirkte An- bzw. Abwesenheit der N-terminalen SR- Domäne zu einem veränderten Einfluss auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 führt. In diesem Fall induziert die Kinase Clk2 die verstärkte Expression der trunkierten Isoform (Abb.35).

Da die meisten SR- Proteine mittels alternativen Spleißens reguliert werden, könnten die Clks auch weitere SR- Domäne enthaltenden Proteine regulieren. Auch die Clks selbst werden durch alternatives Spleißen reguliert, ihre regulierenden Transfaktoren müssen jedoch erst noch identifiziert werden [243;293]. Somit zeigen unsere Daten, wie ein kompliziertes Netzwerk regulatorischer Proteine durch Phosphorylierung

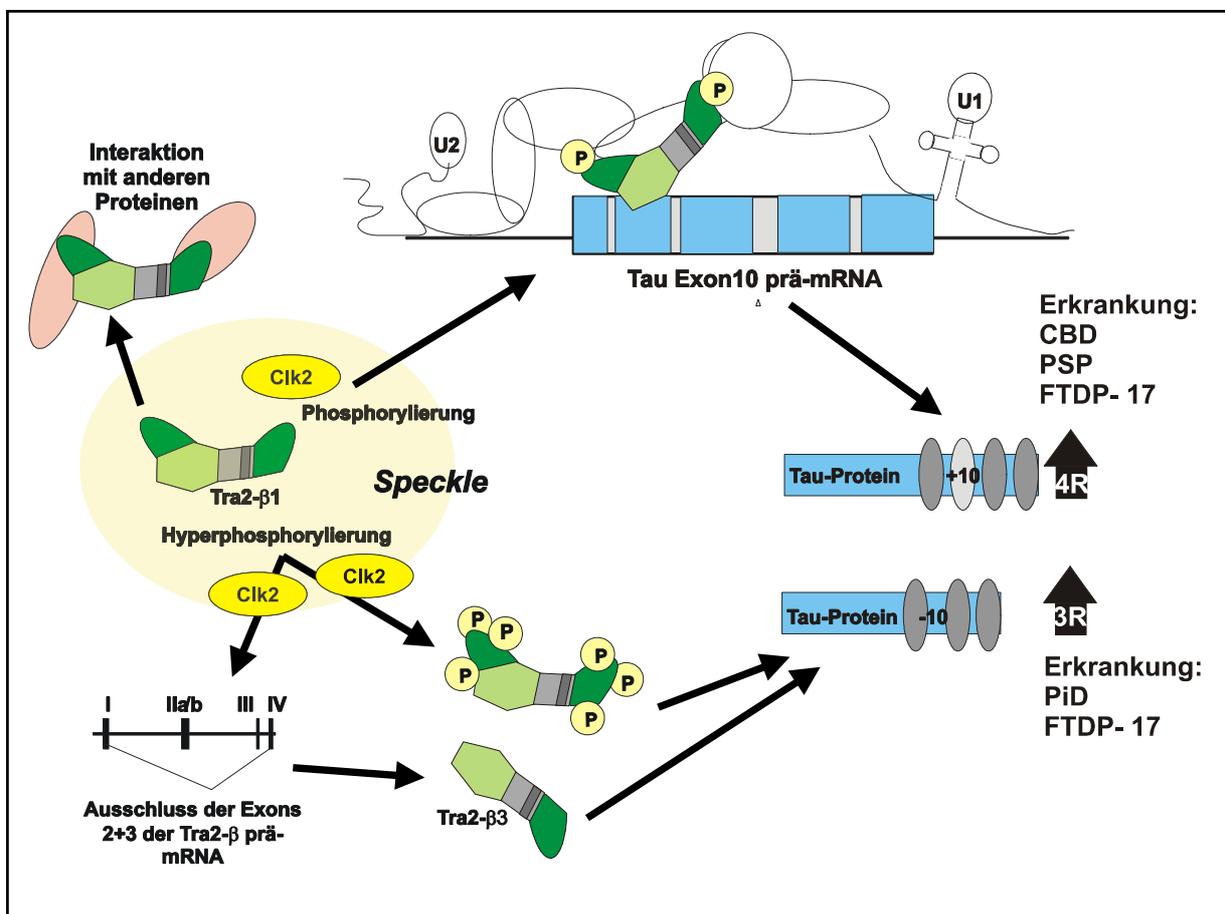


Abb.35: Modell für den Einfluss von Clk2 und Tra2- β auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10

Phosphorylierung von Htra2- β 1 durch die Kinase Clk2 führt zur Freisetzung aus den Speicherkompartimenten (*speckles*). Htra2- β 1 kann an den exonischen Enhancer des Exons 10 der tau prä- mRNA binden, Exon 10 wird vermehrt eingeschlossen, die 4R Isoformen verstärkt exprimiert.

Hyperphosphorylierung von Htra2- β 1 verringert die Bindungskapazität an den exonischen Enhancer, Exon 10 wird verstärkt ausgeschlossen. Desweiteren verstärkt Hyperphosphorylierung des Htra2- β 1 Proteins durch Clk2 die Generierung der Htra2- β 3 Isoform, dadurch kommt es ebenfalls zu verstärktem Ausschluss von Exon 10, es werden vermehrt 3R Tau- Isoformen gebildet. Ein Änderung des Verhältnisses der 3R / 4R Tau Isoformen zueinander ist pathologisch.

verändert werden kann, mit dem Ergebnis spezifisch veränderter prä- mRNA Prozessierungswege.

Selektive Ablagerung nur einiger Tau- Isoformen wird in einer Anzahl von neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. der progressiven supranukleären Blickparese, der kortikobasalen Degeneration und der Pickschen Erkrankung [283] beobachtet. Diese Erkrankungen zeigen häufig eine Assoziation zu Fehlspleißen von Tau Exon 10 [294]. Es ist möglich, dass diese Verschiebung der Isoformkomposition durch Konzentrationsunterschiede von Transfaktoren verursacht wird, die die prä- mRNA Prozessierung regulieren. Diese Variationen sind wahrscheinlich die Ursache für den gewebespezifischen Einfluss mutierter Allele [129] und tragen möglicherweise zu pleiotropen Phänotypen einiger Mutationen in der Bevölkerung bei [130]. Wir vermuten daher, dass durch Konzentrationsänderungen der Proteine, die an der prä- mRNA Prozessierung beteiligt sind, eine Veränderung des alternativen Spleißens bewirkt wird, welches zur Entstehung von Tauopathien beiträgt.

Die Mehrzahl dieser regulatorischen Proteine wird durch Phosphorylierung aus ihren intranukleären Speicherkompartimenten freigesetzt, welches mit dem unterschiedlichem Phosphorylierungsstatus, der in den meisten dieser Erkrankungen beobachtet werden kann, übereinstimmt [295]. Mit einem besseren Verständnis des molekularen Mechanismus, der das alternative Spleißen reguliert, wird es deutlicher, dass defektes Spleißen der prä- mRNA bisher als auslösender Faktor für Erkrankungen unterschätzt wurde [7;13;296]. Eine Reihe von Experimenten zeigt, dass krankheitsauslösende Fehlspleißereignisse in Zellkultursystemen geändert werden können [207;297-299;299;300]. Dies deutet darauf hin, dass eine Veränderung der Auswahl alternativer Spleißstellen, z.B. durch niedermolekulare Substanzen, die die Phosphorylierung beeinflussen, ein neues therapeutisches Prinzip darstellen könnte.

6.9 Fehlregulation alternativen Spleißens und Erkrankungen: Therapeutische Ansätze

Mechanismen, durch die Defekte des prä- mRNA Spleißens zur Ursache von Erkrankungen werden können, sind unterschiedlich. Mutationen können einzelne Gene betreffen, indem sie cis- Elemente verändern und so das Spleißen des betroffenen Gens verändern. Diese Mutationen können zur Expression von nicht

natürlich vorkommenden RNAs führen, oder, wenn sie in regulatorischen Elementen der prä- mRNA liegen, in einer Verschiebung des Verhältnisses natürlich vorkommender alternativer RNA- Isoformen resultieren. So führt beispielweise eine Punktmutation im Intron 2 des thalassämischen β -Globin Gens zu Entstehung einer kryptischen Spleißstelle. Dadurch wird ein Teil des Introns in die RNA eingeschlossen und es kann kein funktionelles β - Globin Protein gebildet werden (Abb.36). Durch Mutationen entstandene kryptische Spleißstellen können durch komplementäre Oligonukleotide [299;301] oder siRNAs (small interference RNAs) maskiert werden, sodass das Spleißen zum erwünschten Genprodukt führt.

Mutationen, die zu einer veränderten Verwendung alternativer Spleißstellen führen, sind auf cis- Ebene in den exonischen und intronischen regulatorischen Elementen zu finden (ESEs, ESSs, ISEs, ISSs). Diese Veränderungen sind u. a. für familiäre Formen von IGHD II (*isolated growth hormone deficiency type II*), Frasier Syndrom, atypische zystische Fibrose und bestimmte Formen der FTDP- 17 verantwortlich (Übersicht in [302]).

Da die Auswahl von Spleißstellen von der relativen Konzentration der regulatorischen Proteine abhängt, könnte eine Veränderung der Konzentration dieser Proteine zu einer Korrektur des pathologischen Isoformverhältnisses führen, wie es für Tau-Proteinisoformen in bestimmten Mutationen der FTDP-17 der Fall ist. Dazu ist eine genaue Kenntnis der molekularen Mechanismen, die die Auswahl von Spleißstellen regulieren, notwendig.

Nachdem die relative Konzentration am Spleißen beteiligter regulatorischer Proteine (SR- und hnRNP- Proteine), sowie deren Aktivität und Verfügbarkeit durch reversible Phosphorylierung reguliert wird, bietet sich eine Vielfalt von Ansatzpunkten für therapeutische Konzepte. So kann beispielsweise das defekte Spleißverhalten, wie es für bestimmte Mutationen der FTDP-17 nachgewiesen wurde, in Zellkultur reguliert werden, indem regulatorische Proteine durch ihre Kinase aktiviert bzw. inhibiert werden. Es wäre denkbar, niedermolekulare Substanzen zu isolieren, die eine Freisetzung spezifischer regulatorischer Faktoren bewirken. Dies könnte entweder über eine Aktivierung der entsprechenden Kinase oder eine Blockierung der korrespondierenden Phosphatase erfolgen (Abb.36, S.97).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Substanzen, wie z. B. Aminoglykosid-Antibiotika, direkt mit regulatorischen Strukturen der mRNA interagieren können. Diese Interaktion lässt sich indirekt durch einen Einfluss auf das Spleißverhalten des

