

Institut für Biochemie und Molekularbiologie I:
Zelluläre Signaltransduktion
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Georg W. Mayr

Intrazelluläre Zielsteuerung der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Yuan-Na Lin

Hamburg 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. Georg W. Mayr angefertigt.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
an der Universität Hamburg am: 21.01.2011

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G.W. Mayr
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. M. Jücker
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. T. Bräulke

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Prinzipien der zellulären Signaltransduktion	1
1.1.1 Phosphatidylinositole und Inositolphosphate in der zellulären Signaltransduktion.....	1
1.2 Inositolphosphat-Kinasen (IPKs) als zentrale Enzyme des Inositolphosphat- Stoffwechsels	4
1.2.1 Die Familie der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinasen.....	6
1.2.2 Die Rolle der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase für das Immunsystem.....	8
1.3 Intrazelluläre Zielsteuerungsmechanismen	14
1.3.1 Die Zielsteuerung an das Aktinfilament.....	15
1.3.2 Zielsteuerungsmechanismen für den Transport von Makromolekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma.....	17
1.3.2.1 Nukleärer Import	17
1.3.2.2 Nukleozytoplasmatisches Shuttling.....	20
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	21
2. MATERIAL & METHODEN	22
2.1 Material	22
2.1.1 Bakterienstämme.....	22
2.1.2 Zelllinien	22
2.1.2.1 NCI-H1299-Zellen (<i>Homo sapiens</i>).....	22
2.1.2.2 HeLa-Zellen (<i>Homo sapiens</i>).....	22
2.1.3 Enzyme	22
2.1.4 Chemikalien.....	23
2.1.5 DNA-Molekulargewichtsstandard	23
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	23
2.1.7 Medien	25
2.1.8 Kits.....	25
2.1.9 Plasmide	25
2.1.10 Vektor zur eukaryotischen Expression von EGFP- Fusionsproteinen der HsIP3K-B	26
2.1.11 Medien für die eukaryotische Zellkultur	26
2.1.12 Antibiotika.....	26
2.1.13 Oligonukleotide.....	26
2.1.13.1 NLS-Mutanten der HsIP3K-B.....	26
2.1.13.2 FEA-Motiv-Mutanten der HsIP3K-B.....	27
2.1.13.3 Pseudo-Phosphorylierungsmutanten der HsIP3K-B	28
2.1.13.4 Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten der HsIP3K-B.....	29
2.1.14 Sequenzieroligonukleotide für pHsIP3K-B/EGFP	29
2.1.15 Geräte.....	30
2.1.16 Verbrauchsmaterialien	31

2.1.17 Software	31
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	32
2.2.1.1 Anzucht und Lagerung von <i>E.coli</i> Kulturen.....	32
2.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Zellen	32
2.2.1.3 Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> nach [Hanahan,1983].....	33
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	34
2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA („Maxi-Präparation“).....	34
2.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA („Mini-Präparation“).....	35
2.2.2.3 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA.....	36
2.2.2.4 Cycle Sequencing	36
2.2.2.5 <i>QuikChange</i> TM Mutagenese.....	38
2.2.2.6 Präparativer Dpn I-Restriktionsverdau.....	40
2.2.2.7 Analytische Auftrennung von DNA durch die Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion.....	41
2.2.2.9 Oligo-Ligation	42
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	43
2.2.3.1 Zellbiologische Arbeitstechniken	43
2.2.3.2 Kontinuierliche Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien.....	43
2.2.3.3 <i>In vivo</i> Lokalisation der Mutanten des EGFP- Fusionsproteins der HsIP3K-B.....	43
2.2.3.4 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	44
2.2.3.5 Leptomycin B-Behandlung von eukaryotischen Zellen.....	45
2.2.3.6 Fixierung der eukaryotischen Zellen	45
2.2.3.7 Färbung der Zellkerne	45
2.2.3.8 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	46
2.2.3.9 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung.....	46
2.2.3.10 Bestimmung der Kern/Zytoplasma-Ratio	47
2.2.3.11 Bestimmung von F-Aktin durch Bildung einer Aktin/Zytoplasma-Ratio.....	48
2.2.3.12 Bestimmung von F-Aktin durch Bildung einer Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio.....	50
2.2.3.13 Auswertung mit <i>ImageJ</i>	51
3. ERGEBNISSE	53
3.1 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der kortikalen F-Aktin-Lokalisation des EGFP-Fusionsproteins der HsIP3K-B und ihrer Mutanten in H1299- und HeLa-Zellen	54
3.1.1 Intrazelluläre Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen der HsIP3K-A in H1299-Zellen.....	55

3.2 Experimentelle Identifizierung, Charakterisierung und Klassifizierung eines funktionellen NLS in der HsIP3K-B	58
3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) der HsIP3K-B in H1299- und HeLa-Zellen.....	59
3.2.1.1 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen.....	59
3.2.1.2 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen.....	61
3.2.1.3 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen.....	65
3.2.1.4 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen.....	67
3.2.1.5 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) der HsIP3K-B ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen.....	69
3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ QQLR) (NLS-Tripelmutante) der HsIP3K-B in H1299- und HeLa-Zellen.....	74
3.2.2.1 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ QQLR) in H1299- und HeLa-Zellen.....	77
3.2.2.2 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ QQLR) (NLS-Tripelmutante) der HsIP3K-B ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen.....	79
3.2.3 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ QQLR) (NLS-Tripelmutante) und der NLS-Einzelmutanten (Glutamin-Screening) der HsIP3K-B in H1299- und HeLa-Zellen.....	85
3.2.4 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und ABD(HsIP3K-B)/EGFP der HsIP3K-B in H1299 und HeLa-Zellen.....	89
3.2.4.1 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen.....	90
3.2.4.2 Intrazelluläre Lokalisation von EGFP in H1299-Zellen.....	92
3.2.4.3 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine ABD(HsIP3K-B)/EGFP, EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen.....	94
3.2.4.4 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP der HsIP3K-B ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zelle.....	96
3.2.5 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins NLS(HsIP3K-B)/EGFP der HsIP3K-B und EGFP in H1299- und HeLa-Zellen.....	101

3.2.5.1 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen.....	102
3.2.5.2 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine NLS(HsIP3K-B)/EGFP und EGFP in H1299- und HeLa-Zellen	104
3.2.6 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP/HsIPMK (Wildtyp), EGFP/NLS (HsIPMK) und EGFP/3xNLS (SV40) in H1299-Zellen.....	105
3.2.6.1 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP/HsIPMK (Wildtyp), EGFP/NLS (HsIPMK) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen	105
3.2.6.2 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP/3xNLS (SV40) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen.....	109
3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Lokalisationsstudien über das Kernlokalisierungssignal (NLS) der HsIP3K-B.....	112
3.3 Aktinbindungsstudien des EGFP-Fusionsproteins der HsIP3K-B und seiner Mutanten in H1299- und HeLa-Zellen.....	115
3.3.1 Die Lokalisation am kortikalen F-Aktin der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ QQLR) (NLS-Tripelmutante) in H1299-Zellen	116
3.3.2 Die Lokalisation am kortikalen F-Aktin der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP(Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ QQLR) (NLS-Tripelmutante) in HeLa-Zellen.....	118
3.3.3 Die Lokalisation am kortikalen F-Aktin der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (P ¹⁵⁴ QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q ¹⁵⁰ AA) (FEA 2) in H1299-Zellen.....	121
3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Lokalisationsstudien am kortikalen F-Aktin in H1299- und HeLa-Zellen.....	124
3.4 Untersuchung der intrazellulären Zielsteuerung der HsIP3K-B mithilfe des Modells „Pseudo-Phosphorylierung“ und „Pseudo-Dephosphorylierung.....	126
3.4.1 <i>In silico</i> Prädiktion putativer Phosphorylierungsstellen.....	127
3.4.2 Intrazelluläre Lokalisation der Pseudo-Phosphorylierungsmutanten S166E, S174E, S176E und des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen	128
3.4.3 Intrazelluläre Lokalisation der Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten S166A, S174A, S176A und des Fusionsproteins pEGFP/HsIP3K-B (Wildtyp) in H1299-Zellen.....	131
3.4.4 Intrazelluläre Lokalisation der Pseudo-Phosphorylierungsmutante S166E und des Fusionsproteins pEGFP/HsIP3K-B (Wildtyp) in HeLa-Zellen.....	133
3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Lokalisationsstudien der Pseudo-Phosphorylierungs- und Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten in H1299- und HeLa-Zellen.....	136

3.5 Intrazelluläre Lokalisation der endogenen HsIP3K-B in Ratten-Thymozyten	137
3.5.1 Lokalisationsstudien der endogenen Form der HsIP3K-B nach Leptomycin B-Behandlung in Ratten-Thymozyten.....	137
4. DISKUSSION	142
4.1 Bestimmung der Kernlokalisierung und der kortikalen F-Aktinbindung von EGFP-Fusionsproteinen.....	142
4.2 Identifizierung und Charakterisierung eines funktionellen Kernlokalisierungssignals (NLS) der HsIP3K-B	149
4.3 F-Aktinbindung von EGFP-Fusionsproteinen der HsIP3K-B	155
4.4 Modell der „Pseudo-Phosphorylierung“ und „Pseudo-Dephosphorylierung“	159
4.5 Mögliche physiologische Bedeutung von intrazellulären Zielsteuerungs- mechanismen der HsIP3K-B	163
5. ZUSAMMENFASSUNG	170
6. LITERATURVERZEICHNIS	172
7. ANHANG.....	183
7.1 Abkürzungsverzeichnis	183
7.2 Tabellenübersicht der Aminosäuren und ihrer Eigenschaften	187
7.3 Wissenschaftliche Veröffentlichungen	188
8. DANKSAGUNG	189
9. LEBENS LAUF	190
10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	191

1. Einleitung

1.1 Prinzipien der zellulären Signaltransduktion

Um zu gewährleisten, dass die Koordination der zellulären Aktivitäten in vielzellig organisierten höheren Organismen auch bei unterschiedlichen Umweltbedingungen erhalten bleibt, werden Signalübertragungssysteme benötigt.

Das Prinzip ist einfach: Ein Signal (first messenger) bindet an einem spezifischen Transmembran-Rezeptorprotein der Zellmembran. Es kommt zu einer sterischen Umorientierung des intrazellulären Anteils des Rezeptors, wodurch direkt oder über einen Transducer (z.B. heterotrimere G-Proteine) ein primärer Effektor (z.B. Adenylat-Cyclase, Phospholipase C) aktiviert wird. Dieser Effektor bewirkt in der Zelle die Freisetzung eines sekundären Botenstoffs (second messenger), der für die weitere Umsetzung des extrazellulären Signals sorgt (siehe Abbildung 1.1).

Die meisten Signalmoleküle sind von chemischer Natur [Knippers, 2001; Michal, 1999]. Der Hauptteil der Signalmoleküle ist hydrophil (z.B. Neurotransmitter, Hormone, Wachstumsfaktoren) und initiiert den oben geschilderten Verlauf der Signalübertragung. Einige sind hydrophob (z.B. Steroide, Thyroide, Retinsäure) und können somit durch die Zellmembran ins Zytosol diffundieren. Dort binden sie an spezifische Proteinrezeptoren, die die Transkription der DNA, und somit die Genexpression beeinflussen.

Die gesamte Kaskade, vom extrazellulären Stimulus zur intrazellulären Antwort, wird als Signaltransduktion bezeichnet. Neben vielen verschiedenen Signalvermittlungswegen (z.B. parakrine, autokrine und neuronale Signalübertragung), spielt die endokrine Signalübertragung (z.B. Hormone durch den Blutkreislauf) eine entscheidende Rolle im Organismus [Löffler & Petrides, 7. Auflage, Kapitel 27].

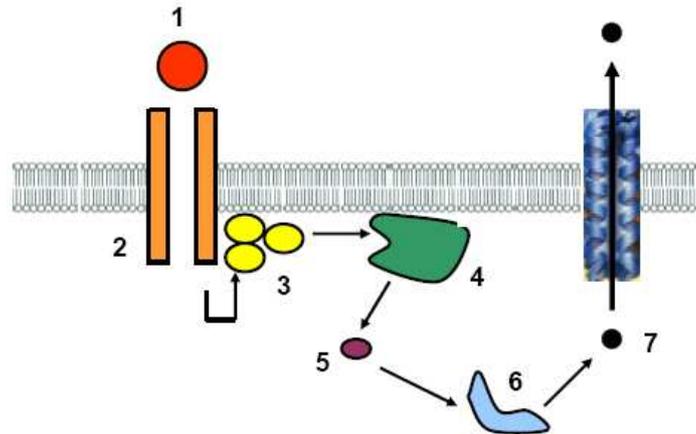


Abbildung 1.1: Signaltransduktion durch chemische Botenstoffe

Die Bindung des extrazellulären Signals (1) aktiviert den Transmembran-Rezeptor (2). Die Aktivierung bewirkt eine Weiterleitung des Signals über einen Transducer (3) oder direkt an die nachgeschalteten primären Effektorproteine (4). Diese leiten das Signal durch die Aktivierung und Freisetzung des sekundären Botenstoffes (second messenger) (5) weiter. Die sekundären Botenstoffe aktivieren wiederum ein sekundäres Effektorprotein (6), welches das extrazellulär vermittelte Signal in eine zelluläre Antwort umsetzt (7).

1.1.1 Phosphatidylinositole und Inositolphosphate in der zellulären Signaltransduktion

Einen der grundlegenden Mechanismen der Signalübertragung stellt die Inositol-1,4,5-trisphosphat-Signaltransduktionskaskade (InsP₃-Kaskade) dar. Das InsP₃ wurde erstmals im Jahr 1984 als ein neuer sekundärer Botenstoff (second messenger) in der Signaltransduktion beschrieben wurde [Berridge & Irvine 1984]. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Wirkungen dieses Botenstoffes auf Prozesse der Transkription, Translation und der Zellmigration beschrieben worden. Dabei ist die am intensivsten untersuchte Funktion von InsP₃ die intrazelluläre Regulation der Kalziumhomöostase.

Es gibt zwei verschiedene Signalkaskaden, über die InsP₃ auf extrazelluläre Stimuli hin entstehen kann (siehe Abbildung 1.2). Der erste Weg führt über die Aktivierung von heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Transmembran-Rezeptoren durch Neurotransmitter wie Glutamat und Acetylcholin, Geruchsstoffe, Hormone oder Licht. Diese Rezeptorproteine besitzen sieben Membran-durchspannende Helices (Serpentinen-Rezeptoren) und sind an ihrer zytosolischen Seite an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt. Das G-Protein besitzt eine Guanylnukleotid-Austausch-Faktor (GEF) Aktivität, die nach Bindung des Botenstoffs aktiviert wird.

Dadurch wird das an der α -Untereinheit des G-Proteins gebundene Molekül GDP gegen ein Molekül GTP ausgetauscht. Dieser Austausch führt zum Zerfall des G-Proteins in die α - und β/γ -Untereinheiten und schließlich zu deren Bindung an unterschiedlichen β -Isoformen der Phospholipase C. Es erfolgt eine Stimulation der Phospholipase C β (PLC β) und damit die Katalyse der Hydrolyse von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) in Diacylglycerol (DAG), welches in der Plasmamembran verbleibt, und das wasserlösliche Ins(1,4,5)P₃ [Löffler & Petrides, 7. Auflage, Kapitel 27]. Der zweite Signalweg führt über die Bindung von z.B. Wachstumshormonen (EGF, PDGF) oder Antigenen an Rezeptor gekoppelte Tyrosinkinase. Die Bindung des Botenstoffes führt zu einer Homodimerisierung der Rezeptoren, die eine Erhöhung der Kinaseaktivität durch Transphosphorylierung verursacht. Diese aktivierte Rezeptortyrosinkinase kann nun γ -Isoformen der Phospholipase C über deren SH2-Domänen (*src*-Homologie Region 2) binden und deren Aktivität durch Phosphorylierung stimulieren. Die aktivierte Phospholipase C kann nun auch auf diesem Weg die Hydrolyse von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) in Diacylglycerol (DAG) und InsP₃ katalysieren [Löffler & Petrides, 7. Auflage, Kapitel 27]. Durch Bindung des wasserlöslichen InsP₃ an spezifische InsP₃-Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums (ER), kann der Ausstrom von Kalziumionen (Ca²⁺) aus Vesikeln in der Membran dieses intrazellulären Speichers vermittelt, und somit die intrazelluläre Kalziumkonzentration beeinflusst werden [Krauss, 2003]. Die freigesetzten Kalziumionen und das membranständige Diacylglycerol (DAG) können eine Reihe von Proteinkinasen aktivieren, wie z.B. die Proteinkinase C (PKC). In Folge werden Funktionsproteine phosphoryliert, welche die spezifische Zellantwort auslösen. Die Bildung von InsP₃-Molekülen, und damit auch die der Kalziumionen, wird solange vollzogen, bis das extrazelluläre Signal nicht mehr auf die Zelle einwirkt [Löffler & Petrides, 7. Auflage, Kapitel 27]. Die InsP₃-Moleküle können danach zwei Schicksale haben: InsP₃ kann zum einen bis zum myo-Inositol dephosphoryliert und somit inaktiviert werden. Es steht damit der erneuten Bildung von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) zur Verfügung. Der Großteil der InsP₃-Moleküle wird durch die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (IP3K) zu InsP₄ (Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat) und weiter zu höher phosphorylierten Inositolphosphate phosphoryliert [Irvine & Shell, 2001].

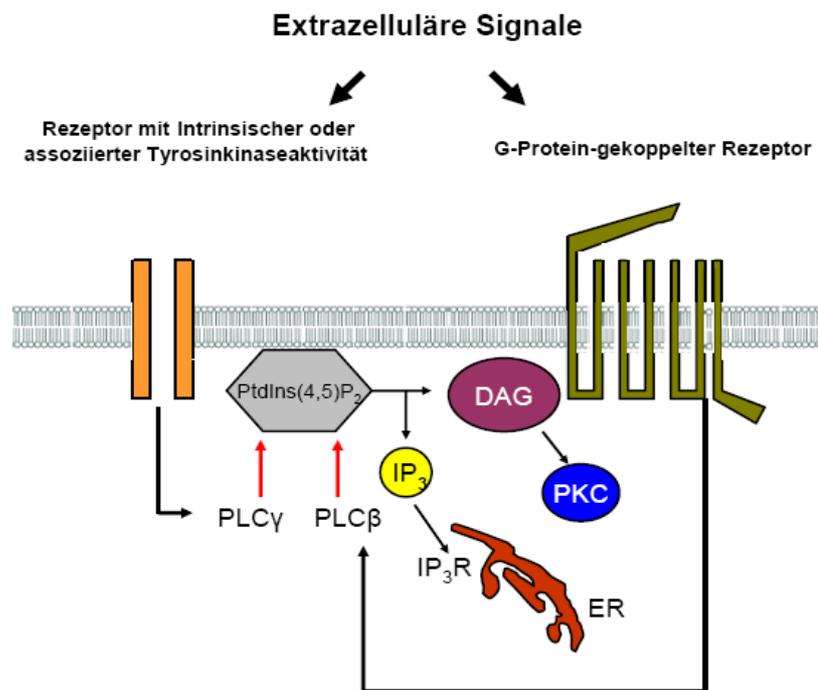


Abbildung 1.2: Intrazelluläre Bildung des Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffs $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

Extrazelluläre Signale bewirken entweder über an heterotrimeren G-Proteinen gekoppelte Rezeptoren (Neurotransmitter, Geruchsstoffe, Hormone, Licht) oder über Transmembranrezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinaseaktivität (Wachstumsfaktoren), die Aktivierung von PLC-Isoformen. Die hydrolytische Spaltung des Membranphospholipids $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ führt zur Bildung der Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Nach Bindung des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ an $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -spezifische Oberflächenrezeptoren intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher (z.B. ER), wird Ca^{2+} in das Zytoplasma freigesetzt. Das DAG aktiviert die Proteinkinase C, die weitere Funktionsproteine phosphoryliert und somit die spezifische Zellantwort auslöst.

1.2 Inositolphosphat-Kinasen (IPKs) als zentrale Enzyme des Inositolphosphat-Stoffwechsels

Der gesamte Inositolphosphatmetabolismus wird über eine Vielzahl von Kontrollmechanismen reguliert (siehe Abbildung 1.3). Dazu zählen die Inositolphosphatkinasen (IPKs) und Inositolphosphatphosphatasen (IPPs). Dabei ist der Stoffwechsel der Inositolphosphate unmittelbar mit dem Stoffwechsel der Phosphatidylinositole verbunden [Abel *et al.*, 2001]. Ausgangssubstrat für die Synthese aller InsPs ist das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$), das sich im inneren Blatt der Plasmamembran befindetet. Die durch die Aktivität einer Phospholipase C bewirkte Hydrolyse von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ führt zur Bildung der sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Außerdem ist das durch vollständige Dephosphorylierung des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ [Drayer *et al.*, 1996] gebildete *myo*-Inositol, Ausgangssubstrat für die erneute Bildung von Phosphatidylinositol, aus dem durch Phosphorylierungsreaktionen u.a. $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ gebildet werden kann.

Je nach Gewebeart unterscheiden sich auch die vorliegenden Isoformen und die spezifische Expression der Inositolphosphatkinasen, deren intrazelluläre Lokalisation oft stark variiert. Anhand von Sequenzähnlichkeiten können drei verschiedene Arten von IPKs unterschieden werden: Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase (IP₅-2K), die Inositol-1,3,4-trisphosphat 5/6-Kinase/Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphat 1-Kinase (IP₃-5/6-K/IP₄-1-K) und die drei Subfamilien der PDKG-Kinasen: Die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP₃K) mit ihren bis zu drei Isoformen, die Inositolphosphatmultikinase (IPMK) und die ebenfalls bis zu drei Isoformen der Inositolhexakisphosphatkinasen (IP₆K).

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP₃K-B) untersucht, die Ca²⁺- und CaM-abhängig Ins(1,4,5)P₃ in 3-Position zu Ins(1,3,4,5)P₄ phosphoryliert.

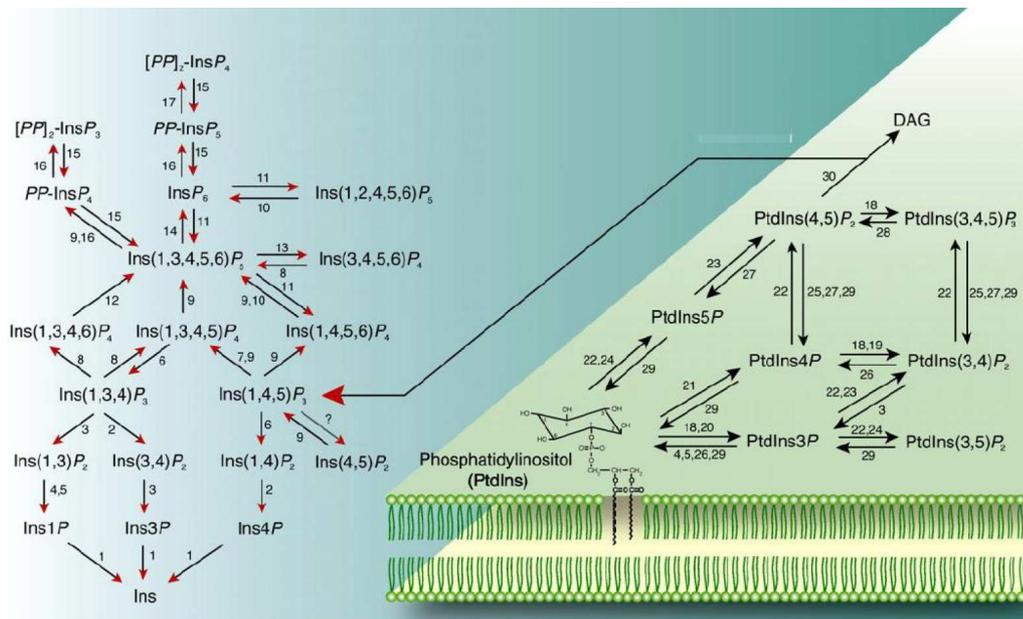


Abbildung 1.3: Stoffwechsel der Inositolphosphate und Phosphatidylinositole

Das sich im inneren Blatt der Plasmamembran befindende Phosphatidylinositol (PtdIns) und seine an unterschiedlichen Positionen phosphorylierten Derivate werden durch spezifische Kinasen und Phosphatasen ineinander umgewandelt. Das PtdIns(4,5)P₂ kann darüber hinaus durch die Aktivität einer Phospholipase C in Diacylglycerol und Ins(1,4,5)P₃ gespalten werden. Diacylglycerol verbleibt in der Plasmamembran, während der Ca²⁺-freisetzende, sekundäre Botenstoff Ins(1,4,5)P₃ wasserlöslich und folglich im Zytoplasma frei diffusibel ist. Das Ins(1,4,5)P₃ ist Ausgangssubstrat für ein Vielzahl von Inositolphosphaten, die durch spezifische Kinasen und Phosphatasen erzeugt werden. Durch eine vollständige Dephosphorylierung können die Inositolphosphate zum *myo*-Inositol abgebaut werden. Die Phosphorylierung führt bis hin zum vollständig phosphorylierten InsP₆ und darüber hinaus zu Pyrophosphatgruppen-tragenden Inositolphosphaten (modifiziert nach [Abel et al., 2001]).

- 1 Inositol Monophosphatase; 2 Ins(1,4)P₂/Ins(1,3,4)P₃-1-Phosphatase; 3 Ins(1,3,4)P₃/Ins(3,4)P₂/PtdIns(3,4)P₂-4-Phosphatase; 4 Ins(1,3)P₂/PtdIns3P-3-Phosphatase Typ I; 5 Ins(1,3)P₂/PtdIns3P-3-Phosphatase Typ III; 6 Ins(1,4,5)P₃/Ins(1,3,4,5)P₄-5-Phosphatase; 7 Ins(1,4,5)P₃-3-Kinase; 8 Ins(1,3,4)P₃/Ins(1,3,4,5)P₄-1-Kinase; 9 Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK); 10 Ins(1,4,5,6)P₄/Ins(1,2,4,5,6)P₅-3-Kinase; 11 Multiple Inositol Polyphosphatphosphatase; 12 Ins(1,3,4,6)P₄-5-Kinase; 13 Ins(1,3,4,5,6)P₅-1-Phosphatase; 14 Ins(1,3,4,5,6)P₅-2-Kinase; 15 Diphosphoinositol Polyphosphat Phosphohydrolase; 16 Diphosphoinositol Polyphosphat Synthase (InsP₆-Kinase); 17 Bis-Diphosphoinositol Polyphosphat Synthase; 18 Phosphoinositid-3-Kinase Typ I; 19 Phosphoinositid-3-Kinase Typ II; 20 Phosphoinositid-3-Kinase Typ III; 21 PtdIns-4-Kinase; 22 PtdInsP-Kinase Typ I; 23 PtdInsP-Kinase Typ II; 24 PtdInsP-Kinase Typ III; 25 PtdIns(4,5)P₂/PtdIns(3,4,5)P₃-5-Phosphatase; 26 PtdInsPolyphosphat-3-Phosphatase; 27 SHIP; 28 PTEN; 29 Synaptojanin; 30 Phospholipase C

1.2.1 Die Familie der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinasen

Vor 20 Jahren wurde zum ersten Mal entdeckt, dass Ins(1,4,5)P₃ spezifisch in 3-Position zu Ins(1,3,4,5)P₄ phosphoryliert wird [Batty *et al.*, 1985; Irvine *et al.*, 1986]. Das für diese Phosphorylierung zuständige Enzym, die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (IP3K), kommt nur im Tierreich vor. Die Inositolphosphatmultikinase (IPMK), die ebenfalls Ins(1,4,5)P₃ in 3-Position phosphorylieren kann, ist hingegen auch in Pflanzen und Hefe nachgewiesen worden. Da eine Phosphorylierung stets mit ATP-Verbrauch einhergeht und bisweilen bekannt war, dass eine spezifische 5-Phosphatase für die Inaktivierung des Ins(1,4,5)P₃ zuständig ist, stellte sich die Frage nach der eigentlichen Funktion dieser Kinase.

Durch Forschungsarbeiten in den vergangenen Jahren, wurden viele neue Erkenntnisse über die IP3K-Familie, einschließlich ihrer drei Isoformen, gewonnen. Bisher konnten drei cDNA-Sequenzen, die für drei Isoformen der Inositoltrisphosphat 3-Kinase codieren, in Vertebraten identifiziert werden. Diese werden nach der Reihenfolge ihrer Charakterisierung als Isoform A, B und C bezeichnet. Alle drei Isoformen katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe vom ATP auf die 3'-Hydroxylgruppe des sekundären Botenstoffes Ins(1,4,5)P₃. Mittlerweile konnten weitere Isoformen, wie zum Beispiel in der Honigbiene (*Apis*) und in *Drosophila melanogaster*, aus den genomischen Sequenzen vorhergesagt werden [Clandinin *et al.*, 1998; Kucharski & Maleszka, 2002]. Im Labor von Prof. Mayr wurden diese Isoformen aus *Drosophila melanogaster* rekombinant und katalytisch aktiv hergestellt. Während die A-Isoform in Vertebraten hauptsächlich in Neuronen, aber auch in Hoden und den roten Blutkörperchen exprimiert wird, wurden die Isoformen B und C beinahe ubiquitär nachgewiesen. Dabei wurde die Isoform B in Geweben von Lunge, Thymus, Hoden, Gehirn und Herz, jedoch nicht von Milz, Leber, Niere und Darm gefunden [VanWeyenberg *et al.*, 1995; Dewaste *et al.*, 2002]. Die Expression der C-Isoform wurde in Pankreas, Niere, Skelettmuskel, Leber, Lunge, Plazenta, Gehirn und Herz gezeigt [Dewaste *et al.*, 2000; Nalaskowski *et al.*, 2003]. Vom Aufbau lassen sich die Enzyme in drei funktionelle Bereiche gliedern (siehe Abbildung 1.4). Allen drei Isoformen der IP3K gemein ist die hochkonservierte C-terminale Region. Dort befindet sich die katalytische Domäne, die enzymatische Aktivität besitzt [Bertsch *et al.*, 2000]. N-terminal der katalytischen Domäne befindet sich die Ca²⁺/Calmodulin Bindungsdomäne, die durch Bindung von Ca²⁺ die IPK-Aktivität stimuliert. Sowohl die Sensibilität als auch die Kinaseaktivitäten der Isoformen A und B gegenüber Ca²⁺/Calmodulin-Stimulation werden über Phosphorylierungen durch PKA und PKC reguliert [Nalaskowski & Mayr, 2004]. Eine weitere konservierte Domäne, die der Ca²⁺/Calmodulin Bindungsdomäne vorausgeht, ist die sogenannte PEST-Sequenz (Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T)), die u.a. reich an sauren Aminosäuren ist.

Sie stellt eine Spaltstelle für bestimmte Proteasen, die Calpaine, dar [Rechsteiner & Rogers, 1996]. Die HsIP3K-B enthält fünf potentielle PEST-Sequenzen (PESTfind Analysis Webtool; <https://embl1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>), was ein Hinweis für die besonders hohe Sensitivität des Enzyms gegenüber Proteolyse darstellt. Der N-Terminus hingegen weist zwischen den Isoformen große Unterschiede in Länge und Aminosäuresequenz auf, wodurch sich die unterschiedlichen Molekulargewichte der Isoformen (Isoform A: 52 kD, B: 102 kD; C: 75 kD) erklären lassen. Die N-terminale Region besitzt mit großer Wahrscheinlichkeit Funktionen der Regulation und Zielsteuerung. In der A-Isoform wurde im N-Terminus eine Aktinbindungsdomäne (ABD) identifiziert, die das Enzym an die aktinreichen dendritischen Dornen von Neuronen lenkt [Irvine & Schell, 2001]. Die ubiquitär vorkommende B-Isoform weist intrazelluläre Lokalisationen am Endoplasmatischen Retikulum (ER), am F-Aktin und an der Plasmamembran auf [Brehm *et al.*, 2004; Dewaste *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 1997]. In der Rattenform konnte die ABD von Dr. Isabell Schreiber im Bereich der Aminosäuren 108-170 identifiziert werden [Schreiber, 2002]. Die ABD besteht aus zwei prädierten α -Helices (Aminosäuren 130-149 und 155-166), denen eine prolinreiche Verbindungssequenz vorausgeht. Die C-Isoform ist überwiegend nukleär lokalisiert [Nalaskowski *et al.*, 2003].

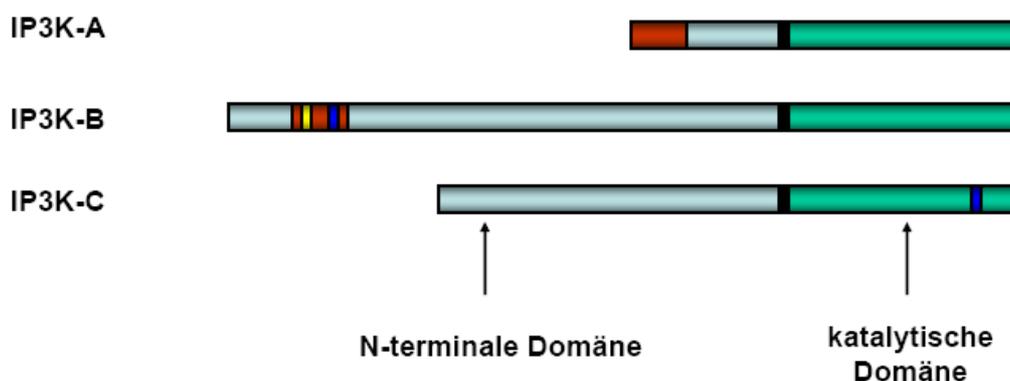


Abbildung 1.4: Modularer Aufbau der humanen Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase Isoformen

Die drei bekannten Isoformen der HsIP3K (genannt A,B,C) bestehen aus jeweils drei funktionalen Einheiten. Die C-terminal gelegene katalytische Domäne (grün) und die N-terminal an sie anschließende Ca²⁺/Calmodulin-Bindungsdomäne (schwarz) sind zwischen den Isoformen hoch konserviert. Die N-terminalen Domänen (blaugrau) der drei Isoformen unterscheiden sich deutlich in Länge und Aminosäuresequenz voneinander. Sie haben wahrscheinlich Aufgaben in der Regulation und Zielsteuerung. Im äußerst N-terminal gelegenen Bereich der A-Isoform wurde eine Aktinbindungsdomäne (rot) charakterisiert. In der B-Isoform liegt innerhalb der ABD im N-terminalen Bereich sowohl ein NLS (*nuclear localization signal*) (gelb) als auch ein NES (*nuclear export signal*) (blau) vor. In der C-Isoform konnte innerhalb der katalytischen Domäne ein NES identifiziert werden.

1.2.2 Die Rolle der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase Isoform B für das Immunsystem

In den letzten Jahren hat sich nicht nur unser Wissen über die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP3Ks) vermehrt, sondern es wurden auch neue Erkenntnisse über das Produkt der IP3Ks, das $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, gewonnen. Inzwischen hat sich die enorme Relevanz des $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ für das Immunsystem herausgestellt.

Es ist bekannt, dass alle drei Isoformen der HsIP3K den sekundären Botenstoff $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ phosphorylieren. Diese Phosphorylierung führt zum Abbau des Ca^{2+} -freisetzenden sekundären Botenstoffes und zur Bildung des neuen sekundären Botenstoffes $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, durch den ein wichtiger Stoffwechselweg zu höherphosphorylierten Inositolphosphaten eröffnet wird [Irvine & Schell, 2001; Fukuda & Mikoshiba, 1997]. Die B-Isoform der humanen IP3K (HsIP3K) wird als einzige der Isoformen auch im Thymus exprimiert. Der Thymus ist ein Organ des Lymphsystems von Wirbeltieren, in dem die Reifung von T-Lymphozyten erfolgt. Hierfür wandern während der Ontogenese aus dem Knochenmark Prä-T-Lymphozyten in den Thymus ein. Diese Lymphozyten besitzen weder charakteristische T-Lymphozytenantigene noch Antigen-spezifische T-Zell-Rezeptoren. Sie sind $\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$ („doppelt negativ“) und entwickeln sich in der Thymusdrüse schnell zu $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ („doppelt positiven“) Zellen. Diese doppelt positiven T-Lymphozyten entwickeln ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) und durchlaufen den Prozess der positiven und negativen Selektion. Dieser Prozess stellt das Schlüsselereignis im Aufbau eines individuellen kompetenten protektiven Repertoires an T-Zellen dar. Dabei werden etwa 95% der T-Lymphozyten während der Thymuspassage eliminiert. Die sich ausdifferenzierenden T-Lymphozyten verlieren entweder das CD4 oder das CD8 und sind damit als reife T-Lymphozyten einfach positiv und tragen entweder CD4 (T-Helferzellen) oder CD8 (Suppressor- oder cytotoxische Zellen) als Oberflächenmarker [Löffler & Petrides, 7. Auflage, Kapitel 37].

Mittlerweile wurde durch Experimenten mit Knock-Out-Mäusen gezeigt, dass es in Abwesenheit der IP3K-B und ihres Produktes $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, zu einer schweren Störung der T-Zell-Entwicklung kommt, was auf eine gestörte Selektion zurückgeführt wird [Pouillon *et al.*, 2003, Wen *et al.*, 2004]. Dabei wird die Ursache der T-Zell-Entwicklungsstörung vor allem in der starken Senkung der intrazellulären $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Konzentration in IP3K-B-defizienten Mäusen vermutet, da die Konzentrationen an $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zwischen Wildtyp und IP3K-B Knock-Out T-Lymphozyten (exprimieren keine HsIP3K-B) keinen Unterschied zeigen.

Die Reifung der T-Lymphozyten von doppelt positiven ($CD4^+/CD8^+$) zu einfach positiven Zellen ($CD4^+$ oder $CD8^+$) wird folglich durch die Abwesenheit von $Ins(1,3,4,5)P_4$ gestört [Pouillon *et al.*, 2003]. Wen und Kollegen konnten mithilfe weiterer Experimente mit Knock-Out-Mäusen einen Mechanismus finden, der das Phänomen der gestörten T-Zellentwicklung in Abwesenheit von IP3K-B erklärt [Wen *et al.*, 2004] (siehe Abbildung 1.5). Im naiven unstimulierten Thymozyten wird Ras, ein kleines G-Protein, durch $GAP1^{IP4BP}$ in einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand gehalten. Dabei ist $GAP1^{IP4BP}$ über die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) mit dem membrangebundenen $PtdIns(4,5)P_2$ an der Plasmamembran lokalisiert. Durch eine Stimulation des TCR (*T-cell receptor*) auf der Zelloberfläche des naiven Thymozyten wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche die positive T-Zell-Selektion initiiert. Dabei wird die $PLC\gamma$ aktiviert, die dann das $PtdIns(4,5)P_2$ zum Diacylglycerol (DAG) und $Ins(1,4,5)P_3$ spaltet. Das DAG rekrutiert das Ras-aktivierende RasGRP1 an die Zellmembran, welches Ras durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert. Diese Aktivierung löst eine MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase)-Kaskade aus, die schließlich das Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) aktiviert. Das Erk ist ein wichtiger Mediator der positiven T-Zell-Selektion. Währenddessen bewirkt das gebildete $Ins(1,4,5)P_3$ einen Ca^{2+} -Ausstrom aus intrazellulären Speichern und wird anschließend durch die IP3K-B zum $Ins(1,3,4,5)P_4$ phosphoryliert. Das wasserlösliche $Ins(1,3,4,5)P_4$ konkurriert mit dem membranständigen $PtdIns(4,5)P_2$ um die Bindungsstelle an der PH-Domäne von $GAP1^{IP4BP}$. Dies führt dazu, dass $GAP1^{IP4BP}$ von der Plasmamembran verschwindet und vermehrt ins Zytoplasma entlassen wird. Hierbei bestimmt also die Balance zwischen der $PtdIns(4,5)P_2$ - und der $Ins(1,3,4,5)P_4$ -Konzentration die Lokalisation von $GAP1^{IP4BP}$. Durch die Ablösung des $GAP1^{IP4BP}$ von der Plasmamembran auf der einen Seite, und der Spaltung vom membranständigen $PtdIns(4,5)P_2$ auf der anderen Seite, entfällt die Hemmung von Ras, sodass seine Aktivierung ungehindert stattfinden kann. Kommt es nun zu einer Zerstörung der IP3K-B, wie in den Knock-Out-Mäusen, wird $Ins(1,3,4,5)P_3$ nicht zu $Ins(1,3,4,5)P_4$ umgesetzt. Folglich konkurriert kein Substrat mit dem $PtdIns(4,5)P_2$ um die Bindungsstelle an der PH-Domäne von $GAP1^{IP4BP}$, sodass $GAP1^{IP4BP}$ an der Plasmamembran assoziiert bleibt und weiterhin das Ras in einem inaktiven Zustand hält. Die Erk-Aktivierung entfällt und damit die positive T-Zell-Selektion [Wen *et al.*, 2004].

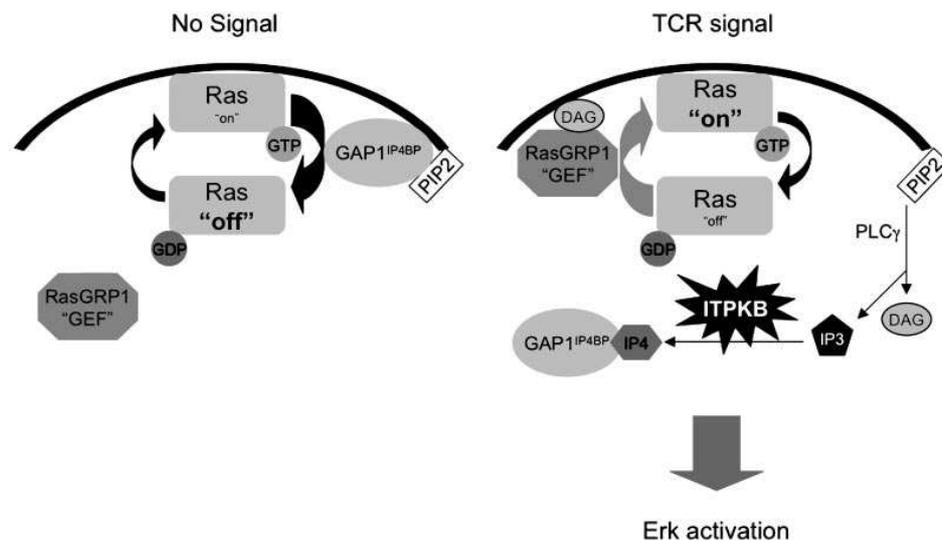


Abbildung 1.5: Rolle der HsIP3K-B in der Regulation des Ras/MAPK/Erk-Signalswegs in T-Lymphozyten

Dargestellt ist jeweils ein unstimulierter (links) und stimulierter Zustand (rechts) eines T-Lymphozyten. In einem naiven, unstimulierten T-Lymphozyten wird Ras durch das membranständige GAP1^{IP4BP} in einem inaktiven Zustand gehalten. Nach Stimulierung wird PtdIns(4,5)P₂ zum DAG und Ins(1,4,5)P₃ durch PLC γ gespalten. Zum einen erfolgt eine RasGRP1-vermittelte Aktivierung des Ras durch das DAG, wodurch MAPK-Kaskade vermittelt Erk aktiviert wird. Zum anderen erfolgt eine Phosphorylierung des Ins(1,4,5)P₃ zum Ins(1,3,4,5)P₄ durch die HsIP3K-B. Das GAP1^{IP4BP} wird durch die Bindung an das Ins(1,3,4,5)P₄ von der Zellmembran abgelöst, womit eine Aktivierung des Ras ermöglicht wird (nach [Wen *et al.*, 2004]).

Aus diesem Mechanismus ist also ersichtlich, dass das Ins(1,3,4,5)P₄ und das DAG für die positive Selektion der T-Lymphozyten unentbehrlich sind.

Nach Huang *et al.* führt der Ins(1,3,4,5)P₄-Mangel ebenso über eine daraus folgende Störung der Membrantranslokation der Interleukin-2 Tyrosinkinase (Itk) an die Plasmamembran, zu einer gestörten positiven T-Zell-Selektion [Huang *et al.*, 2007] (siehe Abbildung 1.6). Die Itk stellt ein Schlüsselaktivator der PLC γ dar, die das membranständige PtdIns(4,5)P₂ zum Diacylglycerol (DAG) und Ins(1,4,5)P₃ spaltet. Wie oben beschrieben, ermöglicht erst das DAG die Rekrutierung des Ras-aktivierenden RasGRP1 an die Zellmembran, woraufhin das Ras aktiviert und der Ras/MAPK/Erk-Signalsweg initiiert wird. Nach diesem Mechanismus bewirkt die TCR-Stimulation zunächst eine geringe Aktivierung der Itk und ihres Effektors PLC γ , sodass ebenfalls eine geringe Konzentration an Ins(1,4,5)P₃ und DAG entsteht. Die IP3K-B phosphoryliert das Ins(1,4,5)P₃ zum Ins(1,3,4,5)P₄, woraufhin die Itk mit ihrer PH-Domäne an das membranständige Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) bindet und an die Plasmamembran translokalisiert wird.

Dort kann die Itk nun die PLC γ auf ein Höchstmaß aktivieren und somit die Ins(1,4,5)P $_3$ - und DAG-Konzentration um eine Vielfaches erhöhen. Dieser Mechanismus beschreibt also eine positive Rückkopplungsschleife des wasserlöslichen Ins(1,3,4,5)P $_4$ über die Itk zur PLC γ [Huang *et al.*, 2007]. Es bleibt zukünftigen Forschungsarbeiten überlassen zu zeigen, ob diese positive Regulation des Ins(1,3,4,5)P $_4$ auf den Ras/MAPK/Erk-Signalweg möglicherweise eine Rolle in der Tumorgenese spielt.

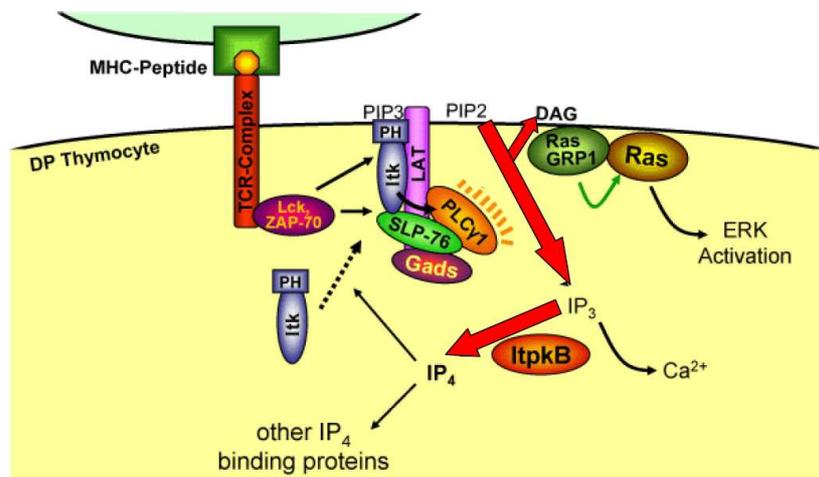


Abbildung 1.6: Rolle der IP3K-B in einer positiven Rückkopplungsschleife der TCR-induzierten positiven Selektion von doppelt positiven T-Lymphozyten

Die TCR-Stimulierung bewirkt zunächst eine geringe Aktivierung der Itk und der PLC γ . Das nach Spaltung der PtdIns(4,5)P $_2$ entstandene Ins(1,4,5)P $_3$ wird durch die IP3K-B zu Ins(1,3,4,5)P $_4$ phosphoryliert, welches die PtdIns(3,4,5)P $_3$ -vermittelte PH-Domänen-abhängige Membrantranslokation der Itk an die Plasmamembran, erleichtert. Dort kann die Itk die PLC γ auf ein Höchstmaß aktivieren und die Ins(1,4,5)P $_3$ - und DAG-Konzentration um eine Vielfaches erhöhen.

➔ Umsetzung ; ➡ Modulation ; ⋯➡ Bindung

(modifiziert nach [Sauer Lab Research; http://www.scripps.edu/imm/sauer/lab_login.html])

Sowohl Miller als auch Maréchal und Kollegen wiesen nach, dass eine Zerstörung der IP3K-B auch zu einer Beeinträchtigung der B-Zell-Entwicklung, zu defekten IgG3-Antikörper-Antworten führt und schließlich den B-Zell-Tod induziert [Miller *et al.*, 2007; Maréchal *et al.*, 2007]. Dabei wird die gesunkene Überlebensrate IP3K-B-defizienter Mäuse auf eine geringere Phosphorylierung von Erk1/2 und eine Erhöhung der Bim-Genexpression zurückgeführt [Maréchal *et al.*, 2007]. Dem Ins(1,3,4,5)P $_4$ wird in den B-Lymphozyten eine inhibierende Wirkung auf Ca $^{2+}$ induzierende Kanäle zugesprochen [Miller *et al.*, 2007].

Die Forschungsgruppe Jia *et al.* konnte außerdem zeigen, dass das $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ein negativer Regulator der Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat ($\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$)-vermittelten Signaltransduktion in neutrophilen Granulozyten darstellt [Jia *et al.*, 2007] (siehe Abbildung 1.7). Indem $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ an die gleiche Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) bindet wie $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, konkurriert es um die Bindung. Dadurch wird die Membrantranslokation vieler intrazellulärer Proteine an die Plasmamembran gehemmt und somit die Initiierung nachgeschalteter Signalkaskaden gestört, die zu einer Vielzahl von Ereignissen in der Zelle, wie z.B. der Chemotaxis und der Formation von Superoxiden, führen. Demnach hemmt das $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ die inflammatorische Antwort [Jia *et al.*, 2007]. Der Sinn dieser Regulierung könnte im Schutz vor einer Zerstörung des umliegenden Gewebes durch unkontrollierte Freisetzung von toxisch reaktiven Sauerstoff-Spezies und enzymatischen Granulaten, wie Proteasen, liegen.