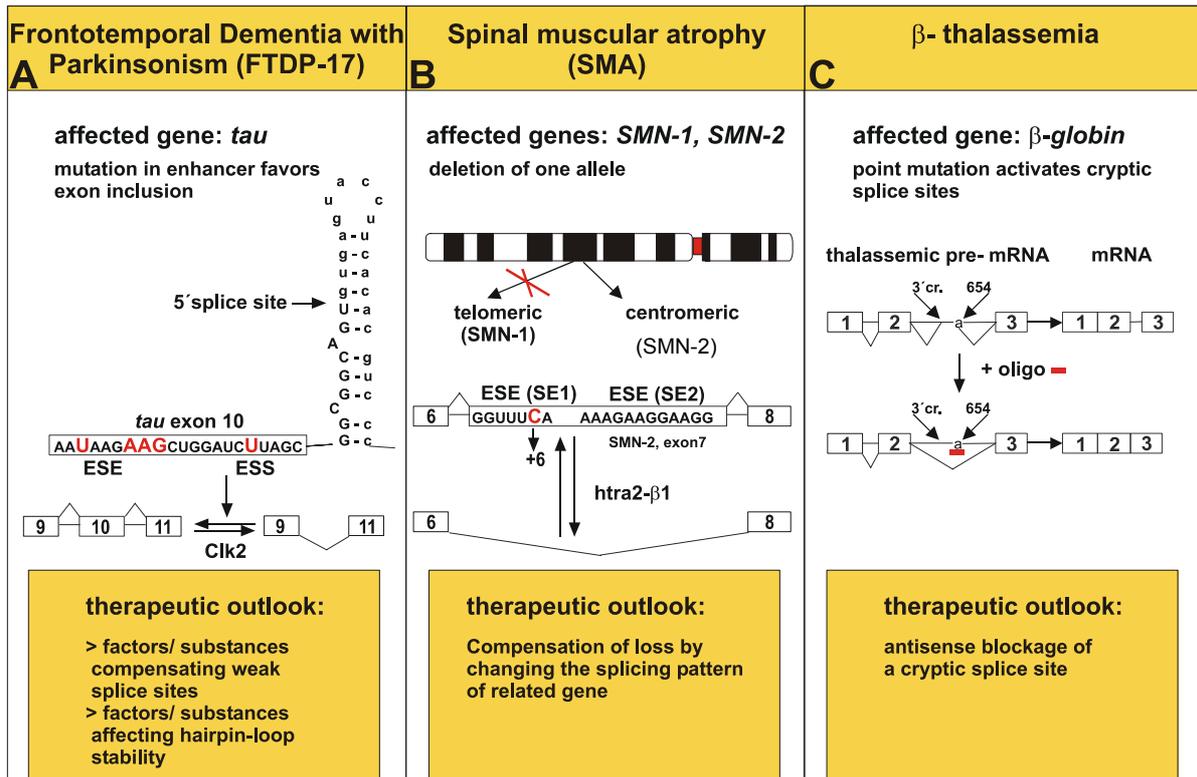


Abb.36 Beispiele für Erkrankungen infolge von Fehlern des prä- mRNA Spleißens

- A. Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (FTDP- 17): Beispiel für eine Mutation in einem Spleiß-Enhancer
Spleißen von Tau Exon 10 wird durch exonische und intronische Enhancer und Silencersequenzen feinreguliert. Mutationen in der Nähe von Exon 10, die in FTDP- 17 Patienten nachgewiesen wurden (rote Schrift) begünstigen den Einbau von Exon 10. Unter Einfluss der CDC- ähnlichen Kinase Clk2 konnte dieser verstärkte Einschluss des Exons reguliert werden. Dies eröffnet neue therapeutische Möglichkeiten, FTDP- 17 bzw. verwandte Erkrankungen zu behandeln, indem nach Faktoren oder Substanzen gescreent wird, die den Gebrauch alternativer Exons selektiv regulieren.
- B. Spinale Muskuläre Atrophie (SMA): Kompensation eines nicht- funktionellen Gens
Positionsklonierung führte zur Identifizierung des *survival of motoneuron*- Gens (SMN) als eines der in SMA betroffenen Gene. Zwei nicht-identische Kopien von SMN existieren auf Chromosom 5q31. Volllängen SMN kann nur von der telomerischen Kopie generiert werden (SMN-1), da ein stiller C/T Austausch in der zentromerischen Kopie (SMN-2, rot markiert) zur Generierung eines trunkierten Proteins führt. SMA wird verursacht durch einen Defekt bei der Expression des funktionellen Gens. Eine Möglichkeit, den Ausfall der SMN-1 Expression zu kompensieren, ist die Überexpression von htra2- β 1. Dieses SR-ähnliche Protein kann das Spleißmuster der SMN-2 prä- mRNA in Richtung Einschluss von Exon 7 verschieben und so zu einem funktionsfähigen Protein führen.
- C. β -Thalassämie: Eine Punktmutation aktiviert eine kryptische Spleißstelle
Das zweite Intron des thalassämischen β - Globingens enthält eine C nach T Mutation an Position 654. Daurch wird eine zusätzliche 5'- Spleißstelle kreiert, die eine kryptische Spleißstelle an Position 579 der β - Globin prä- mRNA aktiviert. Dies führt zum Einschluss einer intronischen Region. *Antisense*-Oligonukleotide können verwendet werden, um diese anormale Spleißstelle zu maskieren.

Tau- Minigens mittels Transfektionsassays in Zellkultur nachweisen. Auch hier könnten sich therapeutische Ansätze bieten.

Da die meisten Spleißfaktoren erst nach der Freisetzung aus den nukleären Speicherkompartimenten aktiv sind und diese Freisetzung als regulatorischer

Prozess für die Konzentrationseinstellung der verfügbaren Spleißproteine verantwortlich ist, bietet es sich an chemische Banken zu screenen, um spezifische Agonisten bzw. Antagonisten für diese Kinasen zu identifizieren.

Desweiteren ist es wahrscheinlich, dass die Freisetzung der Spleißfaktoren als Folge von Rezeptorstimulation erfolgt, sodass spezifische Antagonisten/Agonisten diesen Prozess unterbinden könnten. Derartige Moleküle wären aufgrund ihrer geringen Größe pharmakologisch leichter einsetzbar.

Wenn es durch Mutationen zu einer Veränderung der Komponenten des Spleißosoms oder anderer regulatorischer Komplexe kommt, wird die Expression multipler Proteine beeinflusst. So wurden für die autosomal dominante Retinitis Pigmentosa Mutationen in drei Genen identifiziert [303-305], die ortholog zu den Hefegenen PRP31, PRP3 und PRP8 sind, welche an der Funktion des U4/U6 U5- tri snRNPs beteiligt sind. Durch positionale Klonierung konnte SMN als verantwortliches Gen für SMA (*spinal muscular atrophie*) identifiziert werden. Ursache der Erkrankung ist in den meisten Fällen der homozygote Verlust der funktionellen telomerischen SMN1- Kopie [304]. Die genaue Funktion von SMN ist nicht bekannt, es interagiert jedoch mit verschiedenen RNP- Komplexen unterschiedlicher Funktion [305]. Eine Möglichkeit, für den Ausfall der SMN-1 Expression zu kompensieren, ist die Überexpression des Transfaktors Htra2- β 1. Dieses SR-ähnliche Protein kann das Spleißmuster der SMN-2 prä- mRNA in Richtung Einschluss von Exon 7 verschieben und so zu einem funktionsfähigen Protein führen (Abb.36, S.97). Der Einsatz synthetischer Exon- spezifischer Aktivatoren [306] könnte den Effekt dieses Transfaktors stimulieren und zu einem therapeutischen Einsatz führen.

Kommt es durch Mutationen zu einem Einfluss auf Faktoren, die an der Regulation alternativer Spleißvorgänge beteiligt sind, so können die entsprechenden Effekte wesentlich diversere Symptomen und größere phänotypische Heterogenität hervorrufen, als in den oben angeführten Beispielen.

Bei der Transition von normalem Zellwachstum zu Neoplasia und anschließend zu malignen Tumoren findet man bei vielen Genen ein dramatisch verändertes alternatives Spleißmuster [13;307]. Das Spleißen verändert sich wahrscheinlich als Folge von Veränderungen in transagierenden regulatorischen Faktoren, da Mutationen in den betroffenen Genen nicht detektiert werden können [302]. Ähnliche Überlegungen lassen sich auch für Tauopathien anstellen, da hier, beispielsweise bei der Alzheimer Erkrankung, keine Mutationen im Tau- Gen detektiert werden können,

das alternative Spleißmuster von Tau Exon 10 jedoch in Hippokampus und frontalem Kortex von Patienten im Vergleich zu Kontrollen bzw. Kontrollregionen verändert zu sein scheint (D. Glatz, pers. Kommunikation).

Da Fehlregulation alternativen Spleißens sich mehr und mehr als Ursache für menschliche Erkrankungen herauskristallisiert, intensiviert sich die Suche nach neuen therapeutische Strategien, die darauf abzielen, Fehlspleißen entweder zu umgehen oder zu korrigieren.

Die Ansätze reichen von Überexpression regulatorischer Proteine, die das alternative Spleißen bestimmter Exons beeinflussen [9;207;307], Verwendung von Oligonukleotiden, die die Verwendung abweichender Spleißstellen verhindern [308;309], Verwendung von Komponenten, die die Phosphorylierung von Spleißfaktoren beeinflussen [310] oder potentielle Sekundärstrukturen stabilisieren [311], Hochdurchsatzverfahren zur Identifikation von Komponenten, die die Spleiß-Effizienz bestimmter Target- RNAs verändern [312] bis zu trans-Spleißansätzen, um mutierte Exons durch Wildtyp- Exons zu ersetzen [313].

Eine Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zu Spleißdefekten führen, sollte den Erfolg und die Zielrichtung der therapeutischen Strategien verbessern, ebenso wie der Einsatz therapeutischer Reagenzien zu einer weiteren Aufklärung der molekularen Grundlagen beitragen kann. So könnte ein Zusammenspiel von molekularbiologischer Grundlagenforschung, deren Ziel u.a. die Aufklärung molekularer Mechanismen ist, die die Selektion von Spleißstellen bestimmen, und klinischer Forschung, die zu einer detaillierten Analyse von Erkrankungen führt, sowie die daraus resultierenden verbesserten Diganose und Behandlungsmöglichkeiten dazu führen, dass Erkrankungen wie Alzheimer Demenz heilbar werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Stoilov,P. Regulation of alternative splicing by human transformer-2-beta. 2002.
2. Stoilov,P., Daoud, R., Nayler, O. and Stamm, S., Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by binding to novel exonic enhancers of its exon 2 Mol. Cell Biol., submitted
3. Rujescu,D., Hartmann,A.M., and Stamm,S., Alternatives Spleißen: Wie der Mensch aus 35.000 Genen 250.000 Proteine macht, Bioforum, (2001) 830-834.
4. Horowitz,D.S. and Krainer,A.R., Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing, Trends Genet., 10 (1994) 100-106.
5. Nayler,O., Stamm,S., and Ullrich,A., Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases, Biochem. J., 326 (Pt 3) (1997) 693-700.
6. Lee,V.M., Goedert,M., and Trojanowski,J.Q., Neurodegenerative tauopathies, Annu. Rev. Neurosci., 24 (2001) 1121-1159.
7. Stoss,O., Stoilov,P., Daoud,R., Hartmann,A.M., Olbrich,M., and Stamm,S., Misregulation of pre-mRNA splicing that causes human diseases, Gene Ther. Mol Biol., 5 (2000) 9-28.
8. Nayler,O., Hartmann,A.M., and Stamm,S., The ER repeat protein YT521-B localizes to a novel subnuclear compartment, J. Cell Biol., 150 (2000) 949-962.
9. Hartmann,A.M., Rujescu,D., Giannakouros,T., Nikolakaki,E., Goedert,M., Mandelkow,E.M., Gao,Q.S., Andreadis,A., and Stamm,S., Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors, Mol. Cell Neurosci., 18 (2001) 80-90.
10. Stoss,O., Stoilov,P., Hartmann,A.M., Nayler,O., and Stamm,S., The in vivo minigene approach to analyze tissue-specific splicing, Brain Res. Brain Res. Protoc., 4 (1999) 383-394.
11. D'Souza,I. and Schellenberg,G.D., tau Exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites, J. Biol. Chem., 277 (2002) 26587-26599.
12. Gao,Q.S., Memmott,J., Lafyatis,R., Stamm,S., Sreaton,G., and Andreadis,A., Complex regulation of tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia, J. Neurochem., 74 (2000) 490-500.
13. Philips,A.V. and Cooper,T.A., RNA processing and human disease, Cell Mol. Life Sci., 57 (2000) 235-249.
14. Stoilov,P., Meshorer,E., Gencheva,M., Glick,D., Soreq,H., and Stamm,S., Defects in pre-mRNA processing as causes of and predisposition to diseases, DNA Cell Biol., 21 (2002) 803-818.
15. Stamm,S., Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome, Hum. Mol. Genet., 11 (2002) 2409-2416.
16. Braak,H. and Braak,E., Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, Acta Neuropathol. (Berl), 82 (1991) 239-259.
17. Delacourte,A., David,J.P., Sergeant,N., Buee,L., Wattez,A., Vermersch,P., Ghazali,F., Fallet-Bianco,C., Pasquier,F., Lebert,F., Petit,H., and Di Menza,C., The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease, Neurology, 52 (1999) 1158-1165.

18. Houlden, H., Baker, M., Morris, H.R., MacDonald, N., Pickering-Brown, S., Adamson, J., Lees, A.J., Rossor, M.N., Quinn, N.P., Kertesz, A., Khan, M.N., Hardy, J., Lantos, P.L., George-Hyslop, P., Munoz, D.G., Mann, D., Lang, A.E., Bergeron, C., Bigio, E.H., Litvan, I., Bhatia, K.P., Dickson, D., Wood, N.W., and Hutton, M., Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype, *Neurology*, 56 (2001) 1702-1706.
19. Pastor, P., Ezquerra, M., Tolosa, E., Munoz, E., Marti, M.J., Valldeoriola, F., Molinuevo, J.L., Calopa, M., and Oliva, R., Further extension of the H1 haplotype associated with progressive supranuclear palsy, *Mov Disord.*, 17 (2002) 550-556.
20. Takuma, H., Arawaka, S., and Mori, H., Isoforms changes of tau protein during development in various species, *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 142 (2003) 121-127.
21. Andreadis, A., Brown, W.M., and Kosik, K.S., Structure and novel exons of the human tau gene, *Biochemistry*, 31 (1992) 10626-10633.
22. Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M., The role of tau in Alzheimer's disease, *Med. Clin. North Am.*, 86 (2002) 615-627.
23. Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I., The distribution of tau in the mammalian central nervous system, *J. Cell Biol.*, 101 (1985) 1371-1378.
24. Kowall, N.W. and Kosik, K.S., Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.*, 22 (1987) 639-643.
25. Papasozomenos, S.C. and Binder, L.I., Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 8 (1987) 210-226.
26. Uberti, D., Rizzini, C., Spano, P.F., and Memo, M., Characterization of tau proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line, *Neurosci. Lett.*, 235 (1997) 149-153.
27. Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussiere, T., Dupire, M.J., Delacourte, A., Michalski, J.C., and Caillet-Boudin, M.L., Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization, *Biochim. Biophys. Acta*, 1619 (2003) 167-176.
28. Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W., Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin, *J. Mol. Biol.*, 116 (1977) 207-225.
29. Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W., Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly, *J. Mol. Biol.*, 116 (1977) 227-247.
30. Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W., A protein factor essential for microtubule assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 72 (1975) 1858-1862.
31. Liu, C.W., Lee, G., and Jay, D.G., Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 43 (1999) 232-242.
32. Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R., Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 33 (2000) 95-130.
33. Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A., Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2, *Brain Res.*, 387 (1986) 271-280.