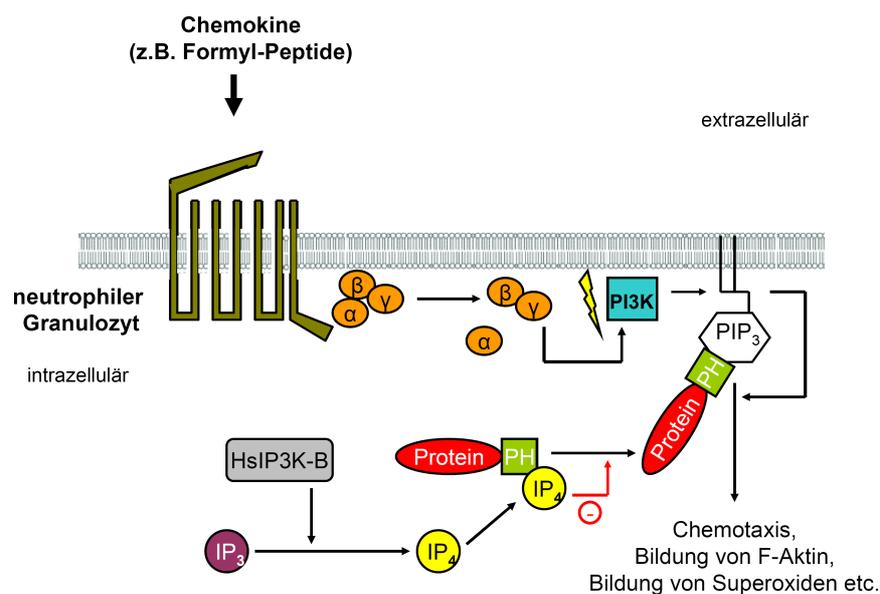


Abbildung 1.7: $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ als negativer Regulator der $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -vermittelten Signaltransduktion in einem neutrophilen Granulozyten

Binden Chemokine (z.B. Formyl-Peptide) an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor auf der Zelloberfläche eines neutrophilen Granulozyten, dissoziiert das G-Protein zunächst in seine α - und β/γ -Untereinheiten. Die β/γ -Untereinheiten initiieren die Aktivierung der PI3K, die eine Akkumulation des $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ an der Plasmamembran bewirkt. Eine Vielzahl von intrazellulären Proteinen kann mit $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ über die PH-Domäne interagieren und somit an die Plasmamembran translokalisieren. Dort triggern sie nachgeschaltete Signalkaskaden, die zu einer Vielzahl von Ereignissen in der Zelle führen (z.B. Chemotaxis, Bildung und Polymerisation von F-Aktin, Formation von Superoxiden). Die HsIP3K-B setzt $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ um, das an die gleiche PH-Domäne von Zielproteinen bindet wie $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ und somit um die Bindung konkurriert. Liegt ein $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Überschuss vor, wird die Membrantranslokation und damit nachgeschaltete Signalwege gehemmt.

Sauer und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass das $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ auch eine positive Regulierung der $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -vermittelten PH-Domänen-assozierten Plasmamembran-Translokation bewirken kann. Um dieses Phänomen in doppelt positiven T- Lymphozyten zu erklären, wurden in der Forschungsgruppe von Sauer zwei unterschiedliche Modelle aufgestellt: das "induced fit"- Modell und das kooperativ allosterische Modell (siehe Abbildung 1.8). In dem "induced fit"- Modell bindet $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ an eine PH-Domäne der I tk und verändert ihre Konformation so, dass sie daraufhin eine hohe Affinität zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ und $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ besitzt. Sobald die $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -gebundene PH-Domäne auf einen lokalen $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -Überschuss stößt (z.B. an der Plasmamembran nach einer Rezeptorstimulierung), ersetzt $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ einfach das $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ und bleibt fest verbunden. Auf diese Weise hat das $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ die Bindung von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ an die PH-Domäne erleichtert, indem die Konformation dieser Domäne danach angepasst wurde.

Im kooperativ allosterischen Modell liegt die PH-Domäne schon im vorab als Dimer oder in einem höher aggregierten Zustand vor. Das $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ bindet an eine der Untereinheiten und induziert Veränderungen der Konformation in einer anderen Untereinheit, so dass diese das $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ mit einer höheren Affinität binden können. Dies würde bedeuten, dass schon eine geringe $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Konzentration die Bindung von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ an PH-Domänen-Aggregaten verstärkt. Interessanterweise fanden Sauer und Kollegen heraus, dass PH-Domänen tatsächlich Aggregate bilden - eine bis dahin unbekannte Eigenschaft dieser Domänen. Zukünftig soll u.a. der Frage nachgegangen werden, wie sich die Aggregation der PH-Domänen auf ihre *in vivo*- Funktion auswirkt [Sauer Lab Research; http://www.scripps.edu/imm/sauer/lab_login.html].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Forschungsarbeiten in den letzten Jahren wichtige Beiträge zu der Struktur und Funktion der IP3K-B und vor allen Dingen zu ihrer essenziellen Rolle in vielen Signaltransduktionswegen von Zellen des Immunsystems geleistet haben. Dadurch wurde eine Vielzahl von Möglichkeiten für zukünftige Forschungsthemen im Bereich der Entwicklung des Immunsystems eröffnet. So könnte die pharmakologische Modulation der $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Konzentration zukünftige therapeutische Ziele in der Medizin, z.B. bei der Bekämpfung T-Zell-abhängiger Immunerkrankungen oder der Immundefizienz, darstellen.

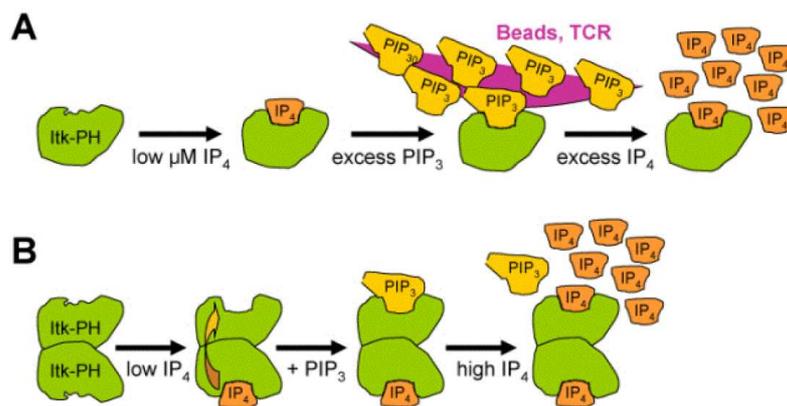


Abbildung 1.8: Mechanismus der erleichterten PtdIns(3,4,5)P₃-Bindung an PH-Domänen durch Ins(1,3,4,5)P₄

Die Abbildung zeigt zwei Modelle (A und B) zur Erklärung der erleichterten PtdIns(3,4,5)P₃-Bindung an PH-Domänen durch Ins(1,3,4,5)P₄ in doppelt positiven T-Lymphozyten.

Im "induced fit"-Modell bindet Ins(1,3,4,5)P₄ an eine PH-Domäne der Itk und erhöht ihre Bindungsaffinität zu Ins(1,3,4,5)P₄ und PtdIns(3,4,5)P₃. Im Falle eines lokalen PtdIns(3,4,5)P₃-Überschusses, ersetzt PtdIns(3,4,5)P₃ das Ins(1,3,4,5)P₄ und bleibt fest mit der PH-Domäne verbunden (A). Im kooperativ allosterischen Modell liegt die PH-Domäne als Dimer oder in einem höher aggregierten Zustand vor. Das Ins(1,3,4,5)P₄ bindet an eine der Untereinheiten und erleichtert über eine Konformationsänderung die Bindung der anderen Untereinheiten mit PtdIns(3,4,5)P₃ (B). (nach [Sauer Lab Research; http://www.scripps.edu/imm/sauer/lab_login.html])

1.3 Intrazelluläre Zielsteuerungsmechanismen

Für die Funktion und Wirkung von Proteinen spielt nicht allein die enzymatische Aktivität, sondern insbesondere auch die intrazelluläre Lokalisation eine wesentliche Rolle. Eine große Anzahl von Proteinen innerhalb einer eukaryotischen Zelle sind Zielsteuerungsmechanismen unterworfen, die von ihrer Funktion abhängig sind und die wiederum die Funktionen beeinflussen können. Dadurch wird ermöglicht, dass diese Funktionen spezifisch in bestimmten Zellkompartimenten wirken. Von ganz besonderer Bedeutung ist dies bei Signaltransduktionsproteinen, d.h. Proteinen, deren Hauptfunktion die zelluläre bzw. intrazelluläre Informationsübertragung ist. Dabei kann über die dynamische intrazelluläre Lokalisation eines Enzyms seine Funktion abgeleitet werden.

Die meisten Proteine entstehen an den Ribosomen im Zytosol, nur wenige werden an den Ribosomen der Mitochondrien gebildet. Abhängig davon ob Sekretionsproteine, Membranrezeptoren oder lysosomale Enzyme entstehen, wird die Lokalisation dieser Proteine durch Sortiermerkmale koordiniert, die für den Weitertransport in bestimmte zelluläre Kompartimente sorgen.

Dabei hat eine große Anzahl von Proteinen kein spezielles Sortiermerkmal und verbleibt deshalb frei oder komplexiert mit anderen Proteinen im Zytosol. Liegt der Bestimmungsort des Proteins innerhalb der Zelle, so verbleiben sie im Zytoplasma oder werden durch Signalmerkmale in die Mitochondrien, Peroxisomen oder in den Zellkern transportiert. Sekretorische Proteine hingegen werden über das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat und sekretorische Partikel aus der Zelle ausgeschleust. Fehlerhafte Proteine werden in Lysosomen entsorgt. Für die Verteilung synthetisierter Proteine auf intrazelluläre Organellen sind spezifische Erkennungsmerkmale notwendig. Man unterscheidet dabei zwei Arten solcher Erkennungsmerkmale: Signalpeptide und Signaldomänen. Ein Signalpeptid im klassischen Sinne ist ein spezifischer Sequenzabschnitt, bestehend aus kurzen Aminosäuresequenzen am N-Terminus eines Proteins. Diese Signalsequenzen lenken ein Protein zu seinem Bestimmungsort (z.B. in das Lumen des ER) und werden während des Transports oder unmittelbar danach entfernt [Löffler & Petrides, 7. Auflage, Kapitel 9].

Signaldomänen hingegen sind Oberflächenstrukturen, welche durch die Tertiärstruktur des Proteins ausgebildet werden und für das entsprechende Protein charakteristisch sind. Sie bleiben im fertigen Protein erhalten und dienen der Translokation in bestimmte Zellkompartimente. Signaldomänen, die den Import eines Proteins in den Zellkern medieren, werden Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signals*, NLS) genannt. Aber auch die Zielsteuerung zu intrazellulären Strukturen, wie z.B. den Filamentstrukturen F-Aktin, wird über Signaldomänen gesteuert, die Aktinbindungsdomänen (ABD) genannt werden [Löffler & Petrides, 7. Auflage, Kapitel 3 und 8].

1.3.1 Die Zielsteuerung an das Aktinfilament

Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Es bildet mit den Mikrotubuli und den intermediären Filamenten das Zytoskelett einer eukaryotischen Zelle und ist eines der fünf häufigsten Proteine in Eukaryoten. Liegt Aktin als einzelnes Molekül (Monomer) vor, wird es als G-Aktin (globuläres Aktin) bezeichnet und ist ca. 42 kDa groß. G-Aktin bindet das Nukleotid ATP (Adenosintriphosphat) und kann mit weiteren Aktinmolekülen polymerisieren, wobei ATP unter Hydrolyse eines Phosphatrests zu ADP (Adenosindiphosphat) umgesetzt wird. Die entstehende Kette von Aktinmonomeren bildet so die filamentöse Form der Aktinfilamente, die F-Aktin genannt wird [Stryer, 1999]. In dem Modell von Hanson und Lowy [Hanson & Lowy, 1965] kann das F-Aktin entweder als eine einfache linksgewundene Helix aus polymerisierten G-Aktin-Monomeren, oder als eine rechtsgewundene Doppelhelix, angesehen werden.

Mittlerweile sind über 160 Aktin bindende Proteine (ABPs) identifiziert worden, wobei nur wenige Aktinbindungsdomänen (ABDs) beschrieben werden konnten. Die meisten der Aktin bindenden Proteine sind für die Bildung, Vernetzung oder Bündelung und Abbau von F-Aktin zuständig und werden nach ihrer Funktion in sieben Gruppen unterteilt [Dos Remedios *et al.*, 2003] (siehe Abbildung 1.9).

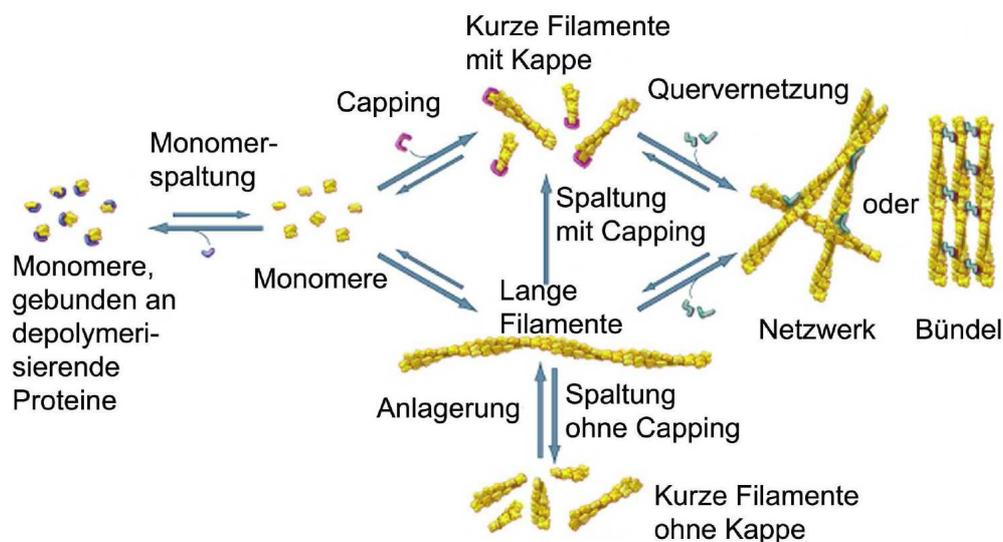


Abbildung 1.9: Die sieben Gruppen von F-Aktin bindenden Proteinen und ihrer Funktionen

Die Abbildung zeigt Darstellungen direkter Interaktionen von Aktin-bindenden Proteinen mit F-Aktin. Filamentendbindende Proteine (capping proteins), die die Enden von F-Aktin binden und den Austausch von Monomeren verhindern (1). Quervernetzungsproteine (branched nucleation), die mindestens zwei Aktinbindungsdomänen besitzen und so die Bildung von Filamentbündeln, verzweigten Filamenten und dreidimensionalen Netzwerken unterstützen (2). Stabilisierungsproteine (bundling proteins), die an F-Aktin binden und so die Depolymerisierung verhindern oder die Polymerisierung fördern (3). Monomerbindepoteine (monomer sequestering proteins), die G-Aktin stabilisieren und „abkapseln“ und so seine Polymerisierung verhindern (4). Filament depolymerisierende Proteine (depolymerizing proteins), die die Umwandlung von F- zu G-Aktin induzieren (5). Filament auflösende Proteine (severing proteins), die die Durchschnittslänge der F-Aktinfilamente verkürzen, indem sie sie in zwei Teile schneiden (6). Motorproteine, die F-Aktin als „Gleise“ zur Fortbewegung nutzen (7). (nach [Brehm, 2006])

1.3.2 Zielsteuerungsmechanismen für den Transport von Makromolekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma

Charakteristisch für eukaryotische Zellen ist insbesondere ihre Kompartimentierung, d.h. das Schaffen von abgeschlossenen Reaktionsräumen durch Biomembranen. Dabei bildet die Doppelmembran der Kernhülle ein Kontinuum mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird von Kernporenkomplexen (*nuclear pore complex*, NPC) durchdrungen, die einen regulierten Austausch von Makromolekülen erlauben. Der koordinierte Ablauf des nukleozytoplasmatischen Transports ermöglicht den notwendigen, gezielten Austausch von Makromolekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma, wie z.B. den Kernimport aller nukleären Proteine, wie Histone und Transkriptionsfaktoren nach ihrer Bildung an im Zytoplasma lokalisierten Ribosomen [Görlich & Kutay, 1999] oder den Kernexport verschiedener, im Kern gebildeter RNA-Typen (Transport-RNA, ribosomale RNA, Boten-RNA) zu ihrem Wirkort im Zytoplasma. Ein spezialisiertes Organell erhöht die genetische Stabilität und ermöglicht wichtige zelluläre Schlüsselreaktionen, wie z.B. den kontrollierten Zugang von Transkriptionsregulatoren zum Chromatin.

Diese evolutionären Vorteile erforderten nicht zuletzt eine hohe energetische Aktivität, was sich an der Beteiligung von mehr als 100 verschiedenen Proteinen zeigt [Görlich & Kutay, 1999]. Erst dieser komplexe nukleozytoplasmatische Mechanismus ermöglichte die Entwicklung höher organisierter multizellulärer Lebewesen.

1.3.2.1 Nukleärer Import

In den meisten Fällen können Transportrezeptoren das zu transportierende Protein nicht direkt binden, sondern benötigen dafür Adaptermoleküle, die den Transport vermitteln.

Der am besten charakterisierte Mechanismus für den nukleären Import von Proteinen ist der klassische Kernlokalisierungssignal (NLS) abhängige Weg (siehe Abbildung 1.10) [Görlich & Kutay, 1999], bei dem die Involvierung von Adaptorproteinen eine entscheidende Rolle spielt. Das zu transportierende Protein ist durch ein Kernlokalisierungssignal (NLS) gekennzeichnet, das ein bestimmtes Motiv in der Aminosäuresequenz des Proteins darstellt.

Die meisten dieser Signale stellen kurze Bereiche in der Primärstruktur dar, die reich an basischen Aminosäuren (Lysine, Arginine) sind. Man unterscheidet zwischen einem monopartiten und einem bipartiten NLS [Fontes *et al.*, 2000]. Das kanonische monopartite NLS zeichnet sich durch ein einzelnes basisches Cluster aus, hingegen tragen bipartite NLS zwei solcher Cluster, welche durch eine Verbindungssequenz aus beliebigen Aminosäuren getrennt sind.

Die genaue Definition einer Konsensussequenz dieser Kernlokalisierungssignale war seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Das monopartite NLS konnte durch Deletions- und Mutationsanalysen nur in einem engen Rahmen definiert werden. Offen blieb die Frage, was tatsächlich für den Kernimport für eine Vielzahl von Proteinen benötigt wird. Chelsky *et al.* haben synthetische Peptide aus einer Vielzahl von Spezies, die ein putatives NLS nachahmen, mit CSA (chicken serum albumin) konjugiert [Chelsky *et al.*, 1989]. Es stellte sich heraus, dass das basische Cluster allein nicht für einen Kerntransport ausreichend ist. Der Prototyp eines monopartiten NLS ist eine vier Aminosäuren umfassende Sequenz und wird wie folgt definiert: K-[RK]-X-[RK] [Chelsky *et al.*, 1989]. Dabei steht X vorzugsweise für ein Lysin, Arginin, Prolin, Valin oder Alanin. Inzwischen wurden sowohl für das monopartite als auch für das bipartite NLS-Konsensussequenzen erstellt.

Nach der Proteinbiosynthese eines NLS-tragenden Proteins an den Ribosomen im Zytoplasma, kann dieses nicht passiv (bei einer Größe von >30kD) durch den Kernporenkomplex diffundieren [Cole *et al.*, 1998]. Das NLS wird nun durch das Adaptorprotein Importin- α erkannt und gebunden [Gorlich & Kutay, 1999]. Das mit dem zu transportierenden Protein beladene Importin- α ist in der Lage, das für den Kontakt mit dem Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC) verantwortliche Importin- β zu binden. Als ternärer NLS-Protein/Importin- α / β -Komplex wird nun die aktive Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern vermittelt. Dabei geht das Importin- β eine Interaktion mit dem Kernporenkomplex (NPC) ein. Im Zellkern liegt eine hohe Konzentration der mit GTP-beladenen Form des Ran-Proteins (RanGTP) vor. RanGTP bindet direkt an Importin- β und bewirkt eine sterische Umorientierung, die es Importin- β unmöglich macht weiterhin an Importin- α zu binden. Der zurückbleibende Komplex aus Importin- α und NLS-Protein ist auf Dauer nicht stabil und zerfällt, womit die Translokation beendet wird. Das NLS-tragende Protein wird im Zellkern freigesetzt und kann diesen bei entsprechender Größe (>30kD) auch nicht mehr durch passive Diffusion verlassen. Für den Rücktransport der beteiligten Importine in das Zytoplasma stehen zwei Export-Mechanismen zur Verfügung: Der Importin- β /RanGTP-Komplex wird direkt durch den Kernporenkomplex ins Zytoplasma transportiert, wobei das RanGTP-gebundene Importin- β in diesem Mechanismus die Exportin-Funktion für seinen eigenen Transport ausübt. Im Zytoplasma befinden sich zwei Ran-spezifische Proteine mit GAP-Aktivität: das Ran-bindende-Protein 1 (RanBP1) und das Ran-GTPase-aktivierende-Protein (RanGAP). Die beiden Proteine erhöhen die GTPase-Aktivität von Ran um mehrere Größenordnungen, sodass das durch Hydrolyse von GTP gebildete RanGDP nicht länger in der Lage ist Importin- β zu binden.

Es wird nun im Zytoplasma freigesetzt und steht für weitere Transportzyklen zur Verfügung. Der zweite Exportmechanismus stellt der nukleäre Export des Adaptorproteins Importin- α durch das spezifische Exportin CAS (*cellular apoptosis susceptibility protein*) dar. Nach Bildung des ternären Komplexes aus Importin- α , CAS und RanGTP im Kern, wird der Export durch das Exportin CAS über den Kernporenkomplex ins Zytoplasma vermittelt. Dort bewirken die schon beschriebenen Ran-spezifischen Proteine mit GAP-Aktivität die Hydrolyse von GTP zu GDP und den Zerfall des Komplexes in seine drei Bestandteile. Auch das freigesetzte Adaptorprotein Importin- α steht nun für neue Transportvorgänge zur Verfügung.

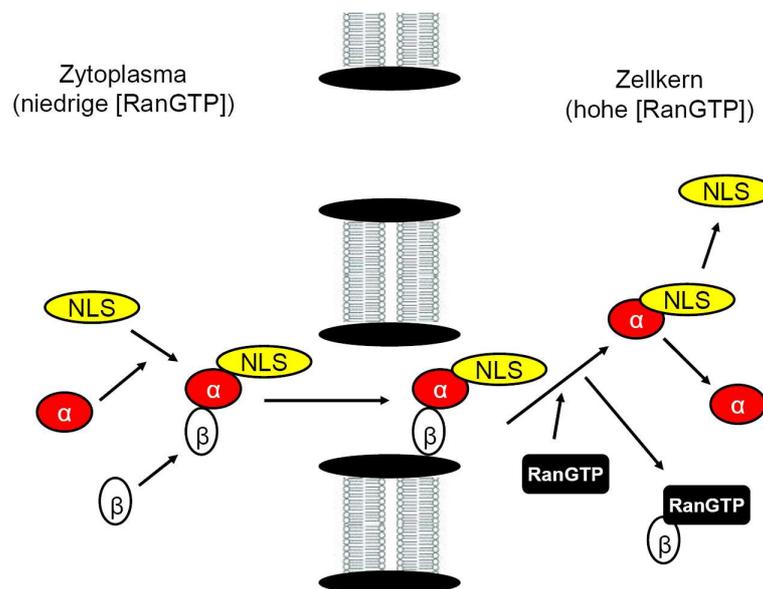


Abbildung 1.10: Nukleärer Import von Proteinen mit Kernlokalisierungssignal (NLS)

Das im Zytoplasma synthetisierte Protein trägt ein Kernlokalisierungssignal (NLS) (gelb). Dieses wird vom Adaptorprotein Importin- α (rot, α) erkannt und gebunden. Ein ternärer Komplex aus NLS-Protein, Importin- α und Importin- β (weiß, β) wird über den Kernporenkomplex (NPC) in den Zellkern transportiert. Im Zellkern wird durch RanGTP (schwarz) der Zerfall des ternären Komplexes und die Freisetzung des NLS-Proteins bewirkt. (modifiziert nach [Görllich & Kutay, 1999])

1.3.2.2 Nukleozytoplasmatisches Shuttling

Die räumliche Trennung abgeschlossener Reaktionsräume, welche die mRNA-Synthese im Kern und die Proteinbiosynthese im Zytoplasma ermöglicht, setzen streng regulierte Transportmechanismen voraus. Die Entdeckung eines dem Kernimport-Mechanismus gegenüberstehenden Kernexports hat die Sichtweise des bidirektionalen Transports über die Kernhülle, erweitert. Mittlerweile sind eine Vielzahl von Proteinen bekannt, die kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herpendeln [Gama-Carvalho & Carmo-Fonseca, 2001]. Diese Shuttleproteine (Pendelproteine) charakterisieren sich durch das Vorhandensein sowohl eines Kernlokalisierungssignals (NLS) als auch eines Kernexportsignals (NES) und sind Schlüsselfaktoren in der Informationsübertragung zwischen Zytoplasma und Zellkern. Nicht wenige nukleozytoplasmatische Shuttleproteine fungieren u.a. als Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, Transportrezeptoren und –adaptoren, Steroidhormonrezeptoren und RNA-Bindeproteine. Insbesondere bei der Regulation der Genexpression spielt das nukleozytoplasmatische Shuttling von Proteinen eine wichtige Rolle. Dabei hat sich herausgestellt, dass diese regulatorischen Faktoren einem steten Transport zwischen Zytoplasma und Zellkern unterliegen, wobei jedoch in Abhängigkeit von der Balance zwischen Import- und Exportaktivität, ein vorherrschender Aufenthalt im Kern oder im Zytoplasma beobachtet wird. Durch diesen Mechanismus des steten Transports wird eine deutlich dichtere Regulation der Proteinaktivitäten erlaubt.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Forschungsarbeiten in den letzten Jahren haben gezeigt, dass die humane Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP3K-B) eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion von Säugetierzellen spielt. Dabei ist ihre enzymatische Umsetzung des zytoplasmatischen sekundären Botenstoffs $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ u.a. essenziell für die Entwicklung des Immunsystems. Die Proliferation und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten, sowie das Signaling in neutrophilen Granulozyten, sind abhängig von der $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Konzentration, und damit vom Vorhandensein der IP3K-B [Poillon *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2007; Maréchal *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2007; Irvine, 2007]. Unmittelbar verbunden mit der Funktion ist die intrazelluläre Lokalisation der HsIP3K-B. Das Enzym weist Lokalisationen im Zytoplasma, am Endoplasmatischen Retikulum (ER), am F-Aktin und an der Plasmamembran, auf [Brehm *et al.*, 2004, Dewaste *et al.*, 2003, Soriano *et al.*, 1997]. Durch die Arbeiten von Maria Brehm konnte außerdem gezeigt werden, dass sich ein Kernlokalisierungssignal (NLS) innerhalb der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B befindet [Brehm, 2006]. Zusätzlich wurde ein Kernexportsignal (NES) innerhalb der ABD identifiziert [Ernst, 2007]. Somit stellt die ABD der HsIP3K-B eine multifunktionale Domäne für die intrazelluläre Zielsteuerung dar.

Ziel dieser Arbeit war eine experimentelle Identifizierung, eine genaue Charakterisierung sowie eine Klassifizierung des von Maria Brehm gefundenen Kernlokalisierungssignals (NLS) in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B. Außerdem sollte eine quantitative Methode entwickelt werden, um die Stärke der F-Aktinbindung von EGFP-Fusionsproteinen der HsIP3K-B in der H1299- und HeLa-Zelllinie bestimmen zu können. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von „Pseudo-Phosphorylierungs-“ und „Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten“ der HsIP3K-B und damit einhergehend die Klärung der Zielsteuerungsregulation dieses Enzyms über Proteinkinasen. Zusätzlich sollte über Lokalisations-Bestimmungen der endogenen HsIP3K-B in Ratten-Thymozyten, die Aussagekraft der intrazellulären Lokalisationsstudien von EGFP-Fusionsproteinen überprüft werden. Insgesamt sollten die intrazellulären Lokalisationsstudien zum Verständnis der Zusammenhänge von Lokalisation, Funktion und Regulation der HsIP3K-B beitragen.

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Stamm zur Klonierung und Vermehrung von Plasmiden:

Escherichia coli XL1-Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI_q ZDM15 Tn10 (Tet_r)]; (Bullock 1987); Stratagene (Amsterdam, Niederlande)

2.1.2 Zelllinien

2.1.2.1 NCI-H1299-Zellen (*Homo sapiens*)

NCI-H1299 Zellen (ATCC No. CRL-5803) sind humane epitheliale, nicht kleinzellige Lungenkarzinomzellen. Die unbegrenzte Teilungsfähigkeit dieser Zellen ist auf das Fehlen des Tumorsuppressorproteins p53 zurückzuführen, da das p53 Gen homozygot partiell deletiert ist.

2.1.2.2 HeLa- Zellen (*Homo sapiens*)

Hela Zellen (DSMZ No. ACC 57) sind humane epitheliale Cervixkarzinomzellen. Sie sind menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) und die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurden. Die Zellen waren sowohl durch ein virales Protein, welches den p53 Tumorsuppressor inaktiviert, als auch durch eine Mutation in der HLA (Humanes Leukozyten Antigen) Supergenfamilie auf Chromosom 6, zu Tumorzellen entartet. Die Bezeichnung leitet sich vom Namen der Spenderin, Frau Henrietta Lacks, ab.

2.1.3 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden überwiegend von MBI Fermentas (Heidelberg) erworben.

Hind III	Fermentas (Heidelberg)
Sac II	New England Biolabs (Schwalbach)
Xho I	Fermentas (Heidelberg)
Nhe I	Fermentas (Heidelberg)
Dpn I	Fermentas (Heidelberg)

DNA-Polymerasen:

Pfu Turbo® DNA Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Ultra Pfu Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)

Ligase:

T4-DNA-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
---------------	------------------------

Phosphatase:

CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)	Fermentas (Heidelberg)
--	------------------------

2.1.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden kommerziellen Herstellern erworben:

Aldrich (Steinheim)
 Biomol (Hamburg)
 Fluka (Buchs, Schweiz)
 Merck (Darmstadt)
 Sigma (Deisenhofen)

2.1.5 DNA-Molekulargewichtsstandard

1 kb DNA Leiter	GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas, Heidelberg)
-----------------	--

2.1.6 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer, Lösungen und ihrer Zusammensetzung sind nachfolgend aufgeführt.

1 x PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	6,46 mM	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O
	1,47 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,4 mit NaOH einstellen und autoklavieren

RF I	100 mM 50 mM 30 mM 10 mM 15 % (w/v)	RbCl MnCl ₂ * 4H ₂ O K-Acetat CaCl ₂ * 2H ₂ O Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, nach Sterilfiltration bei 4 °C lagern
RF II	10 mM 10 mM 75 mM 15 % (v/v)	MOPS RbCl CaCl ₂ * 2H ₂ O Glycerin pH 6,8 mit Essigsäure einstellen, nach Sterilfiltration bei 4 °C lagern
1 x TAE	40 mM 1 mM	Tris-Acetat EDTA pH 8,0
6 x DNA - Probenpuffer	30 % (v/v) 0,15 % (w/v) 0,15 % (w/v)	Glycerin in H ₂ O Bromphenolblau Xylencyanol
3 % Paraformaldehyd	3 g	Paraformaldehyd in 100 ml auf 60 °C erwärmtes PBS pH 7,2
4',6-Diamidin-2-phenylindol- dihydrochlorid (DAPI)	2 mg/ml	in ddH ₂ O gelöst
Kanamycin-Stocklösung	50 mg/ml	Kanamycin in ddH ₂ O lösen Steril filtrieren, bei – 20 °C lagern
Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml	Ampicillin in ddH ₂ O lösen Steril filtrieren, bei – 20 °C lagern
Leptomycin B-Stocklösung	5 µg/ml	in 70 % Methanol gelöst, bei – 80 °C lagern

2.1.7 Medien

LB-Medium	10 g/l 10 g/l 5 g/l	Bacto-Trypton NaCl Hefeextrakt pH 7,2 mit NaOH einstellen, autoklavieren
Agar-Platten	10 g/l 10 g/l 5 g/l 15 g/l	Bacto-Trypton NaCl Hefeextrakt Agar pH 7,2 mit NaOH einstellen, autoklavieren

2.1.8 Kits

Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Taq-Polymerase Half-Term-Puffer	Genpak/Genetix (New Milton, UK)
DyeEx TM 2.0 Spin Kit	Qiagen (Hilden)
NucleoSpin [®] Extract II	Macherey Nagel (Düren)
NucleoSpin [®] Plasmid Kit	Macherey Nagel (Düren)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Metafectene TM	Biontex (München)
dNTP Set PCR Grade	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.9 Plasmide

pEGFP-N1	Clontech (Palo Alto, CA, USA)
pEGFP-C1	Clontech (Palo Alto, CA, USA)

Im Arbeitskreis hergestellt:

pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp)	(Brehm <i>et al.</i> , 2004)
pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD)	(Brehm <i>et al.</i> , 2004)
pABD(HsIP3K-B)/EGFP	(Brehm <i>et al.</i> , 2004)
pEGFP/HsIP3K-A (Wildtyp)	(Dr. Nalaskowski)
pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD)	(Dr. Nalaskowski)
pEGFP/ABD (HsIP3K-A)	(Dr. Nalaskowski)
pEGFP/HsIPMK (Wildtyp)	(Dr. Nalaskowski)
pEGFP/NLS (HsIPMK)	(Dr. Nalaskowski)

2.1.10 Vektor zur eukaryotischen Expression von EGFP-Fusionsproteinen der HsIP3K-B

Die Lokalisationsstudien wurden mit der Technik der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Für die Detektion des Enzyms wurde zunächst ein Vektor hergestellt, der die eukaryotische Expression eines Fusionsproteins der HsIP3K-B mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) ermöglicht. Für die folgenden Arbeiten wurde ein Fusionsprotein mit EGFP-Tag am C-Terminus benutzt [Brehm *et al.*, 2004] (Abb. 2.1.).

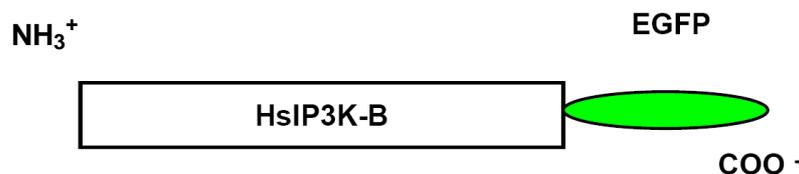


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines EGFP-Fusionsproteins

Dargestellt ist das Konstrukt HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) als EGFP-Fusionsprotein. Der GFP-Tag (grün) ist an seinem N-Terminus mit dem Enzym (weiß) fusioniert.

NH_3^+ : N-terminales Ende; COO^- : C-terminales Ende

2.1.11 Medien für die eukaryotische Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagles Medium	GIBCO BRL (Eggenstein)
OptiMEM	GIBCO BRL (Eggenstein)
0,5 % Trypsin/EDTA	GIBCO BRL (Eggenstein)
Leptomycin B (20 nM)	A.G. Scientific (San Diego, CA, USA)

2.1.12 Antibiotika

Kanamycin	Fluka (Sigma Aldrich, Schweiz)
Ampicillin	Boehringer (Mannheim)
Penicillin-Streptomycin	GIBCO BRL (Eggenstein)

2.1.13 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei MWG (Ebersberg) bestellt.

2.1.13.1 NLS-Mutanten der HsIP3K-B

NLS- Tripelmutante der HsIP3K-B (pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR))

MN406 5' - GGG CCG GAG GAG GCC CAG CAG CAG CTG CGG ATC TTG CAG -3'

MN407 5' - CTG CAA GAT CCG CAG CTG CTG CTG GGC CTC CTC CGG CCC -3'

NLS-Einzelmutante der HsIP3K-B (pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸RKLR))

YL011 5'- GGG CCG GAG GAG GCC CAG AGG AAG CTG CGG A -3'

YL012 5'- T CCG CAG CTT CCT CTG GGC CTC CTC CGG CCC -3'

NLS-Einzelmutante der HsIP3K-B (pHsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸QKLR))

YL013 5'- CCG GAG GAG GCC AAG CAG AAG CTG CGG ATC TT -3'

YL014 5'- AA GAT CCG CAG CTT CTG CTT GGC CTC CTC CGG -3'

NLS-Einzelmutante der HsIP3K-B (pHsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸RQLR))

YL015 5'- GAG GAG GCC AAG AGG CAG CTG CGG ATC TTG C -3'

YL016 5'- G CAA GAT CCG CAG CTG CCT CTT GGC CTC CTC -3'

NLS-Einzelmutante der HsIP3K-B (pHsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸RKLQ))

YL017 5'- GCC AAG AGG AAG CTG CAG ATC TTG CAG CGC GAG -3'

YL018 5'- CTC GCG CTG CAA GAT CTG CAG CTT CCT CTT GGC -3'

NLS-Fusionspeptid der HsIP3K-B (pNLS(HsIP3K-B)/EGFP)

YL019 5'- TCG AGA TGG AGG CCA AGA GGA AGC TGC GGA TCT TGC CGC -3'

YL020 5'- GGC AAG ATC CGC AGC TTC CTC TTG GCC TCC ATC -3'

Phosphorylierte Oligonukleotide- pNLS(HsIP3K-B)/EGFPYL019a 5'- TCG AGA TGG AGG CCA AGA GGA AGC TGC GGA TCT TGC CGC -3'
(mit 5'-Phosphatgruppe)YL020a 5'- GGC AAG ATC CGC AGC TTC CTC TTG GCC TCC ATC -3'
(mit 5'-Phosphatgruppe)**2.1.13.2 FEA-Motiv-Mutanten der HsIP3K-B****FEA 1 (pHsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP))**MN408 5'-ATG TTT GAG GCG CAC CCC CAG GCA CAG CCC TCC GCC ATT CAA
GCG -3'MN409 5'-CGC TTG AAT GGC GGA GGG CTG TGC CTG GGG GTG CGC CTC AAA
CAT -3'

FEA 2 (pHsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA))

YL029 5'- CAG AAA GTG GGC ATG CAG GCG GCG CAC ATC CAG GCA -3'

YL030 5'- TGC CTG GAT GTG CGC CGC CTG CAT GCC CAC TTT CTG -3'

2.1.13.3 Pseudo-Phosphorylierungsmutanten der HsIP3K-B**Pseudo-Phosphorylierungsmutante S99E**

MN390a 5'- GGC AGT AGC GTG AGC GAA CCA AGT TGG GCT GGT -3'

MN391a 5'- ACC AGC CCA ACT TGG TTC GCT CAC GCT ACT GCC -3'

Pseudo-Phosphorylierungsmutante S101E

MN392a 5'- AGC GTG AGC AGC CCA GAG TGG GCT GGT CGC CTG -3'

MN393a 5'- CAG GCG ACC AGC CCA CTC TGG GCT GCT CAC GCT -3'

Pseudo-Phosphorylierungsmutante S120E

MN394a 5'- GCA GCC GGT ACC CTC GAG CCG CCA GGG CCG GAG -3'

MN395a 5'- CTC CGG CCC TGG CGG CTC GAG GGT ACC GGC TGC -3'

Pseudo-Phosphorylierungsmutante S159E

MN396a 5'- ATC CAG GCA CAG AGC GAG GCC ATT CAA GCG CCC -3'

MN397a 5'- GGG CGC TTG AAT GGC CTC GCT CTG TGC CTG GAT -3'

Pseudo-Phosphorylierungsmutante S166E

MN398a 5'- ATT CAA GCG CCC CGC GAA CCG CGT TTG GGC AGG -3'

MN399a 5'- CCT GCC CAA ACG CGG TTC GCG GGG CGC TTG AAT -3'

Pseudo-Phosphorylierungsmutante S174E

YL021 5'- TTG GGC AGG GCT CGC GAA CCC TCC CCG TGC CCC -3'

YL022 5'- GGG GCA CGG GGA GGG TTC GCG AGC CCT GCC CAA -3'

Pseudo-Phosphorylierungsmutante S176E

YL025 5'- AGG GCT CGC TCG CCC GAG CCG TGC CCC TTC CGC -3'

YL026 5'- GCG GAA GGG GCA CGG CTC GGG CGA GCG AGC CCT -3'

2.1.13.4 Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten der HsIP3K-B

Pseudo-Dephosphorylierungsmutante S99A

YL001 5'- GGC AGT AGC GTG AGC GCC CCA AGT TGG GCT GG -3'

YL002 5'- CC AGC CCA ACT TGG GGC GCT CAC GCT ACT GCC -3'

Pseudo-Dephosphorylierungsmutante S101A

YL003 5'- AGC GTG AGC AGC CCA GCT TGG GCT GGT CGC CT -3'

YL004 5'- AG GCG ACC AGC CCA AGC TGG GCT GCT CAC GCT -3'

Pseudo-Dephosphorylierungsmutante S120A

YL005 5'- GCA GCC GGT ACC CTC GCC CCG CCA GGG CCG G -3'

YL006 5'- C CGG CCC TGG CGG GGC GAG GGT ACC GGC TGC -3'

Pseudo-Dephosphorylierungsmutante S159A

YL007 5'- ATC CAG GCA CAG AGC GCC GCC ATT CAA GCG C -3'

YL008 5'- G CGC TTG AAT GGC GGC GCT CTG TGC CTG GAT -3'

Pseudo-Dephosphorylierungsmutante S166A

YL009 5'- ATT CAA GCG CCC CGC GCC CCG CGT TTG GGC AG -3'

YL010 5'- CT GCC CAA ACG CGG GGC GCG GGG CGC TTG AAT -3'

Pseudo-Dephosphorylierungsmutante S174A

YL023 5'- TTG GGC AGG GCT CGC GCG CCC TCC CCG TGC C -3'

YL024 5'- G GCA CGG GGA GGG CGC GCG AGC CCT GCC CAA -3'

Pseudo-Dephosphorylierungsmutante S176A

YL027 5'- AGG GCT CGC TCG CCC GCC CCG TGC CCC TTC C -3'

YL028 5'- G GAA GGG GCA CGG GGC GGG CGA GCG AGC CCT -3'

2.1.14 Sequenzieroligonukleotide für HsIP3K-B/EGFP

MB001 (bp462, vorwärts) 5'- CCA GGC ACA GAG CTC CGC CA -3'

MB009 (bp1, vorwärts) 5'- tca age ttC GAT GGC TGT GTA CTG CTA TGC G -3'

MN007 (EGFP, vorwärts) 5'- CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G -3'

MN008 (EGFP, rückwärts) 5'- CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G -3'

UB231 (bp1) 5'- GAG GTC TCG AAT GGC TGT GTA CTG CTA TGC -3'

2.1.15 Geräte

Analysenwaage <i>BP 221S</i>	Sartorius (Göttingen)
Autoklav 5075 ELV	Systec (Wettenberg)
Brutschrank für Bakterienkultur	Memmert (Schwabach)
Duran Glasgeräte	Schott, Brand (Mainz)
Feinwaage PM 480 <i>Delta range</i>	Mettler (Giessen)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25 CFL	Zeiss (Göttingen)
Elektrophoresenkammer	MWG-Biotech (Ebersberg)
Heizblock <i>Thermomixer 5436</i>	Eppendorf (Hamburg)
Heizblock <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf (Hamburg)
Inkubator mit CO ₂ -Begasung für Zellkultur	Heraeus (Hanau)
Kamera DX30	Kappa (Hanau)
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph (Schwabach)
Mischer VF2	KIKA-Labortechnik (Staufen)
PCR-Maschinen: <i>Mastercycler Gradient/Personal</i>	Eppendorf (Hamburg)
Netzanschlussgerät <i>Gene Power Supply GPS 200/400</i>	Pharmacia (Stockholm, Schweden)
Durchlichtmikroskop CK2	Olympus (Hamburg)
pH-Meter pH526	WTW (Weilheim)
pH-Elektroden <i>SenTix mic</i> und <i>Sentix 41</i>	WTW (Weilheim)
Photometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf (Hamburg)
Pipette, Model <i>Reference</i> , 1 - 10 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipette, Model <i>Reference</i> , 10 - 100 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipette, Model <i>Reference</i> , 50 - 250 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipette, Model <i>Reference</i> , 250 - 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe <i>accu-jet</i>	Brand (Wertheim)
Schüttelinkubator Serie 25	New Brunswick, Scientific Co. Ins. (NJ, USA)
Sterile Werkbank <i>LaminAir HB 2448K</i>	Heraeus (Hanau)
Sterile Werkbank <i>Herasafe</i>	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus (Hanau)
Videodokumentationssystem, Kamera <i>VarioCam</i>	Phase (Lübeck)
Wasserbad GFL 1086	Wesarg (Hamburg)

Zentrifuge *Sorvall RC 5C plus*
mit GSA- und SS-34-Rotor

Sorvall (Utah, USA)

Vakuumzentrifuge

Bachofer (Reutlingen)

UV-Tisch

Bachofer (Reutlingen)

2.1.16 Verbrauchsmaterialien

Chamber Slide (4 Kammern)

Nalgen Nunc

International

Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (steril), 75 cm²

Greiner (Frickenhausen)

Injektionskanüle 0,55/25 mm

Braun (Kronberg)

Küvetten *Uvette 220* (50 bis 2.000 µl)

Eppendorf (Hamburg)

Pipetten

Beckton Dickinson
(NJ,USA)

Pipettenspitzen

(Sarstedt)

Reaktionsgefäße aus Polypropylen (0,2, 1,5 und 2,0 ml)

Eppendorf (Hamburg)

Spritzen (steril, 20 und 60 ml)

Braun (Kronberg)

Sterilfilter *Millex* 0,22 µm

Millipore (Schwalbach)

Probenröhrchen mit Schraubverschluss aus Polypropylen,
Spitzboden (steril, 50 ml, *BlueMax*)

Greiner (Frickenhausen)

Probenröhrchen mit Schraubverschluss aus Polypropylen,
Spitzboden (steril, 15 ml, *BlueMax*)

Greiner (Frickenhausen)

Pasteurpipetten

Brand (Wertheim)

2.1.17 Software

Kappa ImageBase Kappa

Kappa (Gleichen)

Corel PHOTO-PAINT 11

Koch Media,

Deutschland GmbH

Corel PHOTO-PAINT 9

Koch Media,

Deutschland GmbH

Photoshop 7.0

Adobe Systems Incorporated
(San Jose, USA)

ImageJ

Wayne Rasband (NIH,USA)

BioEdit

Tom Hall

Sigma Stat 3.10

Systat Software Inc.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Alle Lösungen und Medien sowie Reaktionsgefäße, Glaswaren und Pipettenspitzen, werden vor der Verwendung bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 1,2 bar für 35 min autoklaviert. Lösungen mit hitzelabilen Zusätzen wie Antibiotika werden sterilfiltriert. Arbeitsflächen und Geräte werden durch Besprühen mit 70 %igem Ethanol desinfiziert.

2.2.1.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli* Kulturen

Um homogene Plasmid-Präparationen gewinnen zu können, werden Bakterienkulturen aus einem einzigen Klon gezüchtet. Dazu werden Zellen einer Flüssigkultur durch Ausstreichen auf einer LB-Agar-Platte vereinzelt und umgedreht in den Brutschrank gestellt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C sind aus den einzelnen Bakterien Kolonien herangewachsen, die für Mini- bzw. Maxi-Präparationen verwendet werden können. Die Agar-Platten können mit Parafilm versiegelt bis zu 4 Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

2.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Mit dieser Methode werden die Bakterien für die Aufnahme von Plasmiden „kompetent“ gemacht. Da die Transformation freier DNA durch Bakterien unter natürlichen Bedingungen nicht sehr effizient verläuft, müssen die Bakterien zunächst für die Aufnahme von Plasmid-DNA vorbereitet werden.

3 ml LB-Medium mit 6 µl Tetracyclin (50 µg/ml) in einem Übernachtröhrchen wurden mit einem Klon XL-1-Blue angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde 1 ml aus dem Übernachtröhrchen in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 schüttelinkubiert. Anschließend werden die Zellen 15 min auf Eis gekühlt. Die Sedimentation erfolgt durch Zentrifugation bei 4 °C, 2.000 rpm für 15 min.

Der Überstand wird dekantiert und das Pellet mit 33,3 ml vorgekühltem RF-I-Puffer resuspendiert und wiederum 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird 15 min bei 2.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird erneut dekantiert und die Zellen in 8 ml vorgekühltem RF-II-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Danach werden zügig Aliquots von 100 µl abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

2.2.1.3 Hitzeschocktransformation von *E. coli* nach [Hanahan, 1983]

Die Transformation beschreibt den Vorgang des Einbringens von freier Fremd-DNA in die Bakterien. Das mutagenisierte Plasmid wird in den Klonierungsstamm *E. coli* XL 1 blue transformiert. Mithilfe zelleigener Reparatursysteme der *E. coli* werden die bei der QuikChangeTM- Mutagenese entstandenen Nicks geschlossen. Das Plasmid kann methyliert und repliziert werden. Hier spielt die „Hitzeschock“-Behandlung eine wesentliche Rolle. Sie sorgt dafür, dass das „Fluid-Mosaik“ der Bakterienzellwand gelockert wird, sodass die DNA eindringen kann. Zugleich ist sie der kritische Schritt in der Transformation, weil die löchrigen Zellen extrem empfindlich sind und das abrupte Einbringen der Plasmid-DNA der Gefahr einer Zerstörung der Zellwand mit sich bringen kann.

Durch das zusätzliche Einbringen eines Kanamycin-Resistenzgens, welches in den Expressionsplasmiden pEGFP-C1 und pEGFP-N1 vorhanden ist, enthalten die transformierten Zellen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Kanamycin-Platten kommt es zu einer Selektion der transformierten *E. coli*.

Ein Aliquot (100 µl) chemisch-kompetenter *E. coli* XL1 blue -Zellen wird 15 min auf Eis aufgetaut. Danach fügt man 1-10 µl Plasmid-DNA-Lösung hinzu und vermischt sie. Es folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Der Hitzeschock wird dann für 60 sec bei 42 °C im Heizblock vollzogen und nachfolgend 0,5 min auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz werden 900 µl vorgewärmtes steriles LB-Medium pipettiert. Das Wachstum der Zellen erfolgt 1 h im Thermoschüttler (350 rpm, 37 °C). Anschließend werden 100-900 µl der Zellen auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Die Platten werden invertiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA („Maxi-Präparation“)

Die Plasmid-Maxipräparation dient dazu, die Plasmid-DNA aus den Zellen der am Tag zuvor gepickten Bakterienklone, zu isolieren. Für die Präparation wird das EndoFree Plasmid Maxi Kit von QIAGEN verwendet. Es handelt sich hier um ein Reinigungsprinzip, bei dem die Plasmid-DNA an das QIAGEN Anionen-Austausch Harz gebunden und somit isoliert wird. Die Durchführung erfolgt gemäß den Anweisungen des EndoFree Plasmid Maxi Kit-Protokolls von QIAGEN.

Für die Plasmid-Maxipräparation wurden die nach der Transformation auf den Agarplatten gewachsenen Klone gepickt und in einem mit Kanamycin (50 µl/ml) angeimpften Übernächtröhrchen mit 3 ml LB-Medium (1:1000 Verdünnung) für acht Stunden im Schüttelinkubator bebrütet (37 °C; 220rpm). Das Antibiotikum dient der Selektion der Bakterien. Anschließend werden 300 ml LB-Medium mit 200 µl der Vorkultur angeimpft und für 12 bis 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Auch hier wird das LB-Medium zuvor mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Übernächtkultur wird bei 6000 g, 4°C für 15 min zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Resuspensions-Lösung aufgenommen. Zu dem resuspendierten Pellet werden nun 10 ml Lysis-Puffer dazugegeben, mehrmals invertiert und für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präzipitation wird durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 verbessert. Das Lysat wird in die Tube des Filters geschüttet und für weitere 10 min inkubiert. Danach wird das Lysat durch den Filter gepresst und in einem 50 ml Probenröhrchen gesammelt. 2,5 ml ER (*endotoxin removal*) Puffer werden hinzugefügt, mehrmals invertiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wird die Säule zusammen mit dem Filter mit 10 ml des Äquilibrier-Puffers QBT äquilibriert. Nach der Inkubation wird das filtrierte Lysat vorsichtig auf den Filter gegeben, wobei sich die DNA an die Matrix bindet. Anschließend wird der Filter zusammen mit der Säule zweimal mit 30 ml des Wasch-Puffers QC versetzt. Daraufhin wird 15 ml Elutions-Puffer QN auf die Säule gegeben und anschließend mit 10,5 ml Isopropanol bei 15 000 g, 4 °C für 30 min präzipitiert. Das DNA-Pellet wird nun mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und bei 15 000 g für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wird das DNA-Pellet für 30 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und in 250 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA („Mini-Präparation“)

Wie die Plasmid-Maxipräparation, dient die Plasmid-Minipräparation der Plasmidisierung des gewünschten Plasmids, jedoch im Miniaturmaßstab. Alle Plasmid-DNA Extraktionen werden gemäß den Anweisungen des MACHEREY-NAGEL-Standardprotokolls zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* mit NucleoSpin® Plasmid, durchgeführt. Das Prinzip der Extraktion besteht in der basischen Lyse der Bakterienzellen und einer anschließenden Adsorption der DNA auf einer Silica-Matrix. Der optionale für Weiterverwendung der DNA in Sequenzierreaktionen oder enzymatischen Anwendungen empfohlene Waschschriff mit dem AW Puffer (50°C) wird stets durchgeführt.

Für die Plasmid-Minipräparation wurden die nach der Transformation auf den Agarplatten gewachsenen Klone gepickt und mit 3 µl Kanamycin (50 µl/ml) angeimpften Übernächtröhrchen (3 ml LB-Medium) über Nacht im Schüttelinkubator bebrütet (37 °C; 220rpm). Auch hier wird durch das Antibiotikum ein Selektionsdruck ausgeübt, um zu gewährleisten, dass sich ausschließlich die Bakterien mit dem gewünschten mutierten Plasmid vermehren. Die Übernächtkultur wird durch mehrmaliges Zentrifugieren in 2 ml Eppendorfgefäßen bei 11.000 g für 30 sec pelletiert. Das Pellet wird in 250 µl A1-Puffer resuspendiert und mit 250 µl A2-Puffer lysiert. Die Suspension wird nach mehrmaligem Invertieren für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Vorgang der Lyse zu stoppen wird die Suspension mit 300 µl A3-Puffer unter mehrmaligem Invertieren neutralisiert, wobei sich ein flockiger, weißer Niederschlag bildet. Die Suspension wird nun für 10 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird auf die Spin-Säule, die in einem 2 ml Gefäß platziert ist, gegeben und bei 11.000 g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, da die Matrix die DNA bindet. Anschließend erfolgen zwei Wasch-Schritte: zunächst wird die Matrix mit 500 µl 50 °C warmen AW-Puffer versetzt und für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Im zweiten Waschschriff wird die Matrix mit 500 µl A4-Puffer versetzt und ebenfalls für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Die Matrix wird nochmals für 2 min bei 11.000 g zentrifugiert, um den restlichen Wasch-Puffer zu entfernen, und wird daraufhin in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Abschließend wird die DNA von der Matrix mit 50 µl AE-Puffer (pH 8-8,5) bei 11.000 g eluiert.

2.2.2.3 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA

Bei dieser DNA-Bestimmung wird sowohl die Menge der isolierten DNA geprüft, als auch die Reinheit kontrolliert. Dieser Schritt ist insofern wichtig, da für die anschließende Sequenzierung eine definierte Menge an möglichst reiner DNA eingesetzt werden muss.

Es gilt hierbei, dass der Quotient der UV-Absorption von der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum der DNA) und die bei 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine), zwischen 1,8 und 2,0 liegen soll. Je stärker der Wert davon abweicht, desto unreiner ist die vorliegende DNA.

95 µl ddH₂O wird in eine Microküvette pipettiert, um vom Photometer den Blank-Wert zu bestimmen. 5 µl der isolierten Plasmid-DNA werden dazugegeben und erneut gemessen. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm, einer Konzentration von 50 µg/ml.

2.2.2.4 Cycle Sequencing

Beim Cycle Sequencing handelt es sich im Grunde genommen um eine Sequenzanalyse.

Sie liefert die letzte Sicherheit, ob die aufgenommenen DNA tatsächlich die gewünschte Mutation beinhaltet. Sein Prinzip entspricht der DNA-Sequenzierung durch die Kettenabbruchmethode nach Sanger [Sanger *et al.*, 1977]: Anhand von DNA-Matrizen werden in einer zyklisch enzymatischen Reaktion *in vitro* durch einen kontrollierten Abbruch DNA-Fragmente erzeugt. Im Vergleich zur traditionellen Sequenzierung ist die Methode viel sparsamer, da nur sehr wenig Template-DNA eingesetzt werden muss.

Zunächst hybridisiert der Primer am 3'-Ende der Matrizen-DNA. Eine DNA-Polymerase synthetisiert dann aus den vier Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), die dem Reaktionsgemisch zugesetzt sind, den komplementären DNA-Strang. Anders als bei der PCR werden auch 2',3'-Dideoxynucleotide (ddNTPs) zugesetzt, nach deren Einbau die Strangsynthese abgebrochen wird, da sie keine 3'-Hydroxylgruppe besitzen und es zu keiner weiteren Phosphodiesterbindung kommen kann. Der Sequenzierungsansatz enthält alle vier dNTPs, sowie ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP). Ähnlich der PCR, erfolgt die Replikation auch hier durch mehrmaliges Durchlaufen von Denaturierung, Annealing und Elongation. Jedoch wird bei der Sequenzierung nur ein Primer eingesetzt, so dass entweder der Matrizen- oder der Komplementärstrang repliziert wird. Da zu jedem Zeitpunkt der Synthese der Zufall entscheidet, ob ein normales (dNTP) oder ein modifiziertes Nucleotid (ddNTP) eingebaut wird, entstehen DNA-Fragmente jeder Länge. Sie beginnen jeweils mit der Primer-Sequenz und enden mit einem bestimmten ddNTP.

Durch eine zusätzliche Markierung der ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, können alle Fragmente in einer automatischen Sequenzgel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Anregung mit Laserlicht detektiert werden.

Durchführung:

In einem 0,2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wird folgender Reaktionsansatz zusammenpipettiert:

Sequenzierungsansatz: Gesamtvolumen 20 µl	
x µl	Plasmid-DNA (400-500 ng)
1,5 µl	Sequenzierprimer (10 pmol/µl)
3 µl	BigDye Reagenz
5 µl	Half Term Verdünnungspuffer
ad 20 µl	ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz durchläuft im Thermocycler (*Mastercycler personal*, Eppendorf) folgendes Programm:

Sequenzierungsprogramm		
25x	10 sec	Denaturierung 96°C
	5 sec	Annealing 50°C
	4 min	Elongation 60°C

Nach Beendigung der Replikation im Thermocycler wird der Ansatz mit Hilfe des *DyeExTM 2.0 Spin Kits* gereinigt. Die Sequenzierung der entstandenen Fragmente erfolgt mittels elektrophoretischer Trennung und Fluoreszenz im Sequenzierlabor des Instituts für Pathologie am UKE.

2.2.2.5 *QuikChange*TM Mutagenese

Die *QuikChange*-PCR-Mutagenese ist eine Methode, mit der man unter geringem Zeitaufwand gezielte Punktmutationen, Insertionen und Deletionen in Plasmiden erzeugen kann.

Bei der *QuikChange*-Mutagenese lässt sich durch Zugabe von zwei Primern, die beide die gewünschte Mutation enthalten, das komplette Plasmid bilden. Dabei wird als Template ein supercoiled, doppelsträngiger Vektor mit dem zu mutierenden Insert eingesetzt. Hierbei sind, im Unterschied zur normalen PCR, die Primer komplementär und die Elongationsrichtung geht von einer Stelle im Plasmid aus. Von dieser Stelle wird nach beiden Seiten der Sequenz elongiert, bis eine vollständige Elongation am gesamten Plasmid erfolgt ist (siehe Abbildung 2.2). Außerdem benötigt man eine Proofreading-Polymerase (z.B. *Pfu*-Polymerase), dNTPs, *Pfu* Polymerase Puffer und die Template-DNA als Matrizenstrang. Die Primer führen die Mutation ein, wobei die Template Plasmid-DNA erhalten bleibt. Als Produkte entstehen eine mutierte Plasmid-DNA und eine unmutierte Template Plasmid-DNA.

Durchführung:

In zwei 0,2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße werden zusammenpipettiert:

Tube 1)

<i>QuikChange</i>-Mutagenese-Ansatz in Tube 1): Gesamtvolumen 25 µl	
2,5 µl	Template DNA (10 ng/µl)
1 µl	Mutagenese-Primer F (10 pmol/µl)
1,25 µl	dNTPs (5mM)
0,5 µl	Turbo-Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
2,5 µl	<i>Pfu</i> Polymerase Puffer (10x)
17,3 µl	ddH ₂ O

Tube 2) wie Tube 1) aber:

Anstatt 1 µl Mutagenese-Primer **F** (forward), 1 µl Mutagenese-Primer **R** (reverse).

Die Ansätze werden in den Eppendorf Thermocycler (*Mastercycler personal*, Eppendorf) gestellt und folgendes Programm gestartet:

QCM-Programm:		
30 sec	initiale Denaturierung	95°C
30 sec	Denaturierung	95°C
1 min	Annealing	55°C
8 min	Elongation	68°C

10x

Die Tubes werden vereinigt, 1 µl Turbo-Pfu DNA-Polymerase zupipettiert und weitere 18 Zyklen laufen gelassen.

Nach Ablauf der Reaktion werden die Ansätze für einige Minuten zum Abkühlen auf Eis gestellt.

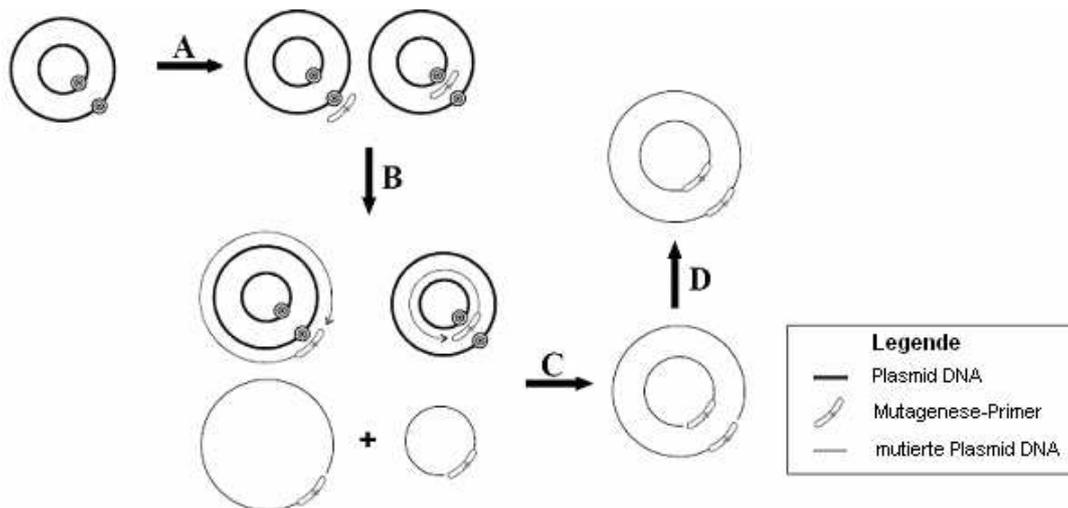


Abb.2.2: Prinzip der *QuikChange*TM-Mutagenese (QCM)

- A: In zwei getrennten Ansätzen lagern sich zwei komplementäre Primer, die die gewünschte Mutation tragen, an die entsprechenden Sequenzbereiche des Plasmids an.
- B: Durch die Aktivität der *Pfu*-Polymerase werden die Primer zu einer nicht-methylierten Plasmid DNA, die die gewünschte Mutation trägt, verlängert.
- C: Nach Vereinigung und Amplifizierung der zwei Ansätze, werden mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* die methylierten Ausgangsplasmide und die hemimethylierten Plasmide entfernt. Nur die vollständig nicht-methylierte Plasmid DNA, die in beiden Strängen die gewünschte Mutation trägt, bleibt erhalten.
- D: Durch die Transformation wird das Plasmid in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen eingebracht. Das eigene Reparatursystem der *E. coli* Zellen schließt die Nicks, methyliert und repliziert das Plasmid, so dass die mutierte Plasmid DNA durch eine Mini-Präparation gewonnen werden kann.

2.2.2.6 Präparativer Dpn I-Restriktionsverdau

Da man zur Weiterverarbeitung ausschließlich die mutierten Plasmide haben will, muss man die Template Plasmid-DNA entfernen. Die Template Plasmid-DNA ist, im Gegensatz zu der neu synthetisierten mutierten Plasmid-DNA, meistens methyliert, da die meisten Bakterienstämme das *dam*-Methylierungssystem besitzen. Das *dam*-Gen kodiert eine Methyltransferase, die Adenin in der Zielsequenz GATC an Position N6 methyliert [Urig *et al.*, 2002]. Mit der Zugabe von dem Restriktionsenzym *Dpn* I, das spezifisch methylierte und hemimethylierte, jedoch nicht unmethylierte DNA, hydrolysiert, ist man in der Lage ausschließlich Template Plasmid-DNA zu entfernen (Zielsequenz: 5'-Gm⁶ATC-3'). Dies ist wichtig, damit nur die mutierte Plasmid-DNA transformiert wird, und später nach dem Erfolg der eingeführten Mutation untersucht werden kann.

Durchführung:

10 µl vom QCM-Ansatz werden als Kontrollen für die analytische Agarose-Gelelektrophorese abgenommen. Die restlichen 40 µl werden mit dem Restriktionsenzym *Dpn* I verdaut.

In einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß werden zusammenpipettiert:

Ansatz für den Dpn I-Verdau	
40 µl	PCR-Ansatz
1 µl	<i>Dpn</i> I (10 U/µl)

Der Ansatz wird 1 Stunde bei 37°C im Heizblock inkubiert. 10 µl werden für die Agarose-Gelelektrophorese entnommen.

2.2.2.7 Analytische Auftrennung von DNA durch die Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen Charakterisierung von DNA-Fragmenten. Hierbei werden Nukleinsäure-Fragmente durch Wanderung entlang eines elektrischen Feldes ihrer Größe und ihres Gewichtes nach aufgetrennt. Die Ursache der Wanderung liegt in der negativen Ladung der DNA (negativ geladene Phosphatgruppen). Dadurch wandern sie in der Elektrophorese zum Plus-Pol, wobei gilt, dass je kleiner und leichter die DNA ist, desto schneller und weiter läuft sie.

Zur Auftrennung werden 0,8%ige Agarosegele verwendet. Es werden 0,4 g Agarose (SeaKem LE Agarose, BMA Rockland, ME USA) mit 50 ml 1x TAE-Puffer ca. 2 min aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wird sie mit 1µl Ethidiumbromid-Lösung (2 mg/ml) versetzt und für eine halbe Stunde in eine Gelkammer mit Kamm zum Aushärten überführt.

Durch Anfärben mit Ethidiumbromid (baseninterkalierender Fluoreszenzfarbstoff) können später die Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Je nach zurückgelegter Laufstrecke, lässt sich durch Vergleich mit einer 1 kb DNA Leiter (Längenstandard) auf die Anzahl der Basenpaare der vorliegenden DNA-Fragmente schließen. Anschließend wird die DNA mit 6x DNA Probenpuffer versetzt und in die Taschen des ausgehärteten Agarosegels pipettiert. Die DNA-Fragmente werden bei einer Spannung von 80 V für ca. 45 min in der mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt, anschließend auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Videodokumentationssystem festgehalten.

Probenvorbereitung:

Lane	Probe	H ₂ O	6x DNA Loading-Buffer
1	10 µl vor Dpn I Verdau	-	2 µl
2	10 µl nach Dpn I Verdau	-	2 µl
3	1 µl 1 kb DNA-Ladder	9 µl	2 µl

2.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die 0,7%ige präparative Agarose-Gelelektrophorese wird bei 80 V für 45 min durchgeführt. Dabei wird der TAE-Puffer stets neu angesetzt.

Zur Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „NucleoSpin[®] Extract II-Kit“ von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Prinzipiell werden bei der Gelextraktion die Wasserstoffbrückenbindungen der Agarose-Polymere durch Erwärmen und unter dem Einfluß chaotroper Salzen gelöst, wobei die DNA aus der Lösung verdrängt wird. Dadurch wird die Bindung der DNA an der Silica-Membran in der Säule ermöglicht. Die Elution der DNA von der Silica-Membran erfolgt durch den leicht alkalischen Puffer NE (5mM Tris/HCl, pH 8,5).

2.2.2.9 Oligo-Ligation

Unter Ligation versteht man ein Verfahren, bei dem „fremde“ DNA in Plasmide eingebracht wird. Dabei werden mit Hilfe der T4-Ligase unter ATP-Verbrauch, das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure unter Bildung eines Phosphodiesters, verbunden.

Durchführung:

Die Ansätze für die Ligation werden jeweils in einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Zunächst wird ein Mix aus Wasser und zwei Primern zusammengemischt.

Mix-Ansatz: Gesamtvolumen 40 µl	
38 µl	ddH ₂ O
1 µl	Primer 1 (100 µM)
1 µl	Primer 2 (100 µM)

Der Ansatz wird bei 95°C, 5 min lang im Heizblock inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf Eis abgekühlt. Danach wird eine 1:100 Verdünnung hergestellt. Der Ligationsansatz wird in einem 0,2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Ligationsansatz: Gesamtvolumen 10 µl	
2 µl	Vektor-DNA
2 µl	Mix-Verdünnung (Insert-DNA)
1 µl	Ligase-Puffer (10x)
4 µl	ddH ₂ O
1 µl	T4-DNA-Ligase

Der Ansatz wird 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

Reaktionsgefäße, Glaswaren, Pipettenspitzen und Lösungen werden bei 121°C und 1,2 bar für 35 min autoklaviert. Arbeitsflächen und Geräte werden durch Besprühen mit 70 %igem Ethanol desinfiziert.

2.2.3.2 Kontinuierliche Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Die Kultivierung der H1299- und der HeLa-Zellen erfolgt in T75 Gewebekulturflaschen (250 ml; Greiner, Frickenhausen) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FCS (fötale Kälberserum, engl. *fetal calf serum*) und 1 % PenStrep (Penicillin – Streptomycin) bei 37°C und 5 % CO₂. Etwa alle 2 Tage erreichen die adhärent wachsenden Zellen eine 80%ige Konfluenz und werden passagiert. Zuvor werden alle Lösungen auf 37°C vorgewärmt. Das Medium wird abgesaugt und der Zellrasen mit 10ml PBS (37°C) gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 2 min mit 2ml Trypsin EDTA von der Flaschenoberfläche abgelöst. Durch das manuelle Beklopfen der Flasche wird zusätzlich das Ablösen der Zellen unterstützt. Danach werden sie in 10ml Medium resuspendiert und zum Aufbrechen von Zellaggregaten ca. 10-mal auf- und abpipettiert. Die anschließende Menge der zu entnehmenden Zellsuspension richtet sich nach der Konfluenz der Zellen. Beim Passagieren im 48 Stunden-Intervall werden 10 ml der Zellsuspension entnommen, die zur Aussaat in Kammerdeckgläser (Chamber-Slides) für Transfektionsexperimente zur Verfügung stehen. Die in der Flasche verbleibenden 2 ml der Zellsuspension werden mit 10 ml Vollmedium aufgefüllt und weiter kultiviert.

2.2.3.3 *In vivo* Lokalisation der Mutanten des EGFP-Fusionsproteins der HsIP3K-B

Für alle Lokalisationsstudien wurden die humane Tumorzelllinie H1299 (nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom) und die humane Tumorzelllinie HeLa (epitheliale Cervixkarzinomzellen) verwendet und mit dem Wildtyp HsIP3K-B sowie ihrer Mutanten, transient transfiziert. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt.

Die Analyse der GFP-Fluoreszenzbilder erfolgte mit der Software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>, Stand: 03.07.2007).

2.2.3.4 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Im Gegensatz zur Transformation, die den Vorgang der Aufnahme von freier DNA bei Bakterien beschreibt, versteht man unter der Transfektion das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellkulturzellen. Hierbei unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion). In dieser Arbeit wurde stets die transiente Transfektion durchgeführt. Je nach Zellart eignen sich verschiedene Verfahren, wie zum Beispiel die Calcium-Phosphat-Präzipitation, die Mikroinjektion, die Elektroporation und die Transfektion durch kationische Lipidvesikel. Letztere wurden im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung des liposomalen Transfektionsreagenzes MetafecteneTM (Biontex, München) durchgeführt. Das Prinzip besteht in der elektrostatischen Anziehungskraft zwischen der positiv geladenen Oberfläche der Liposomen und dem Phosphatrückgrat der DNA sowie der negativ geladenen Oberfläche von Zellmembranen. Dadurch bildet sich eine hydrophobe Hülle um die DNA. Diese Vesikel können leicht mit der Zellmembran verschmelzen, wonach die Fracht ins Cytosol abgegeben oder endozytiert wird. Der genaue Ablauf dieses Prozesses ist jedoch noch unklar.

Zur Durchführung der transienten Transfektion werden zunächst zwei Verdünnungen der Zellsuspension nach dem Passagieren hergestellt (Verdünnung A: 1:5, Verdünnung B: 1:10). Dann werden beide Verdünnungen in je zwei Kammern eines Vierkammer-Deckgläsern (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Währenddessen wird der Transfektionsmix mit dem liposomalen Transfektionsreagenz MetafecteneTM (Biontex, München) vorbereitet. Dafür werden zwei Lösungen (A und B) hergestellt.

Lösung A: 50 µl OptiMEM I (37°C)
1 µg Plasmid-DNA
mischen durch auf- und abpipettieren

Lösung B: 50 µl OptiMEM I (37°C)
6 µl MetafecteneTM (RT)
mischen durch auf- und abpipettieren

Lösung A wird zu Lösung B gegeben, der Ansatz durch einmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In jede Kammer des Vierkammer-Deckglases werden 25 µl des Transfektionsansatzes gegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.5 Leptomycin B-Behandlung von eukaryotischen Zellen

Das Leptomycin B (LMB) ist ein von *Streptomyces* produziertes Toxin und wird in der Signaltransduktion als ein Inhibitor des Kernexports verwendet. Die Leptomycin B-Behandlung blockiert das CRM1 (auch Exportin1 genannt), welches viele Proteine und RNA-Proteinkomplexe in das Zytoplasma exportiert [Wolff *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1990; Kudo *et al.*, 1999; Fukuda *et al.* 1997; Kudo *et al.*, 1998; Asscher *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2002]. Somit verbleiben die Proteine nach LMB-Zugabe trotz eines Kernexportsignals im Zellkern. Um das Exportsignal zu untersuchen werden H1299- und HeLa- Zellen nach der Transfektion mit Leptomycin B behandelt. Zunächst wird das Medium mit dem Transfektionsansatz vom Vortag aus den Kammern des Deckglases abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Dann werden die Zellen pro Kammer mit 250 µl eines 20 nM Leptomycin B-haltigem Vollmedium versetzt und sechs Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgt die Fixierung der Zellen.

2.2.3.6 Fixierung der eukaryotischen Zellen

Mit der Fixierung werden eine längere Haltbarkeit und auch eine mechanische Stabilität der Zellen erreicht. Das Prinzip besteht in der Bildung kovalenter Bindungen freier Aminogruppen, was zur Vernetzung benachbarter Proteine führt.

In der Durchführung wird zunächst das Medium mit dem Transfektionsansatz vom Vortag aus den Kammern des Deckglases abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgt mit 3%igem Paraformaldehyd in PBS für 10 min im Brutschrank bei 37 °C. Anschließend werden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen (37 °C).

2.2.3.7 Färbung der Zellkerne

Die Färbung der H1299-Zellkerne erfolgt mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI), einem AT-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff, der mit DNA interkaliert und bei UV-Anregung (340 nm) mit einer Wellenlänge von 490 nm blau fluoresziert.

Nach der Fixierung werden 250 µl DAPI in 1x PBS (10 µg/ml) in die entsprechenden Kammern des Deckglases gegeben und im Brutschrank bei 37°C für 10 min inkubiert.

Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (37°C) und zur Lagerung mit 300 µl 1x PBS überschichtet.

Die DAPI-Färbung ist lichtempfindlich und sollte stets im Dunkeln bei 4°C gelagert werden.

2.2.3.8 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

Das grün fluoreszierende Protein (Abkürzung GFP; engl. *green fluorescent protein*) ist ein erstmals 1961 von Osamu Shimomura beschriebenes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das die Eigenschaft besitzt bei Anregung mit blauen oder ultraviolettem Licht (395 nm und 475 nm), grünes Licht der Wellenlänge 509 nm zu emittieren [Smith *et al.*, 2002]. Seine kaum zu überschätzende Bedeutung in der Biologie, insbesondere der Zellbiologie, liegt in der Möglichkeit, GFP mit beliebigen anderen Proteinen zu fusionieren.

Der eigentliche Fluorophor des GFPs bildet sich autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ innerhalb der 238 Aminosäure-langen Polypeptidkette. Diese intrinsische Fluoreszenz basiert nicht auf einem Umbau durch ein externes Enzym oder nachträglich integrierte Substanzen, sondern kommt vollständig ohne zellspezifische Prozessierungssysteme aus. Somit kann das intakte Protein in jeder Zelllinie synthetisiert werden und eignet sich damit als Marker für die Genexpression, um die räumliche und zeitliche Verteilung eines Proteins in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen direkt zu beobachten. Damit das GFP als Marker für Proteine verwendet werden kann, wird ein EGFP-Fusionsprotein hergestellt, indem die DNA des zu untersuchenden Proteins mit der GFP-cDNA fusioniert wird.

Das im Arbeitskreis erfolgreich etablierte und auch in dieser Arbeit für alle Lokalisationsstudien in eukaryotischen Zellen verwendete EGFP, ist eine punktmutierte Form der Wildtyp GFP-cDNA [Cormack *et al.*, 1996]. Sie zeichnet sich durch eine optimierte Transfektion und eine verbesserte Expression und Fluoreszenzintensität gegenüber dem Wildtyp aus.

2.2.3.9 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der fixierten und gefärbten Zellen wird an einem inversen Fluoreszenzmikroskop *Axiinvert 25 CFL* durchgeführt. Die Bilddokumentation basiert auf einer digitalen Kamera *Kappa DX30* und der Software *Kappa ImageBase*.

Von jeder Zelle werden jeweils zwei Aufnahmen mit unterschiedlichen Filtern gemacht. Die GFP-Fluoreszenzbilder werden mit einem FITC-Filter (Exzitationsfilter 450-490, Strahlteiler *FT-510*, Emissionsfilter *LP 520*, Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen, und die DAPI-Fluoreszenz wird durch den DAPI-Filter (Exzitationsfilter *G365*, Strahlteiler *FT-395*, Emissionsfilter *LP 420*, Zeiss, Jena, Deutschland) sichtbar gemacht.

Dabei wurden die Zellen bei 1000-facher Vergrößerung (100x Ölimmersions-Objektiv, 10x Okular) betrachtet und fotografiert. Die Analyse der GFP-/DAPI- Fluoreszenz Bilder erfolgte mit der Software *ImageJ*.

2.2.3.10 Bestimmung der Kern/Zytoplasma-Ratio

Hierbei wurde die mittlere Fluoreszenzintensität des GFP-Signals des Fusionsproteins im Kern und Zytoplasma mit Hilfe der „Region of interest“-Funktion (*ImageJ*) gemessen. Es werden jeweils drei „Area of interest“ im Kern und Zytoplasma vermessen und gemittelt, um eine Kern/Zytoplasma-Ratio zu bilden [Ernst, 2007].

Eine Ratio =1 lässt auf eine Gleichverteilung der Fluoreszenz in der Zelle schließen. Ist die Ratio <1 ist die Fluoreszenz im Zellkern schwächer und bei einer Ratio >1 stärker als im Zytoplasma.

Zur Demonstration dieser Methode sind in Abbildung 2.3 ein GFP- (Abbildung 2.3A) und das jeweilige DAPI-Fluoreszenzbild (Abbildung 2.3B) einer H1299-Zelle dargestellt, die mit einem EGFP-Fusionsprotein transfiziert wurde. Hierbei dient das DAPI-Fluoreszenzbild zur eindeutigen Identifizierung des Zellkerns.

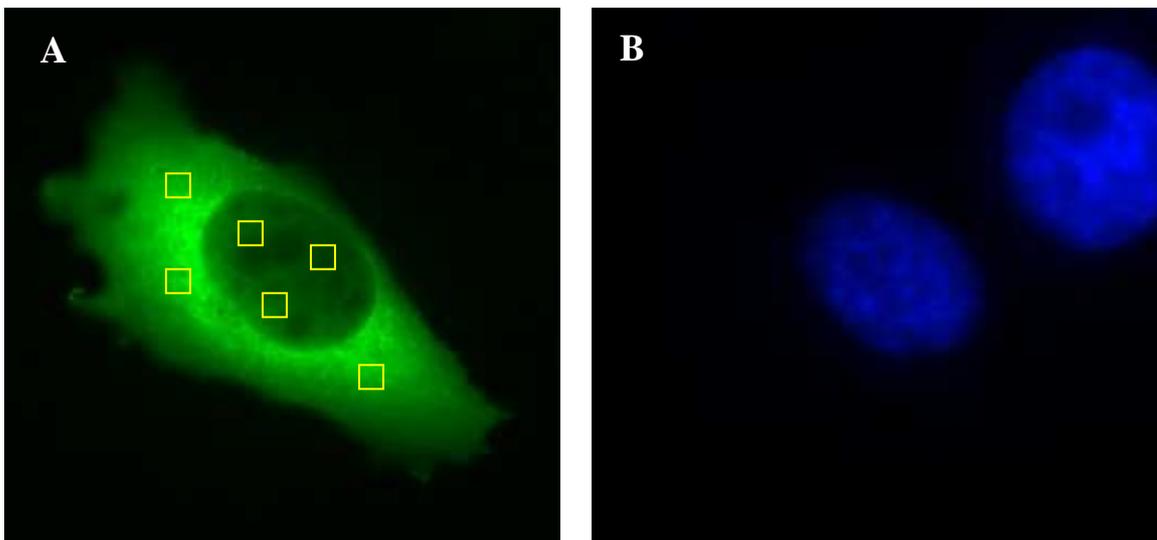


Abbildung 2.3: Auswertung der Kern/Zytoplasma-Ratio in H1299-Zellen

Durch das Legen von jeweils drei „Area of interest“ (als Quadrate links dargestellt, (A)) werden im Zellkern und Zytoplasma die GFP-Fluoreszenzintensitäten gemessen und gemittelt. Der Kern/Zytoplasma-Quotient ergibt dann die Kern/Zytoplasma-Ratio. Eine Ratio =1 lässt auf eine Gleichverteilung der Fluoreszenz in der Zelle schließen. Ist die Ratio <1 ist die Fluoreszenz im Zellkern schwächer und bei einer Ratio >1 stärker als im Zytoplasma. Das DAPI-Fluoreszenzbild dient zur eindeutigen Identifizierung des Zellkerns (B).
(1000-fache Vergrößerung)

2.2.3.11 Bestimmung von F-Aktin durch Bildung einer Aktin/Zytoplasma-Ratio

Auch hier wurde die „Region of interest“-Funktion (*ImageJ*) verwendet, um die mittlere Fluoreszenzintensität des GFP-Signals zu messen. Hierbei werden jeweils drei definierte Größen von „Area of interest“ am F-Aktinstrang und Zytoplasma vermessen und gemittelt, um eine Aktin/Zytoplasma-Ratio zu bilden.

In der Abbildung 2.4 sind GFP-Fluoreszenzbilder von drei H1299-Zellen gezeigt, die einmal mit pEGFP/HsIP3K-A (Wildtyp) (Abbildung 2.4 A.1/A.2), einmal mit pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) (Abbildung 2.4B) und einmal mit pEGFP (Abbildung 2.4C) transfiziert wurden. Es wurde bei der mit dem pEGFP/HsIP3K-A (Wildtyp) transfizierten Zellen ein Abschnitt eines F-Aktinstrangs stark vergrößert und an drei Stellen durch das Legen einer definierten Größe der „Area of interest“ (*ImageJ*) die Fluoreszenzintensität bestimmt und gemittelt (Abbildung 2.4 A.2). Es wird eine Aktin/Zytoplasma-Ratio gebildet. Hier lässt eine Ratio =1 auf eine Gleichverteilung der Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas schließen. Ist die Ratio <1 ist die Fluoreszenzintensität am F-Aktinstrang schwächer und bei einer Ratio >1 stärker als im Zytoplasma. Für die mit dem pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) (Abbildung 2.4B) bzw. dem pEGFP-N1 (Abbildung 2.4C) transfizierten Zellen konnte dieser Ratio aufgrund der nicht zu identifizierenden F-Aktinstränge (keine Bindung), nicht bestimmt werden.

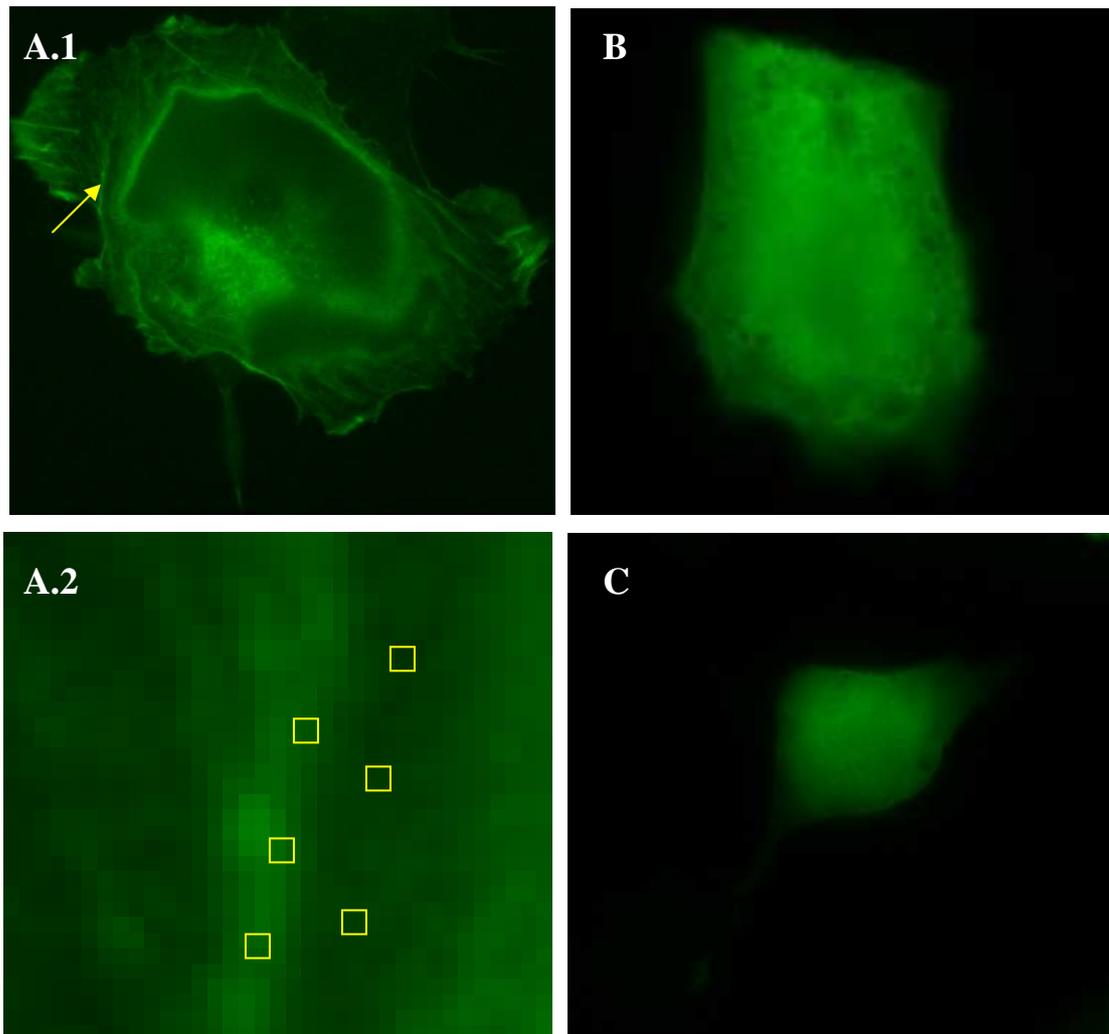


Abbildung 2.4: Auswertung der Aktin/Zytoplasma-Ratio in H1299-Zellen

Es werden jeweils drei großendefinierte „Area of interest“ an einem vergrößerten F-Aktinstrang (s.Pfeil, **A.1**) und im Zytosplasma einer mit pEGFP/HsIP3K-A (Wildtyp) transfizierten Zelle, gelegt (**A.2**), um die GFP-Fluoreszenzintensitäten zu messen und zu mitteln. Hierbei lässt eine Ratio =1 auf eine Gleichverteilung der Fluoreszenz innerhalb des Zytosplasmas schließen. Ist die Ratio <1 ist die Fluoreszenzintensität am F-Aktinstrang schwächer und bei einer Ratio >1 stärker als im Zytosplasma. Bei den mit pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) (**B**) bzw. mit pEGFP-N1 (**C**) transfizierten Zellen konnte dieser Ratio aufgrund der nicht zu identifizierenden F-Aktinstränge, nicht bestimmt werden. (1000-fache Vergrößerung)

2.2.3.12 Bestimmung von F-Aktin durch Bildung einer Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio

Für die Bildung einer Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio wurde auch hier die „Region of interest“-Funktion (*ImageJ*) verwendet. In diesem Fall wurden an jeweils drei Stellen der Plasmamembran und des Zytoplasmas durch das Legen einer definierten Größe der „Area of interest“ (*ImageJ*) die Fluoreszenzintensität gemessen und gemittelt (Abbildung 2.5B), um eine Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio zu bilden. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die GFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran auf die Fluoreszenz der EGFP-Fusionsproteine, die am kortikalen F-Aktin gebunden sind, zurückzuführen ist.

Die Abbildung 2.5 zeigt GFP-Fluoreszenzbilder einer H1299-Zelle, die mit einem EGFP-Fusionsgen (Abbildung 2.5 A/B) transfiziert wurde. Hier wurde ein Abschnitt der Plasmamembran stark vergrößert, um die „Area of interest“ zu legen (Abbildung 2.5B). Eine Ratio =1 lässt auf eine Gleichverteilung der Fluoreszenz zwischen der Plasmamembran und des Zytoplasmas schließen. Ist die Ratio <1 ist die Fluoreszenzintensität an der Plasmamembran schwächer und bei einer Ratio >1 stärker als im Zytoplasma.

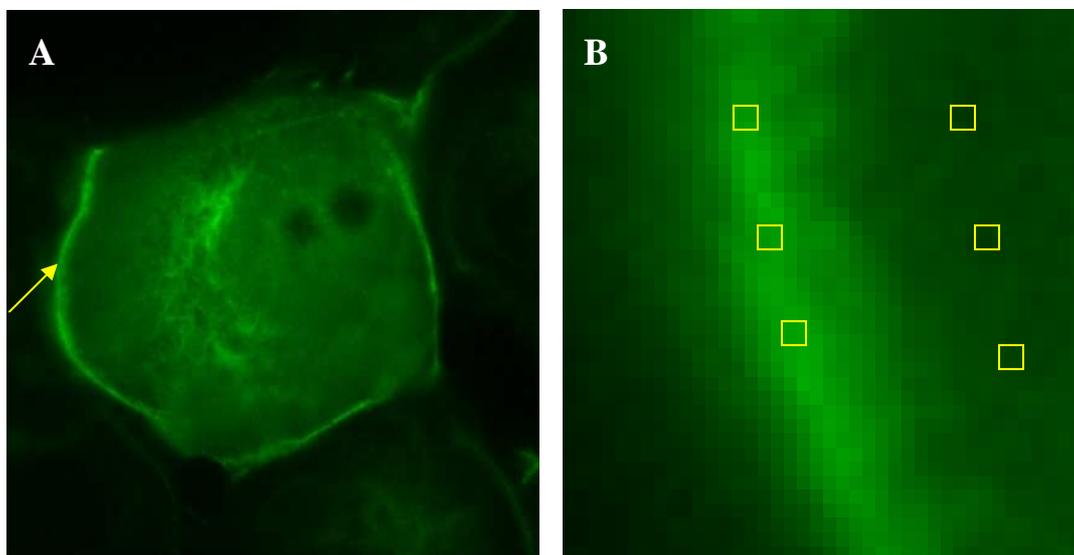


Abbildung 2.5: Auswertung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio in H1299-Zellen

Um die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio dieser H1299-Zelle zu bestimmen, wird zunächst ein Abschnitt der Plasmamembran stark vergrößert (s. Pfeil, A), um durch das Legen von jeweils drei „Area of interest“ die GFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran bzw. im Zytoplasma zu messen und zu mitteln (B). Hier lässt eine Ratio <1 auf eine geringere Fluoreszenzintensität an der Plasmamembran und eine Ratio >1 auf eine höhere Fluoreszenzintensität als im Zytoplasma schließen. Eine Ratio =1 bedeutet eine Gleichverteilung der Fluoreszenz zwischen Plasmamembran und Zytoplasma. (1000-fache Vergrößerung)

2.2.3.13 Auswertung mit *ImageJ*

ImageJ [Rasband, 2006; Abràmoff *et al.*, 2004] ist eine freizugängliche Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungssoftware, die für medizinische und wissenschaftliche Bildanalysen genutzt wird. In dieser Arbeit wurden die Auswertungen der Fluoreszenzbilder mit dieser Software durchgeführt. Hierbei wird die mittlere Fluoreszenzintensität des GFP-Signals des Fusionsproteins im Zellkern (bzw. am F-Aktinstrang oder an der Plasmamembran) und Zytoplasma mit Hilfe der „Region of interest“-Funktion gemessen. Dabei werden an den entsprechenden Strukturen jeweils drei „Area of interest“ gelegt und somit die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals gemessen und gemittelt. Aus den beiden Mittelwerten wird dann entweder eine Kern/Zytoplasma-Ratio, eine Aktin/Zytoplasma-Ratio oder eine Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio gebildet.

$$R_{x/y} = (\sum I_x/n) / (\sum I_y/n)$$

x = Zellkern, F-Aktinstrang oder Plasmamembran
y = Zytoplasma
R_{x/y} = x-/y-Ratio
I_x = Fluoreszenzintensität im x
I_y = Fluoreszenzintensität im y
n = Anzahl der Messungen

Die Häufigkeit der jeweiligen Ratio wird in einem x-/y-Diagramm gegenübergestellt und somit die Verteilung ermittelt. Dabei wird die jeweilige Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Für die bessere Darstellung der Ergebnisse wurde die x-Achse logarithmiert. Es gilt, dass alle links von der y-Achse liegenden Werte eine Ratio <1, alle rechts von der y-Achse liegenden Werte eine Ratio >1, aufweisen. Die Werte auf der y-Achse besitzen eine Ratio =1.

Zur Demonstration dieser Darstellungsform wird die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio von EGFP in der H1299-Zelllinie mit einem x-/y-Diagramm erfasst (Diagramm 2.1). Auch hier wurde die x-Achse logarithmiert.

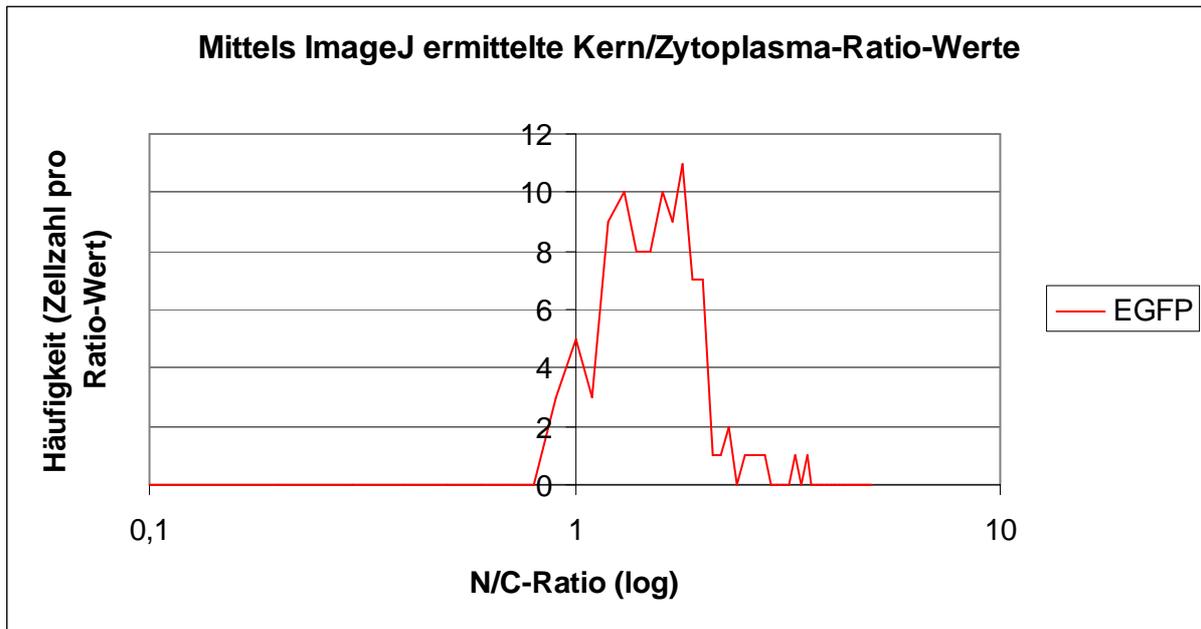


Diagramm 2.1: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio von EGFP in H1299-Zellen

In einem x-/y-Diagramm wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, wobei die x-Achse logarithmiert wird. Die Kern/Zytoplasma-Ratio auf der x-Achse wird gegen die Häufigkeit auf der y-Achse aufgetragen. Es wurde die mit pEGFP-N1 transfizierte H1299-Zelllinie analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ* mit 100 GFP-Fluoreszenzbildern pro Messreihe. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299-Zellen beträgt $1,63 \pm 0,47$.

Aus dem Diagramm 2.1 ist ersichtlich, dass sich der überwiegende Teil der Werte rechts von der y-Achse befinden, und somit eine Ratio >1 aufweisen. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass das EGFP eine Kernlokalisierung aufweist [Seibel *et al.*, 2007].

3. Ergebnisse

Die Funktion und Wirkung von Proteinen werden nicht nur durch ihre enzymatischen Aktivitäten, sondern vor allem auch durch ihre intrazelluläre Lokalisation, bestimmt. Daher ist für die korrekte Zielsteuerung eine Reihe von Regulationselementen notwendig.

Die humane Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP3K-B) ist an einer Vielzahl von intrazellulären Strukturen lokalisiert. Sie besitzt sowohl eine zytoplasmatische Lokalisation, eine F-Aktin-Lokalisation, eine Lokalisation an der Plasmamembran, als auch eine Bindung am Endoplasmatischen Retikulum (ER) [Soriano *et al.*, 1997; Dewaste *et al.*, 2003; Brehm *et al.*, 2004]. Im Rahmen der Diplomarbeit von Olga Ernst konnte ein Leucinreiches Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) in der N-terminalen Domäne der HsIP3K-B identifiziert werden [Ernst, 2007]. Dieses NES ermöglicht die Erkennung und Bindung durch Exportine und damit den Export dieser Proteine aus dem Zellkern. Außerdem konnte in der Doktorarbeit von Maria Brehm gezeigt werden, dass sich in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP3K-B) ein putatives monopartites Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) befindet [Brehm, 2006]. Proteine, die eine NLS-Konsensussequenz besitzen, werden von Importinen erkannt, gebunden und in den Zellkern transportiert. Es gibt sowohl monopartite als auch bipartite und sonstige Kernlokalisierungssignale. Proteine, die ein monopartites NLS besitzen, weisen die folgende Konsensussequenz auf: K-[RK]-X-[RK] [Chelsky *et al.*, 1989], wobei X vorzugsweise für ein Lysin, Arginin, Prolin, Valin oder Alanin steht.