34. Himmler,A., Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family, *Mol. Cell Biol.*, 9 (1989) 1389-1396.
35. Goedert,M., Spillantini,M.G., Potier,M.C., Ulrich,J., and Crowther,R.A., Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain, *EMBO J.*, 8 (1989) 393-399.
36. Goedert,M., Spillantini,M.G., Jakes,R., Rutherford,D., and Crowther,R.A., Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *Neuron*, 3 (1989) 519-526.
37. Himmler,A., Drechsel,D., Kirschner,M.W., and Martin,D.W., Jr., Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains, *Mol. Cell Biol.*, 9 (1989) 1381-1388.
38. Wang,Y., Loomis,P.A., Zinkowski,R.P., and Binder,L.I., A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau, *J. Cell Biol.*, 121 (1993) 257-267.
39. Georgieff,I.S., Liem,R.K., Couchie,D., Mavilia,C., Nunez,J., and Shelanski,M.L., Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems, *J. Cell Sci.*, 105 (Pt 3) (1993) 729-737.
40. Couchie,D., Mavilia,C., Georgieff,I.S., Liem,R.K., Shelanski,M.L., and Nunez,J., Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89 (1992) 4378-4381.
41. Andreadis,A., Broderick,J.A., and Kosik,K.S., Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons, *Nucleic Acids Res.*, 23 (1995) 3585-3593.
42. Halverson,R.A., Chambers,C.B., and Muma,N.A., Alternative splicing of amino-terminal Tau mRNA in rat spinal cord during development and following axonal injury, *Exp. Neurol.*, 169 (2001) 105-113.
43. D'Souza,I. and Schellenberg,G.D., Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 17700-17709.
44. Brandt,R., Leger,J., and Lee,G., Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain, *J. Cell Biol.*, 131 (1995) 1327-1340.
45. Hirokawa,N., Shiomura,Y., and Okabe,S., Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules, *J. Cell Biol.*, 107 (1988) 1449-1459.
46. Chen,J., Kanai,Y., Cowan,N.J., and Hirokawa,N., Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons, *Nature*, 360 (1992) 674-677.
47. Lee,G., Newman,S.T., Gard,D.L., Band,H., and Panchamoorthy,G., Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases, *J. Cell Sci.*, 111 (Pt 21) (1998) 3167-3177.
48. Hwang,S.C., Jhon,D.Y., Bae,Y.S., Kim,J.H., and Rhee,S.G., Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 18342-18349.
49. Mandelkow,E.M., Schweers,O., Drewes,G., Biernat,J., Gustke,N., Trinczek,B., and Mandelkow,E., Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 777 (1996) 96-106.

50. Preuss,U., Biernat,J., Mandelkow,E.M., and Mandelkow,E., The 'jaws' model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells, *J. Cell Sci.*, 110 (Pt 6) (1997) 789-800.
51. Goode,B.L., Denis,P.E., Panda,D., Radeke,M.J., Miller,H.P., Wilson,L., and Feinstein,S.C., Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly, *Mol. Biol. Cell*, 8 (1997) 353-365.
52. Goode,B.L. and Feinstein,S.C., Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau, *J. Cell Biol.*, 124 (1994) 769-782.
53. Rocca,W.A., Hofman,A., Brayne,C., Breteler,M.M., Clarke,M., Copeland,J.R., Dartigues,J.F., Engedal,K., Hagnell,O., Heeren,T.J., and ., Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group, *Ann. Neurol.*, 30 (1991) 381-390.
54. Price,J.L. and Morris,J.C., Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.*, 45 (1999) 358-368.
55. Vassar,R., Bennett,B.D., Babu-Khan,S., Kahn,S., Mendiaz,E.A., Denis,P., Teplow,D.B., Ross,S., Amarante,P., Loeloff,R., Luo,Y., Fisher,S., Fuller,J., Edenson,S., Lile,J., Jarosinski,M.A., Biere,A.L., Curran,E., Burgess,T., Louis,J.C., Collins,F., Treanor,J., Rogers,G., and Citron,M., Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science*, 286 (1999) 735-741.
56. Sinha,S., Anderson,J.P., Barbour,R., Basi,G.S., Caccavello,R., Davis,D., Doan,M., Dovey,H.F., Frigon,N., Hong,J., Jacobson-Croak,K., Jewett,N., Keim,P., Knops,J., Lieberburg,I., Power,M., Tan,H., Tatsuno,G., Tung,J., Schenk,D., Seubert,P., Suomensaari,S.M., Wang,S., Walker,D., John,V., and ., Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain, *Nature*, 402 (1999) 537-540.
57. Yan,R., Bienkowski,M.J., Shuck,M.E., Miao,H., Tory,M.C., Pauley,A.M., Brashier,J.R., Stratman,N.C., Mathews,W.R., Buhl,A.E., Carter,D.B., Tomasselli,A.G., Parodi,L.A., Heinrichson,R.L., and Gurney,M.E., Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity, *Nature*, 402 (1999) 533-537.
58. Hussain,I., Powell,D., Howlett,D.R., Tew,D.G., Meek,T.D., Chapman,C., Gloger,I.S., Murphy,K.E., Southan,C.D., Ryan,D.M., Smith,T.S., Simmons,D.L., Walsh,F.S., Dingwall,C., and Christie,G., Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase, *Mol. Cell Neurosci.*, 14 (1999) 419-427.
59. Lin,X., Koelsch,G., Wu,S., Downs,D., Dashti,A., and Tang,J., Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 97 (2000) 1456-1460.
60. Steiner,H. and Haass,C., Intramembrane proteolysis by presenilins, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1 (2000) 217-224.
61. Lee,V.M., Biomedicine. Tauists and beta-aptists united--well almost!, *Science*, 293 (2001) 1446-1447.
62. Gotz,J., Tolnay,M., Barmettler,R., Ferrari,A., Burki,K., Goedert,M., Probst,A., and Nitsch,R.M., Human tau transgenic mice. Towards an animal model for neuro- and glialfibrillary lesion formation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 487 (2001) 71-83.

63. Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., and McGowan, E., Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP, *Science*, 293 (2001) 1487-1491.
64. Irizarry, M.C., Soriano, F., McNamara, M., Page, K.J., Schenk, D., Games, D., and Hyman, B.T., Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse, *J. Neurosci.*, 17 (1997) 7053-7059.
65. Lee, V.M. and Trojanowski, J.Q., Transgenic mouse models of tauopathies: prospects for animal models of Pick's disease, *Neurology*, 56 (2001) S26-S30.
66. Wittmann, C.W., Wszolek, M.F., Shulman, J.M., Salvaterra, P.M., Lewis, J., Hutton, M., and Feany, M.B., Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles, *Science*, 293 (2001) 711-714.
67. Wolfe, M.S., Therapeutic strategies for Alzheimer's disease, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1 (2002) 859-866.
68. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P., Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, *Nature*, 400 (1999) 173-177.
69. Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., and Arendash, G.W., A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease, *Nature*, 408 (2000) 982-985.
70. Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., George-Hyslop, P., and Westaway, D., A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease, *Nature*, 408 (2000) 979-982.
71. Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., and Yednock, T., Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, *Nat. Med.*, 6 (2000) 916-919.
72. Dodart, J.C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., and Paul, S.M., Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model, *Nat. Neurosci.*, 5 (2002) 452-457.
73. Kurz, A., Riemenschneider, M., Drzezga, A., and Lautenschlager, N., The role of biological markers in the early and differential diagnosis of Alzheimer's disease, *J. Neural Transm. Suppl.*, (2002) 127-133.
74. Buerger, K., Zinkowski, R., Teipel, S.J., Tapiola, T., Arai, H., Blennow, K., Andreasen, N., Hofmann-Kiefer, K., DeBernardis, J., Kerkman, D., McCulloch, C., Kohnken, R., Padberg, F., Pirttila, T., Schapiro, M.B., Rapoport, S.I., Moller, H.J., Davies, P., and Hampel, H., Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231, *Arch. Neurol.*, 59 (2002) 1267-1272.

75. Rebeiz, J.J., Kolodny, E.H., and Richardson, E.P., Jr., Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia, *Arch. Neurol.*, 18 (1968) 20-33.
76. Rinne, J.O., Lee, M.S., Thompson, P.D., and Marsden, C.D., Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases, *Brain*, 117 (Pt 5) (1994) 1183-1196.
77. Buee, S., V, Hof, P.R., Buee, L., Leveugle, B., Vermersch, P., Perl, D.P., Olanow, C.W., and Delacourte, A., Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 91 (1996) 351-359.
78. Ksiezak-Reding, H., Morgan, K., Mattiace, L.A., Davies, P., Liu, W.K., Yen, S.H., Weidenheim, K., and Dickson, D.W., Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration, *Am. J. Pathol.*, 145 (1994) 1496-1508.
79. Buee-Scherrer, V., Hof, P.R., Buee, L., Leveugle, B., Vermersch, P., Perl, D.P., Olanow, C.W., and Delacourte, A., Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 91 (1996) 351-359.
80. Di Maria, E., Tabaton, M., Vigo, T., Abbruzzese, G., Bellone, E., Donati, C., Frasson, E., Marchese, R., Montagna, P., Munoz, D.G., Pramstaller, P.P., Zanusso, G., Ajmar, F., and Mandich, P., Corticobasal degeneration shares a common genetic background with progressive supranuclear palsy, *Ann. Neurol.*, 47 (2000) 374-377.
81. Hauw, J.J., Daniel, S.E., Dickson, D., Horoupian, D.S., Jellinger, K., Lantos, P.L., McKee, A., Tabaton, M., and Litvan, I., Preliminary NINDS neuropathologic criteria for Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy), *Neurology*, 44 (1994) 2015-2019.
82. Feany, M.B., Mattiace, L.A., and Dickson, D.W., Neuropathologic overlap of progressive supranuclear palsy, Pick's disease and corticobasal degeneration, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55 (1996) 53-67.
83. Steele, J.C., Richardson, J., and Olszewski, J., A heterogeneous degeneration involving brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze and pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia, *Arch. Neurol.*, (1964) 333-359.
84. Litvan, I., Campbell, G., Mangone, C.A., Verny, M., McKee, A., Chaudhuri, K.R., Jellinger, K., Pearce, R.K., and D'Olhaberriague, L., Which clinical features differentiate progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) from related disorders? A clinicopathological study, *Brain*, 120 (Pt 1) (1997) 65-74.
85. Higgins, J.J., Litvan, I., Pho, L.T., Li, W., and Nee, L.E., Progressive supranuclear gaze palsy is in linkage disequilibrium with the tau and not the alpha-synuclein gene, *Neurology*, 50 (1998) 270-273.
86. Baker, M., Litvan, I., Houlden, H., Adamson, J., Dickson, D., Perez-Tur, J., Hardy, J., Lynch, T., Bigio, E., and Hutton, M., Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy, *Hum. Mol. Genet.*, 8 (1999) 711-715.