Auch die Phosphorylierung, als eine Form der posttranslationalen Modifikation von Proteinen in Zellen, stellt eine weitere Möglichkeit des Protein-Targetings dar. Es wird vermutet, dass auch die humane Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP3K-B) durch spezifische Proteinkinasen (PKs) phosphoryliert und somit in ihrer Lokalisation und Funktion reguliert wird.

Ein Teil dieser Doktorarbeit dient der Untersuchung der kortikalen F-Aktin-Lokalisation der humanen Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP3K-B) in H1299- und HeLa-Zellen. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Methode entwickelt, durch welche die Lokalisation der mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) fusionierten HsIP3K-B und ihrer Mutanten am F-Aktin untersucht werden kann.

Des Weiteren wurde eine experimentelle Identifizierung und Charakterisierung eines funktionellen Kernlokalisierungssignals (NLS) in der HsIP3K-B durchgeführt.

Hierbei wurde zur Bestimmung der Stärke des Kernlokalisierungssignals, der Vergleich mit dem NLS der humanen Inositolphosphatmultikinase (HsIPMK) und dem des Fusionsproteins pEGFP/3xNLS (SV40), einem Protein mit dreifach codiertem NLS (SV40) [Ernst, 2007], herangezogen. Außerdem wurde die Regulation der intrazellulären Zielsteuerung der HsIP3K-B über Phosphorylierungen untersucht. Die Phosphorylierungsstudien wurden in dieser Arbeit mithilfe des Modells „Pseudo-Phosphorylierung“ und „Pseudo-Dephosphorylierung“ durchgeführt. Dabei wurden putative Phosphorylierungsstellen in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B bzw. in ihrer unmittelbaren Nähe, mithilfe des Computerprogramms NetPhos 2.0 [Blom *et al.*, 1999] prädiziert. Die Untersuchung der prädizierten Phosphorylierungsstellen wurde auf sieben begrenzt. Durch das Einführen einer Punktmutation wurde entweder eine konstitutive Phosphorylierung (Serin/Threonin → Glutamat) oder eine konstitutive Dephosphorylierung (Serin/Threonin → Alanin) simuliert. Für alle sieben Pseudo-Phosphorylierungs- bzw. Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten wurde sowohl die Kern- als auch die kortikale F-Aktin-Lokalisation untersucht und ausgewertet.

Da alle bisherigen Lokalisationsstudien ausschließlich mit EGFP-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen durchgeführt worden sind, wurde zusätzlich im Rahmen dieser Doktorarbeit Lokalisationsstudien der endogenen Form der HsIP3K-B in Ratten-Thymozyten durchgeführt. Diese Kontrollversuche sind wichtig für die Bewertung der Ergebnisse mit EGFP-Fusionsproteinen. Durch die Expression wird das Fusionsprotein in nicht-physiologischer Konzentration exprimiert, was zu einer Übersättigung von vorhandenen Bindungspartnern oder zur Überlastung von beteiligten Transportsystemen führen kann [Illies, 2002]. Dieser Effekt könnte durch die Bestimmung der Lokalisation des endogenen Proteins mittels Antikörper umgangen werden. Es wurde die intrazelluläre Lokalisation der endogenen HsIP3K-B vor und nach einer Leptomycin B-Behandlung in Ratten-Thymozyten untersucht.

3.1 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der kortikalen F-Aktin-Lokalisation des EGFP-Fusionsproteins der HsIP3K-B und ihrer Mutanten in H1299- und HeLa- Zellen

Zunächst wurde eine Methode entwickelt, mit der man die F-Aktin-Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine der HsIP3K-B in eukaryotischen Zellen über die Software *ImageJ* bestimmen kann. Zur Kalibrierung dieser Methode wurden das EGFP und unterschiedliche EGFP-Fusionsproteine der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform A (HsIP3K-A) transient in H1299-Zellen transfiziert und mithilfe von *ImageJ* ausgewertet. Dabei wurden sowohl Aktin/Zytoplasma-Ratio-Werte, als auch Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Werte gebildet und die Ergebnisse miteinander verglichen (Abbildung 3.1). Das EGFP wurde bereits im Arbeitskreis erfolgreich etabliert und verwendet [Nalaskowski *et al.*, 2006]. *ImageJ* ist eine freizugängliche Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungssoftware, die vielfach für medizinische und wissenschaftliche Bildanalysen genutzt wird und sich für die Fluoreszenzbestimmung eignet.

3.1.1 Intrazelluläre Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen der HsIP3K-A in H1299-Zellen

Zur Kalibrierung einer Methode der F-Aktin-Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen, wurde die Expression einiger EGFP-Fusionsproteine der HsIP3K-A in H1299-Zellen herangezogen. Die F-Aktinbindung und der Ausschluss einer F-Aktinbindung wurden anhand der Expression jeweils zweier Fusionsproteine EGFP/HsIP3K-A (Wildtyp) und EGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) bzw. EGFP/ABD (HsIP3K-A) und dem EGFP, analysiert.

Das Plasmid pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) kodiert eine Mutante der HsIP3K-A, bei der die Aktinbindungsdomäne (ABD) deletiert wurde. Dadurch verliert das Enzym die Fähigkeit an das F-Aktin zu binden. Das pEGFP/ABD (HsIP3K-A) ist ein Plasmid, bei dem ausschließlich die isolierte Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-A mit dem pEGFP fusioniert ist. Es soll daher deutlich an die F-Aktinstränge binden.

Die Plasmide wurden in H1299-Zellen transient transfiziert und nach 24 h Expression fixiert. Es wurden für jedes der vier EGFP-Fusionsproteine jeweils 100 Zell-Aufnahmen angefertigt (Abbildung 3.1). Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet.

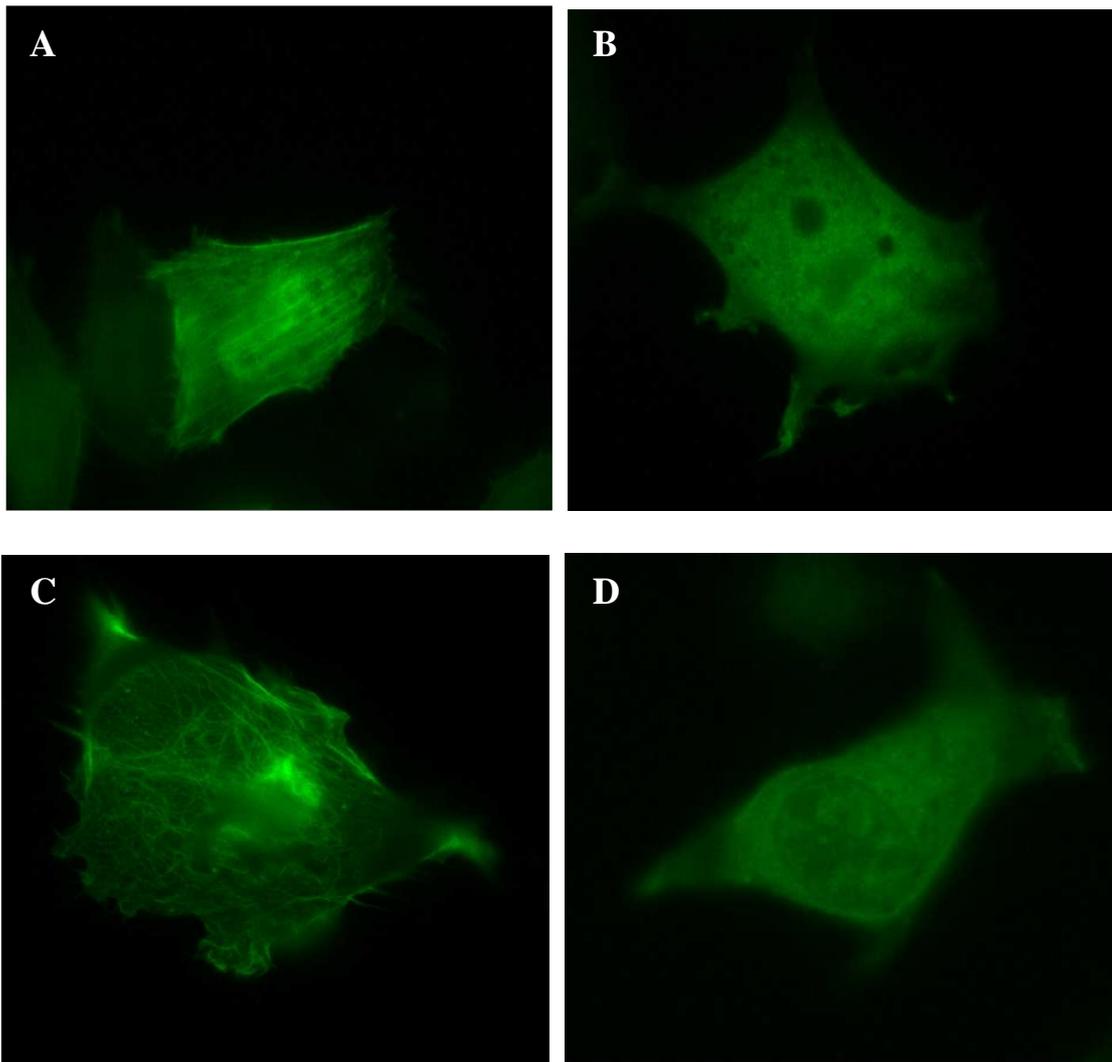


Abbildung 3.1: GFP-Fluoreszenzbilder von pEGFP/HsIP3K-A (Wildtyp), pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD), pEGFP/ABD (HsIP3K-A) und pEGFP-N1 transfizierten H1299-Zellen

Gezeigt sind GFP-Fluoreszenzbilder von H1299-Zellen (A-D). Die Zellen wurden mit den Plasmiden pEGFP/HsIP3K-A (Wildtyp) (A), pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) (B), pEGFP/ABD (HsIP3K-A) (C) und pEGFP-N1 (D) transfiziert und nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet. (1000-fache Vergrößerung)

Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ* (Genaueres siehe Methoden 2.2.3.11 und 2.2.3.12). Dabei wurden Aktin/Zytoplasma-Ratio und Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio bestimmt und die jeweiligen Ergebnisse vom pEGFP/HsIP3K-A (Wildtyp) mit denen der Mutante pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD), bzw. die Ergebnisse von der Mutante pEGFP/ABD (HsIP3K-A) mit denen des pEGFP-N1, verglichen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst.

H1299		
Konstrukte	Mittelwert der Aktin/Zytoplasma-Ratio ± SD*	Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma- Ratio ± SD*
EGFP/HsIP3K-A (Wildtyp)	2,2 ±0,95	2,3 ±0,8
EGFP/HsIP3K-A (ΔABD)	**n.d.	0,8 ±0,25
EGFP/ABD (HsIP3K-A)	2,2 ±0,89	2,3 ±0,8
EGFP	**n.d.	0,8 ±0,34

Tabelle 3.1: Darstellung der gerundeten mittleren Aktin/Zytoplasma-Ratio und der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio mit der entsprechenden Standardabweichung

Es wurde pro Zelllinie und pro Konstrukt jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Gezeigt sind die jeweiligen gerundeten Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen einer Messreihe. Für jedes Konstrukt wurde jeweils eine Transfektion durchgeführt.

*SD = Standardabweichung

** Es konnte keine Aktin/Zytoplasma-Ratio bestimmt werden, da aufgrund der diffusen Fluoreszenzverteilung innerhalb der gesamten Zelle, keine Aktinstränge identifiziert werden konnten.

Mit dieser Lokalisationsstudie unterschiedlicher EGFP-Fusionsproteine der HsIP3K-A konnte gezeigt werden, dass die Methode der Aktin/Zytoplasma-Ratio- bzw. der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Bestimmung mit Hilfe von *ImageJ* in den weiteren Versuchen eingesetzt werden kann. Sowohl die F-Aktinbindung als auch der Ausschluss einer F-Aktinbindung, können mit den jeweiligen Ratio-Werten ermittelt werden.

Die F-Aktinstränge innerhalb der Zelle ("stress fibers") sind nach Transfektion mit der HsIP3K-A in H1299-Zellen besser zu identifizieren als nach Transfektion mit der HsIP3K-B. Zur Bestimmung der F-Aktin-Lokalisation der HsIP3K-B und ihrer Mutanten, sowie aller anderen EGFP-Fusionsproteinen, wurde daher die Methode der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Bestimmung verwendet.

3.2 Experimentelle Identifizierung, Charakterisierung und Klassifizierung eines funktionellen NLS in der HsIP3K-B

Dieser Teil der Arbeit dient der experimentellen Identifizierung, der genauen Charakterisierung sowie einer Klassifizierung des funktionellen Kernlokalisierungssignals (NLS) in der HsIP3K-B. In diesem Rahmen wurde einmal untersucht, ob dieses Kernlokalisierungssignal *notwendig* für den Kernimport des Proteins ist. Dabei wurde das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) (HsIP3K-B Volllängeenzym, bei dem die ABD deletiert wurde) transient in H1299- und HeLa-Zellen transfiziert und daraufhin die Kern- bzw. Zytoplasma-Lokalisation untersucht. Zusätzlich wurde nach dieser Methode eine Tripelmutante untersucht, bei der in der vermuteten Konsensussequenz des NLS der HsIP3K-B gleichzeitig drei Aminosäuren ausgetauscht wurden ($K^{128}RKLR \rightarrow QQQLR$). Zur genaueren Eingrenzung dieses Kernlokalisierungssignals und zur Ermittlung der Bedeutung einzelner Aminosäuren innerhalb der Konsensussequenz für den Kernimport, wurde ein Glutamin-Screening durchgeführt. Hierbei wurde jeweils eine basische Aminosäure Lysin (L) oder Arginin (R) in die neutrale Aminosäure Glutamin (Q) mutiert. Um außerdem zu zeigen, dass das identifizierte Kernlokalisierungssignal das einzige in der HsIP3K-B ist, wurde nach LMB-Behandlung der Kernimport der HsIP3K-B mit dem funktionell inaktivierten NLS (pHsIP3K-B/EGFP ($Q^{128}QQLR$)) analysiert.

Zum anderen wurde untersucht, ob das Kernlokalisierungssignal *hinreichend* für den Kernimport des Proteins ist. Hierbei wurde das Fusionsprotein ABD(HsIP3K-B)/EGFP verwendet [Brehm *et al.*, 2004]. Das Plasmid kodiert eine Mutante der HsIP3K-B, bei der ausschließlich die isolierte Aktinbindungsdomäne (ABD) in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde. Zusätzlich wurde ein NLS(HsIP3K-B)/EGFP-Fusionsgen hergestellt, um die Wirkung des isolierten Kandidaten für das Kernlokalisierungssignal auf die Kern/Zytoplasma-Verteilung zu analysieren. Zur Bestimmung der Stärke dieses NLS, wurde der Vergleich mit dem NLS der humanen Inositolphosphatmultikinase (HsIPMK) und dem des Fusionsproteins EGFP/3xNLS (SV40), einem Protein mit dreifach codiertem NLS (SV40) [Ernst, 2007], herangezogen.

Alle Auswertungen erfolgten mittels der etablierten Kern/Zytoplasma-Ratio-Bestimmung über die „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*. Diese Methode wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Olga Ernst entwickelt [Ernst, 2007].

3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) der HsIP3K-B in H1299- und HeLa-Zellen

Um zu untersuchen, ob das in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B lokalisierte Kernlokalisationsignal (NLS) *notwendig* für den Kernimport des Proteins ist, wurde zunächst das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transient in H1299- und HeLa-Zellen transfiziert und daraufhin die Kern/Zytoplasma-Lokalisation untersucht. Das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) kodiert eine Mutante der HsIP3K-B, bei der die Aktinbindungsdomäne (ABD) deletiert wurde. Durch die Deletion wird das NLS, welches in der ABD lokalisiert ist, entfernt. Ist dieses Kernlokalisationsignal notwendig für den Kernimport, sollte an der Expression des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) ein Kernausschluss beobachtet werden.

3.2.1.1 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen

Die Zelllinien H1299 und HeLa wurden mit HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) (Abbildung 3.2) transfiziert und nach 24 h Expression die Kernlokalisation untersucht. Zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne wurden diese nach der Paraformaldehydfixierung der Zellen mittels DAPI angefärbt.



Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp)

Schematische Darstellung vom HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), dem humanen Volllängenenzym mit C-terminaler EGFP-Markierung (grün). Die ABD (rot) führt zur Bindung des Enzyms an das F-Aktin.

Die Verteilung des Fusionsproteins wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Das EGFP zeigt eine grüne Fluoreszenz, während die mit DAPI angefärbten Zellkerne blau fluoreszierend erscheinen (Abbildung 3.3).

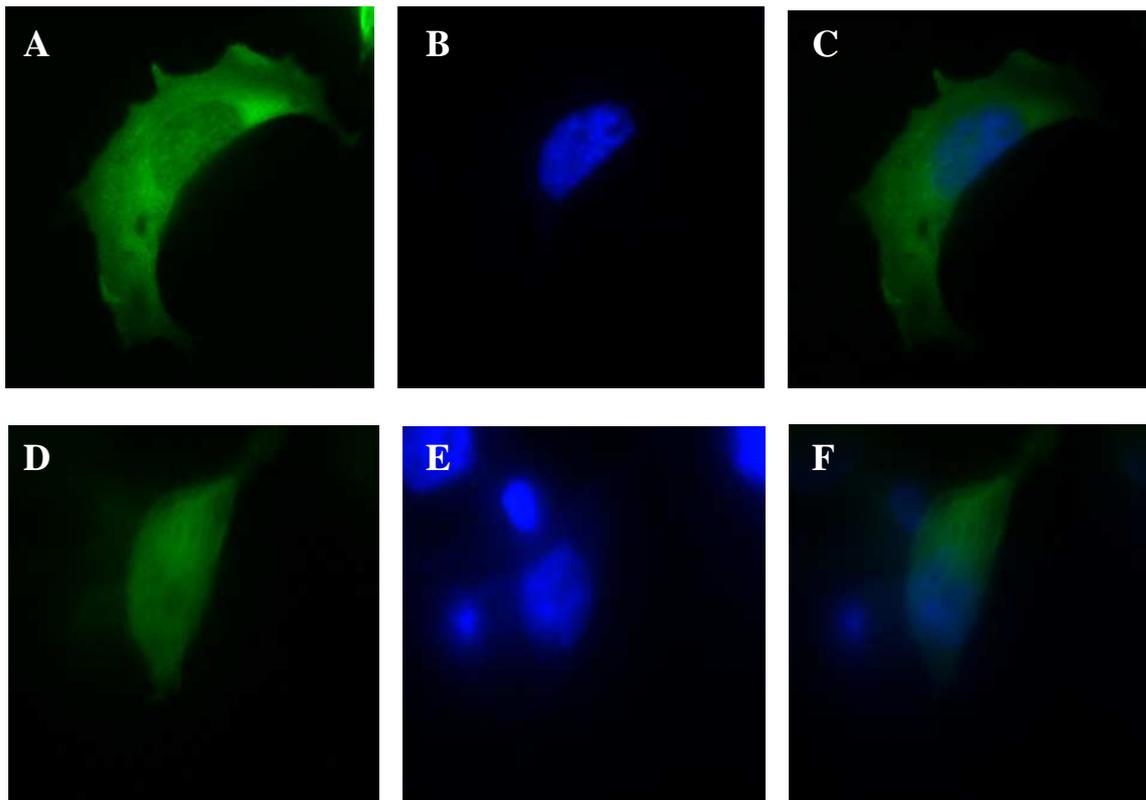


Abbildung 3.3: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen

Die Bilder A-C zeigen eine H1299-Zelle, die Bilder D-F eine HeLa-Zelle. Beide Zelllinien wurden mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfiziert, nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen wurde bestimmt. Die Auswertungen erfolgten mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Die Mittelwerte der Messreihen (HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf (für H1299- Zellen: $p=0,45$; für HeLa-Zellen: $p=0,369$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299 beträgt $0,89 \pm 0,50$ und der von HeLa $0,93 \pm 0,21$. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen festgestellt werden ($p<0,001$; Mann-Whitney-Test).

3.2.1.2 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen

Hier wurde die Auswirkung einer LMB-Behandlung auf das Lokalisationsverhalten des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen untersucht. Das Toxin LMB (Leptomycin B) ist als ein Inhibitor des CRM1 (chromosomal region maintenance) bekannt und wird zur Untersuchung des Kernexport-Verhaltens verwendet. Das LMB inhibiert das CRM1(=Exportin 1) und verhindert damit die Erkennung und Bindung der Proteine, wodurch der Kernexport unterbunden wird.

Es wurde die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen untersucht.

Nach einer sechsstündigen Inkubation mit LMB wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Die Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.4).

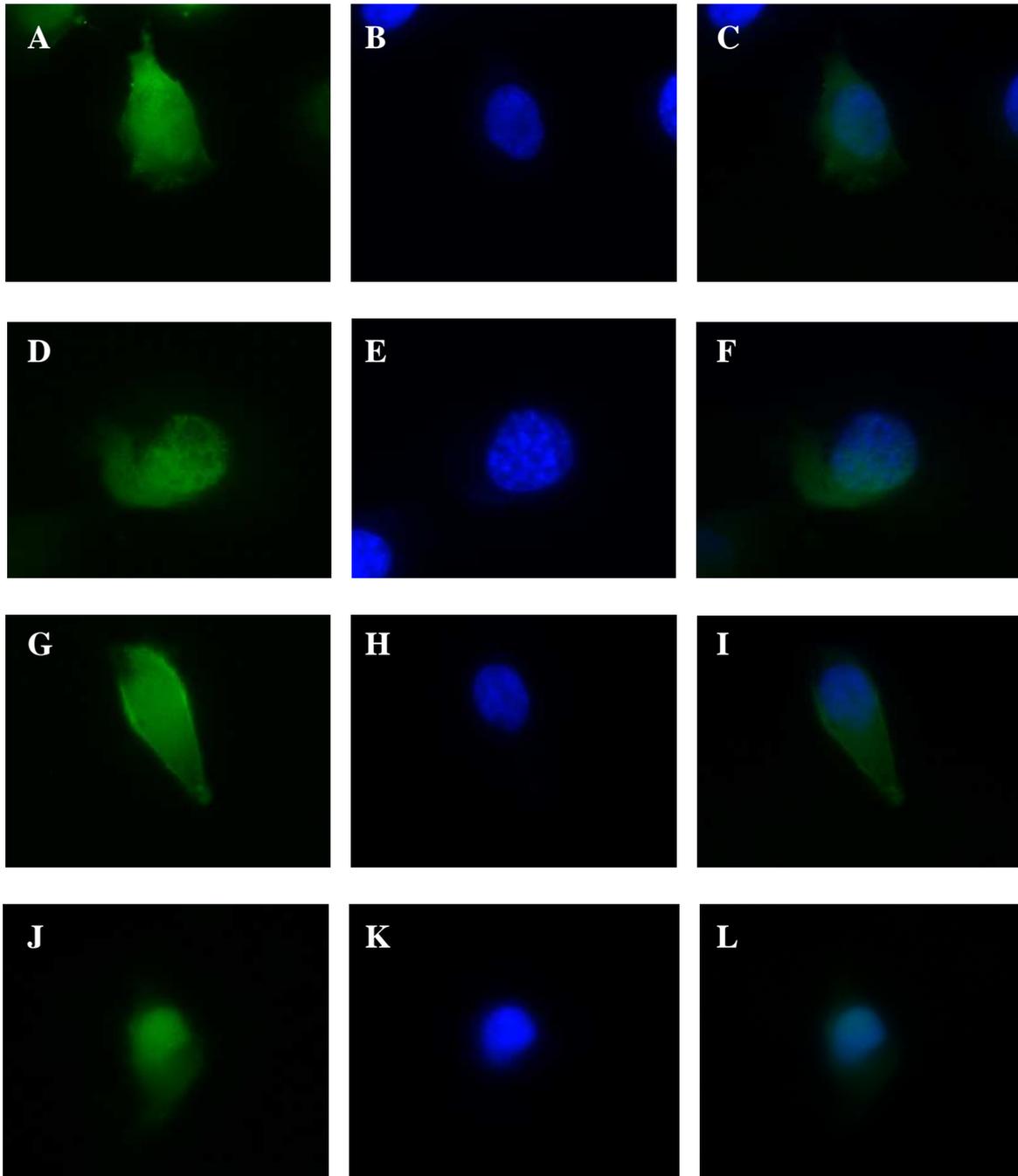


Abbildung 3.4: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen ohne bzw. mit LMB-Behandlung

Die Bilder A-C zeigen eine unbehandelte H1299-Zelle, die Bilder D-F eine behandelte H1299-Zelle, die Bilder G-I eine unbehandelte HeLa-Zelle, die Bilder J-L eine behandelte HeLa-Zelle. Beide Zelllinien wurden mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfiziert. Die behandelten Zellen wurden nach einer sechsstündigen Inkubation mit LMB fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Mittelwerte und Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen wurden bestimmt. Die Auswertungen erfolgten mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Die Mittelwerte der Messreihen (HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen mit LMB-Behandlung) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test, Tukey-Kramer-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299 beträgt $1,42 \pm 0,28$ und der von HeLa $1,58 \pm 0,36$. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Kern/Zytoplasma-Ratio pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten und LMB-behandelten H1299- und HeLa-Zellen vor. Jedoch unterscheiden sich die beiden Verteilungen der Kern/Zytoplasma-Ratio signifikant voneinander ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test). Beide Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen eine Kernanreicherung der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten und LMB-behandelten H1299- und HeLa-Zellen.

Es wurde gezeigt, dass nach LMB-Behandlung der mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen es zu einer Kernanreicherung des Fusionsproteins gekommen ist. Auch die Auswertungen mittels *ImageJ* ergaben jeweils eine signifikante Veränderung der Verteilung der Fluoreszenzintensität vor bzw. nach LMB-Behandlung zwischen Zellkern und Zytoplasma.

Um die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten und LMB-behandelten bzw. unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinie (H1299 bzw. HeLa) zu zeigen, wird in jeweils einem x-/y-Diagramm die jeweilige Ratio-Verteilung der entsprechenden Zelllinie aufgetragen (Diagramm 3.1 und Diagramm 3.2). Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen.

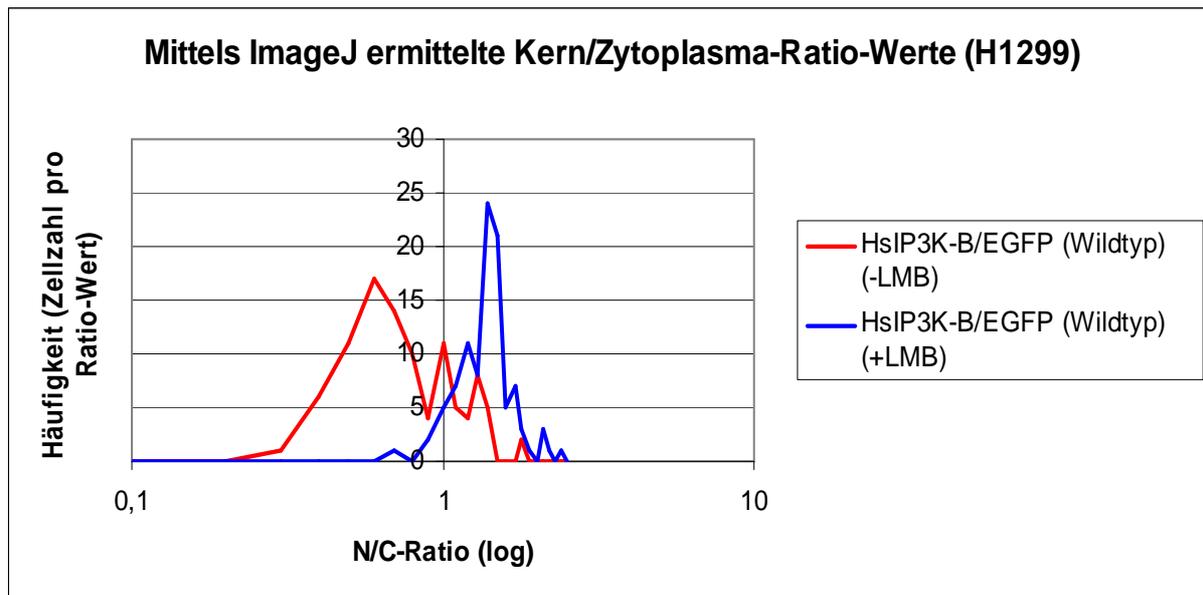


Diagramm 3.1: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten und LMB-behandelten bzw. -unbehandelten H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit unbehandelten H1299-Zellen beträgt $0,89 \pm 0,50$ und der mit behandelten H1299-Zellen $1,42 \pm 0,28$.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) mit LMB-Behandlung ist signifikant größer als der ohne LMB-Behandlung ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

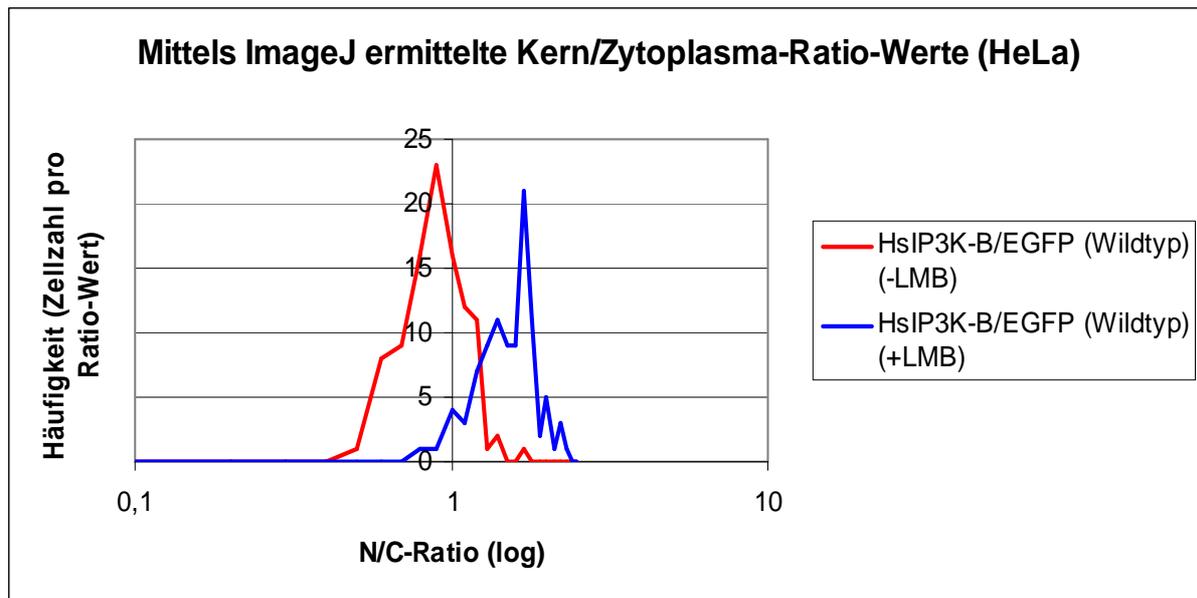


Diagramm 3.2: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten und LMB-behandelten bzw. -unbehandelten HeLa-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit unbehandelten HeLa-Zellen beträgt $0,93 \pm 0,21$ und der mit behandelten HeLa-Zellen $1,58 \pm 0,36$.

Durch die Lokalisationsstudien konnte ermittelt werden, dass der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen nach der LMB-Behandlung signifikant höher ist.

3.2.1.3 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen

Zur Untersuchung der Notwendigkeit des in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B lokalisierten Kernlokalisierungssignals (NLS) für den Kernimport des Proteins, wurde das Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen transfiziert. Das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) kodiert eine Mutante der HsIP3K-B, bei der die Aktinbindungsdomäne (ABD) deletiert wurde. Durch die Deletion wird das NLS, welches in der ABD lokalisiert ist, entfernt.

Die H1299- und HeLa-Zelllinie wurden mit pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) (Abbildung 3.5) transfiziert und nach 24 h Expression die Kernlokalisierung untersucht. Zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne wurden diese nach der Paraformaldehydfixierung der Zellen mittels DAPI angefärbt.

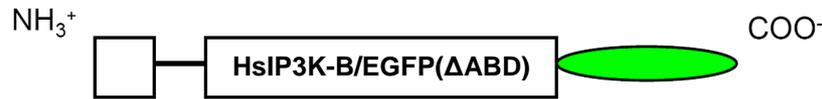


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD)

Schematische Darstellung vom HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), einer Mutante des humanen Vollenzym der HsIP3K-B mit C-terminaler EGFP-Markierung (grün). Die ABD wurde aus der cDNA deletiert und ist in der Abbildung als schwarzer Strich dargestellt.

Die Verteilung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.6).

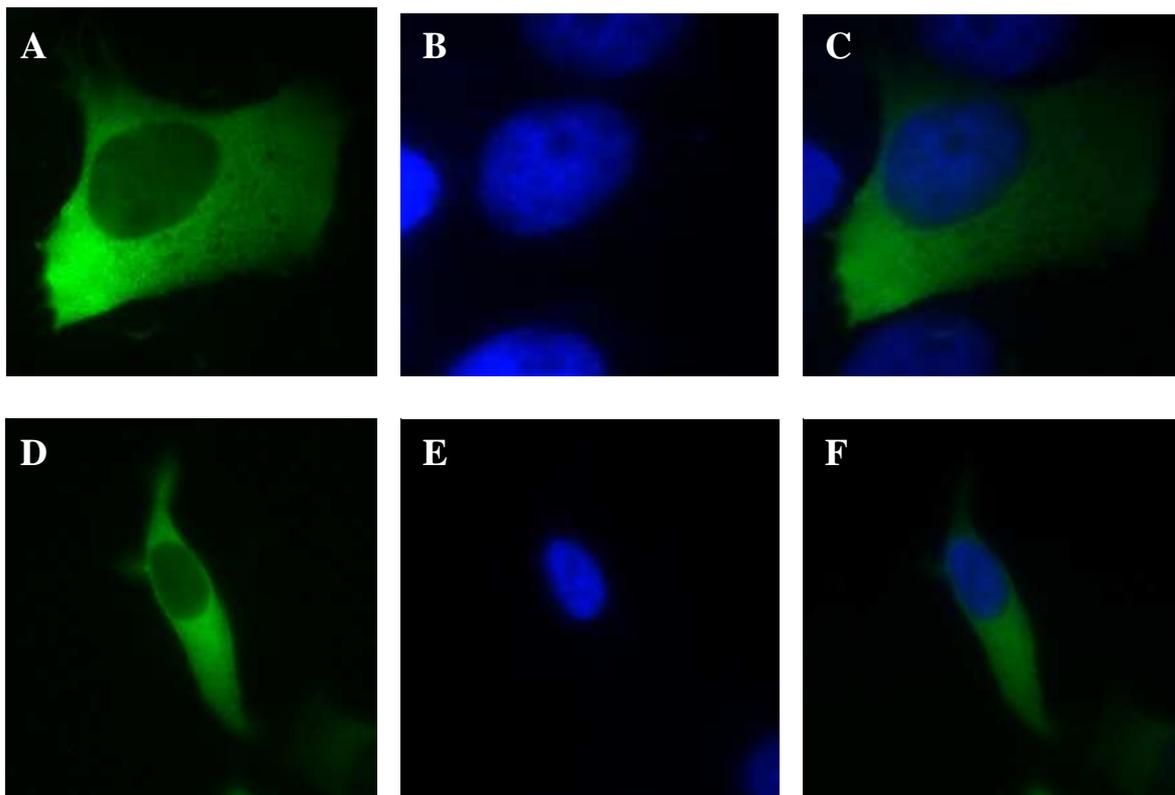


Abbildung 3.6: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen

Die Bilder von A-C zeigen eine H1299-Zelle, die Bilder von D-F eine HeLa-Zelle.

Alle beiden Zelllinien wurden mit pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfiziert, nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio von HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen wurde bestimmt. Die Auswertungen erfolgten mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Die Mittelwerte der Messreihen (HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test, Tukey-Kramer-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299 beträgt $0,45 \pm 0,15$ und der von HeLa $0,46 \pm 0,12$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen beobachtet werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test). Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen, dass bei den pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen deutlich mehr Fluoreszenz im Zytoplasma als im Kern gemessen wurde.

3.2.1.4 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen

In dem vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass nach Transfektion und Expression des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen ein Kernausschluss beobachtet wurde. Auch die Auswertungen mittels *ImageJ* ergaben jeweils eine signifikant geringere Fluoreszenzintensität in Zellkern als im Zytoplasma. Das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) kodiert eine Mutante der HsIP3K-B, bei der die Aktinbindungsdomäne (ABD) deletiert wurde. Durch die Deletion wird das NLS, welches in der ABD lokalisiert ist, entfernt.

Um den Unterschied der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) der jeweiligen Zelllinie (H1299 bzw. HeLa) zu zeigen, wird in jeweils einem x-/y-Diagramm die Ratio-Verteilung der beiden Fusionsproteine für die entsprechende Zelllinie aufgetragen (Diagramm 3.3 und Diagramm 3.4). Auch hier wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen.

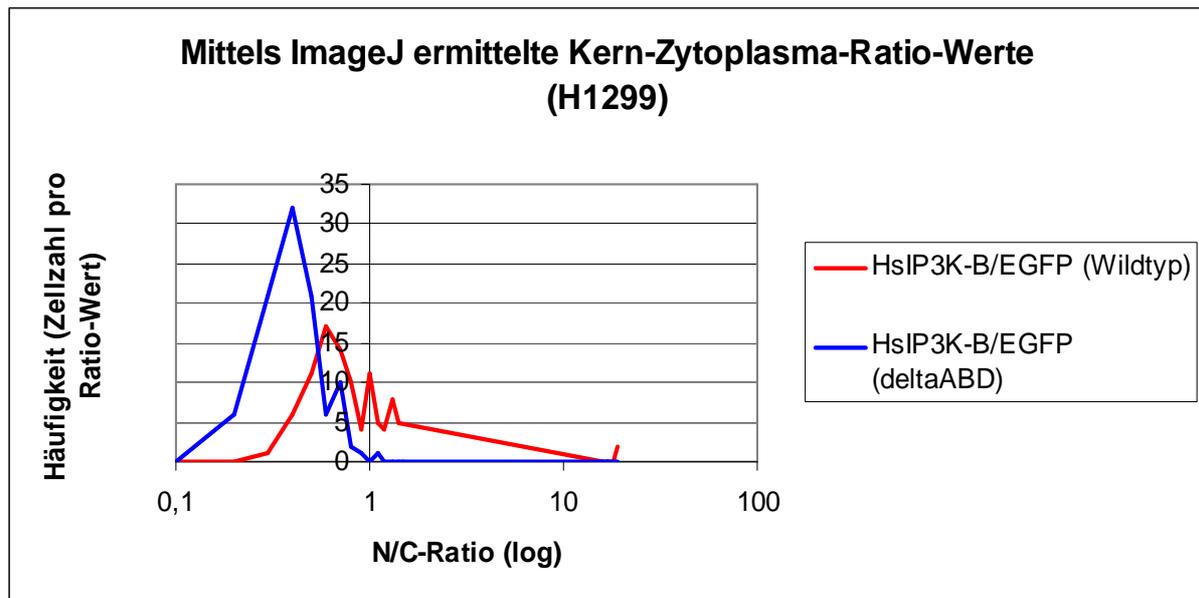


Diagramm 3.3: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299-Zellen beträgt $0,89 \pm 0,50$ und der mit pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299-Zellen $0,45 \pm 0,15$.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen deutlich, dass bei den pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299-Zellen im Vergleich zum Wildtyp, signifikant mehr Fluoreszenz im Zytoplasma als im Kern gemessen wurde ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

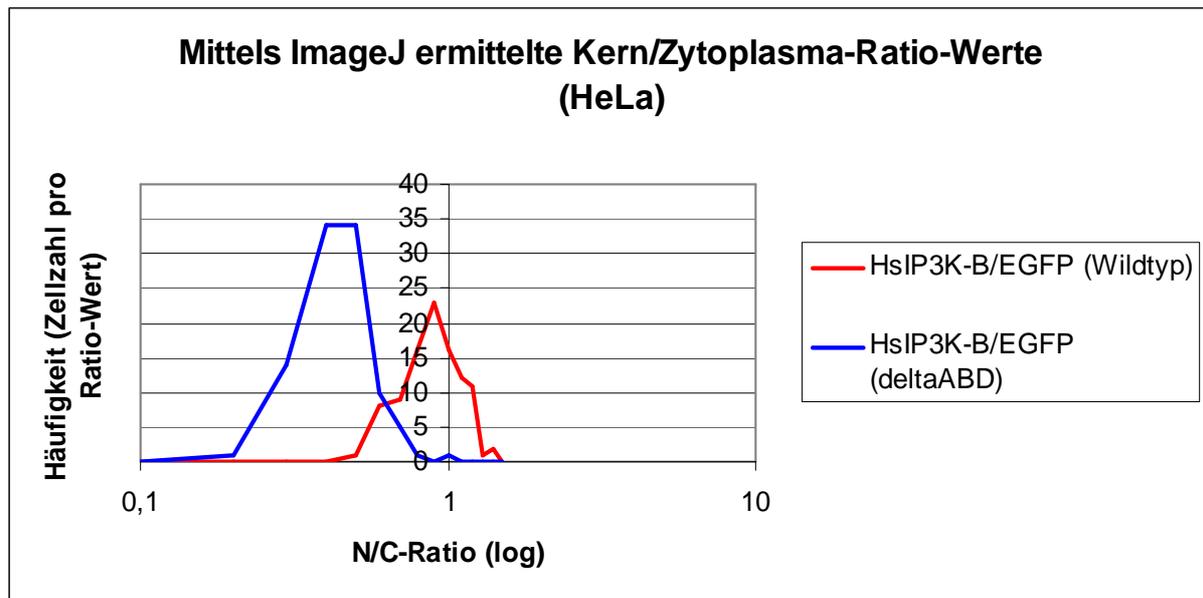


Diagramm 3.4: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten HeLa-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten HeLa-Zellen beträgt $0,93 \pm 0,21$ und der mit pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299-Zellen $0,46 \pm 0,12$.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen deutlich, dass auch bei den pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten HeLa-Zellen im Vergleich zum Wildtyp, signifikant mehr Fluoreszenz im Zytoplasma als im Kern gemessen wurde ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

3.2.1.5 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) der HsIP3K-B ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen

Hier wurde die Auswirkung einer LMB-Behandlung auf das Lokalisationsverhalten des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen untersucht. Das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) ist eine Mutante des HsIP3K-B Vollängenenzym, bei der die Aktinbindungsdomäne (ABD) mit dem darin enthaltenen Kernlokalisierungssignal (NLS), deletiert wurde. Das Toxin LMB (Leptomycin B) ist als ein Inhibitor des CRM1 (chromosomal region maintenance) bekannt und wird zur Untersuchung des Kernexport-Verhaltens verwendet. Das LMB inhibiert das CRM1 (=Exportin 1) und verhindert damit die Erkennung und Bindung der Proteine, wodurch der Kernexport unterbunden wird.

Es wurde die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen untersucht.

Nach einer sechsstündigen Inkubation mit LMB wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Die Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B pEGFP/ Δ ABD wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.7).

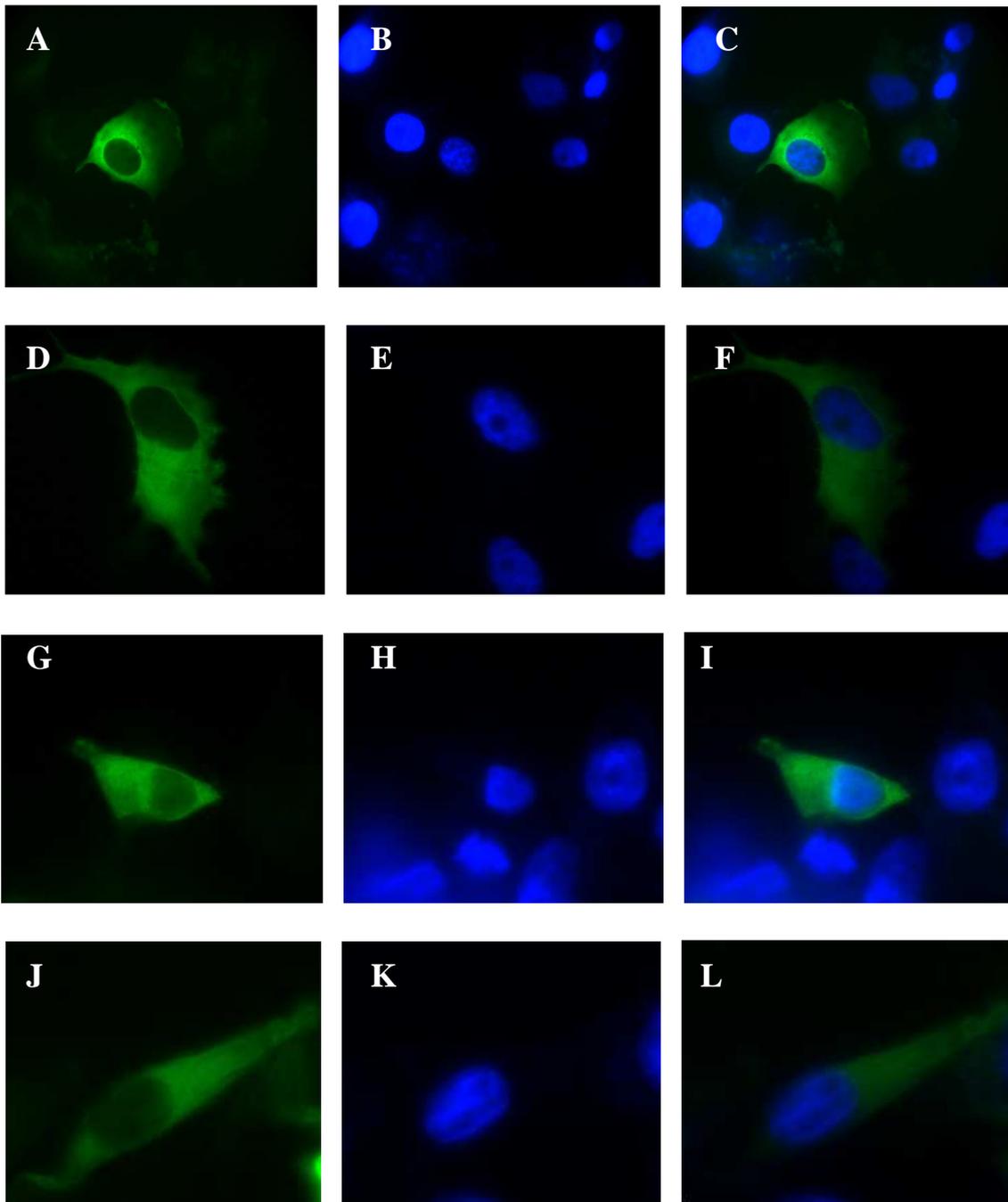


Abbildung 3.7: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen ohne bzw. mit LMB-Behandlung

Die Bilder A-C zeigen eine unbehandelte H1299-Zelle, die Bilder D-F eine behandelte H1299-Zelle, die Bilder G-I eine unbehandelte HeLa-Zelle, die Bilder J-L eine behandelte HeLa-Zelle. Beide Zelllinien wurden mit pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfiziert. Die behandelten Zellen wurden nach einer sechsstündigen Inkubation mit LMB fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen wurde bestimmt. Die Auswertungen erfolgten mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Die Mittelwerte der Messreihen (HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299- und HeLa-Zellen mit LMB-Behandlung) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test, Tukey-Kramer-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299 beträgt $0,59 \pm 0,22$ und der von HeLa $0,58 \pm 0,13$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) und LMB-behandelten H1299- und HeLa-Zellen beobachtet werden ($p = 0,431$; Mann-Whitney-Test). Die Kern/Zytoplasma-Ratio der HsIP3K-B pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten und LMB-behandelten H1299- und HeLa-Zelllinien zeigen einen Kernausschluss.

Es wurde gezeigt, dass nach LMB-Behandlung der mit pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen es zu keiner Kernanreicherung des Fusionsproteins gekommen ist. Auch die Auswertungen mittels *ImageJ* ergaben jeweils keine signifikante Veränderung der Verteilung der Fluoreszenzintensität vor bzw. nach LMB-Behandlung zwischen Zellkern und Zytoplasma.

Um die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der mit pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten und LMB-behandelten bzw. unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinie (H1299 bzw. HeLa) zu zeigen, wird in jeweils einem x-/y-Diagramm die jeweilige Ratio-Verteilung der entsprechenden Zelllinie aufgetragen (Diagramm 3.5 und Diagramm 3.6). Auch hier wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen.

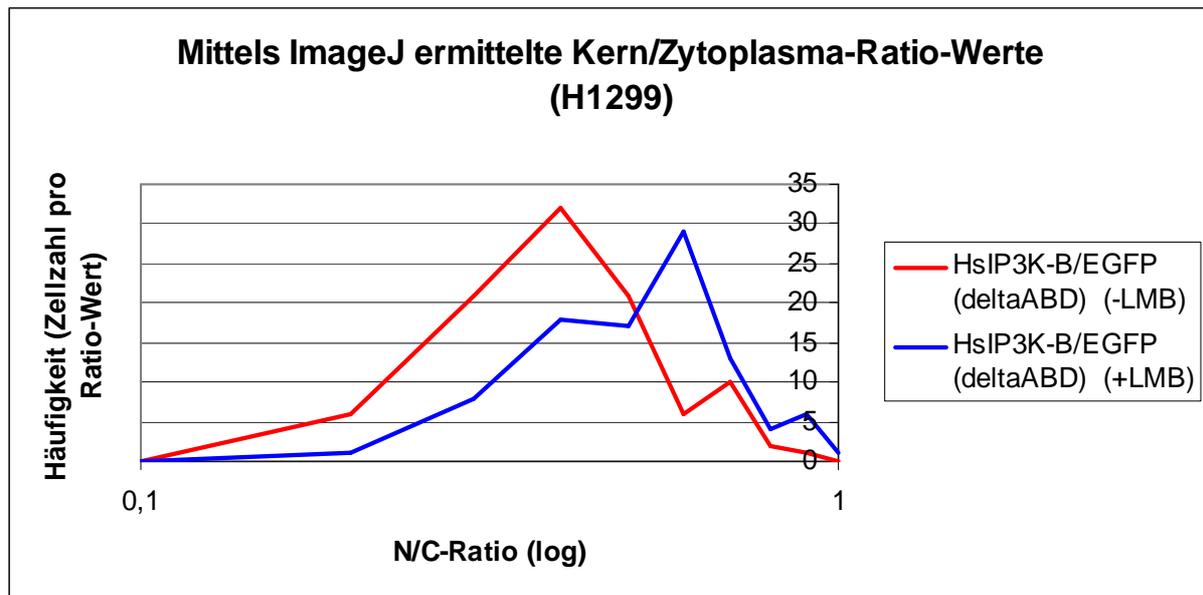


Diagramm 3.5: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten und LMB-behandelten bzw. -unbehandelten H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit unbehandelten H1299-Zellen beträgt $0,45 \pm 0,15$ und der mit behandelten H1299-Zellen $0,59 \pm 0,22$.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) in H1299-Zellen mit LMB-Behandlung unterscheidet sich nicht signifikant von der ohne LMB-Behandlung ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

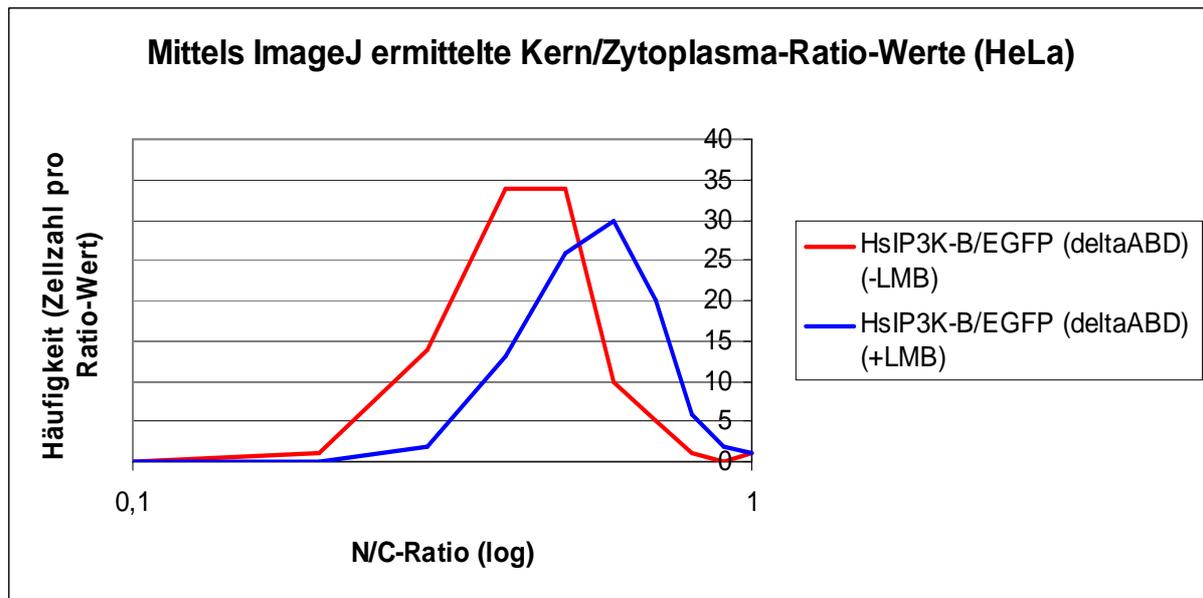


Diagramm 3.6: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten und LMB-behandelten bzw. -unbehandelten HeLa-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit unbehandelten HeLa-Zellen beträgt $0,46 \pm 0,12$ und der mit behandelten HeLa-Zellen $0,58 \pm 0,13$.

Durch die Lokalisationsstudien konnte ermittelt werden, dass sich die Mittelwerte der Kern/Zytoplasma-Ratio der pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen vor bzw. nach der LMB-Behandlung, nicht signifikant verändern.

3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QLR) (NLS-Tripelmutante) der HsIP3K-B in H1299- und HeLa-Zellen

Zur Identifizierung des Kernlokalisierungssignals (NLS) der HsIP3K-B wurde in der Aminosäuresequenz des Enzyms nach der monopartiten NLS-Konsensussequenz (K-[RK]-X-[RK] [Chelsky *et al.*, 1989]) gesucht. Die Arbeiten von Maria Brehm [Brehm, 2006] zeigen, dass sich mit großer Wahrscheinlichkeit eine diesem Konsensus ähnliche Sequenz in der Aktinbindungsdomäne (ABD) befindet. Diese Sequenz wurde daraufhin im Rahmen dieser Arbeit mutiert und das entsprechende Fusionsprotein in H1299 und HeLa-Zellen exprimiert.

Das Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) ist eine Mutante des HsIP3K-B Volllängenenzym, bei der innerhalb des Kernlokalisierungssignals (NLS) drei Punktmutationen eingeführt wurden (NLS-Tripelmutante). Hierbei wurden die ersten drei Aminosäuren des NLS, Lysin¹²⁸, Arginin¹²⁹, Lysin¹³⁰, in Glutamine mutiert. Die chemische Struktur von Glutamin ähnelt der des Lysins bzw. Arginins. Aber im Gegensatz zu den basischen Eigenschaften der beiden Aminosäuren ist Glutamin neutral. Diese Eigenschaft wurde hier gezielt genutzt, um das mögliche Kernlokalisierungssignal funktionell zu inaktivieren, ohne die 3D-Struktur zu verändern.

Die H1299- und HeLa-Zelllinie wurden mit pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfiziert, nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellen zur Identifizierung der Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Das mutierte Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) wird in der Abbildung 3.8 schematisch dargestellt.



Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR)

Schematische Darstellung vom HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR), einer Mutante des humanen Volllängenenzym mit C-terminaler EGFP-Markierung (grün). Die ABD (rot) führt zur Bindung des Enzyms an das F-Aktin. Innerhalb des NLS (gelb) wurde eine dreifache Punktmutation eingeführt, so dass das NLS inaktiviert wird.

Die Verteilung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.9).

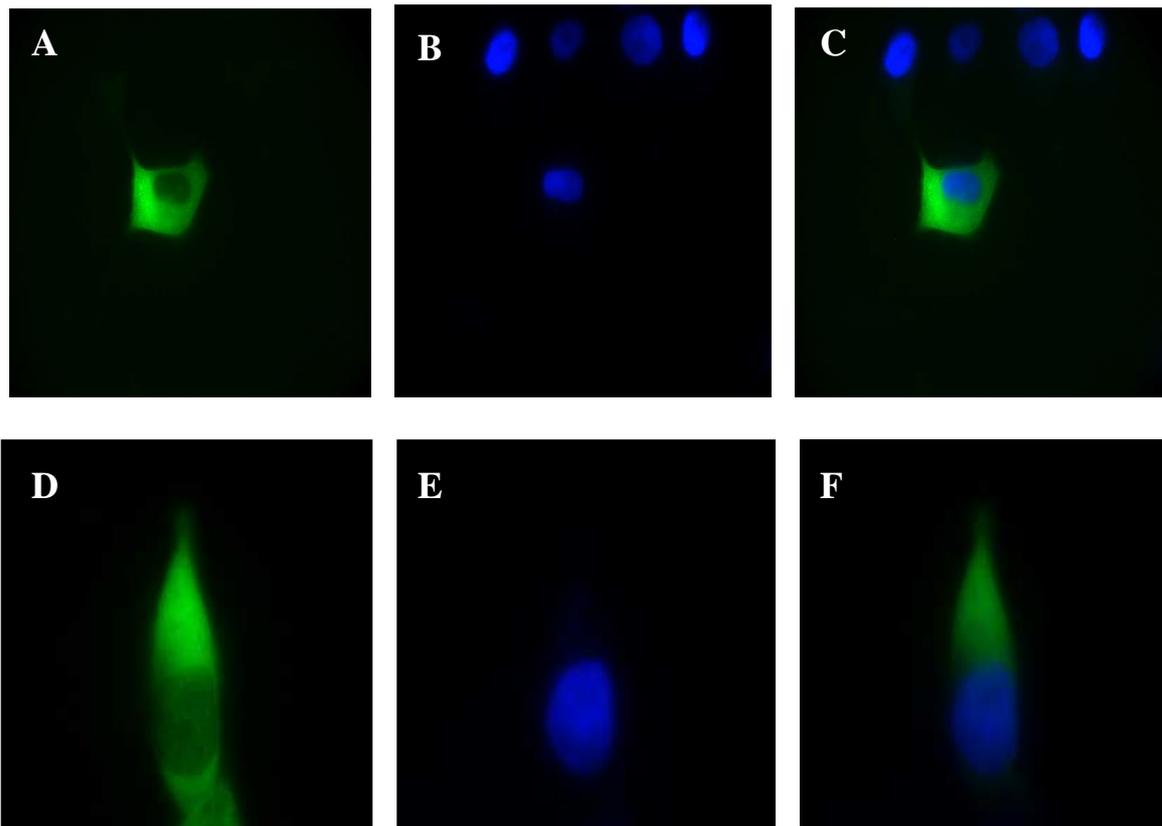


Abbildung 3.9: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen

Die Bilder A-C zeigen eine H1299-Zelle, die Bilder D-F eine HeLa-Zelle. Beide Zelllinien wurden mit HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfiziert, nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio von HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) in H1299- und HeLa-Zellen wurde bestimmt. Die Auswertungen erfolgten mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Die Mittelwerte der Messreihen (HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) in H1299- und HeLa-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test, Tukey-Kramer-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299 beträgt $0,47 \pm 0,20$ und der von HeLa $0,53 \pm 0,12$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen beobachtet werden.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen, dass bei den pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen signifikant mehr Fluoreszenz im Zytoplasma als im Kern gemessen wurde.

3.2.2.1 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) in H1299- und HeLa-Zellen

In dem vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass nach Transfektion und Expression des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) in H1299- und HeLa-Zellen ein Kernausschluss beobachtet wurde. Auch die Auswertungen mittels *ImageJ* ergaben jeweils eine signifikant geringere Fluoreszenzintensität in Zellkern als im Zytoplasma. Bei dem Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) handelt es sich um eine Mutante des HsIP3K-B Volllängenenzym, bei der innerhalb des Kernlokalisationssignals (NLS) drei Punktmutationen eingeführt wurden (NLS-Tripelmutante). Hierbei wurden die ersten drei Aminosäuren des NLS, Lysin¹²⁸, Arginin¹²⁹, Lysin¹³⁰, in Glutamine mutiert.

Um den Unterschied der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der Fusionsproteine pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) der jeweiligen Zelllinie (H1299 bzw. HeLa) zu zeigen, wird in jeweils einem x-/y-Diagramm die Ratio-Verteilung der beiden Fusionsproteine für die entsprechende Zelllinie aufgetragen (Diagramm 3.7 und Diagramm 3.8). Auch hier wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen.

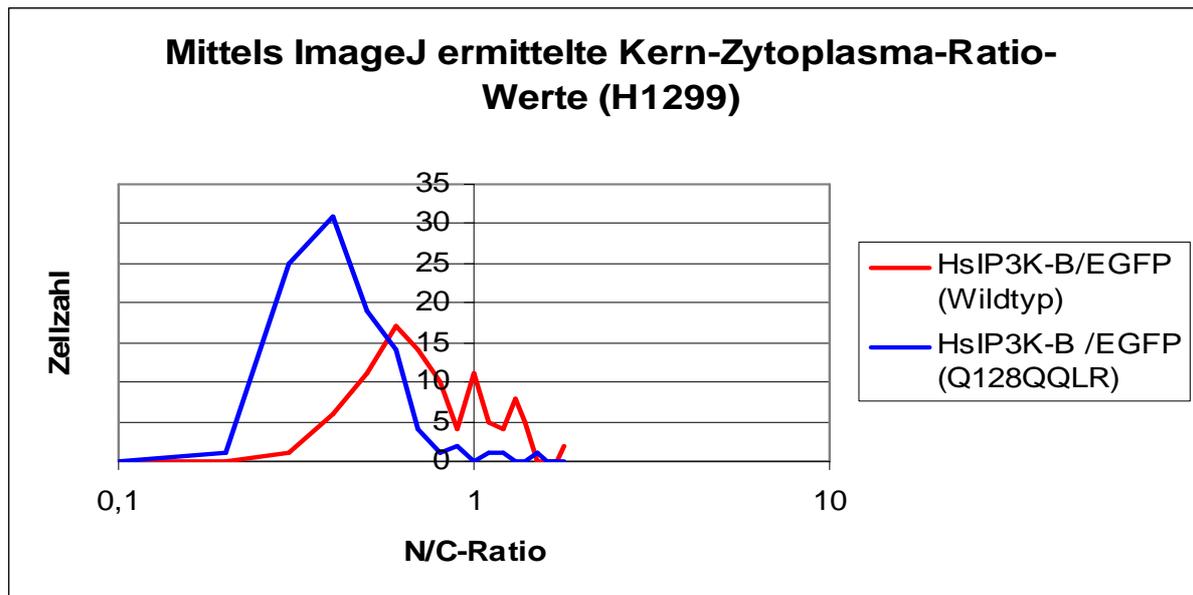


Diagramm 3.7: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299-Zellen beträgt $0,89 \pm 0,50$ und der mit pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299-Zellen $0,47 \pm 0,20$.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen deutlich, dass bei den mit dem Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante) transfizierten H1299-Zellen eine signifikante Anreicherung von Fluoreszenz im Zytoplasma gegenüber dem Wildtyp gemessen wurde ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

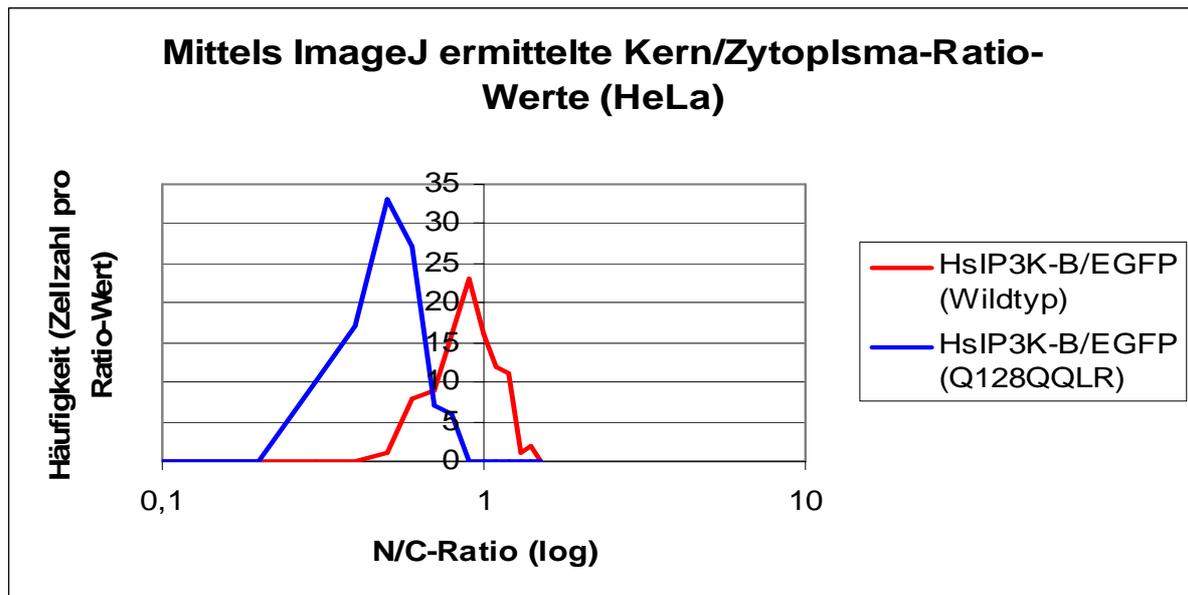


Diagramm 3.8: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten HeLa-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten HeLa-Zellen beträgt $0,93 \pm 0,21$ und der mit pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten HeLa-Zellen $0,53 \pm 0,12$.

Auch hier zeigt die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen deutlich, dass bei den mit dem Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante) transfizierten HeLa-Zellen eine signifikante Anreicherung von Fluoreszenz im Zytoplasma gegenüber dem Wildtyp gemessen wurde ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

3.2.2.2 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante) der HsIP3K-B ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen

Hier wurde die Auswirkung einer LMB-Behandlung auf das Lokalisationsverhalten des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante) in H1299- und HeLa-Zellen untersucht. Das Toxin LMB (Leptomycin B) ist als ein Inhibitor des CRM1 (chromosomal region maintenance) bekannt und wird zur Untersuchung des Kernexport-Verhaltens verwendet. Das LMB inhibiert das CRM1 (=Exportin 1) und verhindert damit die Erkennung und Bindung der Proteine, wodurch der Kernexport unterbunden wird.

Mit diesem Versuch soll untersucht werden, ob es sich bei dem identifizierten Kernlokalisierungssignal (NLS) in der Aktinbindungsdomäne (ABD), um das einzige NLS in der HsIP3K-B handelt. Wenn ein weiteres Kernlokalisierungssignal vorhanden ist, sollte nach Wegfall des Kernexports die Kernlokalisierung des Proteins zunehmen.

Es wurde die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen untersucht.

Nach einer sechsstündigen Inkubation mit LMB wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Die Lokalisation des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.10).

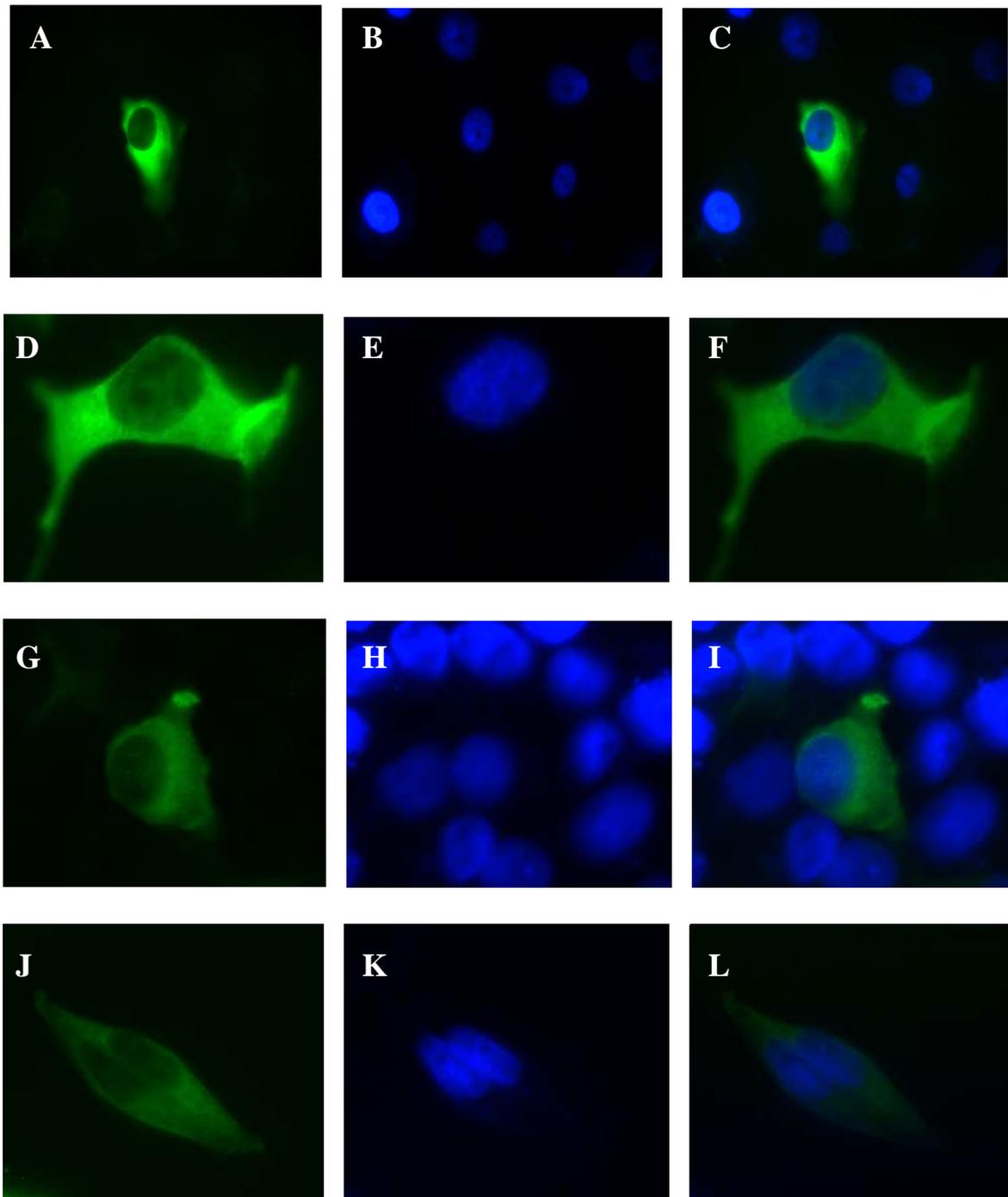


Abbildung 3.10: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pHsIP3K-B/EGFP ($Q^{128}QQLR$) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen ohne bzw. mit LMB-Behandlung

Die Bilder A-C zeigen eine unbehandelte H1299-Zelle, die Bilder D-F eine behandelte H1299-Zelle, die Bilder G-I eine unbehandelte HeLa-Zelle, die Bilder J-L zwei behandelte HeLa-Zelle. Beide Zelllinien wurden mit pHsIP3K-B/EGFP ($Q^{128}QQLR$) transfiziert. Die behandelten Zellen wurden nach einer sechsstündigen Inkubation mit LMB, fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Mittelwerte und Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen, wurden bestimmt. Die Auswertungen erfolgten mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Die Mittelwerte der Messreihen (HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) in H1299- und HeLa-Zellen mit LMB-Behandlung) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test, Tukey-Kramer-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299 beträgt $0,51 \pm 0,15$ und der von HeLa $0,55 \pm 0,11$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den pEGFP/HsIP3K-B (Q¹²⁸QQLR) transfizierten und LMB-behandelten H1299- und HeLa-Zellen beobachtet werden. Die Mittelwerte und Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Werte sind zwischen den pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten und LMB-behandelten H1299- und HeLa-Zellen, identisch.

Es wurde gezeigt, dass nach LMB-Behandlung der mit pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen es zu keiner Kernanreicherung des Fusionsproteins gekommen ist. Weiterhin wurde ein Kernausschluss beobachtet. Auch die Auswertungen mittels *ImageJ* ergaben jeweils keine signifikante Veränderung der Verteilung der Fluoreszenzintensität vor bzw. nach LMB-Behandlung zwischen Zellkern und Zytoplasma.

Um die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der mit pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten und LMB-behandelten bzw. unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinie (H1299 bzw. HeLa) zu zeigen, wird in jeweils einem x-/y-Diagramm die jeweilige Ratio-Verteilung der entsprechenden Zelllinie aufgetragen (Diagramm 3.9 und Diagramm 3.10). Auch hier wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen.

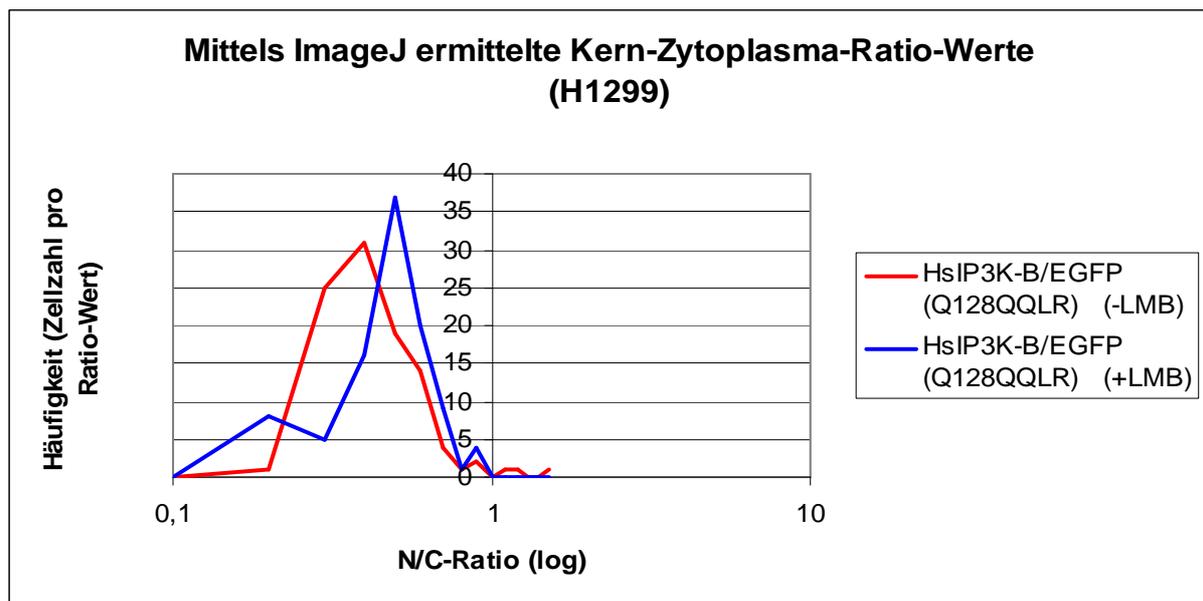


Diagramm 3.9: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten und LMB-behandelten bzw. -unbehandelten H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit unbehandelten H1299-Zellen beträgt $0,47 \pm 0,20$ und der mit behandelten H1299-Zellen $0,51 \pm 0,15$.

Die Mittelwerte der Kern/Zytoplasma-Ratio-Werte des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) in H1299-Zellen ohne bzw. mit LMB-Behandlung, sind identisch. Jedoch weisen die Verteilungen dieser Werte einen signifikanten Unterschied auf ($p=0,005$; Mann-Whitney-Test).

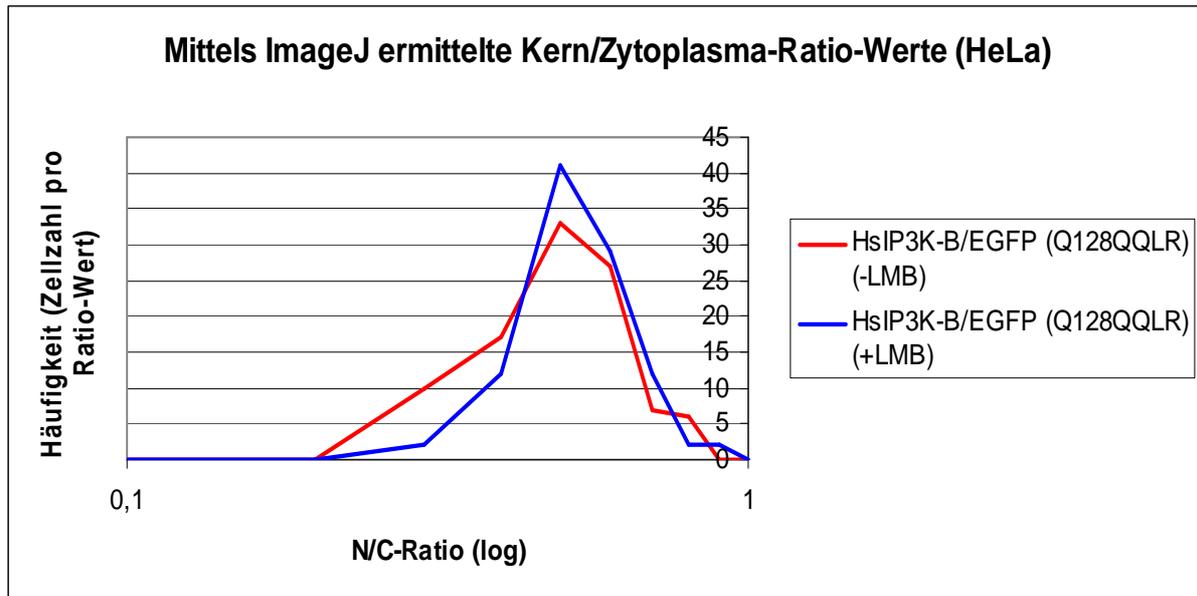


Diagramm 3.10: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten und LMB-behandelten bzw. -unbehandelten HeLa-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit unbehandelten HeLa-Zellen beträgt $0,53 \pm 0,12$ und der mit behandelten HeLa-Zellen $0,55 \pm 0,11$.

Durch die Lokalisationsstudien konnte ermittelt werden, dass die Mittelwerte der Kern/Zytoplasma-Ratio der HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen vor bzw. nach der LMB-Behandlung, gleich bleiben. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem identifizierten NLS um das einzige Kernlokalisierungssignal in der HsIP3K-B handelt.

3.2.3 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QLR) (NLS-Tripelmutante) und der NLS-Einzelmutanten (Glutamin-Screening) der HsIP3K-B in H1299- und HeLa-Zellen

Zur genaueren Eingrenzung des charakterisierten Kernlokalisierungssignals (NLS) und zur Ermittlung der Bedeutung einzelner Aminosäuren innerhalb der Konsensussequenz für den Kernimport, wurde ein Glutamin-Screening durchgeführt. Hierbei wurde jeweils eine basische Aminosäure Lysin (L) oder Arginin (R) innerhalb der möglichen Konsensussequenz für das Kernlokalisierungssignals (NLS), in die neutrale Aminosäure Glutamin (Q) ausgetauscht. Die eingeführten Punktmutationen werden in der Abbildung 3.11 anhand eines Modells dargestellt.

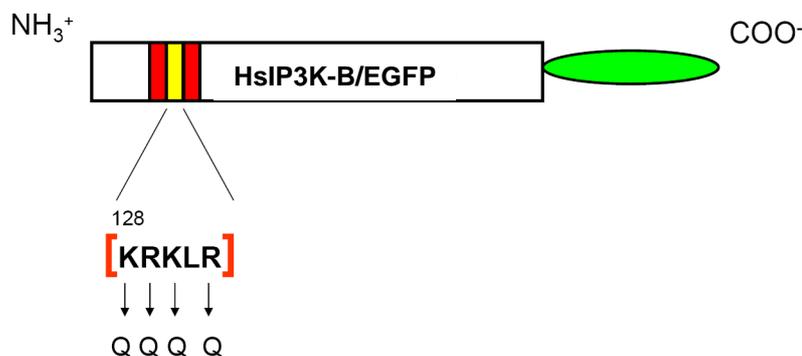


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) mit den NLS-Einzelmutationen

Schematische Darstellung vom HsIP3K-B/EGFP, dem humanen Volllängenenzym mit C-terminaler EGFP-Markierung (grün) und den NLS-Einzelmutationen. Die ABD (rot) führt zur Bindung des Enzyms an das F-Aktin. Innerhalb des NLS (gelb) wurde eine jeweilige Punktmutation eingeführt, so dass das NLS inaktiviert wird.

Die Tabelle 3.2 zeigt die einzelnen Punktmutationen innerhalb des Kernlokalisationssignals (NLS) der HsIP3K-B und die entsprechenden Fusionsvektoren bzw. Fusionsproteine:

Bezeichnung	NLS-Sequenz	Fusionsvektor
Wildtyp	K ¹²⁸ RKLR	pHsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ RKLR)
Mutation 1	Q ¹²⁸ RKLR	pHsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ RKLR)
Mutation 2	K ¹²⁸ QKLR	pHsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ QKLR)
Mutation 3	K ¹²⁸ RQLR	pHsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ RQLR)
Mutation 4	K ¹²⁸ RKLO	pHsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ RKLO)
Bez. des Fusionsproteins	Fusionsprotein	
Volllängenenzym	HsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ RKLR)	
NLS 1	HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ RKLR)	
NLS 2	HsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ QKLR)	
NLS 3	HsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ RQLR)	
NLS 4	HsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ RKLO)	

Tabelle 3.2: Darstellung der Punktmutationen innerhalb des Kernlokalisationssignals (NLS) der HsIP3K-B für das Glutamin-Screening

In der Tabelle dargestellt sind die vier NLS-Einzelmutationen mit den entsprechenden Fusionsvektoren und Fusionsproteinen der HsIP3K-B für das Glutamin-Screening. Aufgrund der Länge der Protein-Namen wurden Abkürzungsbezeichnungen (NLS 1-4) verwendet. Als Vergleich wird die Wildtyp-Sequenz aufgetragen.

Das Glutamin-Screening wurde in der H1299-Zelllinie durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit dem jeweiligen Fusionsprotein NLS 1, NLS 2, NLS 3 oder NLS 4, transfiziert, nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert und zur Identifizierung der Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Die Verteilung der Fusionsproteine wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.12).

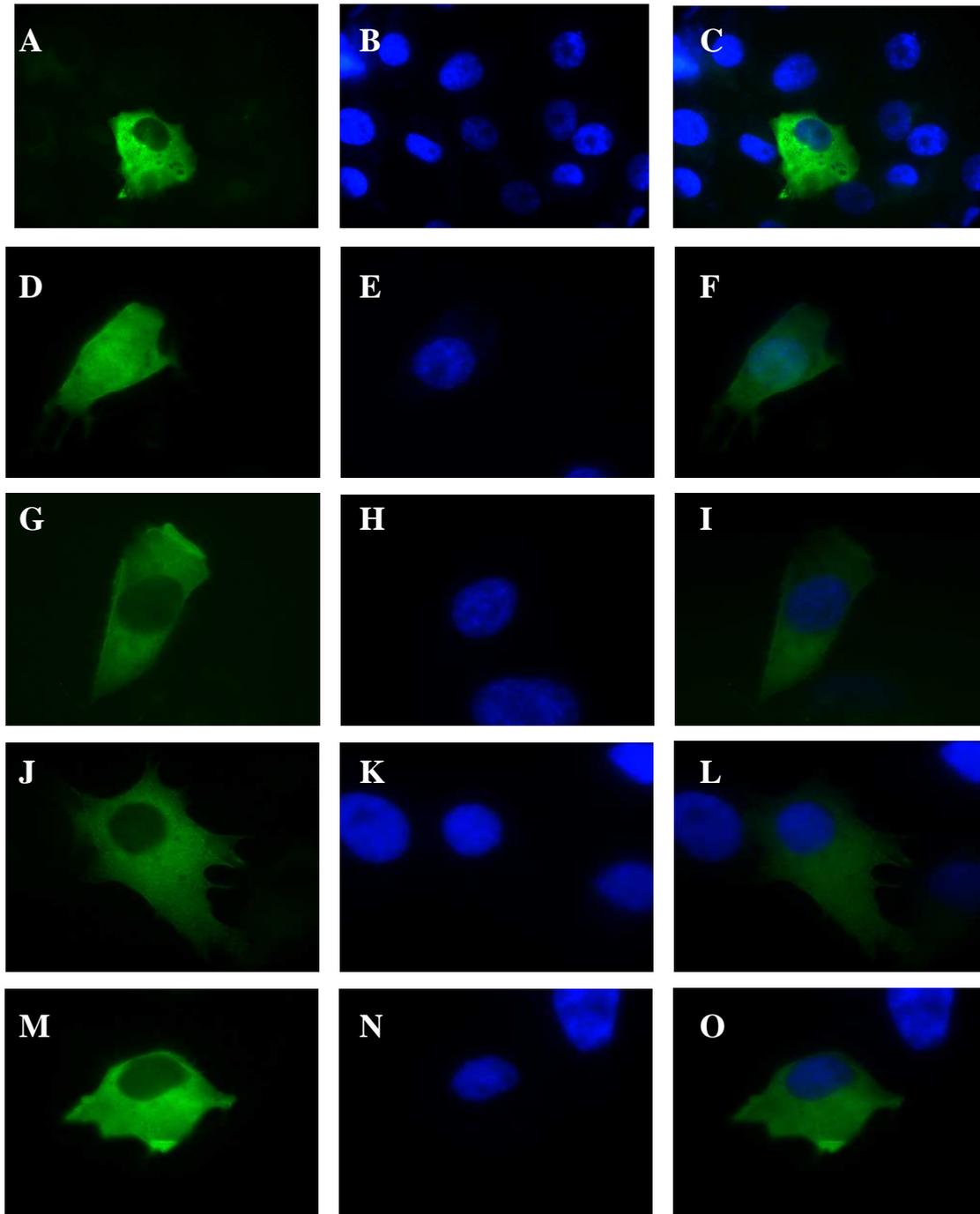


Abbildung 3.12: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pHsIP3K-B/EGFP ($Q^{128}QQLR$), pHsIP3K-B/EGFP ($Q^{128}RKLR$), pHsIP3K-B/EGFP ($K^{128}QQLR$), pHsIP3K-B/EGFP ($K^{128}RQLR$) und pHsIP3K-B/EGFP ($K^{128}RKLO$) transfizierten H1299- Zellen

Die Bilder A-C zeigen eine mit pHsIP3K-B/EGFP ($Q^{128}QQLR$)transfizierte H1299-Zelle, die Bilder D-F eine mit pHsIP3K-B/EGFP ($Q^{128}RKLR$) transfizierte H1299-Zelle, die Bilder G-I eine mit pHsIP3K-B/EGFP ($K^{128}QQLR$) transfizierte H1299-Zelle, die Bilder J-L eine mit pHsIP3K-B/EGFP ($K^{128}RQLR$) transfizierte H1299-Zelle, die Bilder M-O eine mit pHsIP3K-B/EGFP ($K^{128}RKLO$) transfizierte H1299-Zelle. Die Zellen wurden nach 24 h fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Es wurde die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Trippelmutante), NLS 1, NLS 2, NLS 3, NLS 4 (Glutamin Screening) und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen miteinander verglichen.

Die jeweiligen Mittelwerte und Verteilungen der Kern/Zytoplasma-Ratio wurden in einem x/y-Diagramm dargestellt (Diagramm 3.11). Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse des Glutamin-Screenings wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet. Die im Diagramm 3.11 dargestellten Kern/Zytoplasma-Ratio stellen ein repräsentatives Beispiel der jeweils drei ausgewerteten Versuche dar. Die Mittelwerte der Messreihen (NLS 2, NLS 3 und NLS 4) wiesen sowohl untereinander ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test), als auch mit dem Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR), keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,315$; Kruskal-Wallis-Test) auf.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante) beträgt $0,47 \pm 0,20$, der von NLS 2 $0,49 \pm 0,19$, der von NLS 3 $0,52 \pm 0,32$ und der von NLS 4 $0,46 \pm 0,18$ (Diagramm 3.11). Anders verhält es sich mit dem Fusionsprotein NLS 1, das in seiner Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung einen signifikanten Unterschied zu der des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) und der der Fusionsproteine NLS 2, NLS 3 und NLS 4 ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test), jedoch keinen signifikanten Unterschied zu der des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), aufweist ($p = 0,691$; Mann-Whitney-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) beträgt $0,89 \pm 0,50$ und der von NLS 1 $0,87 \pm 0,33$ (Diagramm 3.11).

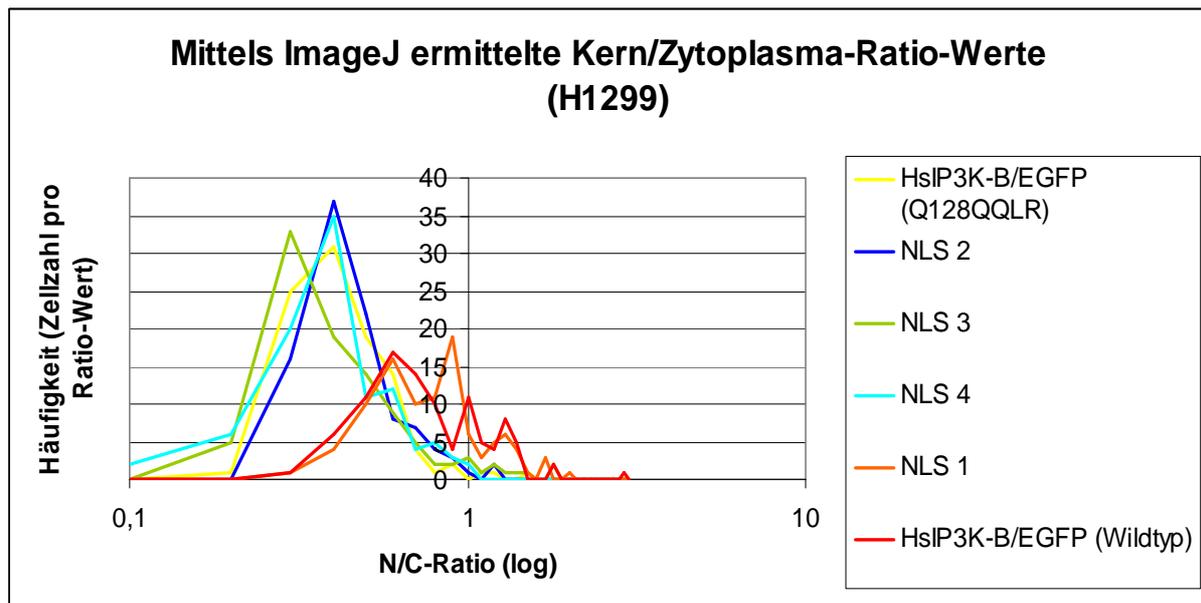


Diagramm 3.11: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR), NLS 1, NLS 2, NLS 3, NLS 4 und von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299-Zellen beträgt $0,47 \pm 0,20$, der pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸RKLR) transfizierten H1299-Zellen $0,87 \pm 0,33$, der mit pHsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸QQLR) transfizierten H1299-Zellen $0,49 \pm 0,19$, der mit pHsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸RQLR) transfizierten H1299-Zellen $0,52 \pm 0,32$, der mit pHsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸RKLQ) transfizierten H1299-Zellen $0,46 \pm 0,18$ und der mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299-Zellen $0,89 \pm 0,50$.

3.2.4 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und ABD(HsIP3K-B)/EGFP der HsIP3K-B in H1299- und HeLa-Zellen

Um zu untersuchen, ob das in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B lokalisierte Kernlokalisierungssignal (NLS) *hinreichend* für den Kernimport des Proteins ist, wurde das Plasmid pABD(HsIP3K-B)/EGFP transient in H1299- und HeLa-Zellen transfiziert und daraufhin die Kern/Zytoplasma-Lokalisation untersucht.

Das Plasmid pABD(HsIP3K-B)/EGFP kodiert eine Mutante der HsIP3K-B, bei der ausschließlich die isolierte Aktinbindungsdomäne (ABD) mit dem darin enthaltenen Kernlokalisierungssignal (NLS) in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde. Ist dieses Kernlokalisierungssignal hinreichend für den Kernimport, soll an der Expression des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP eine Kernanreicherung beobachtet werden.

3.2.4.1 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen

Die Zelllinien H1299 und HeLa wurden mit pABD(HsIP3K-B)/EGFP (Abbildung 3.13) transfiziert und nach 24 h Expression die Kernlokalisierung untersucht. Zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne wurden diese nach der Paraformaldehydfixierung der Zellen mittels DAPI angefärbt.

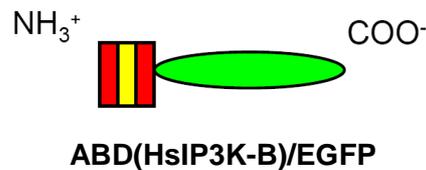


Abb. 3.13: Schematische Darstellung des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP

Schematische Darstellung vom ABD(HsIP3K-B)/EGFP mit der isolierten Aktinbindungsdomäne (ABD, rot) des humanen Volllängenenzym der HsIP3K-B und dem darin enthaltenen NLS (gelb) und C-terminaler EGFP-Markierung (grün).

Die Verteilung des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Das EGFP zeigt eine grüne Fluoreszenz, während die mit DAPI angefärbten Zellkerne blau fluoreszierend erscheinen (Abbildung 3.14).

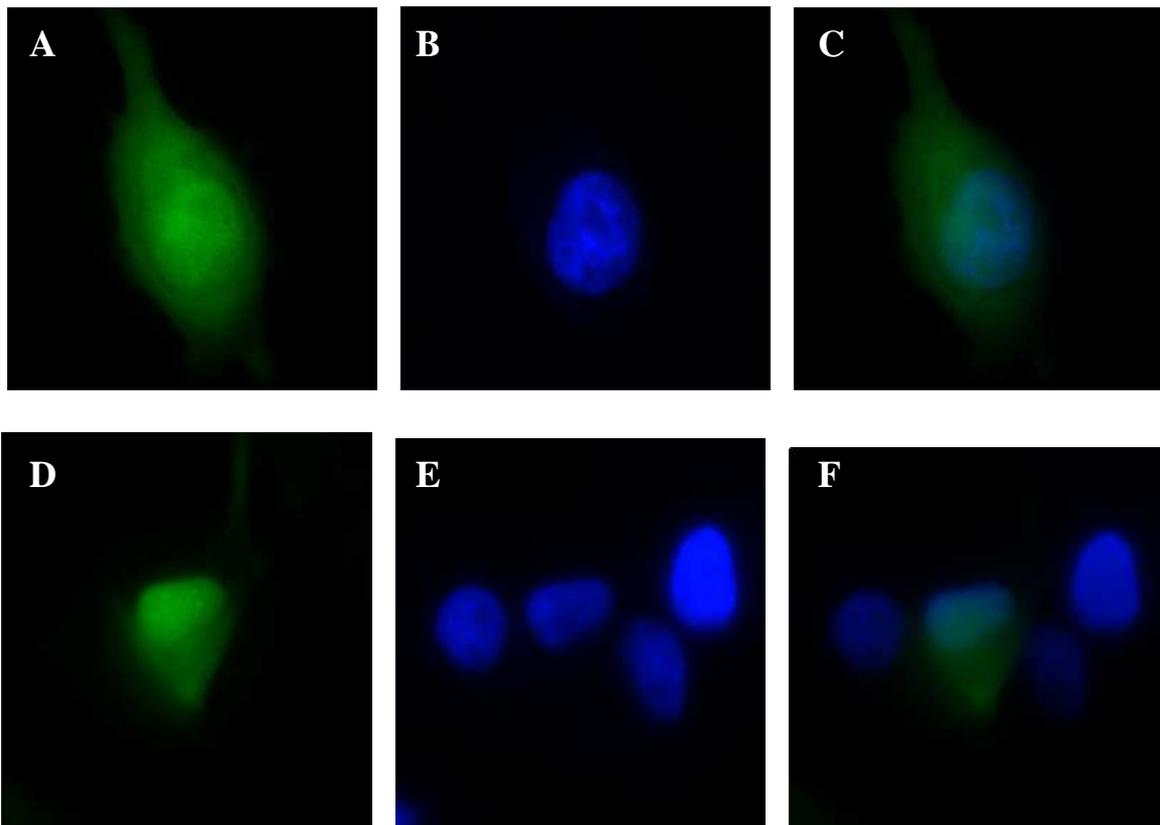


Abbildung 3.14: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299- und HeLa-Zellen

Die Bilder A-C zeigen eine H1299-Zelle, die Bilder D-F eine HeLa-Zelle. Beide Zelllinien wurden mit pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfiziert, nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio von ABD(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen wurden bestimmt. Die Auswertungen erfolgten mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Die Mittelwerte der Messreihen (ABD(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p=0,184$; Kruskal-Wallis-Test, Tukey-Kramer-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299 beträgt $1,60 \pm 0,55$ und der von HeLa $1,58 \pm 0,32$. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,184$; Mann-Whitney-Test) zwischen den pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299- und HeLa-Zellen beobachtet werden.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen deutlich, dass in ABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299- und HeLa-Zellen deutlich mehr Fluoreszenz im Zellkern als im Zytoplasma gemessen wurde.

3.2.4.2 Intrazelluläre Lokalisation von EGFP in H1299-Zellen

Es ist bekannt, dass EGFP allein eine Kernlokalisierung aufweist [Seibel *et al.*, 2007]. Aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts zwischen EGFP und ABD(HsIP3K-B)/EGFP wurden hier ihre intrazellulären Lokalisationen in H1299-Zellen miteinander verglichen.

Die Lokalisation des EGFPs wurde nach 24 h Expression untersucht. Zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne, wurden diese nach der Paraformaldehydfixierung der Zellen mittels DAPI angefärbt. Das EGFP (Abbildung 3.15) zeigt eine grüne Fluoreszenz, während die mit DAPI angefärbten Zellkerne blau fluoreszierend erscheinen. Mittels GFP- und DAPI-Fluoreszenz wird die Verteilung des EGFPs analysiert (Abbildung 3.16).

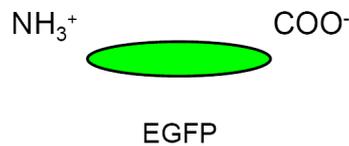


Abb. 3.15: Schematische Darstellung des EGFPs

Das EGFP (grün) kann N- oder C-terminal an Proteine fusioniert werden.

NH₃⁺ : N-terminales Ende; COO⁻ : C-terminales Ende

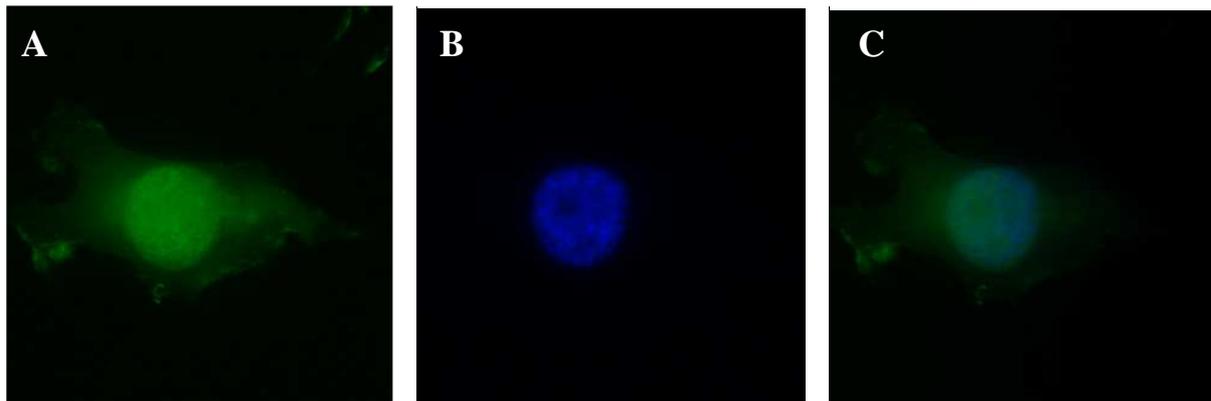


Abbildung 3.16: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von einer pEGFP-N1 transfizierten H1299-Zelle

Die Bilder A-C zeigen eine H1299-Zelle. Die Zellen wurden mit pEGFP-N1 transfiziert, nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio von EGFP in der transfizierten H1299-Zelllinie wird in einem x-/y-Diagramm erfasst (Diagramm 3.12). Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Mit Hilfe der DAPI-Fluoreszenzbilder konnte der Zellkern eindeutig identifiziert werden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet. Das Diagramm stellt ein repräsentatives Beispiel der jeweils drei ausgewerteten Versuche dar.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von EGFP in H1299-Zellen beträgt $1,63 \pm 0,47$.