87. Bonifati,V., Joosse,M., Nicholl,D.J., Vanacore,N., Bennett,P., Rizzu,P., Fabbrini,G., Marconi,R., Colosimo,C., Locuratolo,N., Stocchi,F., Bonuccelli,U., De Mari,M., Wenning,G., Vieregge,P., Oostra,B., Meo,G., and Heutink,P., The tau gene in progressive supranuclear palsy: exclusion of mutations in coding exons and exon 10 splice sites, and identification of a new intronic variant of the disease-associated H1 haplotype in Italian cases, *Neurosci. Lett.*, 274 (1999) 61-65.
88. Ezquerra,M., Pastor,P., Valldeoriola,F., Molinuevo,J.L., Blesa,R., Tolosa,E., and Oliva,R., Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the tau gene highly associated to progressive supranuclear palsy in humans, *Neurosci. Lett.*, 275 (1999) 183-186.
89. Pick,A., Über die Beziehungender senilen Hirnatrophie zur Aphasie, *Prager Medizinische Wochenschrift*, 17 (1892) 165-167.
90. Delacourte,A., Sergeant,N., Wattez,A., Gauvreau,D., and Robitaille,Y., Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation, *Ann. Neurol.*, 43 (1998) 193-204.
91. Wilhelmsen,K.C., Lynch,T., Pavlou,E., Higgins,M., and Nygaard,T.G., Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22, *Am. J. Hum. Genet.*, 55 (1994) 1159-1165.
92. Foster,N.L., Wilhelmsen,K., Sima,A.A., Jones,M.Z., D'Amato,C.J., and Gilman,S., Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants, *Ann. Neurol.*, 41 (1997) 706-715.
93. Spillantini,M.G., Bird,T.D., and Ghetti,B., Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies, *Brain Pathol.*, 8 (1998) 387-402.
94. Jiang,Z., Tang,H., Havlioglu,N., Zhang,X., Stamm,S., Yan,R., and Wu,J.Y., Mutations in tau gene exon10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2beta ^, *J. Biol. Chem.*, (2003).
95. Hutton,M., Lendon,C.L., Rizzu,P., Baker,M., Froelich,S., Houlden,H., Pickering-Brown,S., Chakraverty,S., Isaacs,A., Grover,A., Hackett,J., Adamson,J., Lincoln,S., Dickson,D., Davies,P., Petersen,R.C., Stevens,M., de Graaff,E., Wauters,E., van Baren,J., Hillebrand,M., Joosse,M., Kwon,J.M., Nowotny,P., Heutink,P., and ., Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17, *Nature*, 393 (1998) 702-705.
96. Gambin,T.C., Berry,R.W., and Binder,L.I., Tau polymerization: role of the amino terminus, *Biochemistry*, 42 (2003) 2252-2257.
97. Poorkaj,P., Muma,N.A., Zhukareva,V., Cochran,E.J., Shannon,K.M., Hurtig,H., Koller,W.C., Bird,T.D., Trojanowski,J.Q., Lee,V.M., and Schellenberg,G.D., An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype, *Ann. Neurol.*, 52 (2002) 511-516.
98. Pickering-Brown,S., Baker,M., Yen,S.H., Liu,W.K., Hasegawa,M., Cairns,N., Lantos,P.L., Rossor,M., Iwatsubo,T., Davies,Y., Allsop,D., Furlong,R., Owen,F., Hardy,J., Mann,D., and Hutton,M., Pick's disease is associated with mutations in the tau gene, *Ann. Neurol.*, 48 (2000) 859-867.
99. Rizzini,C., Goedert,M., Hodges,J.R., Smith,M.J., Jakes,R., Hills,R., Xuereb,J.H., Crowther,R.A., and Spillantini,M.G., Tau gene mutation K257T causes a tauopathy similar to Pick's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59 (2000) 990-1001.

100. Kobayashi,T., Ota,S., Tanaka,K., Ito,Y., Hasegawa,M., Umeda,Y., Motoi,Y., Takanashi,M., Yasuhara,M., Anno,M., Mizuno,Y., and Mori,H., A novel L266V mutation of the tau gene causes frontotemporal dementia with a unique tau pathology, *Ann. Neurol.*, 53 (2003) 133-137.
101. Rizzu,P., van Swieten,J.C., Joosse,M., Hasegawa,M., Stevens,M., Tibben,A., Niermeijer,M.F., Hillebrand,M., Ravid,R., Oostra,B.A., Goedert,M., van Duijn,C.M., and Heutink,P., High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands, *Am. J. Hum. Genet.*, 64 (1999) 414-421.
102. Clark,L.N., Poorkaj,P., Wszolek,Z., Geschwind,D.H., Nasreddine,Z.S., Miller,B., Li,D., Payami,H., Awert,F., Markopoulou,K., Andreadis,A., D'Souza,I., Lee,V.M., Reed,L., Trojanowski,J.Q., Zhukareva,V., Bird,T., Schellenberg,G., and Wilhelmsen,K.C., Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95 (1998) 13103-13107.
103. D'Souza,I., Poorkaj,P., Hong,M., Nochlin,D., Lee,V.M., Bird,T.D., and Schellenberg,G.D., Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96 (1999) 5598-5603.
104. Ferrer,I., Pastor,P., Rey,M.J., Munoz,E., Puig,B., Pastor,E., Oliva,R., and Tolosa,E., Tau phosphorylation and kinase activation in familial tauopathy linked to delN296 mutation, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 29 (2003) 23-34.
105. Spillantini,M.G., Yoshida,H., Rizzini,C., Lantos,P.L., Khan,N., Rossor,M.N., Goedert,M., and Brown,J., A novel tau mutation (N296N) in familial dementia with swollen achromatic neurons and corticobasal inclusion bodies, *Ann. Neurol.*, 48 (2000) 939-943.
106. Miyamoto,K., Kowalska,A., Hasegawa,M., Tabira,T., Takahashi,K., Araki,W., Akiguchi,I., and Ikemoto,A., Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel mutation at an intron 10+11-splice site in the tau gene, *Ann. Neurol.*, 50 (2001) 117-120.
107. Bugiani,O., Murrell,J.R., Giaccone,G., Hasegawa,M., Ghigo,G., Tabaton,M., Morbin,M., Primavera,A., Carella,F., Solaro,C., Grisoli,M., Savoiaro,M., Spillantini,M.G., Tagliavini,F., Goedert,M., and Ghetti,B., Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58 (1999) 667-677.
108. Sperfeld,A.D., Collatz,M.B., Baier,H., Palmbach,M., Storch,A., Schwarz,J., Tatsch,K., Reske,S., Joosse,M., Heutink,P., and Ludolph,A.C., FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation, *Ann. Neurol.*, 46 (1999) 708-715.
109. Hasegawa,M., Smith,M.J., Iijima,M., Tabira,T., and Goedert,M., FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10, *FEBS Lett.*, 443 (1999) 93-96.
110. Iijima,M., Tabira,T., Poorkaj,P., Schellenberg,G.D., Trojanowski,J.Q., Lee,V.M., Schmidt,M.L., Takahashi,K., Nabika,T., Matsumoto,T., Yamashita,Y., Yoshioka,S., and Ishino,H., A distinct familial presenile dementia with a novel missense mutation in the tau gene, *Neuroreport*, 10 (1999) 497-501.

111. Stanford,P.M., Halliday,G.M., Brooks,W.S., Kwok,J.B., Storey,C.E., Creasey,H., Morris,J.G., Fulham,M.J., and Schofield,P.R., Progressive supranuclear palsy pathology caused by a novel silent mutation in exon 10 of the tau gene: expansion of the disease phenotype caused by tau gene mutations, *Brain*, 123 (Pt 5) (2000) 880-893.
112. Tolnay,M., Grazia,S.M., Rizzini,C., Eccles,D., Lowe,J., and Ellison,D., A new case of frontotemporal dementia and parkinsonism resulting from an intron 10 +3-splice site mutation in the tau gene: clinical and pathological features, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 26 (2000) 368-378.
113. Spillantini,M.G., Murrell,J.R., Goedert,M., Farlow,M.R., Klug,A., and Ghetti,B., Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95 (1998) 7737-7741.
114. Kowalska,A., Hasegawa,M., Miyamoto,K., Akiguchi,I., Ikemoto,A., Takahashi,K., Araki,W., and Tabira,T., A novel mutation at position +11 in the intron following exon 10 of the tau gene in FTDP-17, *J. Appl. Genet.*, 43 (2002) 535-543.
115. Yasuda,M., Takamatsu,J., D'Souza,I., Crowther,R.A., Kawamata,T., Hasegawa,M., Hasegawa,H., Spillantini,M.G., Tanimukai,S., Poorkaj,P., Varani,L., Varani,G., Iwatsubo,T., Goedert,M., Schellenberg,D.G., and Tanaka,C., A novel mutation at position +12 in the intron following exon 10 of the tau gene in familial frontotemporal dementia (FTD-Kumamoto), *Ann. Neurol.*, 47 (2000) 422-429.
116. Stanford,P.M., Shepherd,C.E., Halliday,G.M., Brooks,W.S., Schofield,P.W., Brodaty,H., Martins,R.N., Kwok,J.B., and Schofield,P.R., Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia, *Brain*, 126 (2003) 814-826.
117. Poorkaj,P., Bird,T.D., Wijsman,E., Nemens,E., Garruto,R.M., Anderson,L., Andreadis,A., Wiederholt,W.C., Raskind,M., and Schellenberg,G.D., Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia, *Ann. Neurol.*, 43 (1998) 815-825.
118. Lippa,C.F., Zhukareva,V., Kawarai,T., Uryu,K., Shafiq,M., Nee,L.E., Grafman,J., Liang,Y., George-Hyslop,P.H., Trojanowski,J.Q., and Lee,V.M., Frontotemporal dementia with novel tau pathology and a Glu342Val tau mutation, *Ann. Neurol.*, 48 (2000) 850-858.
119. Murrell,J.R., Spillantini,M.G., Zolo,P., Guazzelli,M., Smith,M.J., Hasegawa,M., Redi,F., Crowther,R.A., Pietrini,P., Ghetti,B., and Goedert,M., Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58 (1999) 1207-1226.
120. Hong,M., Zhukareva,V., Vogelsberg-Ragaglia,V., Wszolek,Z., Reed,L., Miller,B.I., Geschwind,D.H., Bird,T.D., McKeel,D., Goate,A., Morris,J.C., Wilhelmsen,K.C., Schellenberg,G.D., Trojanowski,J.Q., and Lee,V.M., Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17, *Science*, 282 (1998) 1914-1917.
121. Rizzu,P., Joosse,M., Ravid,R., Hoogeveen,A., Kamphorst,W., van Swieten,J.C., Willemsen,R., and Heutink,P., Mutation-dependent aggregation of tau protein and its selective depletion from the soluble fraction in brain of P301L FTDP-17 patients, *Hum. Mol. Genet.*, 9 (2000) 3075-3082.
122. Dayanandan,R., Van Slegtenhorst,M., Mack,T.G., Ko,L., Yen,S.H., Leroy,K., Brion,J.P., Anderton,B.H., Hutton,M., and Lovestone,S., Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation, *FEBS Lett.*, 446 (1999) 228-232.

123. Matsumura,N., Yamazaki,T., and Ihara,Y., Stable expression in Chinese hamster ovary cells of mutated tau genes causing frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), *Am. J. Pathol.*, 154 (1999) 1649-1656.
124. Arawaka,S., Usami,M., Sahara,N., Schellenberg,G.D., Lee,G., and Mori,H., The tau mutation (val337met) disrupts cytoskeletal networks of microtubules, *Neuroreport*, 10 (1999) 993-997.
125. Frappier,T., Liang,N.S., Brown,K., Leung,C.L., Lynch,T., Liem,R.K., and Shelanski,M.L., Abnormal microtubule packing in processes of SF9 cells expressing the FTDP-17 V337M tau mutation, *FEBS Lett.*, 455 (1999) 262-266.
126. Hirsch,E., Oohashi,T., Ahmad,M., Stamm,S., and Fassler,R., Peri-implantation lethality in mice lacking the Sm motif-containing protein Lsm4, *Mol. Cell Biol.*, 20 (2000) 1055-1062.
127. Higuchi,M., Maas,S., Single,F.N., Hartner,J., Rozov,A., Burnashev,N., Feldmeyer,D., Sprengel,R., and Seeburg,P.H., Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2, *Nature*, 406 (2000) 78-81.
128. Kraus,M.E. and Lis,J.T., The concentration of B52, an essential splicing factor and regulator of splice site choice in vitro, is critical for Drosophila development, *Mol. Cell Biol.*, 14 (1994) 5360-5370.
129. Nissim-Rafinia,M., Chiba-Falek,O., Sharon,G., Boss,A., and Kerem,B., Cellular and viral splicing factors can modify the splicing pattern of CFTR transcripts carrying splicing mutations, *Hum. Mol. Genet.*, 9 (2000) 1771-1778.
130. Rave-Harel,N., Kerem,E., Nissim-Rafinia,M., Madjar,I., Goshen,R., Augarten,A., Rahat,A., Hurwitz,A., Darvasi,A., and Kerem,B., The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis, *Am. J. Hum. Genet.*, 60 (1997) 87-94.
131. Harrison,P.M., Kumar,A., Lang,N., Snyder,M., and Gerstein,M., A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it, *Nucleic Acids Res.*, 30 (2002) 1083-1090.
132. Lander,E.S., Linton,L.M., Birren,B., Nusbaum,C., Zody,M.C., Baldwin,J., Devon,K., Dewar,K., Doyle,M., FitzHugh,W., Funke,R., Gage,D., Harris,K., Heaford,A., Howland,J., Kann,L., Lehoczky,J., LeVine,R., McEwan,P., McKernan,K., Meldrim,J., Mesirov,J.P., Miranda,C., Morris,W., Naylor,J., Raymond,C., Rosetti,M., Santos,R., Sheridan,A., Sougnez,C., Stange-Thomann,N., Stojanovic,N., Subramanian,A., Wyman,D., Rogers,J., Sulston,J., Ainscough,R., Beck,S., Bentley,D., Burton,J., Clee,C., Carter,N., Coulson,A., Deadman,R., Deloukas,P., Dunham,A., Dunham,I., Durbin,R., French,L., Grafham,D., Gregory,S., Hubbard,T., Humphray,S., Hunt,A., Jones,M., Lloyd,C., McMurray,A., Matthews,L., Mercer,S., Milne,S., Mullikin,J.C., Mungall,A., Plumb,R., Ross,M., Shownkeen,R., Sims,S., Waterston,R.H., Wilson,R.K., Hillier,L.W., McPherson,J.D., Marra,M.A., Mardis,E.R., Fulton,L.A., Chinwalla,A.T., Pepin,K.H., Gish,W.R., Chissoe,S.L., Wendl,M.C., Delehaunty,K.D., Miner,T.L., Delehaunty,A., Kramer,J.B., Cook,L.L., Fulton,R.S., Johnson,D.L., Minx,P.J., Clifton,S.W., Hawkins,T., Branscomb,E., Predki,P., Richardson,P., Wenning,S., Slezak,T., Doggett,N., Cheng,J.F., Olsen,A., Lucas,S., Elkin,C., Uberbacher,E., Frazier,M., Gibbs,R.A., Muzny,D.M., Scherer,S.E., Bouck,J.B., Sodergren,E.J., Worley,K.C., Rives,C.M., Gorrell,J.H., Metzker,M.L., Naylor,S.L., Kucherlapati,R.S., Nelson,D.L., Weinstock,G.M., Sakaki,Y., Fujiyama,A.,

- Hattori,M., Yada,T., Toyoda,A., Itoh,T., Kawagoe,C., Watanabe,H., Totoki,Y., Taylor,T., Weissenbach,J., Heilig,R., Saurin,W., Artiguenave,F., Brottier,P., Bruls,T., Pelletier,E., Robert,C., Wincker,P., Smith,D.R., Doucette-Stamm,L., Rubenfield,M., Weinstock,K., Lee,H.M., Dubois,J., Rosenthal,A., Platzer,M., Nyakatura,G., Taudien,S., Rump,A., Yang,H., Yu,J., Wang,J., Huang,G., Gu,J., Hood,L., Rowen,L., Madan,A., Qin,S., Davis,R.W., Federspiel,N.A., Abola,A.P., Proctor,M.J., Myers,R.M., Schmutz,J., Dickson,M., Grimwood,J., Cox,D.R., Olson,M.V., Kaul,R., Raymond,C., Shimizu,N., Kawasaki,K., Minoshima,S., Evans,G.A., Athanasiou,M., Schultz,R., Roe,B.A., Chen,F., Pan,H., Ramser,J., Lehrach,H., Reinhardt,R., McCombie,W.R., de la,B.M., Dedhia,N., Blocker,H., Hornischer,K., Nordsiek,G., Agarwala,R., Aravind,L., Bailey,J.A., Bateman,A., Batzoglu,S., Birney,E., Bork,P., Brown,D.G., Burge,C.B., Cerutti,L., Chen,H.C., Church,D., Clamp,M., Copley,R.R., Doerks,T., Eddy,S.R., Eichler,E.E., Furey,T.S., Galagan,J., Gilbert,J.G., Harmon,C., Hayashizaki,Y., Haussler,D., Hermjakob,H., Hokamp,K., Jang,W., Johnson,L.S., Jones,T.A., Kasif,S., Kasprzyk,A., Kennedy,S., Kent,W.J., Kitts,P., Koonin,E.V., Korf,I., Kulp,D., Lancet,D., Lowe,T.M., McLysaght,A., Mikkelsen,T., Moran,J.V., Mulder,N., Pollara,V.J., Ponting,C.P., Schuler,G., Schultz,J., Slater,G., Smit,A.F., Stupka,E., Szustakowski,J., Thierry-Mieg,D., Thierry-Mieg,J., Wagner,L., Wallis,J., Wheeler,R., Williams,A., Wolf,Y.I., Wolfe,K.H., Yang,S.P., Yeh,R.F., Collins,F., Guyer,M.S., Peterson,J., Felsenfeld,A., Wetterstrand,K.A., Patrinos,A., Morgan,M.J., Szustakowki,J., de Jong,P., Catanese,J.J., Osoegawa,K., Shizuya,H., and Choi,S., Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409 (2001) 860-921.
133. Venter,J.C., Adams,M.D., Myers,E.W., Li,P.W., Mural,R.J., Sutton,G.G., Smith,H.O., Yandell,M., Evans,C.A., Holt,R.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P., Ballew,R.M., Huson,D.H., Wortman,J.R., Zhang,Q., Kodira,C.D., Zheng,X.H., Chen,L., Skupski,M., Subramanian,G., Thomas,P.D., Zhang,J., Gabor Miklos,G.L., Nelson,C., Broder,S., Clark,A.G., Nadeau,J., McKusick,V.A., Zinder,N., Levine,A.J., Roberts,R.J., Simon,M., Slayman,C., Hunkapiller,M., Bolanos,R., Delcher,A., Dew,I., Fasulo,D., Flanigan,M., Florea,L., Halpern,A., Hannenhalli,S., Kravitz,S., Levy,S., Mobarry,C., Reinert,K., Remington,K., Abu-Threideh,J., Beasley,E., Biddick,K., Bonazzi,V., Brandon,R., Cargill,M., Chandramouliswaran,I., Charlab,R., Chaturvedi,K., Deng,Z., Di,F., V, Dunn,P., Eilbeck,K., Evangelista,C., Gabrielian,A.E., Gan,W., Ge,W., Gong,F., Gu,Z., Guan,P., Heiman,T.J., Higgins,M.E., Ji,R.R., Ke,Z., Ketchum,K.A., Lai,Z., Lei,Y., Li,Z., Li,J., Liang,Y., Lin,X., Lu,F., Merkulov,G.V., Milshina,N., Moore,H.M., Naik,A.K., Narayan,V.A., Neelam,B., Nusskern,D., Rusch,D.B., Salzberg,S., Shao,W., Shue,B., Sun,J., Wang,Z., Wang,A., Wang,X., Wang,J., Wei,M., Wides,R., Xiao,C., Yan,C., Yao,A., Ye,J., Zhan,M., Zhang,W., Zhang,H., Zhao,Q., Zheng,L., Zhong,F., Zhong,W., Zhu,S., Zhao,S., Gilbert,D., Baumhueter,S., Spier,G., Carter,C., Cravchik,A., Woodage,T., Ali,F., An,H., Awe,A., Baldwin,D., Baden,H., Barnstead,M., Barrow,I., Beeson,K., Busam,D., Carver,A., Center,A., Cheng,M.L., Curry,L., Danaher,S., Davenport,L., Desilets,R., Dietz,S., Dodson,K., Doup,L., Ferreira,S., Garg,N., Gluecksmann,A., Hart,B., Haynes,J., Haynes,C., Heiner,C., Hladun,S., Hostin,D., Houck,J., Howland,T., Ibegwam,C., Johnson,J., Kalush,F., Kline,L., Koduru,S., Love,A., Mann,F., May,D., McCawley,S., McIntosh,T., McMullen,I., Moy,M., Moy,L., Murphy,B., Nelson,K., Pfannkoch,C., Pratts,E., Puri,V., Qureshi,H., Reardon,M., Rodriguez,R., Rogers,Y.H., Romblad,D., Ruhfel,B., Scott,R., Sitter,C.,

- Smallwood,M., Stewart,E., Strong,R., Suh,E., Thomas,R., Tint,N.N., Tse,S., Vech,C., Wang,G., Wetter,J., Williams,S., Williams,M., Windsor,S., Winn-Deen,E., Wolfe,K., Zaveri,J., Zaveri,K., Abril,J.F., Guigo,R., Campbell,M.J., Sjolander,K.V., Karlak,B., Kejariwal,A., Mi,H., Lazareva,B., Hatton,T., Narechania,A., Diemer,K., Muruganujan,A., Guo,N., Sato,S., Bafna,V., Istrail,S., Lippert,R., Schwartz,R., Walenz,B., Yooseph,S., Allen,D., Basu,A., Baxendale,J., Blick,L., Caminha,M., Carnes-Stine,J., Caulk,P., Chiang,Y.H., Coyne,M., Dahlke,C., Mays,A., Dombroski,M., Donnelly,M., Ely,D., Esparham,S., Fosler,C., Gire,H., Glanowski,S., Glasser,K., Glodek,A., Gorokhov,M., Graham,K., Gropman,B., Harris,M., Heil,J., Henderson,S., Hoover,J., Jennings,D., Jordan,C., Jordan,J., Kasha,J., Kagan,L., Kraft,C., Levitsky,A., Lewis,M., Liu,X., Lopez,J., Ma,D., Majoros,W., McDaniel,J., Murphy,S., Newman,M., Nguyen,T., Nguyen,N., and Nodell,M., The sequence of the human genome, *Science*, 291 (2001) 1304-1351.
134. Kramer,A., The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing, *Annu. Rev. Biochem.*, 65 (1996) 367-409.
135. Thanaraj,T.A. and Stamm,S., Prediction and statistical analysis of alternatively spliced exons, *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 31 (2003) 1-31.
136. Levine,A. and Durbin,R., A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence, *Nucleic Acids Res.*, 29 (2001) 4006-4013.
137. Tarn,W.Y. and Steitz,J.A., Modulation of 5' splice site choice in pre-messenger RNA by two distinct steps, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92 (1995) 2504-2508.
138. Will,C.L. and Luhrmann,R., Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13 (2001) 290-301.
139. Cunningham,T.P., Hagan,J.P., and Grabowski,P.J., Reconstitution of exon-bridging activity with purified U2AF and U1 snRNP components, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, (1995) 218-219.
140. Hoffman,B.E. and Grabowski,P.J., U1 snRNP targets an essential splicing factor, U2AF65, to the 3' splice site by a network of interactions spanning the exon, *Genes Dev.*, 6 (1992) 2554-2568.
141. Collins,C.A. and Guthrie,C., Genetic interactions between the 5' and 3' splice site consensus sequences and U6 snRNA during the second catalytic step of pre-mRNA splicing, *RNA*, 7 (2001) 1845-1854.
142. Chiara,M.D., Palandjian,L., Feld,K.R., and Reed,R., Evidence that U5 snRNP recognizes the 3' splice site for catalytic step II in mammals, *EMBO J.*, 16 (1997) 4746-4759.
143. Wang,Y.-C., Selvakumar,M., and Helfman,D., Alternative pre-mRNA splicing. In: Krainer,A.R. (Ed.), New York, 1997.
144. Rubin,G.M., The draft sequences. Comparing species, *Nature*, 409 (2001) 820-821.
145. Hide,W.A., Babenko,V.N., van Heusden,P.A., Seoighe,C., and Kelso,J.F., The contribution of exon-skipping events on chromosome 22 to protein coding diversity, *Genome Res.*, 11 (2001) 1848-1853.
146. Modrek,B., Resch,A., Grasso,C., and Lee,C., Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes, *Nucleic Acids Res.*, 29 (2001) 2850-2859.
147. Baumbach,W.R., Horner,D.L., and Logan,J.S., The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor, *Genes Dev.*, 3 (1989) 1199-1205.

148. Eipper,B.A., Green,C.B., Campbell,T.A., Stoffers,D.A., Keutmann,H.T., Mains,R.E., and Ouafik,L., Alternative splicing and endoproteolytic processing generate tissue-specific forms of pituitary peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM), *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 4008-4015.
149. Toksoz,D., Zsebo,K.M., Smith,K.A., Hu,S., Brankow,D., Suggs,S.V., Martin,F.H., and Williams,D.A., Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89 (1992) 7350-7354.
150. Zhang,K., Max,E.E., Cheah,H.K., and Saxon,A., Complex alternative RNA splicing of epsilon-immunoglobulin transcripts produces mRNAs encoding four potential secreted protein isoforms, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 31322.
151. Hughes,D.P. and Crispe,I.N., A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing, *J. Exp. Med.*, 182 (1995) 1395-1401.
152. Tabiti,K., Cui,L., Chhatwal,V.J., Mochhala,S., Ngoi,S.S., and Pallen,C.J., Novel alternative splicing predicts a secreted extracellular isoform of the human receptor-like protein tyrosine phosphatase LAR, *Gene*, 175 (1996) 7-13.
153. Sugimoto,Y., Negishi,M., Hayashi,Y., Namba,T., Honda,A., Watabe,A., Hirata,M., Narumiya,S., and Ichikawa,A., Two isoforms of the EP3 receptor with different carboxyl-terminal domains. Identical ligand binding properties and different coupling properties with Gi proteins, *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 2712-2718.
154. Xing,S., Tong,Q., Suzuki,T., and Jhiang,S.M., Alternative splicing of the ret proto-oncogene at intron 4, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205 (1994) 1526-1532.
155. Suzuki,A., Yoshida,M., and Ozawa,E., Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus, *J. Cell Biol.*, 128 (1995) 373-381.
156. Duncan,P.I., Howell,B.W., Marius,R.M., Drmanic,S., Douville,E.M., and Bell,J.C., Alternative splicing of STY, a nuclear dual specificity kinase, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 21524-21531.
157. Sharma,E., Zhao,F., Bult,A., and Lombroso,P.J., Identification of two alternatively spliced transcripts of STEP: a subfamily of brain-enriched protein tyrosine phosphatases, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 32 (1995) 87-93.
158. Eissa,N.T., Strauss,A.J., Haggerty,C.M., Choo,E.K., Chu,S.C., and Moss,J., Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA. tissue-specific regulation and induction by cytokines, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 27184-27187.
159. Guiramand,J., Montmayeur,J.P., Ceraline,J., Bhatia,M., and Borrelli,E., Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 7354-7358.
160. Strohmaier,C., Carter,B.D., Urfer,R., Barde,Y.A., and Dechant,G., A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor, *EMBO J.*, 15 (1996) 3332-3337.
161. O'Malley,K.L., Harmon,S., Moffat,M., Uhland-Smith,A., and Wong,S., The human aromatic L-amino acid decarboxylase gene can be alternatively spliced to generate unique protein isoforms, *J. Neurochem.*, 65 (1995) 2409-2416.
162. Courty,Y., Rosinski-Chupin,I., and Rougeon,F., Various transcripts are generated from the VCSA1 gene by alternative splicing and poly(A) processing in the rat submandibular gland, *Gene*, 162 (1995) 291-296.