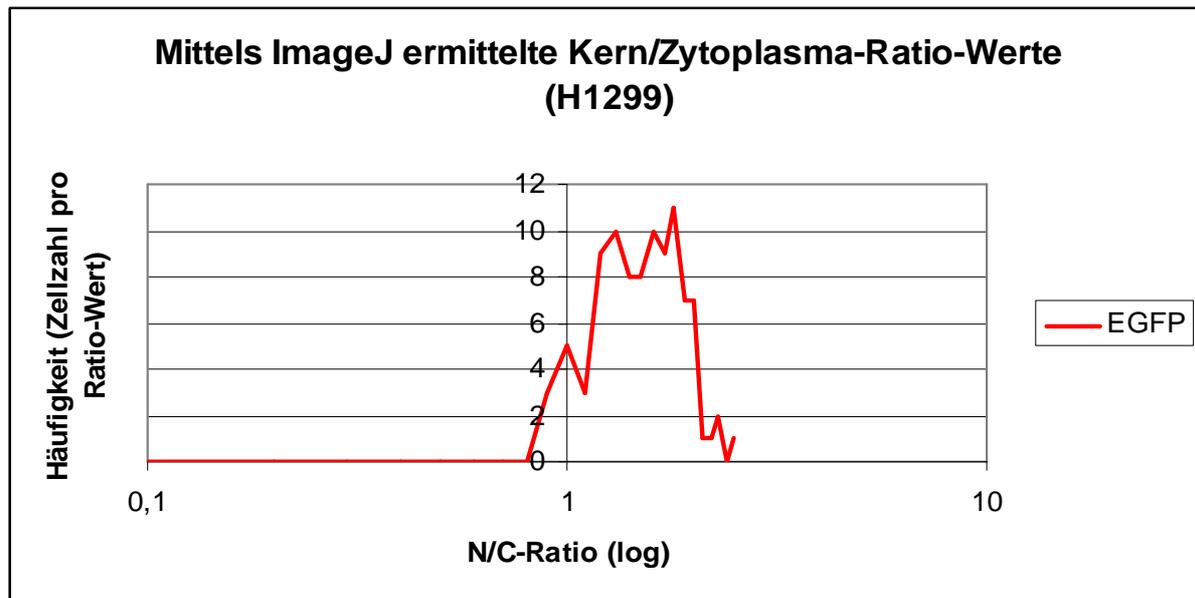


Diagramm 3.12: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio von EGFP in H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) in einem x-/y-Diagramm gegenüber gestellt, wobei die x-Achse logarithmiert wird. Die Kern/Zytoplasma-Ratio auf der x-Achse wird gegen die Häufigkeit auf der y-Achse aufgetragen. Es wurden die mit pEGFP-N1 transfizierten H1299-Zellen analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ* mit 100 GFP-Fluoreszenzbildern pro Messreihe. Die DAPI-Fluoreszenzbilder wurden zur eindeutigen Identifizierung des Zellkerns herangezogen. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pEGFP-N1 transfizierten H1299-Zellen beträgt $1,63 \pm 0,47$.

3.2.4.3 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine ABD(HsIP3K-B)/EGFP, EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen

In dem Kapitel 3.2.4.1 wurde gezeigt, dass nach Transfektion und Expression des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen eine Kernanreicherung beobachtet werden konnte. Auch die Auswertungen mittels *ImageJ* ergaben jeweils eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität in Zellkern als im Zytoplasma. Bei dem Plasmid pABD(HsIP3K-B)/EGFP handelt es sich um eine Mutante des HsIP3K-B Vollängenenzym, bei der ausschließlich die isolierte Aktinbindungsdomäne (ABD) mit dem darin enthaltenen Kernlokalisationsignal (NLS), in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde.

Um die Stärke der Kernanreicherung des Plasmids pABD(HsIP3K-B)/EGFP nach Transfektion in H1299- und HeLa-Zellen zu zeigen, wurde jeweils in einem x-/y-Diagramm (Diagramm 3.13 und Diagramm 3.14) die jeweilige Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der Fusionsproteine ABD(HsIP3K-B)/EGFP, EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) für die entsprechende Zelllinie aufgetragen. Auch hier wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert.

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Hierbei wurde die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von EGFP in H1299-Zellen aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts mit dem Fusionsprotein ABD(HsIP3K-B)/EGFP, als Vergleich herangezogen. Hingegen wurde die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen aufgrund der ähnlichen Regulation mit dem Fusionsprotein ABD(HsIP3K-B)/EGFP, als Vergleich herangezogen.

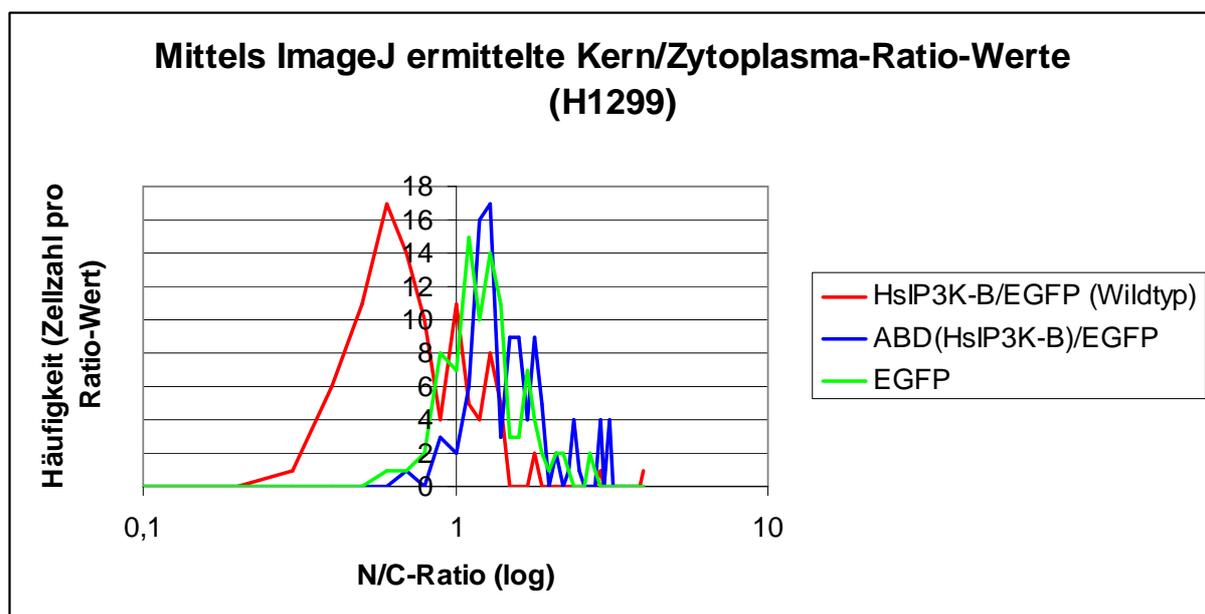


Diagramm 3.13: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der ABD(HsIP3K-B)/EGFP, EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299-Zellen beträgt $1,60 \pm 0,55$, der mit pEGFP-N1 transfizierten H1299-Zellen $1,63 \pm 0,47$ und der mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299-Zellen $0,89 \pm 0,50$.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen deutlich, dass die pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299-Zellen im Vergleich zum Wildtyp signifikant mehr Fluoreszenz im Zytoplasma als im Kern gemessen wurde ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test). Der Vergleich mit EGFP zeigte keine signifikante Änderung der Mittelwerte und Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio ($p = 0,210$; Mann-Whitney-Test).

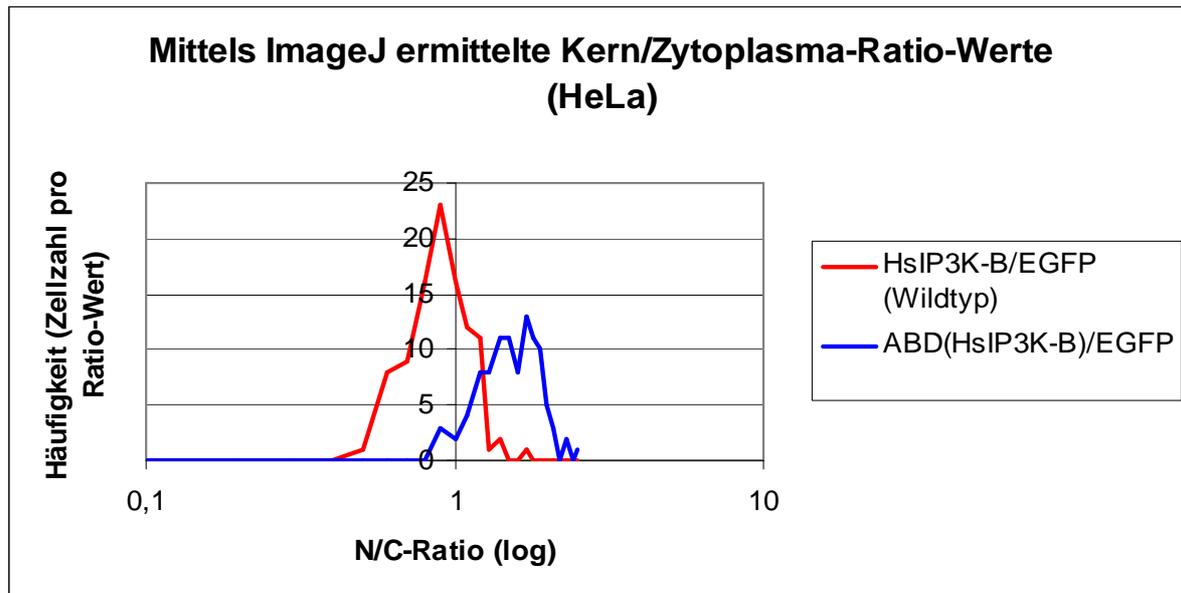


Diagramm 3.14: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pABD(HsIP3K-B)/EGFP, pEGFP-N1 und pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten HeLa-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten HeLa-Zellen beträgt $1,58 \pm 0,32$ und der mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten HeLa-Zellen beträgt $0,93 \pm 0,21$.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen deutlich, dass bei den mit pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten HeLa-Zellen im Vergleich zum Wildtyp, signifikant mehr Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma gemessen wurde ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

3.2.4.4 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP der HsIP3K-B ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen

Hier wurde die Auswirkung einer LMB-Behandlung auf das Lokalisationsverhalten des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen untersucht.

Das Plasmid pABD(HsIP3K-B)/EGFP ist eine Mutante des HsIP3K-B Volllängenzym, bei der ausschließlich die isolierte Aktinbindungsdomäne (ABD) mit dem darin enthaltenen Kernlokalisierungssignal (NLS), in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde. Das Toxin LMB (Leptomycin B) ist als ein Inhibitor des CRM1 (chromosomal region maintenance) bekannt und wird zur Untersuchung des Kernexport-Verhaltens verwendet.

Das LMB inhibiert das CRM1(=Exportin 1) und verhindert damit die Erkennung und Bindung der Proteine, wodurch der Kernexport unterbunden wird.

Mit diesem Versuch soll gezeigt werden, dass in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B sowohl ein Kernlokalisierungssignal (NLS) als auch ein Kernexportsignal (NES) vorhanden ist. Durch die LMB-Behandlung wird der Kernexport inhibiert, sodass es zu einer stärkeren Kernanreicherung kommen sollte als ohne LMB-Behandlung.

Es wurde die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP ohne bzw. mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen untersucht. Nach einer sechsstündigen Inkubation mit LMB wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Die Lokalisation des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.17).

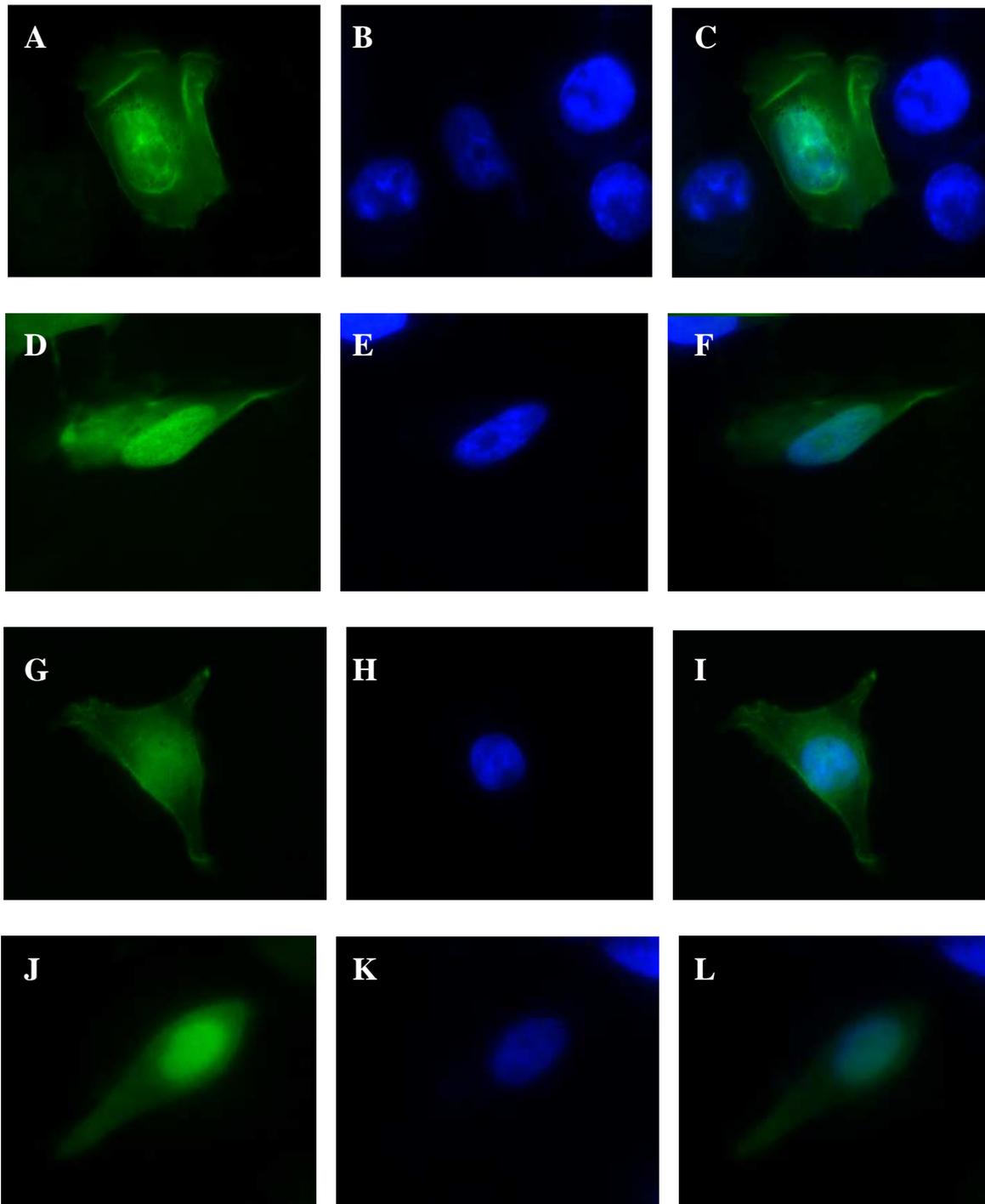


Abbildung 3.17: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299- und HeLa-Zellen ohne bzw. mit LMB-Behandlung

Die Bilder A-C zeigen eine unbehandelte H1299-Zelle, die Bilder D-F eine behandelte H1299-Zelle, die Bilder G-I eine unbehandelte HeLa-Zelle, die Bilder J-L zwei behandelte HeLa-Zelle. Beide Zelllinien wurden mit pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfiziert. Die behandelten Zellen wurden nach einer sechsständigen Inkubation mit LMB fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Mittelwerte und Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP mit LMB-Behandlung in H1299- und HeLa-Zellen wurden bestimmt. Die Auswertungen erfolgten mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Die Mittelwerte der Messreihen (ABD(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen mit LMB-Behandlung) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test, Tukey-Kramer-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299 beträgt $2,2 \pm 0,69$ und der von HeLa $2,34 \pm 0,66$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den ABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten und LMB-behandelten H1299- und HeLa-Zellen beobachtet werden. Die Mittelwerte und Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Werte sind zwischen den ABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten und LMB-behandelten H1299- und HeLa-Zellen, identisch.

Es wurde gezeigt, dass nach LMB-Behandlung der mit pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299- und HeLa-Zellen es zu einer Kernanreicherung des Fusionsproteins gekommen ist. Auch die Auswertungen mittels *ImageJ* ergab jeweils eine signifikante Veränderung der Verteilung der Fluoreszenzintensität vor bzw. nach LMB-Behandlung zwischen Zellkern und Zytoplasma.

Um die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der mit pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten und LMB-behandelten bzw. unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinie (H1299 bzw. HeLa) zu zeigen, wird in jeweils einem x/y-Diagramm die jeweilige Ratio-Verteilung der entsprechenden Zelllinie aufgetragen (Diagramm 3.15 und Diagramm 3.16). Auch hier wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen.

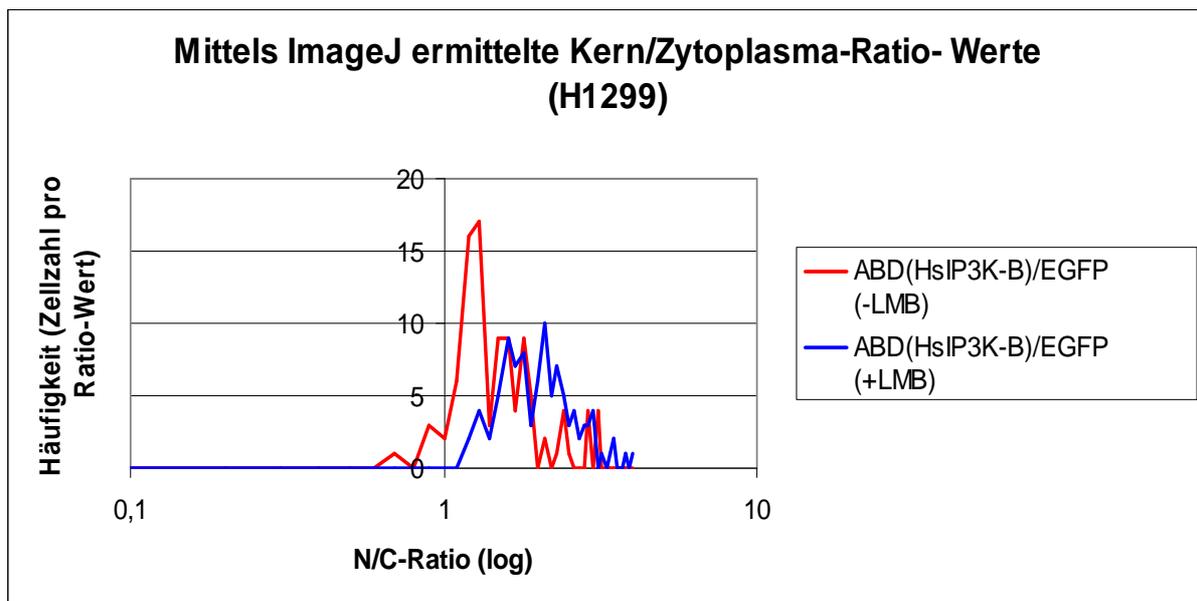


Diagramm 3.15: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten und LMB-behandelten bzw. -unbehandelten H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit unbehandelten H1299-Zellen beträgt $1,60 \pm 0,55$ und der mit mit behandelten H1299-Zellen $2,2 \pm 0,69$.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung des Fusionsproteins ABD(HsIP3K-B)/EGFP mit LMB-Behandlung ist signifikant höher als die ohne LMB-Behandlung ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

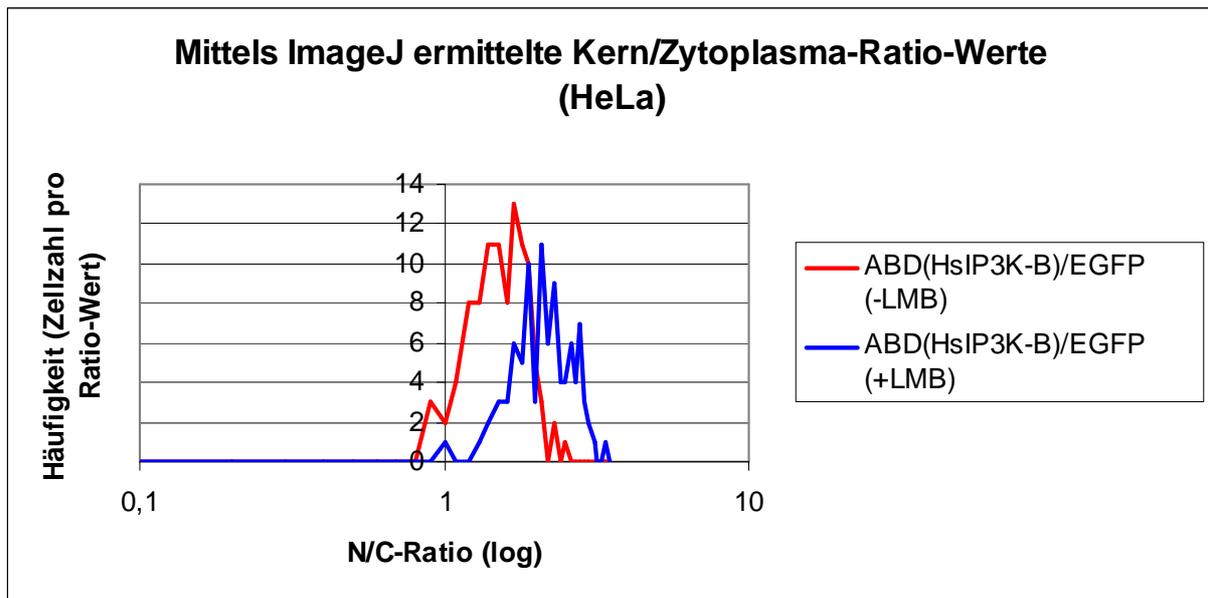


Diagramm 3.16: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten und LMB-behandelten bzw. -unbehandelten HeLa-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit unbehandelten HeLa-Zellen beträgt $1,58 \pm 0,32$ und der mit mit behandelten HeLa-Zellen $2,34 \pm 0,66$.

Durch die Lokalisationsstudien konnte ermittelt werden, dass sich die Mittelwerte der Kern/Zytoplasma-Ratio der pABD(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299- und HeLa-Zellen vor bzw. nach der LMB-Behandlung signifikant erhöhen. Dadurch wurde gezeigt, dass die Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B sowohl ein Kernlokalisierungssignal (NLS) als auch ein Kernexportsignal (NES) beinhaltet.

3.2.5 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins NLS(HsIP3K-B)/EGFP der HsIP3K-B und EGFP in H1299- und HeLa-Zellen

Um zu untersuchen, ob das in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B lokalisierte Kernlokalisierungssignal (NLS) *hinreichend* für den Kernimport des Proteins ist, wurde die Lokalisation der beiden Fusionsproteine ABD(HsIP3K-B)/EGFP und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen untersucht

Das Plasmid pNLS(HsIP3K-B)/EGFP kodiert eine Mutante der HsIP3K-B, bei der ausschließlich das isolierte Kernlokalisierungssignal (NLS) in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde. Dadurch sollte die alleinige Wirkung des NLS auf die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung analysiert werden. Ist dieses Kernlokalisierungssignal hinreichend für den Kernimport, soll an der Expression des Fusionsproteins HsIP3K-B pEGFP/NLS ebenfalls eine Kernanreicherung beobachtet werden.

3.2.5.1 Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen

Die Zelllinien H1299 und HeLa wurden mit pNLS(HsIP3K-B)/EGFP (Abbildung 3.18) transfiziert und nach 24 h Expression die Kernlokalisation untersucht. Zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne wurden diese nach der Paraformaldehydfixierung der Zellen mittels DAPI angefärbt.

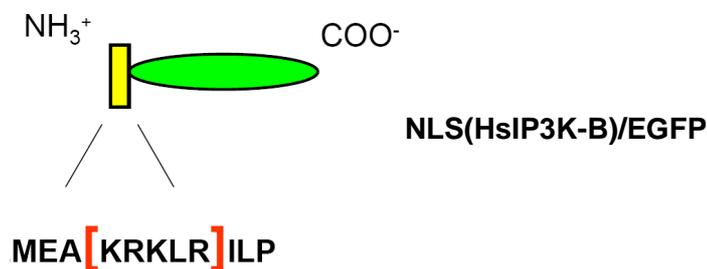


Abb. 3.18: Schematische Darstellung des Fusionsproteins NLS(HsIP3K-B)/EGFP

Schematische Darstellung vom NLS(HsIP3K-B)/EGFP mit dem isolierten Kernlokalisierungssignal (NLS, gelb) des humanen Volllängenzym der HsIP3K-B und C-terminaler EGFP-Markierung (grün). Für die Fusion mit dem EGFP wurden einige Aminosäuren vor und nach dem NLS hinzugefügt.

Die Verteilung des Fusionsproteins NLS(HsIP3K-B)/EGFP wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Das EGFP zeigt eine grüne Fluoreszenz, während die mit DAPI angefärbten Zellkerne blau fluoreszierend erscheinen (Abbildung 3.19).

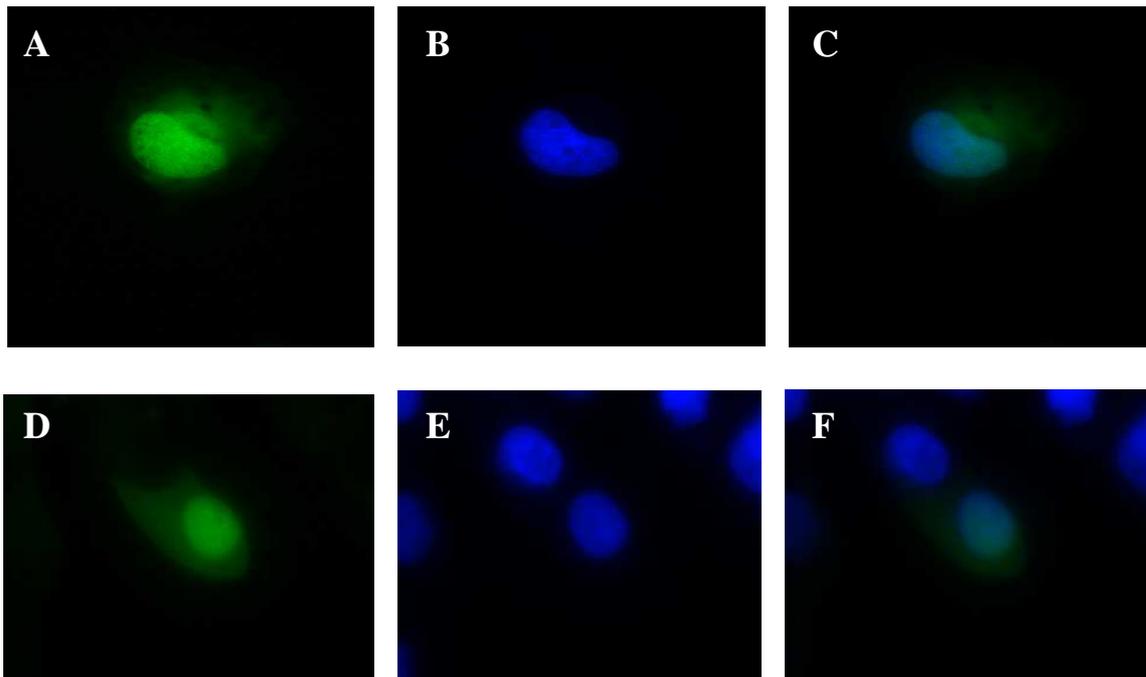


Abbildung 3.19: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299- und HeLa-Zellen

Die Bilder A-C zeigen eine H1299-Zelle, die Bilder D-F eine HeLa-Zelle. Beide Zelllinien wurden mit pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfiziert, nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio von NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen wird bestimmt. Die Auswertungen erfolgten mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Die Mittelwerte der Messreihen (NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p=0,184$; Kruskal-Wallis-Test, Tukey-Kramer-Test).

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von H1299 beträgt $2,26 \pm 0,61$ und der von HeLa $2,14 \pm 0,91$. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p>0,05$; Mann-Whitney-Test) zwischen den pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299- und HeLa-Zellen beobachtet werden. Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen deutlich, dass in pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299- und HeLa-Zellen deutlich mehr Fluoreszenz im Zellkern als im Zytoplasma gemessen wurde.

3.2.5.2 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine NLS(HsIP3K-B)/EGFP und EGFP in H1299- und HeLa-Zellen

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass nach Transfektion und Expression des Fusionsproteins NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299- und HeLa-Zellen eine Kernanreicherung beobachtet werden konnte. Auch die Auswertungen mittels *ImageJ* ergaben jeweils eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität in Zellkern als im Zytoplasma. Bei dem Plasmid pNLS(HsIP3K-B)/EGFP handelt es sich um eine Mutante des HsIP3K-B Volllängeenzym, bei der ausschließlich das isolierte Kernlokalisierungssignal (NLS) in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde.

Um die Stärke der Kernanreicherung des Fusionsproteins NLS(HsIP3K-B)/EGFP nach Transfektion in H1299-Zellen zu zeigen, wurde in einem x-/y-Diagramm (Diagramm 3.17) die jeweilige Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der Fusionsproteine NLS(HsIP3K-B)/EGFP und EGFP aufgetragen. Auch hier wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Hierbei wurde die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von EGFP aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts mit dem Fusionsprotein NLS(HsIP3K-B)/EGFP, als Vergleich herangezogen.

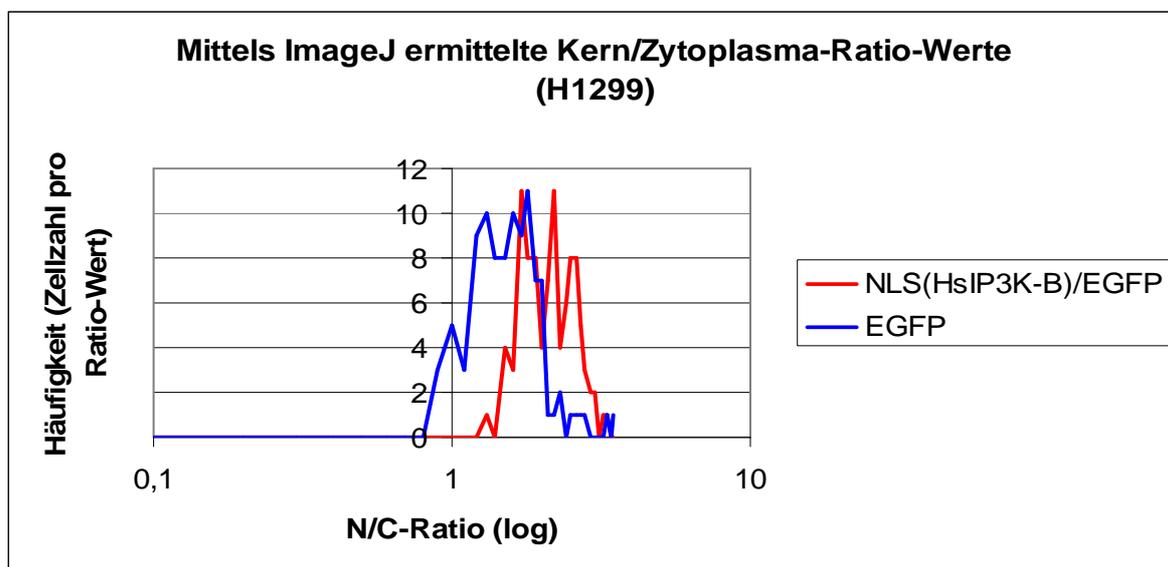


Diagramm 3.17: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der NLS(HsIP3K-B)/EGFP und EGFP in H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299-Zellen beträgt $2,26 \pm 0,61$ und der mit pEGFP-N1 transfizierten H1299-Zellen $1,63 \pm 0,47$.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen zeigen deutlich, dass bei den pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299-Zellen im Vergleich zum EGFP, signifikant mehr Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma gemessen wurde ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

3.2.6 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP/HsIPMK (Wildtyp), EGFP/NLS (HsIPMK) und EGFP/3xNLS (SV40) in H1299-Zellen

Um die Stärke des identifizierten Kernlokalisierungssignals (NLS) der HsIP3K-B einzuordnen, wurden die Plasmide pEGFP/HsIPMK (Wildtyp), pEGFP/NLS (HsIPMK) und pEGFP/3xNLS (SV40) in H1299-Zellen transfiziert. Dabei wurden die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen der Fusionsproteine EGFP/NLS (HsIPMK) und EGFP/3xNLS (SV40) in H1299-Zellen mit der des NLS(HsIP3K-B)/EGFP verglichen.

Wie die HsIP3K-B ist die humane Inositolphosphatmultikinase (HsIPMK) ebenfalls eine Inositolphosphatkinase und besitzt ein NLS. Die IPMK gehört in eine der drei Subfamilien der PDKG-Kinasen. Auch hier wurde das isolierte Kernlokalisierungssignal (NLS) in den pEGFP-N1-Vektor kloniert [Nalaskowski *et al.*, 2002].

Um das NLS der HsIP3K-B mit einem starken Kernlokalisierungssignal zu vergleichen, wurde das Fusionsprotein EGFP/3xNLS (SV40) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Protein mit einem dreifach codierten NLS aus dem Simianes Virus 40 (SV40), einem der stärksten Kernlokalisierungssignale überhaupt. Die Lokalisationsstudien des Fusionsproteins EGFP/3xNLS (SV40) in H1299-Zellen wurden von Olga Ernst durchgeführt [Ernst, 2007].

3.2.6.1 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP/HsIPMK (Wildtyp), EGFP/NLS (HsIPMK) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen

Zunächst wurde das identifizierte Kernlokalisierungssignal (NLS) der HsIP3K-B mit dem der HsIPMK verglichen. Die Abbildung 3.20 zeigt die intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP/HsIPMK (Wildtyp), EGFP/NLS (HsIPMK) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen. Das Plasmid pEGFP/NLS (HsIPMK) kodiert eine Mutante des HsIPMK Vollängenenzym, bei der ausschließlich das isolierte Kernlokalisierungssignal (NLS) in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde [Nalaskowski *et al.*, 2002].

Die H1299-Zellen wurden mit pEGFP/HsIPMK (Wildtyp), EGFP/NLS (HsIPMK) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP transfiziert und nach 24 h Expression die Kernlokalisation untersucht.

Zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne wurden diese nach der Paraformaldehydfixierung der Zellen mittels DAPI angefärbt. Die Verteilung der Fusionsproteine wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Das EGFP zeigt eine grüne Fluoreszenz, während die mit DAPI angefärbten Zellkerne blau fluoreszierend erscheinen (Abbildung 3.20).

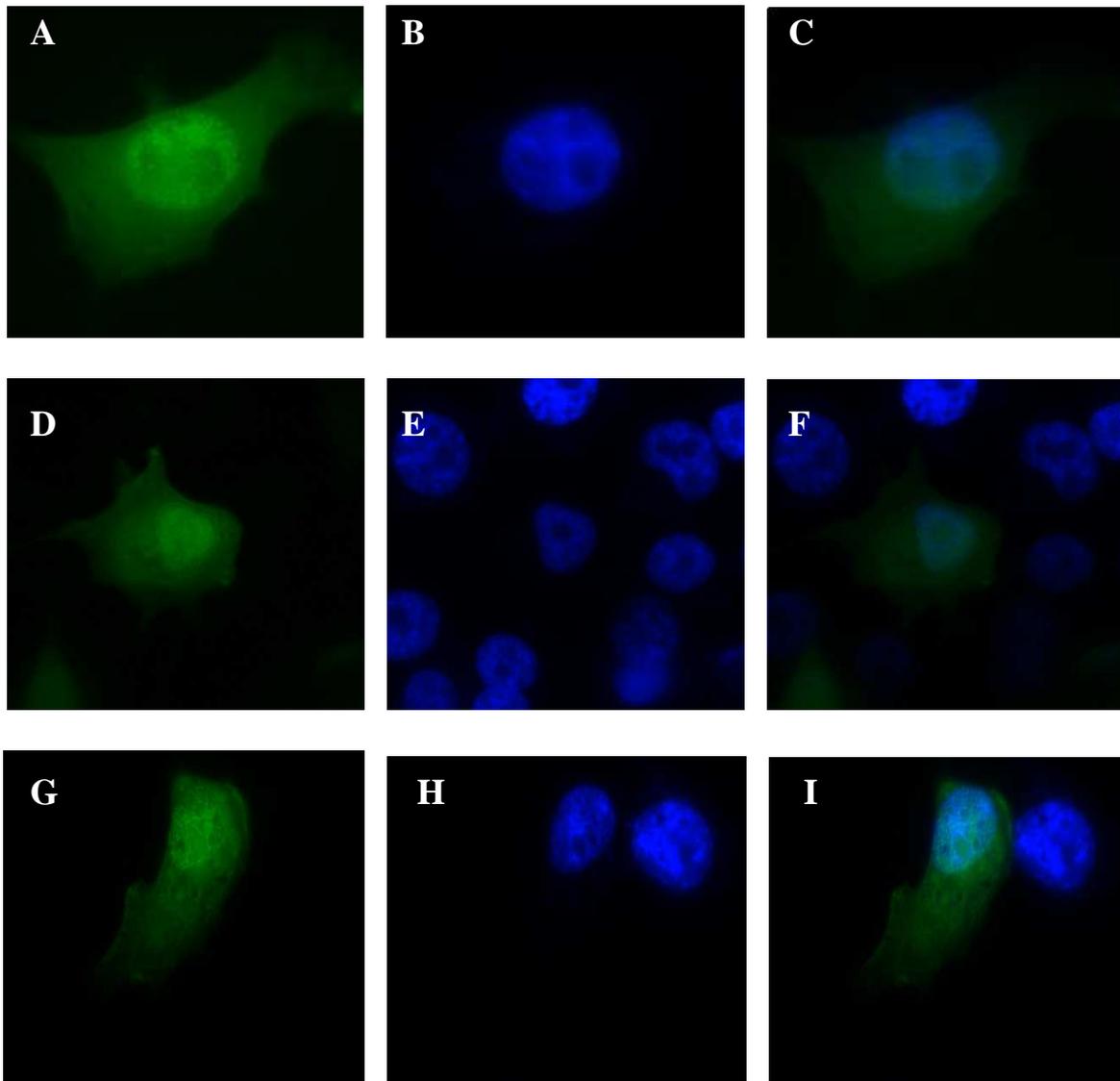


Abbildung 3.20: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von pEGFP/HsIPMK (Wildtyp), pEGFP/NLS (HsIPMK) und pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299-Zellen

Die Bilder A-C zeigen eine mit pEGFP/HsIPMK (Wildtyp) transfizierte H1299-Zelle, die Bilder D-F eine mit pEGFP/NLS (HsIPMK) transfizierte H1299-Zelle, die Bilder G-I eine mit pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierte H1299-Zelle. Die Zellen wurden nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio von EGFP/HsIPMK (Wildtyp) und EGFP/NLS (HsIPMK) in H1299-Zellen wird in einem x-/y-Diagramm dargestellt (Diagramm 3.18). Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Es wurde jeweils eine Transfektion durchgeführt.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von EGFP/HsIPMK (Wildtyp) beträgt $2,12 \pm 0,63$ und der von EGFP/NLS (HsIPMK) $2,15 \pm 0,56$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten und Verteilungen der Kern/Zytoplasma-Ratio festgestellt werden ($p=0,666$; Mann-Whitney-Test).

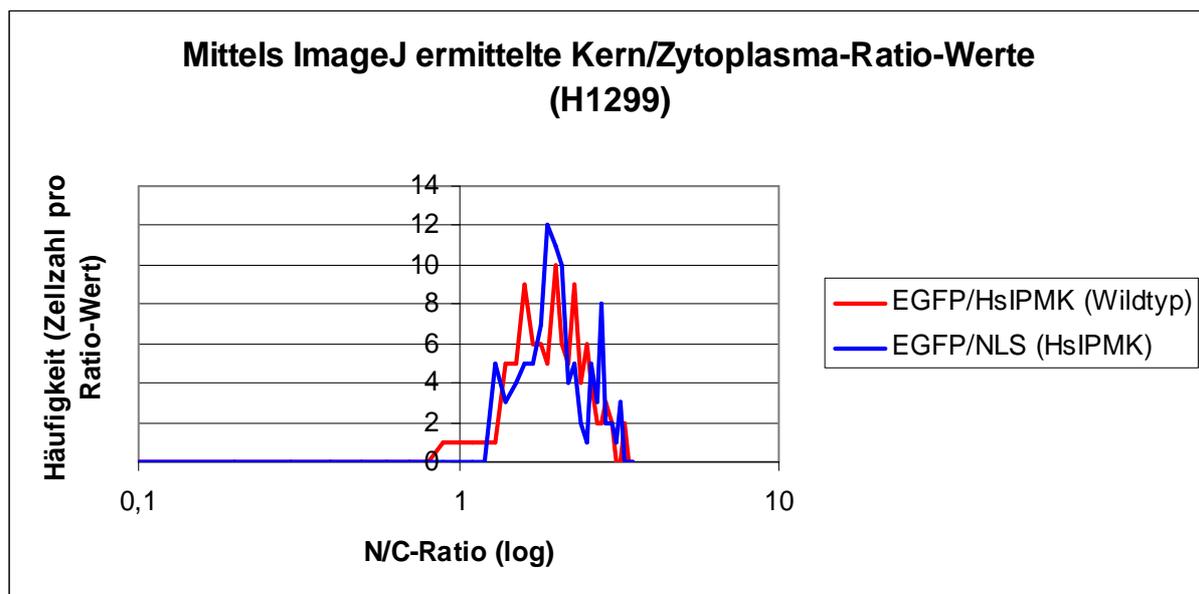


Diagramm 3.18: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung des EGFP/HsIPMK (Wildtyp) und EGFP/NLS (HsIPMK) in H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pEGFP/HsIPMK (Wildtyp) transfizierten H1299-Zellen beträgt $2,12 \pm 0,63$ und der mit pEGFP/NLS (HsIPMK) transfizierten H1299-Zellen $2,15 \pm 0,56$.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der EGFP/HsIPMK (Wildtyp) und EGFP/NLS (HsIPMK) in H1299-Zellen zeigt, dass bei beiden Fusionsproteinen mehr Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma gemessen wurde.

Es wurde gezeigt, dass die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von EGFP/HsIPMK (Wildtyp) und EGFP/NLS (HsIPMK) in H1299-Zellen identisch ist. Nun wird die intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP/NLS (HsIPMK) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen miteinander verglichen.

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio von EGFP/NLS (HsIPMK) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen wird in einem x-/y-Diagramm dargestellt (Diagramm 3.19). Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Es wurde jeweils eine Transfektion durchgeführt.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von EGFP/NLS (HsIPMK) beträgt $2,15 \pm 0,56$ und der von NLS(HsIP3K-B)/EGFP $2,26 \pm 0,61$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten und Verteilungen der Kern/Zytoplasma-Ratio festgestellt werden ($p=0,220$; Mann-Whitney-Test).

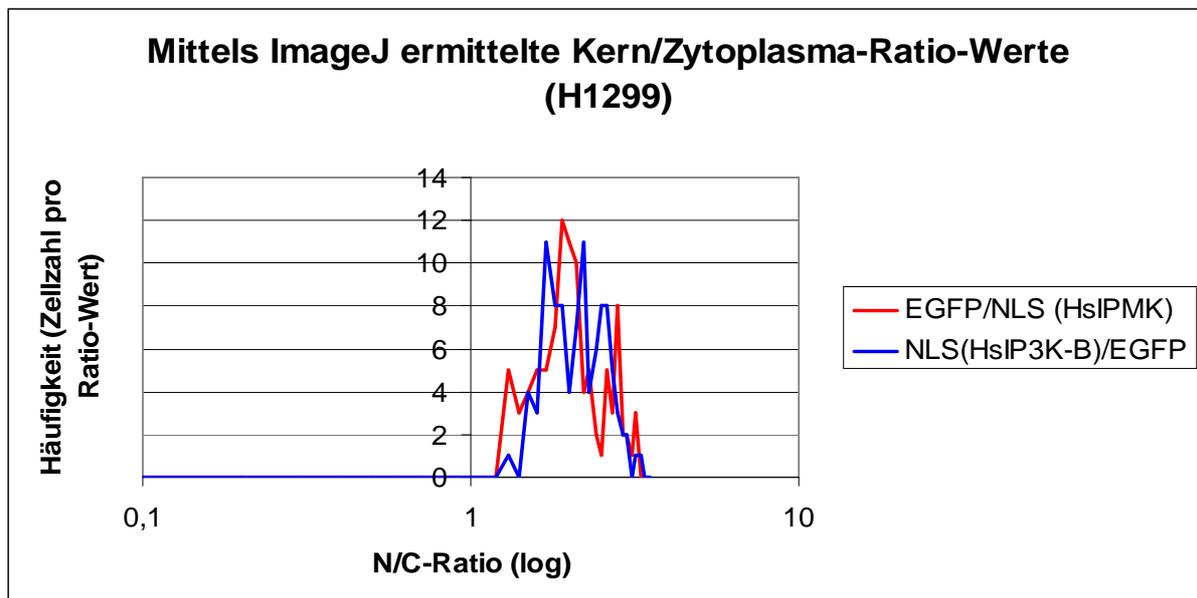


Diagramm 3.19: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der EGFP/NLS (HsIPMK) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Konstrukt eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pEGFP/NLS (HsIPMK) transfizierten H1299-Zellen beträgt $2,15 \pm 0,56$ und der mit pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299-Zellen $2,26 \pm 0,61$.

Die Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von EGFP/NLS (HsIPMK) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen zeigt, dass bei beiden Fusionsproteinen mehr Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma gemessen wurde. Die Stärken der Kernlokalisationsignale der Fusionsproteine EGFP/NLS (HsIPMK) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP sind miteinander vergleichbar.

3.2.6.2 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP/3xNLS (SV40) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen

Um das Kernlokalisationsignal (NLS) der HsIP3K-B mit einem starken NLS zu vergleichen, wurde das Fusionsprotein EGFP/3xNLS (SV40) verwendet. Es handelt sich dabei um ein Protein mit einem dreifach kodierten NLS (SV40). Die Lokalisationsstudien des Fusionsproteins EGFP/3xNLS (SV40) in H1299-Zellen wurden von Olga Ernst durchgeführt [Ernst, 2007]. Die Abbildung 3.21 zeigt eine schematische Darstellung dieses Fusionsproteins.

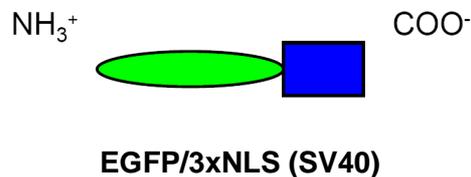


Abb. 3.21: Schematische Darstellung des Fusionsproteins EGFP/3xNLS (SV40)

Schematische Darstellung des EGFP/3xNLS (SV40), der ein dreifaches NLS (SV40) besitzt (kloniert aus dem pDsRed2-Nuc Vektor, *Clontech*) und damit eine fast reine Kernlokalisierung aufweist. Das 3xNLS (SV40) (blau) ist am N-Terminus mit EGFP (grün) markiert.

Die H1299-Zellen wurden mit pEGFP/3xNLS (SV40) und pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfiziert und nach 24 h Expression die Kernlokalisierung untersucht. Zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne wurden diese nach der Paraformaldehydfixierung der Zellen mittels DAPI angefärbt. Die Verteilung der Fusionsproteine wurde mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Das EGFP zeigt eine grüne Fluoreszenz, während die mit DAPI angefärbten Zellkerne blau fluoreszierend erscheinen. Die Abbildung 3.22 zeigt die intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP/3xNLS (SV40) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen.