163. Sommer,B., Keinanen,K., Verdoorn,T.A., Wisden,W., Burnashev,N., Herb,A., Kohler,M., Takagi,T., Sakmann,B., and Seeburg,P.H., Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS, *Science*, 249 (1990) 1580-1585.
164. Kuhse,J., Kuryatov,A., Maulet,Y., Malosio,M.L., Schmieden,V., and Betz,H., Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor, *FEBS Lett.*, 283 (1991) 73-77.
165. Beyersmann,D., Regulation of mammalian gene expression, *EXS*, 89 (2000) 11-28.
166. Lopez,A.J., Developmental role of transcription factor isoforms generated by alternative splicing, *Dev. Biol.*, 172 (1995) 396-411.
167. Stamm,S., Zhang,M.Q., Marr,T.G., and Helfman,D.M., A sequence compilation and comparison of exons that are alternatively spliced in neurons, *Nucleic Acids Res.*, 22 (1994) 1515-1526.
168. Stamm,S., Zhu,J., Nakai,K., Stoilov,P., Stoss,O., and Zhang,M.Q., An alternative-exon database and its statistical analysis, *DNA Cell Biol.*, 19 (2000) 739-756.
169. Sell,S.M., Reese,D., and Ossowski,V.M., Insulin-inducible changes in insulin receptor mRNA splice variants, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 30769-30772.
170. Daoud,R., Da Penha,B.M., Siedler,F., Hubener,M., and Stamm,S., Activity-dependent regulation of alternative splicing patterns in the rat brain, *Eur. J. Neurosci.*, 11 (1999) 788-802.
171. Sun,H. and Chasin,L.A., Multiple splicing defects in an intronic false exon, *Mol. Cell Biol.*, 20 (2000) 6414-6425.
172. Amarasinghe,A.K., MacDiarmid,R., Adams,M.D., and Rio,D.C., An in vitro-selected RNA-binding site for the KH domain protein PSI acts as a splicing inhibitor element, *RNA*, 7 (2001) 1239-1253.
173. Cavaloc,Y., Bourgeois,C.F., Kister,L., and Stevenin,J., The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers, *RNA*, 5 (1999) 468-483.
174. Cooper,T.A., In vivo SELEX in vertebrate cells, *Methods Mol. Biol.*, 118 (1999) 405-417.
175. Liu,H.X., Zhang,M., and Krainer,A.R., Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins, *Genes Dev.*, 12 (1998) 1998-2012.
176. Tacke,R. and Manley,J.L., The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities, *EMBO J.*, 14 (1995) 3540-3551.
177. Li,X., Shambaugh,M.E., Rottman,F.M., and Bokar,J.A., SR proteins Asf/SF2 and 9G8 interact to activate enhancer-dependent intron D splicing of bovine growth hormone pre-mRNA in vitro, *RNA*, 6 (2000) 1847-1858.
178. Blencowe,B.J., Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases, *Trends Biochem. Sci.*, 25 (2000) 106-110.
179. Zhu,J., Mayeda,A., and Krainer,A.R., Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins, *Mol. Cell*, 8 (2001) 1351-1361.
180. Smith,C.W. and Valcarcel,J., Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control, *Trends Biochem. Sci.*, 25 (2000) 381-388.
181. Hertel,K.J. and Maniatis,T., The function of multisite splicing enhancers, *Mol. Cell*, 1 (1998) 449-455.

182. Kawano,T., Fujita,M., and Sakamoto,H., Unique and redundant functions of SR proteins, a conserved family of splicing factors, in *Caenorhabditis elegans* development, *Mech. Dev.*, 95 (2000) 67-76.
183. Longman,D., Johnstone,I.L., and Caceres,J.F., Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*, *EMBO J.*, 19 (2000) 1625-1637.
184. Jumaa,H., Wei,G., and Nielsen,P.J., Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20, *Curr. Biol.*, 9 (1999) 899-902.
185. Wang,H.Y., Xu,X., Ding,J.H., Bermingham,J.R., Jr., and Fu,X.D., SC35 plays a role in T cell development and alternative splicing of CD45, *Mol. Cell*, 7 (2001) 331-342.
186. Valcarcel,J. and Green,M.R., The SR protein family: pleiotropic functions in pre-mRNA splicing, *Trends Biochem. Sci.*, 21 (1996) 296-301.
187. Zahler,A.M., Lane,W.S., Stolk,J.A., and Roth,M.B., SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors, *Genes Dev.*, 6 (1992) 837-847.
188. Mayeda,A., Zahler,A.M., Krainer,A.R., and Roth,M.B., Two members of a conserved family of nuclear phosphoproteins are involved in pre-mRNA splicing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89 (1992) 1301-1304.
189. Roth,M.B., Zahler,A.M., and Stolk,J.A., A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription, *J. Cell Biol.*, 115 (1991) 587-596.
190. Zahler,A.M., Purification of SR protein splicing factors, *Methods Mol. Biol.*, 118 (1999) 419-432.
191. Liu,H.X., Chew,S.L., Cartegni,L., Zhang,M.Q., and Krainer,A.R., Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions, *Mol. Cell Biol.*, 20 (2000) 1063-1071.
192. Wang,Z., Hoffmann,H.M., and Grabowski,P.J., Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity, *RNA.*, 1 (1995) 21-35.
193. Wu,J.Y. and Maniatis,T., Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing, *Cell*, 75 (1993) 1061-1070.
194. Eperon,I.C., Ireland,D.C., Smith,R.A., Mayeda,A., and Krainer,A.R., Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF, *EMBO J.*, 12 (1993) 3607-3617.
195. Zahler,A.M. and Roth,M.B., Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92 (1995) 2642-2646.
196. Blencowe,B.J., Bauren,G., Eldridge,A.G., Issner,R., Nickerson,J.A., Rosonina,E., and Sharp,P.A., The SRm160/300 splicing coactivator subunits, *RNA.*, 6 (2000) 111-120.
197. Eldridge,A.G., Li,Y., Sharp,P.A., and Blencowe,B.J., The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96 (1999) 6125-6130.
198. Longman,D., McGarvey,T., McCracken,S., Johnstone,I.L., Blencowe,B.J., and Caceres,J.F., Multiple interactions between SRm160 and SR family proteins in enhancer-dependent splicing and development of *C. elegans*, *Curr. Biol.*, 11 (2001) 1923-1933.
199. McCracken,S., Lambermon,M., and Blencowe,B.J., SRm160 splicing coactivator promotes transcript 3'-end cleavage, *Mol. Cell Biol.*, 22 (2002) 148-160.

200. Stark, J.M., Bazett-Jones, D.P., Herfort, M., and Roth, M.B., SR proteins are sufficient for exon bridging across an intron, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95 (1998) 2163-2168.
201. Hastings, M.L. and Krainer, A.R., Pre-mRNA splicing in the new millennium, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13 (2001) 302-309.
202. Baker, B.S., Sex in flies: the splice of life, *Nature*, 340 (1989) 521-524.
203. Beil, B., Screatton, G., and Stamm, S., Molecular cloning of htra2-beta-1 and htra2-beta-2, two human homologs of tra-2 generated by alternative splicing, *DNA Cell Biol.*, 16 (1997) 679-690.
204. Dauwalder, B., Amaya-Manzanares, F., and Mattox, W., A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor transformer-2 has conserved splicing regulatory functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93 (1996) 9004-9009.
205. Naylor, O., Cap, C., and Stamm, S., Human transformer-2-beta gene (SFRS10): complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and generation of a tissue-specific isoform, *Genomics*, 53 (1998) 191-202.
206. Stamm, S., Casper, D., Dinsmore, J., Kaufmann, C.A., Brosius, J., and Helfman, D.M., Clathrin light chain B: gene structure and neuron-specific splicing, *Nucleic Acids Res.*, 20 (1992) 5097-5103.
207. Hofmann, Y., Lorson, C.L., Stamm, S., Androphy, E.J., and Wirth, B., Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 (2000) 9618-9623.
208. Lorson, C.L. and Androphy, E.J., An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN, *Hum. Mol. Genet.*, 9 (2000) 259-265.
209. Yamada, T., Goto, I., and Sakaki, Y., Neuron-specific splicing of the Alzheimer amyloid precursor protein gene in a mini-gene system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195 (1993) 442-448.
210. Tacke, R., Tohyama, M., Ogawa, S., and Manley, J.L., Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing, *Cell*, 93 (1998) 139-148.
211. Nikolakaki, E., Du, C., Lai, J., Giannakouros, T., Cantley, L., and Rabinow, L., Phosphorylation by LAMMER protein kinases: determination of a consensus site, identification of in vitro substrates, and implications for substrate preferences, *Biochemistry*, 41 (2002) 2055-2066.
212. Dreyfuss, G., Kim, V.N., and Kataoka, N., Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3 (2002) 195-205.
213. Krecic, A.M. and Swanson, M.S., hnRNP complexes: composition, structure, and function, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11 (1999) 363-371.
214. McAfee, J.G., Huang, M., Soltaninassab, S., Rech, J.E., Iyengar, S., and Lestourgeon, W., The packaging of pre-mRNA. In: Krainer, A.R. (Ed.), *Eukaryotic mRNA processing*, Oxford University Press Inc., New York, New York, 1997, pp. 68-102.
215. Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S., and Burd, C.G., hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA, *Annu. Rev. Biochem.*, 62 (1993) 289-321.
216. Misteli, T. and Spector, D.L., Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors, *Mol. Biol. Cell*, 7 (1996) 1559-1572.
217. Fischbach, K.F. and Technau, G., Cell degeneration in the developing optic lobes of the *sine oculis* and small-optic-lobes mutants of *Drosophila melanogaster*, *Dev. Biol.*, 104 (1984) 219-239.

218. Tejedor, F., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., and Pongs, O., minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*, *Neuron*, 14 (1995) 287-301.
219. Becker, W. and Joost, H.G., Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 62 (1999) 1-17.
220. Becker, W., Weber, Y., Wetzel, K., Eirnbter, K., Tejedor, F.J., and Joost, H.G., Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 25893-25902.
221. Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schurmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., and Joost, H.G., Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 3488-3495.
222. Campbell, L.E. and Proud, C.G., Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases, *FEBS Lett.*, 510 (2002) 31-36.
223. Matsumoto, N., Ohashi, H., Tsukahara, M., Kim, K.C., Soeda, E., and Niikawa, N., Possible narrowed assignment of the loci of monosomy 21-associated microcephaly and intrauterine growth retardation to a 1.2-Mb segment at 21q22.2, *Am. J. Hum. Genet.*, 60 (1997) 997-999.
224. Song, W.J., Sternberg, L.R., Kasten-Sportes, C., Keuren, M.L., Chung, S.H., Slack, A.C., Miller, D.E., Glover, T.W., Chiang, P.W., Lou, L., and Kurnit, D.M., Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region", *Genomics*, 38 (1996) 331-339.
225. Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minoshima, S., Shimizu, Y., and Shimizu, N., Cloning of a human homolog of the *Drosophila* minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225 (1996) 92-99.
226. Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., and Pritchard, M., Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome, *Genomics*, 57 (1999) 407-418.
227. Woods, Y.L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., and Proud, C.G., The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase, *Biochem. J.*, 355 (2001) 609-615.
228. Harrington, C.R., Mukaetova-Ladinska, E.B., Hills, R., Edwards, P.C., Montejo, d.G., Novak, M., and Wischik, C.M., Measurement of distinct immunochemical presentations of tau protein in Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88 (1991) 5842-5846.
229. Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y., Gertz, H.N., Xuereb, J.H., Paykel, E.S., Brayne, C., Huppert, F.A., Mukaetova-Ladinska, E.B., Mena, R., and ., Quantitative analysis of tau protein in paired helical filament preparations: implications for the role of tau protein phosphorylation in PHF assembly in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, 16 (1995) 409-417.