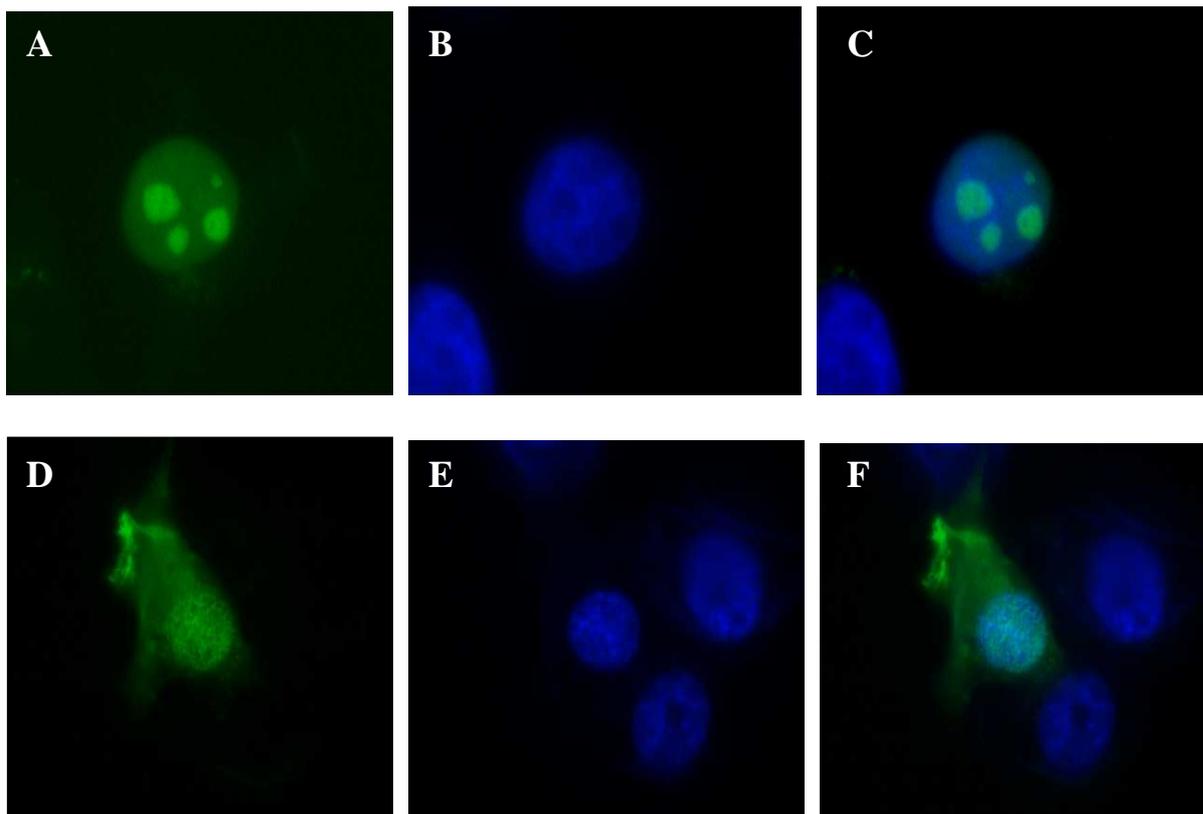


Abbildung 3.22: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von EGFP/3xNLS (SV40) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen

Die Bilder A-C zeigen eine mit pEGFP/3xNLS (SV40) transfizierte H1299-Zelle, die Bilder D-F eine mit pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierte H1299-Zelle. Die Zellen wurden nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert, die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Links ist jeweils die grüne Fluoreszenz des EGFPs und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilungen der Kern/Zytoplasma-Ratio von EGFP/3xNLS (SV40) und NLS(HsIP3K-B)/EGFP in H1299-Zellen werden in zwei getrennte x-/y-Diagramme dargestellt (Diagramm 3.20 und Diagramm 3.21), da sie aufgrund unterschiedlicher Anzahl von GFP-Fluoreszenzbildern nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem für EGFP/3xNLS (SV40) jeweils 50 GFP-Fluoreszenzbilder und für NLS(HsIP3K-B)/EGFP jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden.

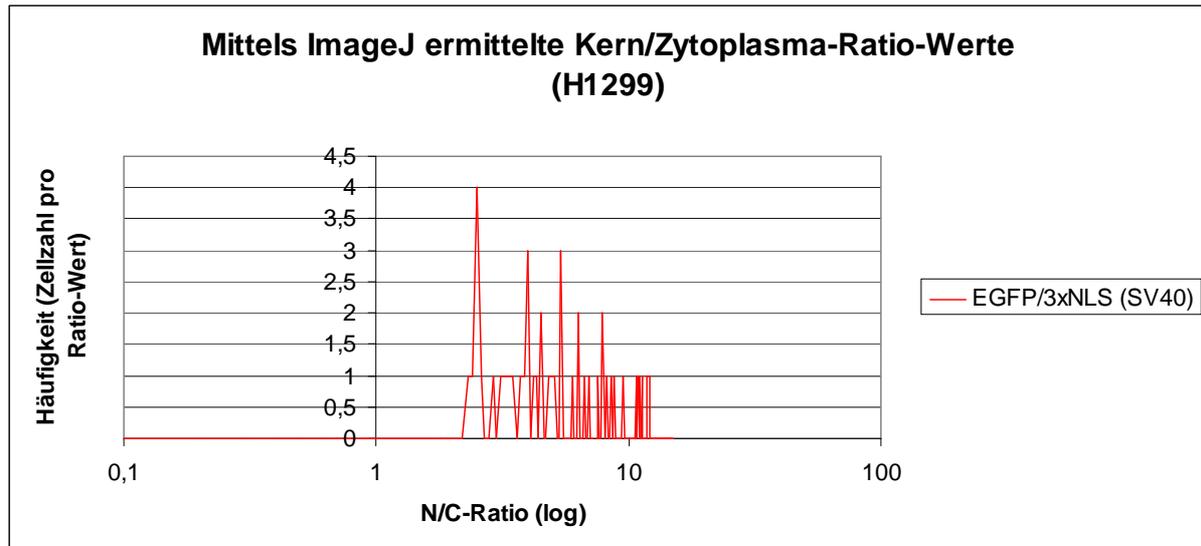


Diagramm 3.20: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pEGFP/3xNLS (SV40) transfizierten H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro Transfektion eine Messreihe mit je 50 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pEGFP/3xNLS (SV40) transfizierten H1299-Zellen beträgt $5,85 \pm 2,96$.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von EGFP/3xNLS (SV40) transfizierten H1299-Zellen beträgt $5,85 \pm 2,96$.

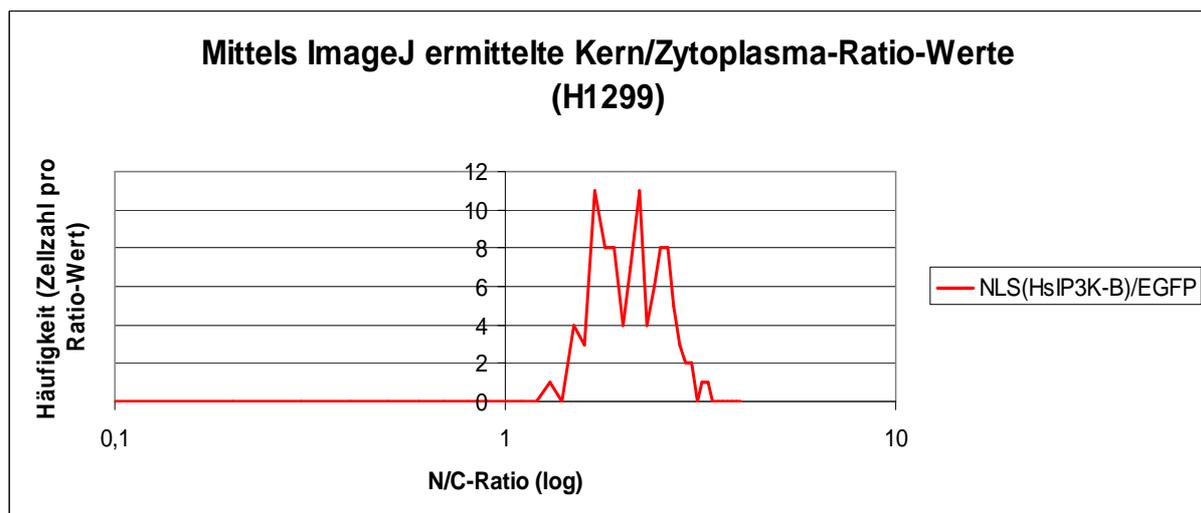


Diagramm 3.21: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro Transfektion, eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299-Zellen beträgt $2,26 \pm 0,61$.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pNLS(HsIP3K-B)/EGFP transfizierten H1299-Zellen beträgt $2,26 \pm 0,61$. Die Mittelwerte und Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe mit pEGFP/3xNLS (SV40) und HsIP3K-B pEGFP/NLS transfizierten H1299-Zellen, unterscheiden sich signifikant voneinander.

Das Kernlokalisierungssignal des Fusionsproteins NLS(HsIP3K-B)/EGFP ist signifikant schwächer als das des Fusionsproteins pEGFP/3xNLS (SV40).

3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Lokalisationsstudien über das Kern-lokalisierungssignal (NLS) der HsIP3K-B

Die Ergebnisse zu den NLS-Lokalisationsstudien aller Konstrukte in den entsprechenden Zelllinien werden in einer Tabelle zusammengefasst, indem die gerundeten Mittelwerte der Kern/Zytoplasma-Ratio mit den dazugehörigen Standardabweichungen pro Versuch aufgelistet werden (Tabelle 3.3). Es sind die Ergebnisse aller drei unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen gezeigt.

Konstrukte	Zelllinien					
	H1299			HeLa		
	Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio ± SD*			Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio ± SD*		
	Transfektion					
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp)	0,9 ±0,50	1,0 ±0,48	0,9 ±0,35	0,9 ±0,21	0,9 ±0,15	0,9 ±0,17
+LMB	1,6 ±0,59	1,4 ±0,28	1,4 ±0,24	1,4 ±0,26	1,5 ±0,26	1,6 ±0,36
HsIP3K-B/EGFP (ΔABD)	0,5 ±0,15	0,6 ±0,3	0,5 ±0,14	0,5 ±0,12	0,4 ±0,11	0,5 ±0,13
+LMB	0,6 ±0,22	0,6 ±0,20	0,6 ±0,20	0,6 ±0,13	0,6 ±0,16	0,5 ±0,15
HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ QQLR)	0,5 ±0,20	0,4 ±0,11	0,4 ±0,10	0,5 ±0,12	0,5 ±0,11	0,5 ±0,13
+LMB	0,5 ±0,15	0,5 ±0,14	0,6 ±0,13	0,6 ±0,13	0,6 ±0,13	0,6 ±0,11
NLS 1 HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ RKLR)	0,9 ±0,33	0,9 ±0,29	0,8 ±0,27	/	/	/
NLS 2 HsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ QKLR)	0,5 ±0,19	0,5 ±0,15	0,5 ±0,15	/	/	/
NLS 3 HsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ RQLR)	0,5 ±0,32	0,5 ±0,19	0,5 ±0,18	/	/	/
NLS 4 HsIP3K-B/EGFP (K ¹²⁸ RKLQ)	0,5 ±0,18	0,5 ±0,17	0,6 ±0,24	/	/	/
ABD(HsIP3K-B)/ EGFP	1,6 ±0,55	1,7 ±0,73	1,5 ±0,4	1,6 ±0,32	1,5 ±0,25	1,7 ±0,34
+LMB	2,2 ±0,69	2,5 ±0,86	2,4 ±1,04	2,1 ±0,74	2,3 ±0,66	2,3 ±0,51
NLS(HsIP3K-B)/ EGFP	2,0 ±0,78	2,3 ±0,61	2,0 ±0,62	2,5 ±1,67	2,1 ±0,91	2,2 ±0,93
EGFP/HsIPMK (Wildtyp)	2,1 ±0,63	/	/	/	/	/
EGFP/NLS (HsIPMK)	2,2 ±0,56	/	/	/	/	/
pEGFP/3xNLS (SV40)	5,9 ±2,96	/	/	/	/	/

Tabelle 3.3: Darstellung der gerundeten mittleren Kern/Zytoplasma-Ratios und der entsprechenden Standardabweichung der Zelllinien H1299 und HeLa in drei Transfektionen

Es wurde pro Zelllinie und pro Konstrukt jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Die gerundeten Mittelwerte der Kern/Zytoplasma-Ratio mit den dazugehörigen Standardabweichungen wurden ermittelt und in der Tabelle zusammengefasst. *SD = Standardabweichung

Durch die Lokalisationsstudien im Kapitel 3.2 konnte ein Kernlokalisierungssignal (NLS) in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B identifiziert und charakterisiert werden. Es handelt sich um das einzige NLS in der HsIP3K-B. Die Stärke dieses NLS ist vergleichbar mit dem der HsIPMK. Beide Kernlokalisierungssignale sind deutlich schwächer als das Fusionsprotein pEGFP/3xNLS (SV40) mit dem dreifachen NLS (SV40), welches eine fast reine Kernlokalisations aufweist. Die Ergebnisse sind in den beiden Zelllinien H1299 und HeLa von der Tendenz her identisch.

3.3 Aktinbindungsstudien des EGFP-Fusionsproteins der HsIP3K-B und seiner Mutanten in H1299- und HeLa-Zellen

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der F-Aktinbindungsstudien des EGFP-Fusionsproteins der HsIP3K-B und einiger seiner Mutanten in H1299- und HeLa-Zellen, vorgestellt. Es handelt sich einmal um das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), welches eine Mutante des HsIP3K-B Volllängenenzym kodierte, bei der die Aktinbindungsdomäne (ABD) deletiert wurde. Das Plasmid pABD(HsIP3K-B)/EGFP kodierte hingegen eine Mutante der HsIP3K-B, bei der ausschließlich die isolierte ABD in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde. Das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) kodierte eine Mutante der HsIP3K-B, bei der gleichzeitig drei Punktmutationen in der NLS-Sequenz eingeführt wurden. Zwei weitere Mutanten sind sogenannte „FEA-Motiv“-Mutanten. Dabei handelt es sich bei dem FEA-Motiv um eine kurze hochkonservierte Sequenz bestehend aus den Aminosäuren F¹⁵⁰-E-A in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B. Das Motiv kommt in einer Vielzahl von Vertebraten vor (z.B. *Monodelphis domestica*, *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Pan troglodytes*). Außerdem liegt das Motiv in der zweiten α -Helix der Aktinbindungsdomäne der HsIP3K-B, die eine wichtige Rolle für die F-Aktinbindung spielt [Brehm, 2006]. Zum einen wurde eine Mutante hergestellt, bei der zwei Aminosäuren unmittelbar hinter dem FEA-Motiv mutiert wurden. Es wurden ein Isoleucin¹⁵³ und ein Serin¹⁵⁸ in Proline mutiert, die die Eigenschaft besitzen α -Helices aufzubrechen (HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1)). Zum anderen wurde das FEA-Motiv direkt mutiert, indem die ersten beiden Aminosäuren durch Glutamin und Alanin ersetzt wurden (HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2)).

Sowohl die α -Helixbrechermutante „FEA 1“, als auch die Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) und ABD(HsIP3K-B)/EGFP der HsIP3K-B wurden in der Dissertation von Maria Brehm für die Ratten IP3K-B beschrieben und für F-Aktinbindungsstudien in NRK 52E Zellen verwendet [Brehm, 2006]. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die humane IP3K-B verwendet und in menschlichen Tumorzelllinien (H1299 und HeLa) untersucht. Dazu wurde eine neue Methode entwickelt, durch welche die Lokalisation der mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) fusionierten HsIP3K-B und ihrer Mutanten am F-Aktin untersucht werden kann (siehe Methoden 2.2.3.12 und Ergebnisse 3.1). Dabei hat sich die Auswertungsmethode der Bildung einer Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio (PM/C-Ratio) zur Bestimmung der Bindung am kortikalen F-Aktin in eukaryotischen Zellen, bewährt. Unter Anwendung dieser Auswertungsmethode wird im Folgenden die kortikale F-Aktinbindung verschiedener EGFP-Fusionsproteine bestimmt.

3.3.1 Die Lokalisation am kortikalen F-Aktin der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante) in H1299-Zellen

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der F-Aktinbindungsstudien des EGFP-Fusionsproteins der HsIP3K-B und einiger seiner Mutanten in H1299-Zellen vorgestellt. Es handelt sich um die Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante). Eine schematische Darstellung des jeweiligen Konstruktes wird im Kapitel 3.2 gezeigt.

Die Plasmide wurden transient in H1299-Zellen transfiziert und nach 24 h Expression die kortikale F-Aktinbindung untersucht. Die Verteilung der Fusionsproteine wurde mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.23)

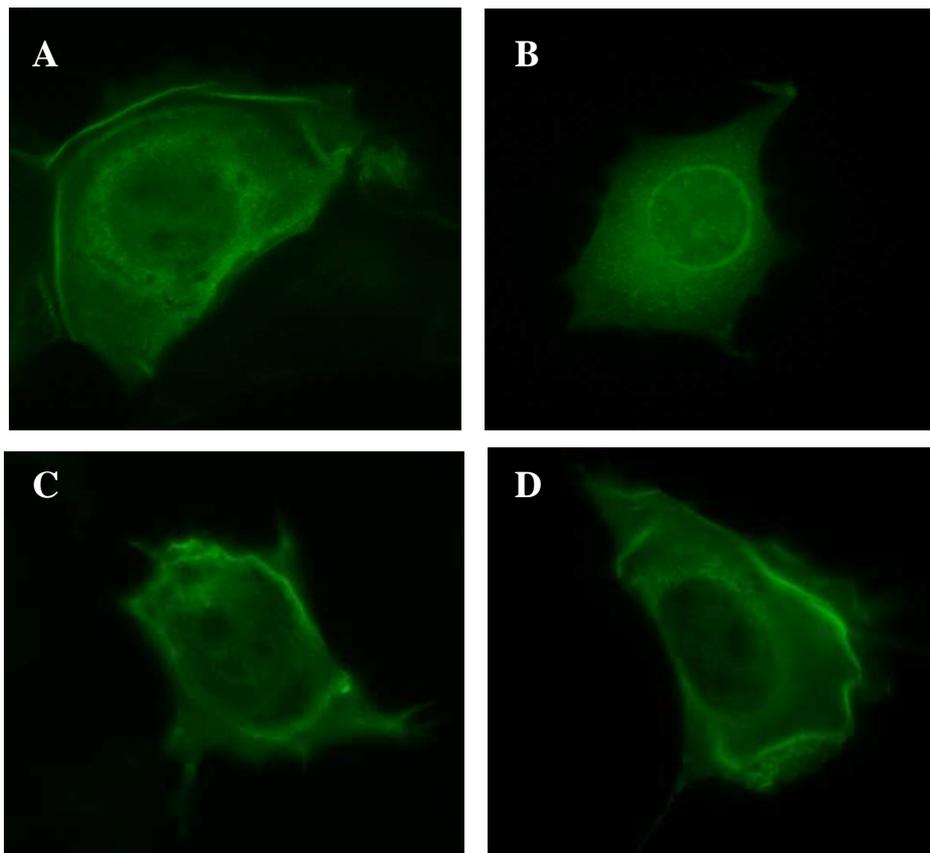


Abbildung 3.23: GFP-Fluoreszenzbilder von pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), pABD(HsIP3K-B)/EGFP und pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299-Zellen

Gezeigt sind GFP-Fluoreszenzbilder von H1299-Zellen (A-D). Die Zellen wurden mit den Plasmiden pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) (A), pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) (B), pABD(HsIP3K-B)/EGFP (C) und pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (D) transfiziert. Alle Zellen wurden nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) in H1299-Zellen wird in einem x-/y-Diagramm dargestellt (Diagramm 3.22). Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet. Das Diagramm stellt ein repräsentatives Beispiel der jeweils drei ausgewerteten Versuche dar.

Die Mittelwerte der Messreihen (HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) in H1299-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test; Kruskal-Wallis-Test)

Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) beträgt $1,52 \pm 0,70$, von HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) $0,96 \pm 0,52$, von ABD(HsIP3K-B)/EGFP $1,51 \pm 0,49$ und von HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) $1,47 \pm 0,84$.

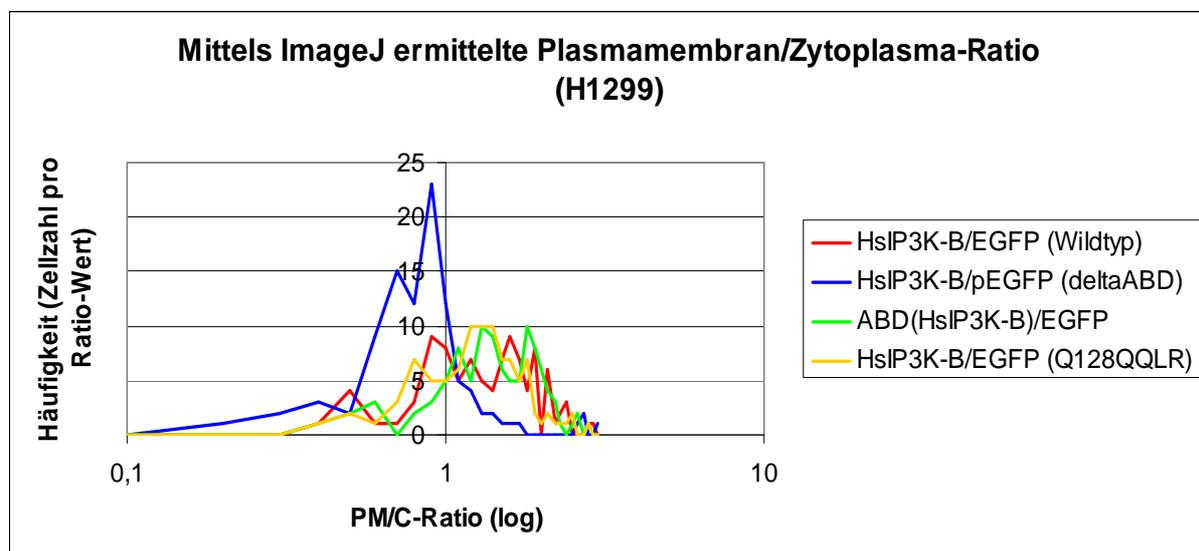


Diagramm 3.22: Darstellung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), pABD(HsIP3K-B)/EGFP und pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) transfizierten H1299-Zellen

Es wird die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Plasmid eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) beträgt $1,52 \pm 0,70$, von HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) $0,96 \pm 0,52$, von ABD(HsIP3K-B)/EGFP $1,51 \pm 0,49$ und von HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) $1,47 \pm 0,84$.

Die Mittelwerte und Verteilungen der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio zeigen, dass bei HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) die kleinste Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio im Vergleich zu denen der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR), gemessen wurde.

3.3.2 Die Lokalisation am kortikalen F-Aktin der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante) in HeLa-Zellen

Es werden die Ergebnisse der F-Aktinbindungsstudien des EGFP-Fusionsproteins der HsIP3K-B und einiger seiner Mutanten in HeLa-Zellen vorgestellt. Es handelt sich um die Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante). Eine schematische Darstellung des jeweiligen Konstruktes wird im Kapitel 3.2 gezeigt.

Die Plasmide wurden transient in HeLa-Zellen transfiziert und nach 24 h Expression die kortikale F-Aktinbindung untersucht. Die Verteilung der Fusionsproteine wurde mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.24).

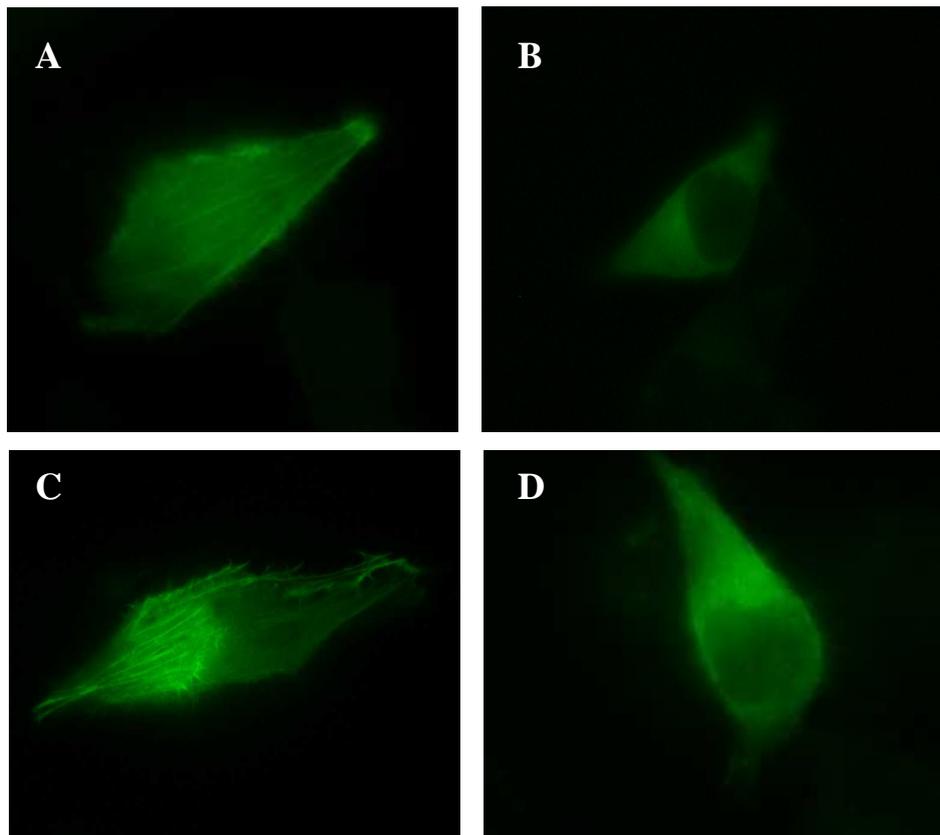


Abbildung 3.24: GFP-Fluoreszenzbilder von pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), pABD(HsIP3K-B)/EGFP und pHsIP3K-B/EGFP (Q^{128} QQLR) transfizierten HeLa-Zellen

Gezeigt sind GFP-Fluoreszenzbilder von HeLa-Zellen (A-D). Die Zellen wurden mit den Plasmiden pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) (A), pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) (B), pABD(HsIP3K-B)/EGFP (C) und pHsIP3K-B/EGFP (Q^{128} QQLR) (D) transfiziert. Alle Zellen wurden nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q^{128} QQLR) in HeLa-Zellen wird in einem x-/y-Diagramm dargestellt (Diagramm 3.23). Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet. Das Diagramm stellt ein repräsentatives Beispiel der jeweils drei ausgewerteten Versuche dar.

Die Mittelwerte der Messreihen (HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q^{128} QQLR) in HeLa-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test).

Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) beträgt $1,55 \pm 0,69$, von HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) $1,0 \pm 0,29$, von ABD(HsIP3K-B)/EGFP $1,70 \pm 0,84$ und von HsIP3K-B/EGFP (Q^{128} QQLR) $1,08 \pm 0,55$.

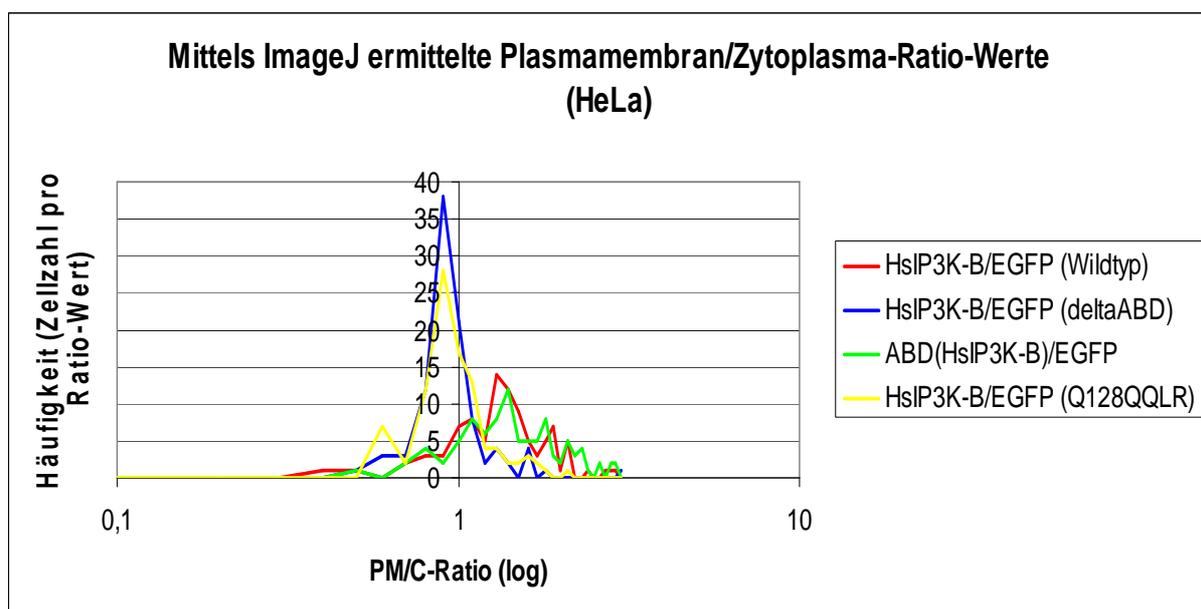


Diagramm 3.23: Darstellung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), pABD(HsIP3K-B)/EGFP und pHsIP3K-B/EGFP (Q^{128} QQLR) transfizierten HeLa-Zellen

Es wird die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Plasmid eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) beträgt $1,55 \pm 0,69$, von HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) $1,0 \pm 0,29$, von ABD(HsIP3K-B)/EGFP $1,70 \pm 0,84$ und von HsIP3K-B/EGFP (Q^{128} QQLR) $1,08 \pm 0,55$.

Die Mittelwerte und Verteilungen der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio zeigen, dass bei HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) und bei HsIP3K-B/EGFP (Q^{128} QQLR) die kleinsten Plasmamembran/Zytoplasma-Ratios im Vergleich zu denen der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) und ABD(HsIP3K-B)/EGFP, gemessen wurden.

3.3.3 Die Lokalisation am kortikalen F-Aktin der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) in H1299-Zellen

Es werden die Ergebnisse der F-Aktinbindungsstudien des EGFP-Fusionsproteins der HsIP3K-B und seiner zwei „FEA-Motiv“-Mutanten, HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) in H1299-Zellen vorgestellt.

Die Abbildung 3.25 zeigt eine schematische Darstellung des jeweiligen Fusionsproteins mit den eingeführten Mutationen.

Die Plasmide wurden transient in H1299-Zellen transfiziert und nach 24 h Expression die kortikale F-Aktinbindung untersucht. Die Verteilung der Fusionsproteine wurde mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.26).

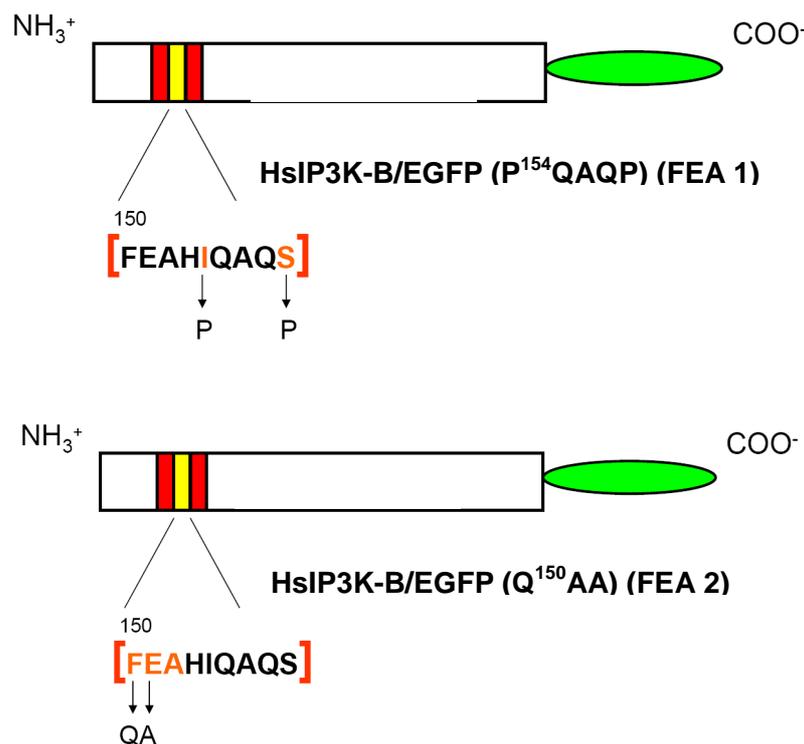


Abb. 3.25: Schematische Darstellung der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2)

Schematische Darstellung vom HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2), zweier Mutanten des humanen Vollängenenzym mit C-terminaler EGFP-Markierung (grün). Die ABD (rot) führt zur Bindung des Enzyms an das F-Aktin. Das darin lokalisierte NLS (gelb) vermittelt den Kernimport. Im FEA-Motiv (in der ABD) bzw. unmittelbar danach, wurden jeweilige Punktmutationen eingeführt.

Die Lokalisation der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) wurde mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet (Abbildung 3.26).

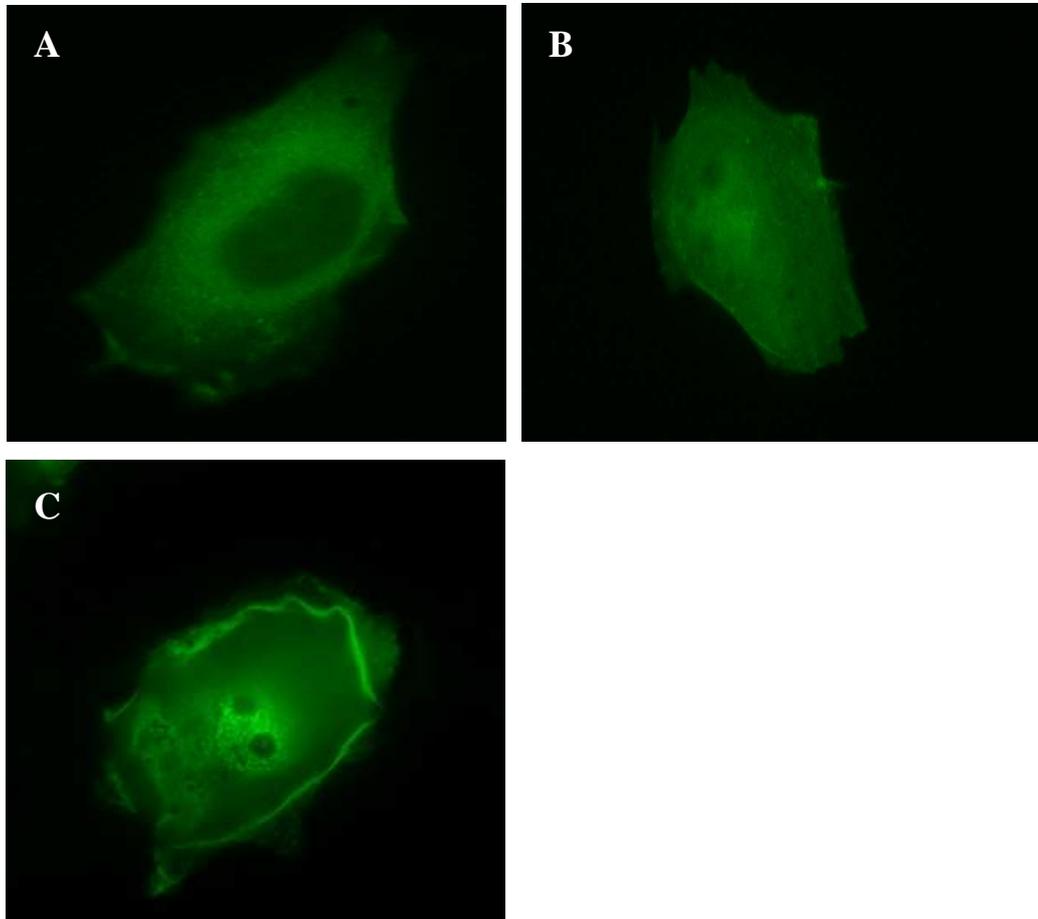


Abbildung 3.26: GFP-Fluoreszenzbilder von HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen

Gezeigt sind GFP-Fluoreszenzbilder von H1299-Zellen (A-C). Die Zellen wurden mit den Plasmiden pHsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) (A) und pHsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) (B) transfiziert. Zum Vergleich wird ein GFP-Fluoreszenzbild einer mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299-Zelle gezeigt (C). Alle Zellen wurden nach 24 h Expression mit Paraformaldehyd fixiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. (1000-fache Vergrößerung)

Die Verteilung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio von HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) in H1299-Zellen wird in einem x-y-Diagramm dargestellt (Diagramm 3.24). Dabei wurde die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Verteilung des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen zum Vergleich mitaufgetragen. Für die bessere Darstellung der Ergebnisse wurde die x-Achse logarithmiert.

Es wird die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse konnten in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet werden. Das Diagramm stellt ein repräsentatives Beispiel der jeweils drei ausgewerteten Versuche dar.

Die Mittelwerte der Messreihen (HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) in H1299-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p=0,441$; Mann-Whitney-Test). Hingegen sind die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Werte des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) signifikant höher als die der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) ($p<0,001$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test).

Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) beträgt $0,98 \pm 0,32$, von HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) $0,96 \pm 0,36$ und von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $1,52 \pm 0,70$.

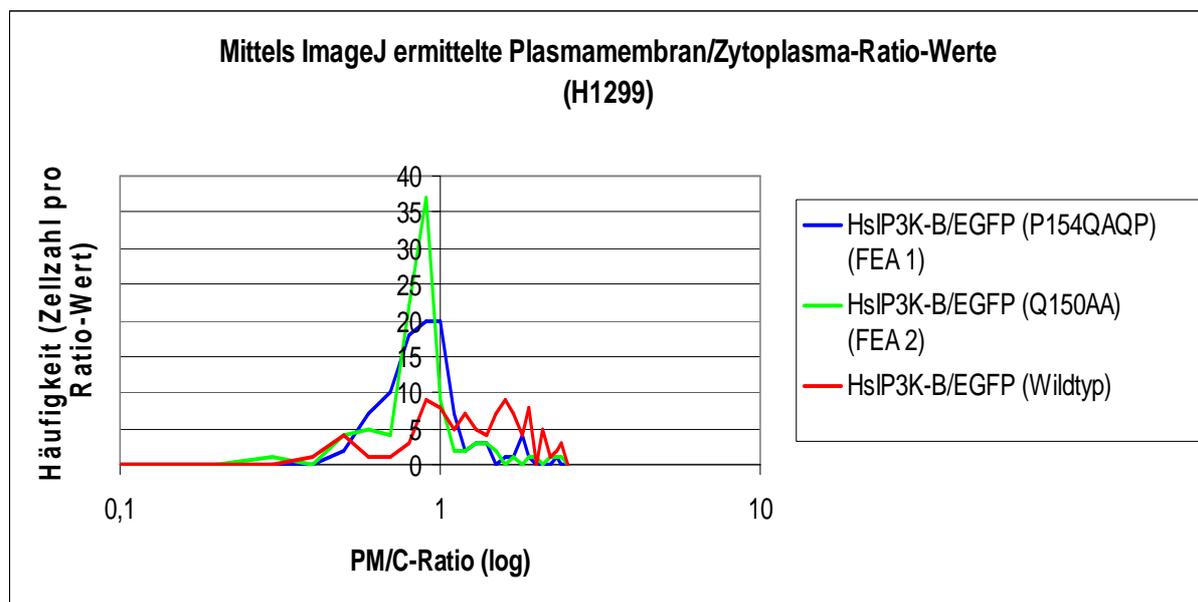


Diagramm 3.24: Darstellung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der mit pHsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1), pHsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) und pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299-Zellen

Es wird die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Plasmid eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) beträgt $0,98 \pm 0,32$, von HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) $0,96 \pm 0,36$ und von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $1,52 \pm 0,70$.

Die Mittelwerte und Verteilungen der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2) zeigen, dass im Vergleich zum HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), signifikant weniger Fluoreszenz am kortikalen F-Aktin gemessen wurde.

3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Lokalisationsstudien am kortikalen

F-Aktin in H1299- und HeLa-Zellen

Die Ergebnisse zu den Lokalisationsstudien am kortikalen F-Aktin aller Konstrukte in den entsprechenden Zelllinien werden in einer Tabelle zusammengefasst, indem die gerundeten Mittelwerte der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio mit den dazugehörigen Standardabweichungen pro Versuch aufgelistet werden (Tabelle 3.4). Es sind die Ergebnisse aller drei unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen gezeigt.

Konstrukte	Zelllinien					
	H1299 Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio ± SD*			HeLa Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio ± SD*		
	Transfektion					
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp)	1,5 ±0,70	1,5 ±0,76	1,6 ±0,68	1,6 ±0,69	1,5 ±0,60	1,6 ±0,86
HsIP3K-B/EGFP (ΔABD)	0,9 ±0,25	1,0 ±0,52	1,0 ±0,79	1,0 ±0,29	0,90 ±0,20	1,0 ±0,23
ABD(HsIP3K-B)/ EGFP	1,5 ±0,52	1,5 ±0,49	1,5 ±0,55	1,7 ±0,84	1,7 ±0,91	1,8 ±0,68
HsIP3K-B/EGFP (Q ¹²⁸ QQLR)	1,3 ±0,66	1,6 ±0,67	1,5 ±0,84	1,1 ±0,55	1,3 ±0,61	1,2 ±0,53
HsIP3K-B/EGFP (P ¹⁵⁴ QAQP) (FEA 1)	1,0 ±0,32	0,9 ±0,25	1,0 ±0,32	/	/	/
Kern/Zytoplasma-Ratio ± SD*	1,0 ±0,42	1,2 ±0,67	1,1 ±0,44	/	/	/
HsIP3K-B/EGFP (Q ¹⁵⁰ AA) (FEA 2)	1,0 ±0,36	0,9 ±0,15	0,9 ±0,17	/	/	/
Kern/Zytoplasma-Ratio ± SD*	0,8 ±0,26	0,8 ±0,30	0,8 ±0,29	/	/	/

Tabelle 3.4: Darstellung der gerundeten mittleren Plasmamembran/Zytoplasma- bzw. Kern/Zytoplasma-Ratios und der entsprechenden Standardabweichung der Zelllinien H1299 und HeLa in drei Transfektionen

Es wurde pro Zelllinie und pro Konstrukt jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Die gerundeten Mittelwerte der Plasmamembran/Zytoplasma- bzw. Kern/Zytoplasma-Ratio mit den dazugehörigen Standardabweichungen, wurden ermittelt und in der Tabelle zusammengefasst.

*SD = Standardabweichung

Es konnte durch die Lokalisationsstudien im Kapitel 3.3 gezeigt werden, dass bei den Fusionsproteinen HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) (NLS-Tripelmutante), im Mittel eine signifikant höhere Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio gemessen wurde als bei den Fusionsproteinen HsIP3K-B/EGFP (ΔABD), HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) und HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA) (FEA 2).

3.4 Untersuchung der intrazellulären Zielsteuerung der HsIP3K-B mithilfe des Modells „Pseudo-Phosphorylierung“ und „Pseudo-Dephosphorylierung“

In diesem Teil der Arbeit wird die Regulation der intrazellulären Zielsteuerung der HsIP3K-B über Phosphorylierungen untersucht. Die Phosphorylierung stellt eine Form der posttranslationalen Modifikation von Proteinen in Zellen dar, die durch spezifische Proteinkinasen (PKs) bewirkt wird. Proteinkinasen sind in der Lage, Phosphatreste spezifisch an Seronin-, Threonin- oder Thyrosinreste anzuhängen [Hunter, 1991]. Sie können unter anderem die Zielsteuerung von Proteinen an spezifischen intrazellulären Strukturen, wie dem Zellkern oder dem F-Aktin, regulieren.

Die Phosphorylierungsstudien wurden in dieser Arbeit mithilfe des Modells „Pseudo-Phosphorylierung“ und „Pseudo-Dephosphorylierung“ durchgeführt. Dabei wurden zunächst putative Phosphorylierungsstellen in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B bzw. in ihrer unmittelbaren Nähe, mithilfe des Computerprogramms NetPhos 2.0 [Blom *et al.*, 1999] prädictiert. Dieser Algorithmus erlaubt den Vergleich der Primärstruktur eines beliebigen Proteins mit Proteinsequenzmotiven, die durch Proteinkinasen selektiv phosphoryliert werden. Die Abfrage ergab insgesamt 21 putative, phylogenetisch konservierte Phosphorylierungsstellen in der ABD-Region der HsIP3K-B. Die Untersuchung der prädictierten Phosphorylierungsstellen wurde auf sieben begrenzt. Unter Berücksichtigung der *in silico* Prädiktion putativer Phosphorylierungsstellen kann durch einen gezielten Austausch der Aminosäuren Serin (S) bzw. Threonin (T) zu Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (N), eine negative Ladung und somit eine konstitutive Phosphorylierung simuliert werden. Der Austausch durch die Aminosäure Alanin (A) führt zur Simulation einer konstitutiven Dephosphorylierung [Mohammadi *et al.*, 2001]. Auch dieser gezielte Austausch von Aminosäuren wird mit Hilfe der *QuikChange*TM-Mutagenese-Technik [Wang & Malcolm, 1999] durchgeführt. Hierbei wurden die entsprechenden Nukleotidaustausche an der Nukleotidsequenz des pHsIP3K-B/EGFP-Vektors vorgenommen, welche bei Expression zum entsprechenden Aminosäureaustausch führen. Auf diese Weise wurde für alle sieben putativen Phosphorylierungsstellen sowohl der „Pseudo-Phosphorylierungs-“ als auch der „Pseudo-Dephosphorylierungsvektor“ generiert.

Für alle sieben Pseudo-Phosphorylierungs- bzw. Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten wurden sowohl die Zellkern- als auch die kortikale F-Aktin-Lokalisation untersucht und mittels der Bildung einer jeweiligen Kern/Zytoplasma-Ratio bzw. Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio, ausgewertet.

3.4.1 *In silico* Prädiktion putativer Phosphorylierungsstellen

Für die Simulation einer Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung, wurden gezielt Stellen innerhalb und in unmittelbarer Nähe der ABD der HsIP3K-B mutagenisiert. Dazu wurden zunächst putative Phosphorylierungsstellen in der Region der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B (AS 103-165) ausfindig gemacht, und diese *in silico* mit Hilfe von NetPhos 2.0 [Blom *et al.*, 1999] prädiziert. Die Abfrage ergab insgesamt 21 putative, phylogenetisch konservierte Phosphorylierungsstellen in der ABD-Region der HsIP3K-B. Die Untersuchung der prädizierten Phosphorylierungsstellen wurde auf sieben begrenzt.

Durch das Einführen einer jeweiligen Punktmutation mit Hilfe der *QuikChange*TM-Mutagenese-Technik [Wang & Malcolm, 1999] wurde entweder eine konstitutive Phosphorylierung (Serin/Threonin → Glutamat) oder eine konstitutive Dephosphorylierung (Serin/Threonin → Alanin) simuliert. Die Abbildung 3.27 zeigt die Aminosäuresequenz der ABD-Region der HsIP3K-B mit den sieben prädizierten Phosphorylierungsstellen.

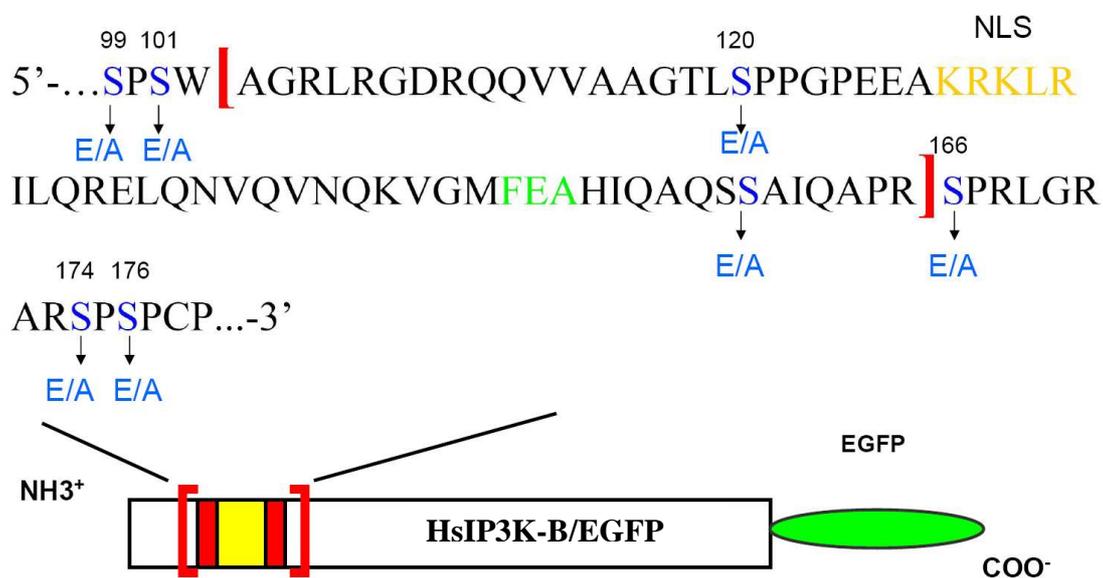


Abb. 3.27: Darstellung der Aminosäuresequenz der ABD-Region der HsIP3K-B mit den prädizierten Phosphorylierungsstellen

Schematische Darstellung vom HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), dem humanen Volllängenenzym mit C-terminaler EGFP-Markierung (grün) und der Aminosäuresequenz der ABD-Region. Die ABD (rot) führt zur Bindung des Enzyms an das F-Aktin. Das in der ABD lokalisierte NLS (gelb) vermittelt den Kernimport des Proteins. Das FEA-Motiv (grün) befindet sich ebenfalls in der ABD. Gezeigt sind die sieben prädizierten Phosphorylierungsstellen (blau) mit den entsprechend eingeführten Punktmutationen (S → E bzw. S → A).

Die Zelllinien H1299 und HeLa wurden mit den Plasmiden der Pseudo-Phosphorylierungs- und Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten transfiziert und nach 24 h Expression sowohl die Kernlokalisierung als auch die kortikale F-Aktinbindung untersucht. Dabei wurde zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne diese nach der Paraformaldehydfixierung der Zellen mittels DAPI angefärbt. Die Verteilungen der Fusionsproteine wurden mit Hilfe der GFP- und DAPI-Fluoreszenz analysiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Für alle sieben Pseudo-Phosphorylierungs- bzw. Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten wurden sowohl die Kern- als auch die kortikale F-Aktin-Lokalisation untersucht und mittels der Bildung einer jeweiligen Kern/Zytoplasma-Ratio bzw. Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio, ausgewertet. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Pseudo-Phosphorylierungsmutanten S166E, S174E und S176E jeweils eine signifikant erhöhte Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio, und die entsprechenden Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten S166A, S174A und S176A eine signifikant geringere Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio gegenüber dem Wildtyp, aufweisen. Alle anderen Pseudo-Phosphorylierungsmutanten zeigten eine gegenüber dem Wildtyp nicht signifikant abweichende Plasmamembran/Zytoplasma- und Kern/Zytoplasma-Ratio ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test). Bei allen Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten wurde jeweils eine gegenüber dem Wildtyp signifikant geringere Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio bestimmt ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test). Im Folgenden werden die Ergebnisse der intrazellulären Lokalisation der Pseudo-Phosphorylierungsmutanten S166E, S174E, S176E, sowie der Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten S166A, S174A und S176A, in H1299- und HeLa-Zellen, vorgestellt.

3.4.2 Intrazelluläre Lokalisation der Pseudo-Phosphorylierungsmutanten S166E, S174E, S176E und des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen

Es werden die Ergebnisse der intrazellulären Lokalisation der Pseudo-Phosphorylierungsmutanten S166E, S174E, S176E in H1299-Zellen vorgestellt. Dabei handelt es sich um Mutationen an *in silico* prädizierten Phosphorylierungsstellen in der ABD-Region der HsIP3K-B. Durch das Einführen einer Punktmutation wurde Serin durch Glutamat ersetzt, wodurch eine negative Ladung und somit eine konstitutive Phosphorylierung simuliert wurde. Die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio- und Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen der Pseudo-Phosphorylierungsmutanten S166E, S174E und S176E in H1299-Zellen werden in zwei getrennt dargestellten x-/y-Diagrammen gezeigt (Diagramm 3.25 und Diagramm 3.26).