230. Colwill,K., Feng,L.L., Yeakley,J.M., Gish,G.D., Caceres,J.F., Pawson,T., and Fu,X.D., SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 24569-24575.
231. Gui,J.F., Tronchere,H., Chandler,S.D., and Fu,X.D., Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91 (1994) 10824-10828.
232. Nikolakaki,E., Kohen,R., Hartmann,A.M., Stamm,S., Georgatsou,E., and Giannakouros,T., Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 40175-40182.
233. Wang,H.Y., Lin,W., Dyck,J.A., Yeakley,J.M., Songyang,Z., Cantley,L.C., and Fu,X.D., SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells, *J. Cell Biol.*, 140 (1998) 737-750.
234. Colwill,K., Pawson,T., Andrews,B., Prasad,J., Manley,J.L., Bell,J.C., and Duncan,P.I., The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution, *EMBO J.*, 15 (1996) 265-275.
235. Wang,H.Y., Arden,K.C., Bermingham,J.R., Jr., Viars,C.S., Lin,W., Boyer,A.D., and Fu,X.D., Localization of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in mouse and human chromosomes, *Genomics*, 57 (1999) 310-315.
236. Gui,J.F., Lane,W.S., and Fu,X.D., A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle, *Nature*, 369 (1994) 678-682.
237. Kuroyanagi,N., Onogi,H., Wakabayashi,T., and Hagiwara,M., Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242 (1998) 357-364.
238. Ben David,Y., Letwin,K., Tannock,L., Bernstein,A., and Pawson,T., A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators, *EMBO J.*, 10 (1991) 317-325.
239. Howell,B.W., Afar,D.E., Lew,J., Douville,E.M., Icely,P.L., Gray,D.A., and Bell,J.C., STY, a tyrosine-phosphorylating enzyme with sequence homology to serine/threonine kinases, *Mol. Cell Biol.*, 11 (1991) 568-572.
240. Hanes,J., von der,K.H., Klaudiny,J., and Scheit,K.H., Characterization by cDNA cloning of two new human protein kinases. Evidence by sequence comparison of a new family of mammalian protein kinases, *J. Mol. Biol.*, 244 (1994) 665-672.
241. Nayler,O., Schnorrer,F., Stamm,S., and Ullrich,A., The cellular localization of the murine serine/arginine-rich protein kinase CLK2 is regulated by serine 141 autophosphorylation, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 34341-34348.
242. Yun,B., Farkas,R., Lee,K., and Rabinow,L., The Doa locus encodes a member of a new protein kinase family and is essential for eye and embryonic development in *Drosophila melanogaster*, *Genes Dev.*, 8 (1994) 1160-1173.
243. Duncan,P.I., Stojdl,D.F., Marius,R.M., Scheit,K.H., and Bell,J.C., The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing, *Exp. Cell Res.*, 241 (1998) 300-308.
244. Prasad,J., Colwill,K., Pawson,T., and Manley,J.L., The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing, *Mol. Cell Biol.*, 19 (1999) 6991-7000.

245. Lai, M.C., Lin, R.I., and Tarn, W.Y., Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55, *Biochem. J.*, Pt (2003).
246. Mcateer and Davis, Basic cell culture technique and maintenance of cell lines, *Basic cell culture*, 19 (1997) 963433-963435.
247. Studier, F.W. and Moffatt, B.A., Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.*, 189 (1986) 113-130.
248. Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M., A high efficiency plasmid transforming *recA* Escherichia coli strain with beta-galactosidase, *Biotechniques*, 5 (1987) 376.
249. Stoss, O., Olbrich, M., Hartmann, A.M., Konig, H., Memmott, J., Andreadis, A., and Stamm, S., The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 8665-8673.
250. Nayler, O., Stratling, W., Bourquin, J.P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A.M., Fackelmayer, F.O., Ullrich, A., and Stamm, S., SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements, *Nucleic Acids Res.*, 26 (1998) 3542-3549.
251. Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., Chalepakis, G., Kruff, V., Chevaillier, P., and Giannakouros, T., SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1, *Nucleic Acids Res.*, 27 (1999) 2972-2980.
252. Hartmann, A.M., Nayler, O., Schwaiger, F.W., Obermeier, A., and Stamm, S., The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59(fyn), *Mol. Biol. Cell*, 10 (1999) 3909-3926.
253. Hasegawa, M., Smith, M.J., Iijima, M., Tabira, T., and Goedert, M., FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10, *FEBS Lett.*, 443 (1999) 93-96.
254. Hasegawa, M., Smith, M.J., Iijima, M., Tabira, T., and Goedert, M., FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10, *FEBS Lett.*, 443 (1999) 93-96.
255. Hasegawa, M., Smith, M.J., Iijima, M., Tabira, T., and Goedert, M., FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10, *FEBS Lett.*, 443 (1999) 93-96.
256. Hasegawa, M., Smith, M.J., Iijima, M., Tabira, T., and Goedert, M., FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10, *FEBS Lett.*, 443 (1999) 93-96.
257. Chen, C. and Okayama, H., High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA, *Mol. Cell Biol.*, 7 (1987) 2745-2752.
258. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84 (1987) 7413-7417.
259. Birnboim, H.C. and Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, 7 (1979) 1513-1523.
260. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning*. In: 1989.
261. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
262. Krebs, E.G., The phosphorylation of proteins: a major mechanism for biological regulation. Fourteenth Sir Frederick Gowland Hopkins memorial lecture, *Biochem. Soc. Trans.*, 13 (1985) 813-820.

263. Lee, K., Du, C., Horn, M., and Rabinow, L., Activity and autophosphorylation of LAMMER protein kinases, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 27299-27303.
264. Duncan, P.I., Stojdl, D.F., Marius, R.M., and Bell, J.C., In vivo regulation of alternative pre-mRNA splicing by the Clk1 protein kinase, *Mol. Cell Biol.*, 17 (1997) 5996-6001.
265. Ashiya, M. and Grabowski, P.J., A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart, *RNA*, 3 (1997) 996-1015.
266. Stamm, S., Casper, D., Hanson, V., and Helfman, D.M., Regulation of the neuron-specific exon of clathrin light chain B, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 64 (1999) 108-118.
267. Kosaki, A. and Webster, N.J., Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells, *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 21990-21996.
268. Sarkissian, M., Winne, A., and Lafyatis, R., The mammalian homolog of suppressor-of-white-apricot regulates alternative mRNA splicing of CD45 exon 4 and fibronectin III CS, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 31106-31114.
269. Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., and Giannakouros, T., SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255 (1999) 602-607.
270. Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de La, M.S., Dikkes, P., and Tsai, L.H., Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration, *Nature*, 402 (1999) 615-622.
271. Nath, R., Davis, M., Probert, A.W., Kupina, N.C., Ren, X., Schielke, G.P., and Wang, K.K., Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274 (2000) 16-21.
272. Bibb, J.A., Snyder, G.L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A.A., Tsai, L.H., Kwon, Y.T., Girault, J.A., Czernik, A.J., Haganir, R.L., Hemmings, H.C., Jr., Nairn, A.C., and Greengard, P., Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons, *Nature*, 402 (1999) 669-671.
273. Nakamura, S., Kawamoto, Y., Nakano, S., Akiguchi, I., and Kimura, J., p35nck5a and cyclin-dependent kinase 5 colocalize in Lewy bodies of brains with Parkinson's disease, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 94 (1997) 153-157.
274. Mandelkow, E., Alzheimer's disease. The tangled tale of tau, *Nature*, 402 (1999) 588-589.
275. Blacker, D., Bertram, L., Saunders, A.J., Moscarillo, T.J., Albert, M.S., Wiener, H., Perry, R.T., Collins, J.S., Harrell, L.E., Go, R.C., Mahoney, A., Beaty, T., Fallin, M.D., Avramopoulos, D., Chase, G.A., Folstein, M.F., McInnis, M.G., Bassett, S.S., Doheny, K.J., Pugh, E.W., and Tanzi, R.E., Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's Disease families, *Hum. Mol. Genet.*, 12 (2003) 23-32.
276. Kuo, H.C., Nasim, F.H., and Grabowski, P.J., Control of alternative splicing by the differential binding of U1 small nuclear ribonucleoprotein particle, *Science*, 251 (1991) 1045-1050.
277. Afshar, M., Prescott, C.D., and Varani, G., Structure-based and combinatorial search for new RNA-binding drugs, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10 (1999) 59-63.
278. Fourmy, D., Recht, M.I., Blanchard, S.C., and Puglisi, J.D., Structure of the A site of Escherichia coli 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic, *Science*, 274 (1996) 1367-1371.

279. Jiang,L., Suri,A.K., Fiala,R., and Patel,D.J., Saccharide-RNA recognition in an aminoglycoside antibiotic-RNA aptamer complex, *Chem. Biol.*, 4 (1997) 35-50.
280. Jiang,L. and Patel,D.J., Solution structure of the tobramycin-RNA aptamer complex, *Nat. Struct. Biol.*, 5 (1998) 769-774.
281. Jiang,L., Majumdar,A., Hu,W., Jaishree,T.J., Xu,W., and Patel,D.J., Saccharide-RNA recognition in a complex formed between neomycin B and an RNA aptamer, *Structure. Fold. Des.*, 7 (1999) 817-827.
282. Varani,L., Spillantini,M.G., Goedert,M., and Varani,G., Structural basis for recognition of the RNA major groove in the tau exon 10 splicing regulatory element by aminoglycoside antibiotics, *Nucleic Acids Res.*, 28 (2000) 710-719.
283. Spillantini,M.G. and Goedert,M., Tau protein pathology in neurodegenerative diseases, *Trends Neurosci.*, 21 (1998) 428-433.
284. Guo,W. and Helfman,D.M., cis-elements involved in alternative splicing in the rat beta-tropomyosin gene: the 3'-splice site of the skeletal muscle exon 7 is the major site of blockage in nonmuscle cells, *Nucleic Acids Res.*, 21 (1993) 4762-4768.
285. Wei,M.L. and Andreadis,A., Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau, *J. Neurochem.*, 70 (1998) 1346-1356.
286. Muro,A.F., Caputi,M., Pariyarath,R., Pagani,F., Buratti,E., and Baralle,F.E., Regulation of fibronectin EDA exon alternative splicing: possible role of RNA secondary structure for enhancer display, *Mol. Cell Biol.*, 19 (1999) 2657-2671.
287. Gallego,M.E. and Nadal-Ginard,B., Myosin light-chain 1/3 gene alternative splicing: cis regulation is based upon a hierarchical compatibility between splice sites, *Mol. Cell Biol.*, 10 (1990) 2133-2144.
288. Misteli,T., Caceres,J.F., Clement,J.Q., Krainer,A.R., Wilkinson,M.F., and Spector,D.L., Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo, *J. Cell Biol.*, 143 (1998) 297-307.
289. Misteli,T., Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function, *J. Cell Sci.*, 113 (Pt 11) (2000) 1841-1849.
290. Hofmann,Y. and Wirth,B., hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1, *Hum. Mol. Genet.*, 11 (2002) 2037-2049.
291. Jumaa,H., Guenet,J.L., and Nielsen,P.J., Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle, *Mol. Cell Biol.*, 17 (1997) 3116-3124.
292. Jumaa,H. and Nielsen,P.J., The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation, *EMBO J.*, 16 (1997) 5077-5085.
293. Katsu,R., Onogi,H., Wada,K., Kawaguchi,Y., and Hagiwara,M., Novel SR-rich-related protein clasp specifically interacts with inactivated Clk4 and induces the exon EB inclusion of Clk, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 44220-44228.
294. Chambers,C.B., Lee,J.M., Troncoso,J.C., Reich,S., and Muma,N.A., Overexpression of four-repeat tau mRNA isoforms in progressive supranuclear palsy but not in Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.*, 46 (1999) 325-332.
295. Mandelkow,E.M. and Mandelkow,E., Tau in Alzheimer's disease, *Trends Cell Biol.*, 8 (1998) 425-427.

296. Daoud,R., Stoilov,P., Stoss,O., Hübener,M., Berzaghi M.d.P., Hartmann,A.M., Olbrich,M., and Stamm,S., Control of pre-mRNA processing by extracellular signals: From molecular mechanisms to clinical applications, *Gene Ther. Mol. Biol.*, 5 (2000) 141-150.
297. Friedman,K.J., Kole,J., Cohn,J.A., Knowles,M.R., Silverman,L.M., and Kole,R., Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 36193-36199.
298. Karras,J.G., McKay,R.A., Dean,N.M., and Monia,B.P., Deletion of individual exons and induction of soluble murine interleukin-5 receptor-alpha chain expression through antisense oligonucleotide-mediated redirection of pre-mRNA splicing, *Mol Pharmacol.*, 58 (2000) 380-387.
299. Schmajuk,G., Sierakowska,H., and Kole,R., Antisense oligonucleotides with different backbones. Modification of splicing pathways and efficacy of uptake, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 21783-21789.
300. Wilton,S.D., Lloyd,F., Carville,K., Fletcher,S., Honeyman,K., Agrawal,S., and Kole,R., Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides, *Neuromuscul. Disord.*, 9 (1999) 330-338.
301. Sierakowska,H., Gorman,L., Kang,S.H., and Kole,R., Antisense oligonucleotides and RNAs as modulators of pre-mRNA splicing, *Methods Enzymol.*, 313 (2000) 506-521.
302. Faustino,N.A. and Cooper,T.A., Pre-mRNA splicing and human disease, *Genes Dev.*, 17 (2003) 419-437.
303. Chakarova,C.F., Hims,M.M., Bolz,H., Abu-Safieh,L., Patel,R.J., Papaioannou,M.G., Inglehearn,C.F., Keen,T.J., Willis,C., Moore,A.T., Rosenberg,T., Webster,A.R., Bird,A.C., Gal,A., Hunt,D., Vithana,E.N., and Bhattacharya,S.S., Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa, *Hum. Mol. Genet.*, 11 (2002) 87-92.
304. Wirth,B., An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA), *Hum. Mutat.*, 15 (2000) 228-237.
305. Terns,M.P. and Terns,R.M., Macromolecular complexes: SMN--the master assembler, *Curr. Biol.*, 11 (2001) R862-R864.
306. Cartegni,L. and Krainer,A.R., Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators, *Nat. Struct. Biol.*, 10 (2003) 120-125.
307. Nissim-Rafinia,M. and Kerem,B., Splicing regulation as a potential genetic modifier, *Trends Genet.*, 18 (2002) 123-127.
308. Kalbfuss,B., Mabon,S.A., and Misteli,T., Correction of alternative splicing of tau in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 42986-42993.
309. Mercatante,D.R. and Kole,R., Control of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy: effects on gene expression, *Biochim. Biophys. Acta*, 1587 (2002) 126-132.
310. Pilch,B., Allemand,E., Facompre,M., Bailly,C., Riou,J.F., Soret,J., and Tazi,J., Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506, *Cancer Res.*, 61 (2001) 6876-6884.

311. Varani,L., Spillantini,M.G., Goedert,M., and Varani,G., Structural basis for recognition of the RNA major groove in the tau exon 10 splicing regulatory element by aminoglycoside antibiotics, *Nucleic Acids Res.*, 28 (2000) 710-719.
312. Andreassi,C., Jarecki,J., Zhou,J., Coover,D.D., Monani,U.R., Chen,X., Whitney,M., Pollok,B., Zhang,M., Androphy,E., and Burghes,A.H., Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients, *Hum. Mol. Genet.*, 10 (2001) 2841-2849.
313. Liu,X., Jiang,Q., Mansfield,S.G., Puttaraju,M., Zhang,Y., Zhou,W., Cohn,J.A., Garcia-Blanco,M.A., Mitchell,L.G., and Engelhardt,J.F., Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing, *Nat. Biotechnol.*, 20 (2002) 47-52.

8 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

1. Hartmann, A.M., D.Rujescu, T.Giannakouros, E.Nikolakaki, M.Goedert, E.M.Mandelkow, Q.S.Gao, A.Andreadis, and S.Stamm. 2001. Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors. *Mol. Cell Neurosci.* 18:80-90.
2. Nikolakaki, E., R.Kohen, A.M.Hartmann, S.Stamm, E.Georgatsou, and T.Giannakouros. 2001. Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B. *J. Biol. Chem.* 276:40175-40182.
3. Rujescu, D., Hartmann, A.M. and Stamm, S. (2001) Wie der Mensch aus 35.000 Genen 250.000 Proteine macht; *Bioforum* 11/2001
4. Daoud, R., Stoilov, P., Stoss, O., Hübener, M., da Penha Berzaghi, M., Hartmann, A.M., Olbrich, O. and Stamm, S. (2000) Control of pre-mRNA processing by extracellular signals: emerging molecular mechanisms; *Gene Ther. Mol. Biol.* 5: 121-130
5. Nayler, O., Hartmann, A.M., Stamm, S. (2000) The ER-repeat protein YT521-B defines a novel subnuclear compartment; *J. Cell Biol.* 150: 949-961
6. Stoss, O., Stoilov, P., Daoud, R., Hartmann, A.M., Olbrich, M. and Stamm, S. (2000) Misregulation of pre-mRNA splicing that causes human diseases; *Gene Ther. Mol. Biol.* 5: 9-30
7. Stoss, O., Stoilov, P., Hartmann, A.M., Nayler, O. and Stamm, S. (1999) The *in vivo* minigene approach to analyze tissue-specific splicing; *Brain Res. Prot.* 4: 383-394
8. Patentschrift: "Reversal of tau missplicing which leads to dementia", filed as european patent; 99122141.7-2107

Weitere Publikationen:

1. Rujescu D, Hartmann A, Vopel S, Giegling I, Grunze H Mild sleep deprivation alters the expression of adenosine kinase but not of cytosolic 5'-nucleotidas in the rat brain (submitted)
2. Rujescu D., Preuß U., Dahmen N., Soyka M., Hartmann AM., Giegling I., Koller G., Bondy B., Möller HJ. and Szegedi A. The GRIN1 locus may modify the susceptibility to seizures during alcohol withdrawal (submitted)
3. Rujescu D, Meisenzahl EM, Giegling I, Hartmann AM, Möller HJ, A functional SNP (V158M) in the COMT gene is associated with variations in white matter and cerebrospinal fluid volume (submitted)
4. Rujescu D, Hartmann AM, Gonnermann C, Möller H-J, Giegling I (2003) A M129V variation in the prion protein which influences white matter volume also influences cognitive performance. *Molecular Psychiatry*, in press
5. Stoss, O., Olbrich, M., Hartmann, A.M., König, H., Andreadis, A. and Stamm, S. (2001) The STAR/GCG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites; *J. Biol. Chem.* 276 (12): 8665-8673
6. Poleev, A., Hartmann, A. and Stamm, S. (2000) A trans-acting factor, isolated by the three hybrid system, that influences alternative splicing of the amyloid precursor protein minigene; *Eur. J. Biochem.* 267: 4002-4010

7. Hartmann, A.M., Nayler, O., Schwaiger, F.W., Obermeier, A. and Stamm, S. (1999) The interaction and colocalisation of Sam68 with the splicing associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59^{fyn}; *Mol. Biol. Cell.* 10: 3909-3926
8. Nayler, O., Strätling, W., Bourquin, J.-P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A.M., Fackelmeyer, F.O., Ullrich, A., and Stamm, S. (1998) SAF-B couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements; *Nucleic Acids Res.*, 26: 3542-3549.
9. Hartmann, A.M. and Stamm, S. (1997) Molecular cloning of a novel alternatively spliced nuclear protein; *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1353: 224-230
10. Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S. and Paulsen, H. (1996) The C-terminal domain of light harvesting chlorophyll-a/b-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex; *Eur. J. Biochem.* 242(2): 288-292

Entwickelte Produkte, Patente:

1. "Reversal of tau missplicing which leads to dementia", filed as european patent; 99122141.7-2107
2. "The localization of YT521-B and other the ER-repeat proteins in nuclear dots is a diagnostic marker for cancer and neuronal diseases", filed as european patent

Poster und Meeting Abstracts:

1. Winterseminar "Biologische Psychiatrie" (Oberlech 2003)
A.M. Hartmann. Alternatives Spleißen von Tau Exon 10, Clk2 und Htra2- β in neurodegenerativen Erkrankungen
2. Glatz D, Berendt F, Hartmann A, Faltraco F, Hampel H, Riederer P, Rujescu D (2002). Altered expression of tau exon 10, clk2 and htra2-beta in post mortem brain of patients with Alzheimer's disease. Research Festival, University of Munich/Germany
3. Vopel S, Grunze H, Hartmann A, Giegling I, Rujescu D (2002) Mild sleep deprivation alters the expression of adenosine kinase but not of cytosolic 5'-nucleotidase in the rat brain. Research Festival, University of Munich/Germany
4. Hartmann A, Rujescu D, Stamm S (2002) Regulation of Alternative Splicing of Human Tau Exon 10 by Phosphorylation of Splicing Factors – Implication for Neurodegenerative Diseases. Research Festival, University of Munich/Germany
5. Hartmann AM, Rujescu D, Andreadis A, Stamm S (2002) Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors. 10th World Congress of Psychiatric Genetics, Brussels/Belgium, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 114 (7), 831: P212.
6. Winterseminar "Biologische Psychiatrie" (Oberlech– 23. 03. 2002)
A.M. Hartmann: Phosphorylierung von Spleißfaktoren reguliert alternatives Spleißen von Tau Exon 10: Implikationen für neurodegenerative Erkrankungen
7. Glatz D, Hartmann AM, Rujescu D (2001) Altered expression of tau exon 10 in post mortem brain of patients with Alzheimer's disease. Research Festival, University of Munich/Germany
8. Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V., München, Herbsttagung, 10.10.-13.10.2000
9. Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, 2000, In House Symposium
10. University of Wisconsin, Memorial Union, Madison, WI, 5th annual meeting of the RNA society, 30.05-04.06.2000:

11. A.M. Hartmann, O. Nayler and S. Stamm: YT521-B can regulate alternative splice site usage depending on the cellular tyrosine phosphorylation status
12. Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, 06.07.1999, In House Symposium
13. A.M. Hartmann, O. Nayler, O. Stoss and S. Stamm: The ER-rich region of the cell specific splicing factor YT521-B is involved in its intracellular localization and binding to other proteins
14. Poleev, A.M. Hartmann and S. Stamm: A trans-acting factor isolated by three-hybrid system approach influencing an alternative splicing of the amyloid precursor protein gene
15. S. Stamm, R. Daoud, A.M. Hartmann, O. Stoss and O. Nayler: New splice factors in neurons. an emerging link between cellular signals and the transcriptosome
16. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 25-29.08.1999 Eukaryotic mRNA processing
17. S. Stamm, O. Nayler and A.M. Hartmann: The interaction and colocalisation of p62/SAM68 with the splicing associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the src family kinases
18. University of Edinburgh, Scotland, 23.07-27.07.1999, 4th annual meeting of the RNA society
19. A.M. Hartmann, O. Nayler and S. Stamm: The glutamic acid/arginin rich domain of the cell specific splicing factor YT521-B is involved in its intracellular localization and binding to other proteins
20. S. Stamm, R. Daoud, A.M. Hartmann, O. Stoss, O. Nayler: Regulation of neuron-specific splicing by neuronal activity and transformer-2 variants
21. Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, 09.07.1998, In House Symposium
22. A.M. Hartmann, O. Stoss, S. Stamm: Yeast two hybrid screens in order to identify proteins involved in the regulation of neuron specific splicing
23. Banff Centre, Banff, Alberta, 27.05.-01.06.1997, 2nd annual meeting of the RNA society
24. S. Stamm, S. Suchanek, A.M. Hartmann and F. Fackelmayer,: Molecular cloning of SAF-B reveals interaction between splicing factors and chromatin

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in der Abteilung Neurobiochemie, sowie in der Psychiatrischen Klinik des Klinikums der Universität München durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Stefan Stamm und Dr. Dan Rujescu für die Überlassung des Themas, die optimale Betreuung und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ich möchte mich ebenfalls bei Prof. Möller dafür bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, diese Arbeit zu betreuen.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter in den beiden Laboren, die mit ihrer guten Laune und tatkräftigen Unterstützung für Spaß an der Arbeit sorgten:

Manuela Ludwig, Rosette Daoud, Oliver Stoss, Peter Stoilov, Daniela Glatz, Claudia Gonnermann, Frank Behrendt, Sven Vopel und Anton Gietl.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Oliver Nayler und der Arbeitsgruppe von Thomas Giannakourous bedanken, durch deren Mitwirkung Teile dieser Arbeit veröffentlicht werden konnten.

Für die Überlassung der Tau-Minigene möchte ich mich bei Athena Andreadis und Michel Goedert bedanken, für die Clk-Expressionsplasmide bei Oliver Nayler, sowie für die Überlassung der Expressionklone p35 und p25 bei Prof. E. Mandelkow.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Annette Magarete Hartmann
Geburtsdatum: 22.05.1965
Geburtsort: Koblenz

Schulbildung

1971-1975 Grundschule in Gau- Algesheim
1975- 1984 Münster Gymnasium in Ingelheim
mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Studium

1986-1989 Biologiestudium an der
Johannes Gutenberg Universität, Mainz
1989-1996 Biologiestudium an der
Ludwig Maximilian Universität, München
1996 Diplomhauptprüfung Biologie an der
Ludwig Maximilian Universität, München
Fächer: Physiologische Botanik
Systematische Botanik
Biologische Psychologie
Anthropologie und Humangenetik
Anschließend Diplomarbeit am Lehrstuhl für
Physiologische Botanik der
Ludwig Maximilian Universität, München
bei PD Dr. Harald Paulsen
Thema: Trimerisierung von Lichtsammlerkomplexen *in vitro*; Mutagenese und Lipidabhängigkeit

Berufstätigkeit

1996- 2001 Technische Angestellte am Max- Planck- Institut für
Neurobiologie, Arbeitsgruppe Dr. Stefan Stamm

Promotion

2000-2003 am Max- Planck- Institut für Neurobiologie,
Arbeitsgruppe Dr. Stefan Stamm
sowie
an der Ludwig Maximilian Universität, München,
Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie,
Dr. Dan Rujescu
Thema: Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon
10 durch Phosphorylierung von Spleißfaktoren