Dabei wurde das Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) als Vergleich herangezogen und jeweils mitaufgetragen. Für die bessere Darstellung der Ergebnisse wurde die x-Achse logarithmiert. Es wird die jeweilige Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse konnten in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet werden. Das Diagramm stellt ein repräsentatives Beispiel der jeweils drei ausgewerteten Versuche dar.

Die Mittelwerte der Messreihen (S166E, S174E, S176E und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test).

Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166E beträgt $2,06 \pm 0,90$, der von S174E $2,04 \pm 0,99$, der von S176E $2,17 \pm 1,10$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $1,52 \pm 0,70$. Es konnte jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test) zwischen den Mittelwerten von S166E, S174E, S176E und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), festgestellt werden (Diagramm 3.25).

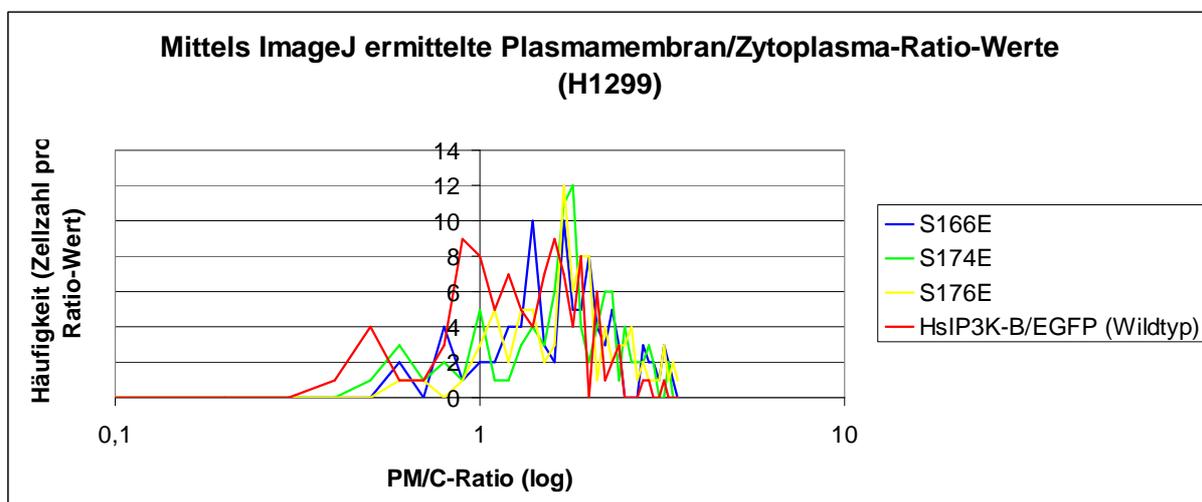


Diagramm 3.25: Darstellung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von S166E, S174E, S176E und von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen

Es wird die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Plasmid eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166E beträgt $2,06 \pm 0,90$, der von S174E $2,04 \pm 0,99$, der von S176E $2,17 \pm 1,10$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $1,52 \pm 0,70$.

Die Mittelwerte und Verteilungen der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Pseudo-Phosphorylierungsmutanten S166E, S174E und S176E zeigen, dass im Vergleich zum HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) signifikant mehr Fluoreszenz am kortikalen F-Aktin gemessen wurde.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166E beträgt $0,63 \pm 0,20$, der von S174E $0,66 \pm 0,17$, der von S176E $0,61 \pm 0,18$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $0,89 \pm 0,50$. Es konnte jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test) zwischen den Mittelwerten von S166E, S174E, S176E und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) festgestellt werden (Diagramm 3.26).

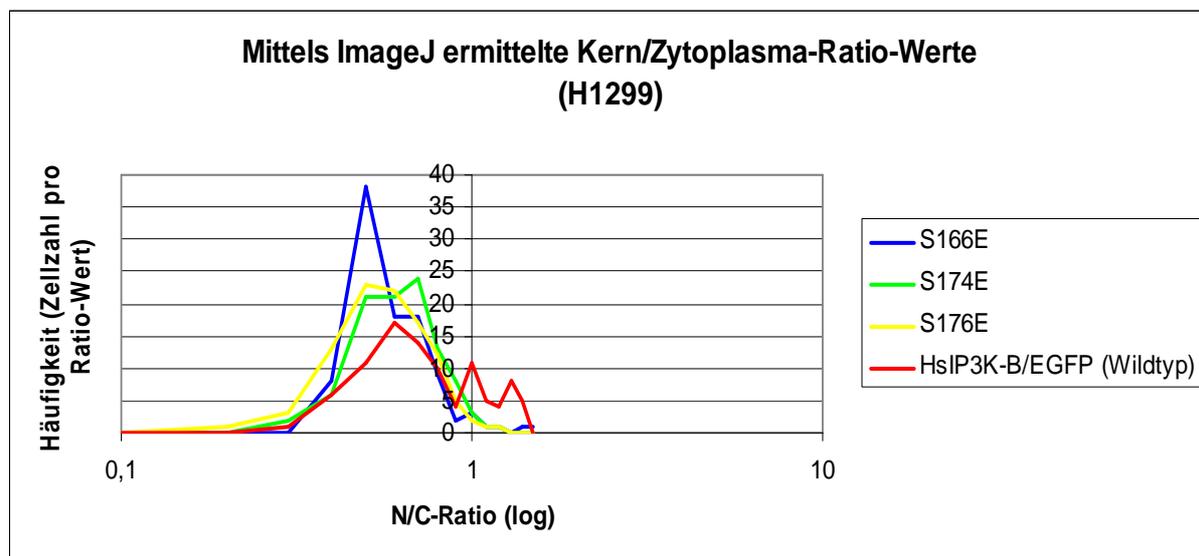


Diagramm 3.26: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von S166E, S174E, S176E und von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Plasmid eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166E beträgt $0,63 \pm 0,20$, der von S174E $0,66 \pm 0,17$, der von S176E $0,61 \pm 0,18$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $0,89 \pm 0,50$.

Die Mittelwerte und Verteilungen der Kern/Zytoplasma-Ratio der Pseudo-Phosphorylierungsmutanten S166E, S174E und S176E zeigen, dass im Vergleich zum HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) signifikant weniger Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma gemessen wurde.

3.4.3 Intrazelluläre Lokalisation der Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten S166A, S174A, S176A und des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen

Es werden die Ergebnisse der intrazellulären Lokalisation der Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten S166A, S174A, S176A in H1299-Zellen vorgestellt. Dabei handelt es sich um Mutationen an *in silico* prädizierte Phosphorylierungsstellen in der ABD-Region der HsIP3K-B. Durch das Einführen einer Punktmutation wurde Serin durch Alanin ersetzt, wodurch eine konstitutive Dephosphorylierung simuliert wurde.

Die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio- und Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen der Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten S166A, S174A und S176A in H1299-Zellen werden in zwei getrennt dargestellte x-/y-Diagrammen gezeigt (Diagramm 3.27 und Diagramm 3.28). Dabei wurde das Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) als Vergleich herangezogen und jeweils mitaufgetragen. Für die bessere Darstellung der Ergebnisse wurde die x-Achse logarithmiert. Es wird die jeweilige Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet. Das Diagramm stellt ein repräsentatives Beispiel der jeweils drei ausgewerteten Versuche dar.

Die Mittelwerte der Messreihen (S166A, S174A, S176A und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test).

Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166A beträgt $1,0 \pm 0,34$, der von S174A $1,03 \pm 0,27$, der von S176A $1,0 \pm 0,18$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $1,52 \pm 0,70$. Es konnte jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test) zwischen den Mittelwerten von S166A, S174A, S176A und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) festgestellt werden (Diagramm 3.27).

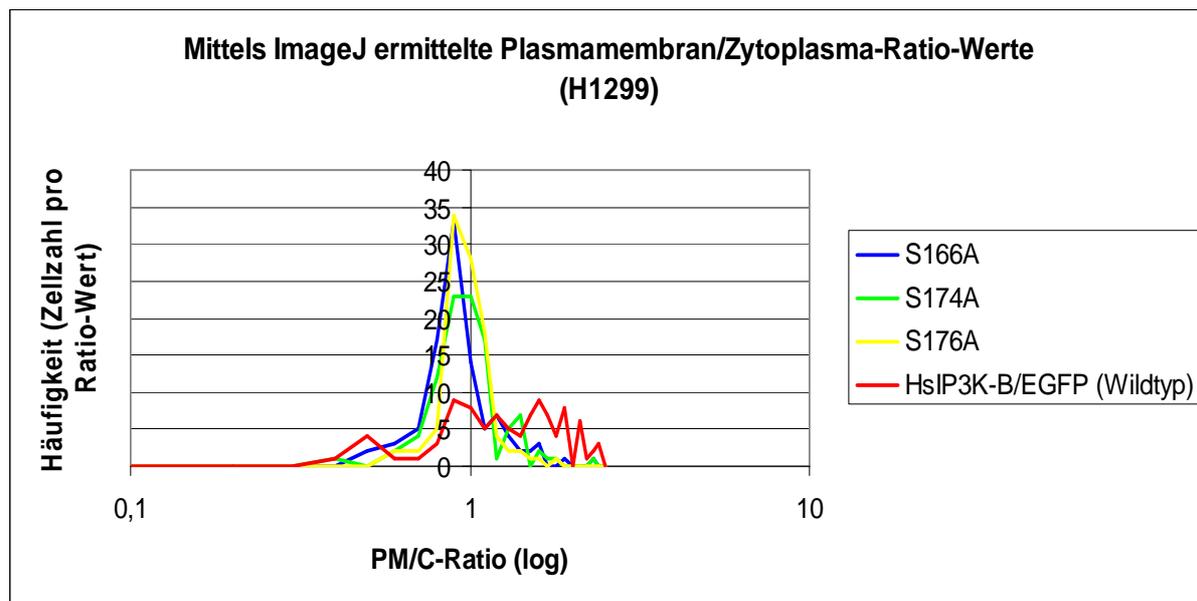


Diagramm 3.27: Darstellung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von S166A, S174A, S176A und von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen

Es wird die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Plasmid eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166A beträgt $1,0 \pm 0,34$, der von S174A $1,03 \pm 0,27$, der von S176A $1,0 \pm 0,18$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $1,52 \pm 0,70$.

Die Mittelwerte und Verteilungen der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten S166A, S174A und S176A zeigen, dass im Vergleich zum HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) signifikant weniger Fluoreszenz am kortikalen F-Aktin gemessen wurde.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166A beträgt $0,67 \pm 0,21$, der von S174A $0,66 \pm 0,17$, der von S176A $0,67 \pm 0,17$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $0,89 \pm 0,50$. Es konnte jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test) zwischen den Mittelwerten von S166A, S174A, S176A und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) festgestellt werden (Diagramm 3.28).

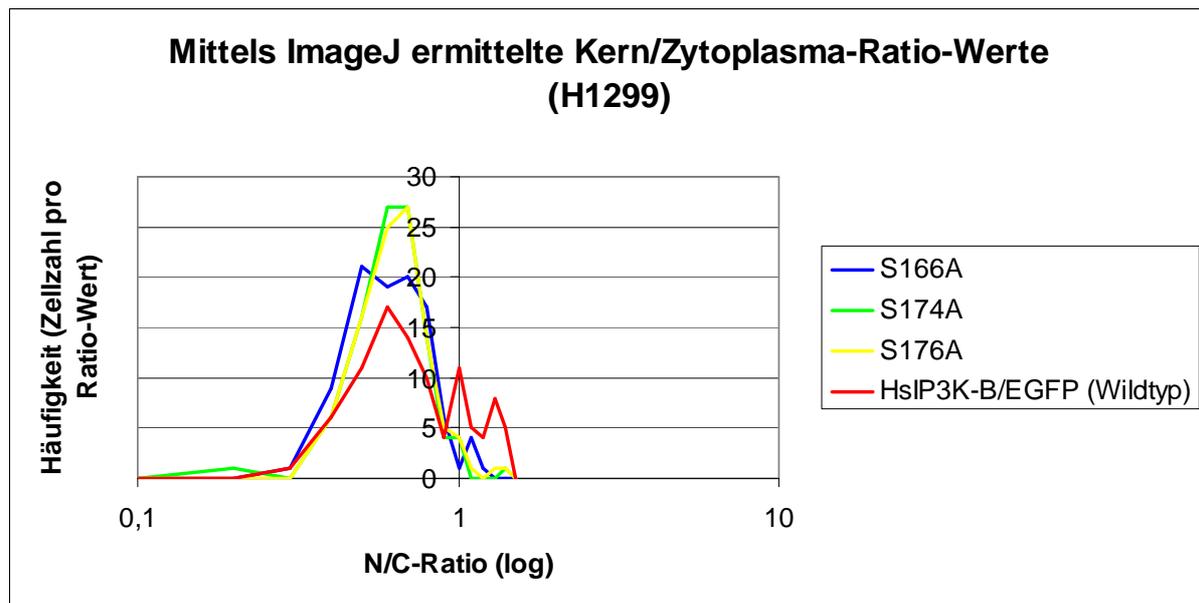


Diagramm 3.28: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von S166A, S174A, S176A und von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Plasmid eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166A beträgt $0,67 \pm 0,21$, der von S174A $0,66 \pm 0,17$, der von S176A $0,67 \pm 0,17$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $0,89 \pm 0,50$.

Die Mittelwerte und Verteilungen der Kern/Zytoplasma-Ratio der Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten S166A, S174A und S176A zeigen, dass im Vergleich zum HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) signifikant weniger Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma gemessen wurde.

3.4.4 Intrazelluläre Lokalisation der Pseudo-Phosphorylierungsmutante S166E und des Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in HeLa-Zellen

Es werden die Ergebnisse der intrazellulären Lokalisation der Pseudo-Phosphorylierungsmutante S166E in HeLa-Zellen vorgestellt. Dabei handelt es sich um eine Mutation an einer *in silico* prädictierten Phosphorylierungsstelle in der ABD-Region der HsIP3K-B. Durch das Einführen einer Punktmutation wurde Serin durch Glutamat ersetzt, wodurch eine negative Ladung und somit eine konstitutive Phosphorylierung simuliert wurde.

Die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio- und Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung der Pseudo-Phosphorylierungsmutante S166E in HeLa-Zellen werden in zwei getrennt dargestellte x-/y-Diagrammen gezeigt (Diagramm 3.29 und Diagramm 3.30).

Dabei wurde das Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) als Vergleich herangezogen und jeweils mitaufgetragen. Für die bessere Darstellung der Ergebnisse wurde die x-Achse logarithmiert. Es wird die jeweilige Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*, in dem jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet. Das Diagramm stellt ein repräsentatives Beispiel der jeweils drei ausgewerteten Versuche dar.

Die Mittelwerte der Messreihen (S166E und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in HeLa-Zellen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test).

Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166E beträgt $1,37 \pm 0,62$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $1,55 \pm 0,69$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten, jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,012$; Mann-Whitney-Test) zwischen den Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Verteilungen von S166E und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), festgestellt werden (Diagramm 3.29).

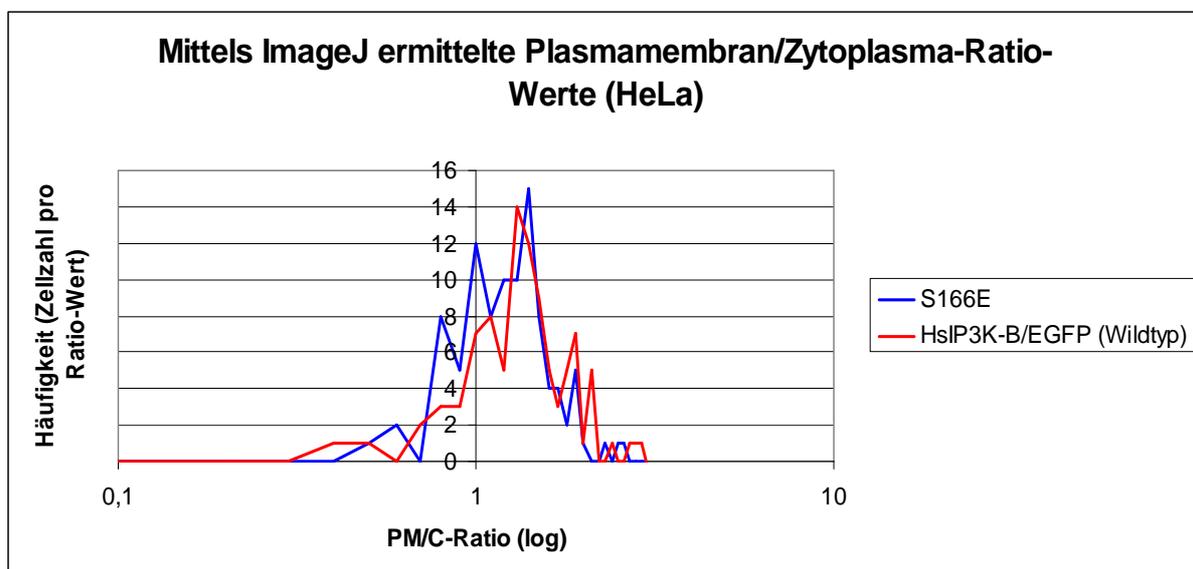


Diagramm 3.29: Darstellung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von S166E und von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in HeLa-Zellen

Es wird die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Plasmid eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166E beträgt $1,37 \pm 0,62$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $1,55 \pm 0,69$.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166E beträgt $0,79 \pm 0,16$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $0,93 \pm 0,21$. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test) zwischen den Mittelwerten von S166E und HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) festgestellt werden (Diagramm 3.30). Jedoch liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verteilungen vor ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

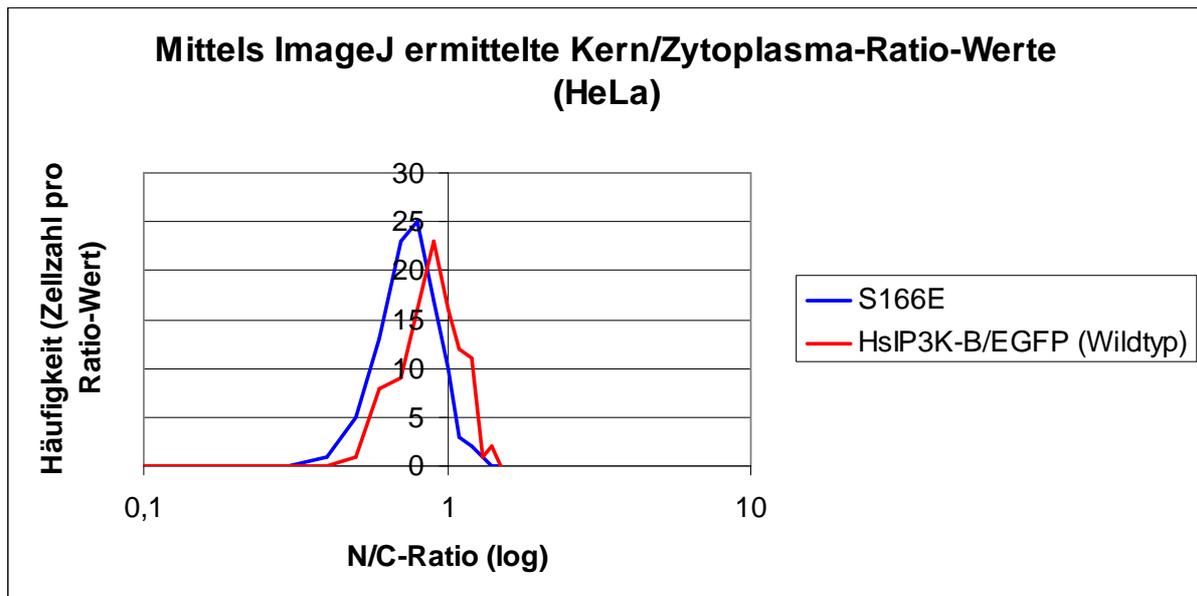


Diagramm 3.30: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung von S166E und von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in HeLa-Zellen

Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio der Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) gegenübergestellt, indem auf der x-Achse die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen wird. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse logarithmiert. Es wurde pro transfiziertes Plasmid eine Messreihe mit je 100 GFP-Fluoreszenzbildern analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von S166E beträgt $0,79 \pm 0,16$ und der von HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) $0,93 \pm 0,21$.

3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Lokalisationsstudien der Pseudo-Phosphorylierungs- und Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten in H1299- und HeLa-Zellen

Die Ergebnisse zu den Lokalisationsstudien der Pseudo-Phosphorylierungs- und Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten in H1299- und HeLa-Zellen werden in einer Tabelle zusammengefasst, indem die gerundeten Mittelwerte der Plasmamembran/Zytoplasma- bzw. Kern/Zytoplasma-Ratio mit den dazugehörigen Standardabweichungen pro Versuch aufgelistet werden (Tabelle 3.5). Es sind die Ergebnisse aller drei unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen gezeigt.

Zelllinie	Konstrukte	Kern/Zytoplasma-Ratio			PM/C-Ratio**			
		Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio ± SD*			Mittelwert der PM/Zytoplasma-Ratio ± SD*			
H1299	HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp)	0,9 ±0,50	1,0 ±0,48	0,9 ±0,35	1,5 ±0,70	1,5 ±0,76	1,6 ±0,68	
HeLa	HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp)	0,9 ±0,21	0,9 ±0,15	0,9 ±0,17	1,6 ±0,69	1,5 ±0,60	1,6 ±0,86	
H1299	Pseudo- Phosphorylierungs- mutanten	S99E	0,8 ±0,51	0,7 ±0,23	0,7 ±0,24	1,8 ±0,88	1,6 ±0,51	1,5 ±0,54
		S101E	0,7 ±0,34	0,7 ±0,22	0,6 ±0,21	1,5 ±0,58	1,3 ±0,44	1,4 ±0,50
		S120E	0,9 ±0,35	0,8 ±0,31	0,8 ±0,29	1,4 ±0,82	1,6 ±0,60	1,5 ±0,50
		S159E	1,0 ±0,42	0,9 ±0,29	0,9 ±0,24	1,4 ±0,92	1,5 ±0,51	1,5 ±0,46
		S166E	0,6 ±0,20	0,7 ±0,29	0,7 ±0,28	2,1 ±0,90	2,3 ±1,11	2,0 ±0,83
		S174E	0,6 ±0,25	0,7 ±0,17	0,6 ±0,17	2,4 ±1,13	2,0 ±0,99	2,2 ±0,84
		S176E	0,7 ±0,30	0,8 ±0,32	0,6 ±0,18	2,7 ±1,41	2,4 ±1,38	2,2 ±1,10
HeLa	S166E	0,8 ±0,16	0,7 ±0,11	0,7 ±0,15	1,4 ±0,62	1,3 ±0,51	1,4 ±0,48	
H1299	Pseudo- Dephosphorylierungs- mutanten	S99A	0,7 ±0,33	0,8 ±0,24	0,8 ±0,31	1,0 ±0,63	1,0 ±0,29	1,0 ±0,27
		S101A	0,7 ±0,28	0,5 ±0,17	0,6 ±0,20	0,9 ±0,38	1,0 ±0,29	1,0 ±0,20
		S120A	0,6 ±0,31	0,6 ±0,24	0,6 ±0,16	1,0 ±0,48	1,0 ±0,26	1,0 ±0,26
		S159A	0,9 ±0,60	0,8 ±0,23	0,8 ±0,24	0,9 ±0,50	1,0 ±0,31	1,1 ±0,40
		S166A	0,5 ±0,19	0,7 ±0,21	0,7 ±0,21	0,9 ±0,36	1,0 ±0,34	1,0 ±0,23
		S174A	0,7 ±0,25	0,7 ±0,17	0,7 ±0,17	1,0 ±0,27	1,0 ±0,33	1,0 ±0,27
		S176A	0,7 ±0,24	0,7 ±0,17	0,6 ±0,14	1,1 ±0,29	1,0 ±0,18	1,1 ±0,27

Tabelle 3.5: Darstellung der gerundeten mittleren Plasmamembran/Zytoplasma- bzw. Kern/Zytoplasma-Ratios mit der jeweiligen Standardabweichung der Zelllinien H1299 und HeLa in drei Transfektionen

Es wurde pro Zelllinie und pro Konstrukt jeweils 100 GFP-Fluoreszenzbilder mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Die gerundeten Mittelwerte der Plasmamembran/Zytoplasma- bzw. Kern/Zytoplasma-Ratio mit den jeweiligen Standardabweichungen wurden ermittelt und in der Tabelle zusammengefasst.

*SD = Standardabweichung

**PM/C-Ratio = Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio

3.5 Intrazelluläre Lokalisation der endogenen RnIP3K-B in Ratten-Thymozyten

Alle bisher vorgestellten Lokalisationsstudien der HsIP3K B wurden mithilfe von EGFP-Fusionsproteinen in den eukaryotischen Zelllinien H1299 und HeLa untersucht. Dabei wurde die HsIP3K-B mit EGFP am C-Terminus fusioniert und zur Transfektion von eukaryotischen Zellen herangezogen. Bei diesem Verfahren kann nach der Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation des jeweiligen Fusionsproteins in fixierten Zellen ermittelt werden. Die quantitative Messung erfolgte einmal durch die von Olga Ernst etablierte Methode zur Bestimmung der Kern/Zytoplasma-Ratio [Ernst, 2007] und einmal durch die in dieser Arbeit entwickelten Methode zur Bestimmung der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio (siehe Methoden 2.2.3.12). Jedoch muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass es sich um ein exprimiertes Fusionsprotein und nicht um ein endogenes Protein handelt.

Das EGFP-Fusionsgen steht im pEGFP-Vektor unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven und sehr starken CMV-Promotors aus dem Zytomegalie-Virus. Die Expression ist folglich für die Zelle nicht-regulierbar und unphysiologisch hoch. Dies kann unter Umständen zu nicht-physiologischen Veränderungen der Zielsteuerung führen, wenn beispielsweise zelluläre Transportmechanismen überlastet werden oder spezifische Bindungspartner nicht in ausreichender Zahl vorhanden sind [Illies, 2002]. Aus diesen Gründen wurde die Lokalisation der endogen exprimierten Ratten Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (RnIP3K-B) zu Kontrollzwecken mittels Immunfluoreszenz untersucht. Wenn dabei das endogene Protein eine ähnliche Lokalisation (und ähnliche LMB-Effekte) zeigt wie das EGFP-Fusionsprotein, treten die oben beschriebenen Effekte in diesem Fall offensichtlich nicht auf und das EGFP-Fusionsprotein ist als Modellsystem zur Untersuchung der Zielsteuerung der HsIP3K-B geeignet.

3.5.1 Lokalisationsstudien der endogenen Form der RnIP3K-B nach Leptomycin B-Behandlung in Ratten-Thymozyten

Um die Ergebnisse der Lokalisationsstudien vom EGFP-Fusionsprotein in eukaryotischen Zellen mit denen des endogenen Proteins zu vergleichen, wurden Lokalisationsstudien der endogenen Form der RnIP3K-B nach Leptomycin B-Behandlung in Ratten-Thymozyten durchgeführt. Die Thymozyten wurden von Frederike Schmid, Andreas Guse und Chiara Cordigliere zur Verfügung gestellt. Die Immunfärbung wurde von Susanne Giehler durchgeführt und die mikroskopischen Aufnahmen wurden von Olga Ernst erstellt.

Dazu wurden die Thymozyten in Petrischalen je nach Versuch 0 oder 5 h mit LMB behandelt. Anschließend wurden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt, mit Paraformaldehyd fixiert und mit dem primären Kin4-Antikörper sowie mit einem sekundären Antikörper (Alexa 568) versetzt. Nach der Immunfluoreszenz wurden die Zellkerne mittels DAPI angefärbt und die Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die Lokalisation der endogenen Form der RnIP3K-B wurde mit Hilfe der Alexa 568- und DAPI-Fluoreszenz nach Behandlung mit LMB in Ratten-Thymozyten analysiert (Abbildung 3.28).

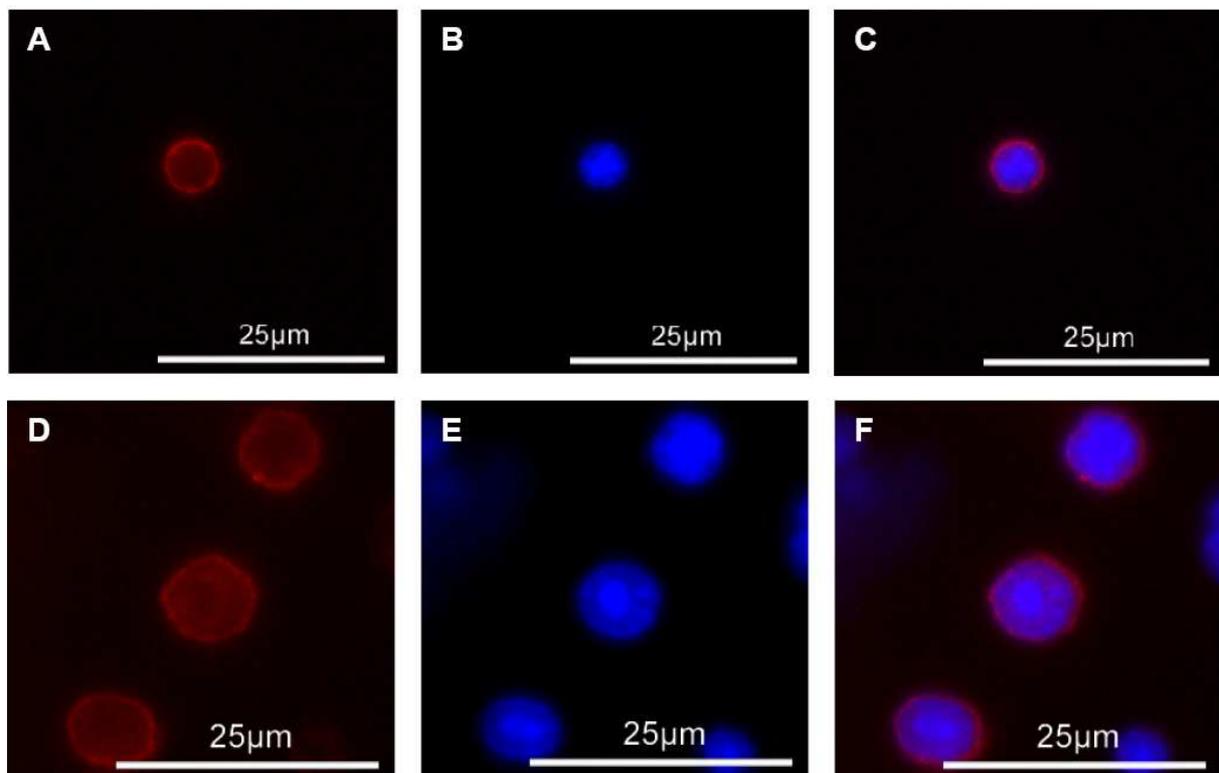


Abbildung 3.28: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von der endogenen Form der RnIP3K-B nach LMB-Behandlung in Ratten-Thymozyten

Die Bilder A-C zeigen einen unbehandelten Thymozyten. Auf den Bildern D-F wird ein 5 h lang mit LMB behandelter Thymozyt dargestellt. Die Zellen wurden ausgesät und je nach Versuch 0 h oder 5 h mit LMB behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und sowohl mit dem Kin4-Antikörper als auch mit dem sekundären Antikörper Alexa 568 inkubiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt und die Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Links ist jeweils die rote Fluoreszenz des Alexa 568-Antikörpers und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild.

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio der endogenen Form der RnIP3K-B in Ratten-Thymozyten wird in einem x-/y-Diagramm dargestellt (Diagramm 3.31). Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Es wird die Kern/Zytoplasma-Ratio gegen die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mittels der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*. Es wurden jeweils 100 Alexa 568-Fluoreszenzbilder ausgewertet. Die DAPI-Fluoreszenzbilder dienten zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe Thymozyten ohne LMB-Behandlung im ersten Versuch beträgt $0,57 \pm 0,12$ und der nach einer 5 h LMB-Behandlung $0,63 \pm 0,14$. Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test) zwischen den LMB-behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet werden.

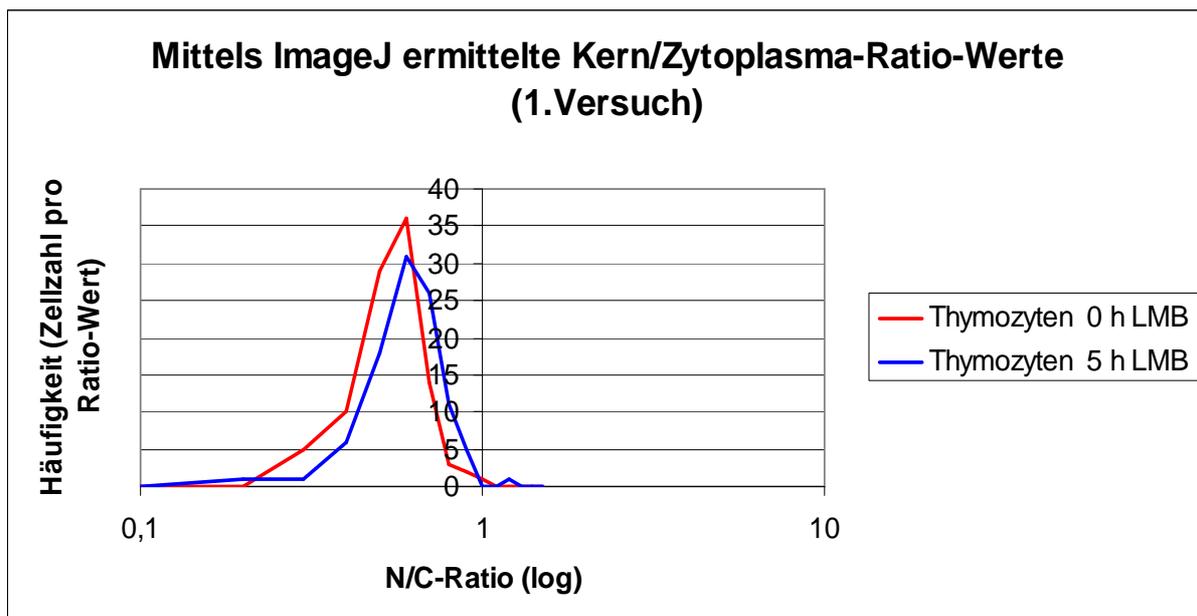


Diagramm 3.31: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio der endogenen Form der RnIP3K-B in Ratten-Thymozyten

Auf der x-Achse wird die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Pro Versuch wurde je eine Messreihe mit LMB-behandelten und unbehandelten Thymozyten analysiert wobei für jede Messreihe je 100 Alexa 568-Fluoreszenzbilder mit der Software *ImageJ* ausgewertet wurden. Mit Hilfe der entsprechenden DAPI-Fluoreszenzbilder wurde der Zellkern ermittelt. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von Thymozyten im 1. Versuch ohne LMB-Behandlung beträgt $0,57 \pm 0,12$ und der mit LMB-Behandlung beträgt $0,63 \pm 0,14$. Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test) zwischen LMB-behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet werden.

Zum Vergleich der Ergebnisse wurde der gleiche Versuch ein weiteres Mal durchgeführt. Zusätzlich wurde in diesem Versuch die Ratten-Thymozyten mit einer 8-fach gegenüber der Standardbedingung erhöhten Konzentration an LMB behandelt (8x 20 nM). Die Lokalisation der endogenen Form der RnIP3K-B wurde mit Hilfe der Alexa 568- und DAPI-Fluoreszenz nach Behandlung mit LMB in Ratten-Thymozyten analysiert (Abbildung 3.29).

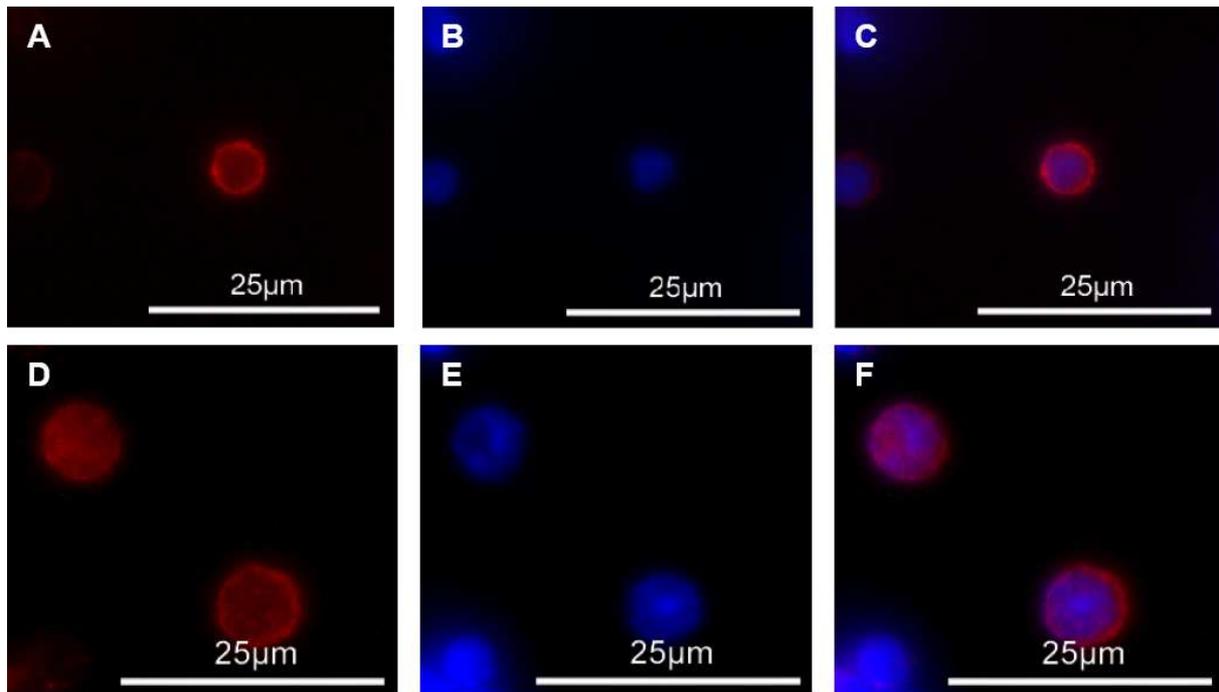


Abbildung 3.29: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von der endogenen Form der RnIP3K-B nach LMB-Behandlung in Ratten-Thymozyten

Die Bilder A-C zeigen einen unbehandelten Thymozyten. Auf den Bildern D-F wird ein 5 h lang mit LMB behandelter Thymozyt dargestellt. Die Zellen wurden ausgesät und je nach Versuch 0 h oder 5 h mit LMB behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und sowohl mit dem Kin4-Antikörper als auch mit dem sekundären Antikörper Alexa 568 inkubiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt und die Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Links ist jeweils die rote Fluoreszenz des Alexa 568-Antikörpers und in der Mitte die blaue Fluoreszenz der durch DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen. Rechts befindet sich das entsprechende Doppelfluoreszenzbild.

Die Verteilung der Kern/Zytoplasma-Ratio der endogenen Form der RnIP3K-B in Ratten-Thymozyten wird in einem x-/y-Diagramm dargestellt (Diagramm 3.32). Die Kern/Zytoplasma-Ratio wird der Häufigkeit gegenüber gestellt. Dabei wurde für die bessere Darstellung der Ergebnisse die x-Achse logarithmiert. Die Auswertung erfolgte mittels der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ*. Es wurden jeweils 100 Alexa 568-Fluoreszenzbilder ausgewertet. Die DAPI-Fluoreszenzbilder dienten zur eindeutigen Identifizierung der Zellkerne.

Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe Thymozyten ohne LMB-Behandlung im zweiten Versuch beträgt $0,53 \pm 0,23$, der nach einer 5 h LMB-Behandlung $0,65 \pm 0,19$ und der nach 5 h mit einer 160 nM LMB-Konzentration $0,77 \pm 0,23$. Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test) zwischen LMB-behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet werden. Auch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den 1-fach (20 nM) und 8-fach (160 nM) LMB-behandelten Zellen festgestellt werden ($p = 0,002$; Mann-Whitney-Test).

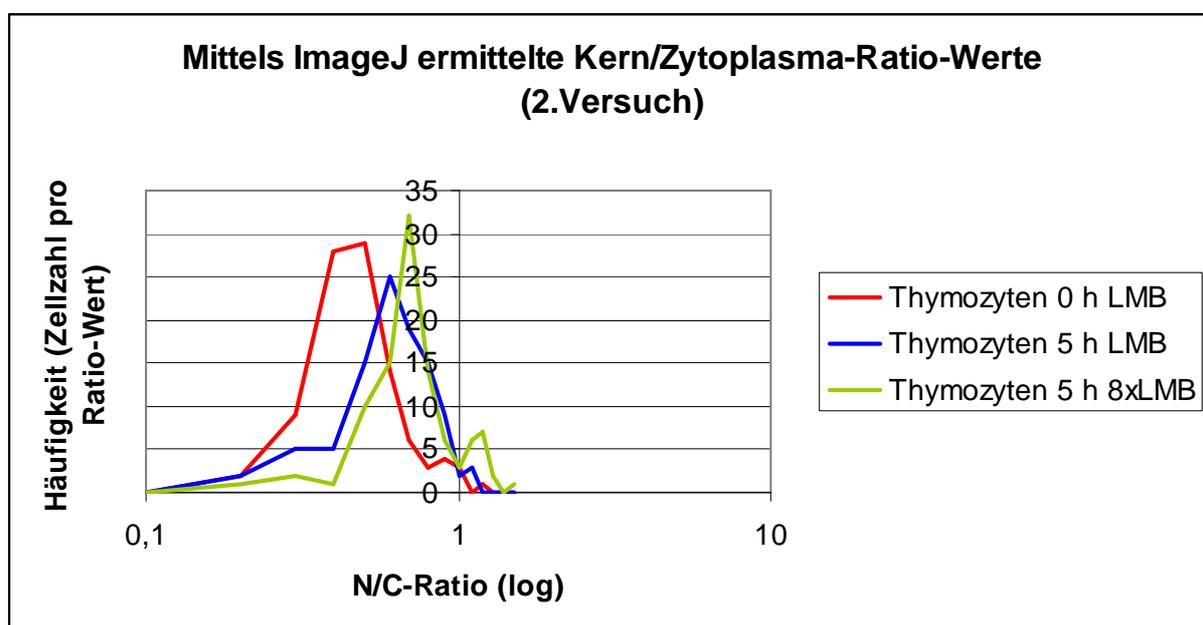


Diagramm 3.32: Darstellung der Kern/Zytoplasma-Ratio der endogenen Form der RnIP3K-B in Ratten-Thymozyten

Auf der x-Achse wird die Kern/Zytoplasma-Ratio und auf der y-Achse die Häufigkeit (Zellzahl pro Ratio-Wert in einer Messreihe) aufgetragen. Pro Versuch wurde je eine Messreihe mit LMB-behandelten und unbehandelten Thymozyten analysiert wobei für jede Messreihe je 100 Alexa 568-Fluoreszenzbilder mit der Software *ImageJ* ausgewertet wurden. Mit Hilfe der entsprechenden DAPI-Fluoreszenzbilder wurde der Zellkern ermittelt. Der Mittelwert der Kern/Zytoplasma-Ratio der Messreihe von Thymozyten im 2.Versuch ohne LMB-Behandlung beträgt $0,53 \pm 0,23$, der mit LMB-Behandlung beträgt $0,65 \pm 0,19$ und der mit einer 8-fachen LMB-Konzentration $0,77 \pm 0,23$. Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test) zwischen LMB-behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet werden. Auch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den 1-fach (20 nM) und 8-fach (160 nM) LMB-behandelten Zellen festgestellt werden ($p = 0,002$; Mann-Whitney-Test).

Die Lokalisationsstudien lassen darauf schließen, dass auch die endogene Form der RnIP3K-B in Ratten-Thymozyten einem LMB-abhängigen Kernexport unterliegt.

4. Diskussion

4.1 Bestimmung der Kernlokalisation und der kortikalen F-Aktinbindung von EGFP-Fusionsproteinen

Es ist bekannt, dass die humane Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP3K-B) an einer Vielzahl von intrazellulären Strukturen lokalisiert ist [Soriano *et al.*, 1997; Dewaste *et al.*, 2003; Brehm *et al.*, 2004]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden speziell die Kern- und die F-Aktin-Lokalisation der HsIP3K-B in H1299- und HeLa-Zellen untersucht. Dabei wurde die Untersuchung der Kernlokalisation über die Bestimmung einer Kern/Zytoplasma-Ratio durchgeführt. Diese Auswertungsmethode wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Olga Ernst entwickelt [Ernst, 2007] und unterscheidet sich stark von herkömmlichen Methoden, bei denen die Bestimmung der Lokalisation des EGFP-Fusionsproteins „per Auge“ erfolgt [Dewaste *et al.*, 2003; Nalaskowski *et al.*, 2003; Nalaskowski, 2003; Stockebrand, 2002] und somit Beobachter-abhängig ist. Die Bestimmung der Kern/Zytoplasma-Ratio erfolgt mittels der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ* [Rasband, 2006; Abràmoff *et al.*, 2004]. Hierbei wird die mittlere Fluoreszenzintensität des GFP-Signals des Fusionsproteins bestimmt, indem im Zellkern und Zytoplasma jeweils drei „Area of interest“ vermessen und die Werte gemittelt werden (siehe Methoden 2.2.3.10). Aus diesen beiden Mittelwerten wird dann eine Kern/Zytoplasma-Ratio errechnet. Wichtig dabei ist, dass die gewählten „Area of interest“ stets für die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals in der ganzen Zelle typische Bereiche erfassen. Dennoch kann die Auswahl des Selektionsbereichs subjektiv sein und sollte durch Blindversuche überprüft werden. Im Vergleich zu der herkömmlichen Methode, wird durch diese neue Auswertungsmethode eine objektivere Bestimmung der Kernlokalisation von EGFP-Fusionsproteinen ermöglicht. Neben der objektiv quantitativen Analyse, zeichnet sich die Methode zudem durch eine benutzerfreundliche Bedienung aus. Mittlerweile hat sie sich im Arbeitskreis etabliert und konnte erfolgreich eingesetzt werden. Dabei hat sich gezeigt, dass sie in unabhängig durchgeführten Lokalisationsstudien vergleichbare Ratio-Werte lieferte (persönliche Mitteilung, Olga Ernst, UKE). Auch in anderen Arbeitsgruppen wurden ähnliche Verfahren zur Bestimmung der Kern/Zytoplasma-Ratio mit der Software *ImageJ* erfolgreich eingesetzt [Auer *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2006; Dequiedt *et al.*, 2006]. Die erfolgreich etablierte und evaluierte Methode zur Bestimmung der Kern/Zytoplasma-Ratio mittels der „Region of interest“-Funktion der Software *ImageJ* wurde in den nachfolgenden Versuchen als Standard-Methode verwendet.

Neben der Untersuchung der Kernlokalisierung wurden auch Lokalisationsstudien am kortikalen F-Aktin durchgeführt. Daher wurde zunächst eine Methode entwickelt, durch welche die F-Aktin-Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen untersucht werden kann. Mit dieser Methode wurde anschließend die F-Aktinbindung der mit EGFP fusionierten HsIP3K-B und ihrer Mutanten in H1299- und HeLa-Zelllinien bestimmt. Es sollte mit dieser Methode ein gegenüber dem herkömmlichen Verfahren objektivere Quantifizierung der F-Aktin-Lokalisation ermöglicht werden. Ähnlich wie bei der Untersuchung der Kernlokalisierung, erfolgte die herkömmliche Bestimmung der F-Aktin-Lokalisation „per Auge“ und war somit ebenfalls stark Beobachter-abhängig [Schreiber, 2002; Brehm *et al.*, 2004; Brehm, 2006]. Während der Entwicklung wurde eine Vielzahl von möglichen Methoden zur Bestimmung der F-Aktinbindung in Erwägung gezogen. Sie wurden alle experimentell erprobt und die jeweiligen Ergebnisse miteinander verglichen (siehe Methoden 2.2.3.11, 2.2.3.12, 2.2.3.13 und Ergebnisse 3.1, Daten nicht gezeigt).

Die erste Methode bestand in der Färbung von F-Aktin durch TRITC (Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat)-markiertes Phalloidin. Phalloidin ist ein Toxin des Weißen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), das eine spezifische Bindung mit den Aktinfilamenten eingeht. An TRITC, einen rot fluoreszierenden Farbstoff, gebunden, kann man das F-Aktinnetzwerk unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen. Dabei sollen die Doppelfluoreszenzbilder, der mit EGFP-Fusionsgenen transfizierten und mit TRITC-markiertem Phalloidin gefärbten Zellen, Hinweise auf eine Kolo-kalisation von Fusionsprotein und F-Aktin geben und somit auf die Stärke und Quantität der F-Aktinbindung dieser Proteine schließen lassen. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die Ergebnisse dieser Methode sehr von der Anwendung verschiedener Bildbearbeitungsprogrammen abhängen. Zur Demonstration dieser methodischen Problematik zeigt Abbildung 4.1 als Beispiel drei unterschiedliche GFP-Phalloidin-Überlagerungsbilder einer mit einem EGFP-Fusionsgen transfizierten H1299-Zelle. Jedes Überlagerungsbild wurde mit einer anderen Bildbearbeitungssoftware erstellt (Corel PHOTO-PAINT 11, Photoshop 7.0 und Corel PHOTO-PAINT 9). Es ist deutlich zu sehen, dass die Überlagerungsbilder sich stark voneinander unterscheiden und dadurch auch unterschiedliche Aussagen über die Kolo-kalisation des GFP- bzw. des Phalloidin-Signals, gemacht werden können. Außerdem ist die Stärke der Fluoreszenzintensität von GFP-Phalloidin-Signalen sehr von der Expressionsrate des jeweiligen Fusionsproteins und der Belichtungszeit der Zellbilder abhängig. Aus diesen Gründen hat sich diese Auswertungsmethode zur quantitativen Bestimmung von EGFP-Fusionsproteinen am F-Aktin nicht bewährt.

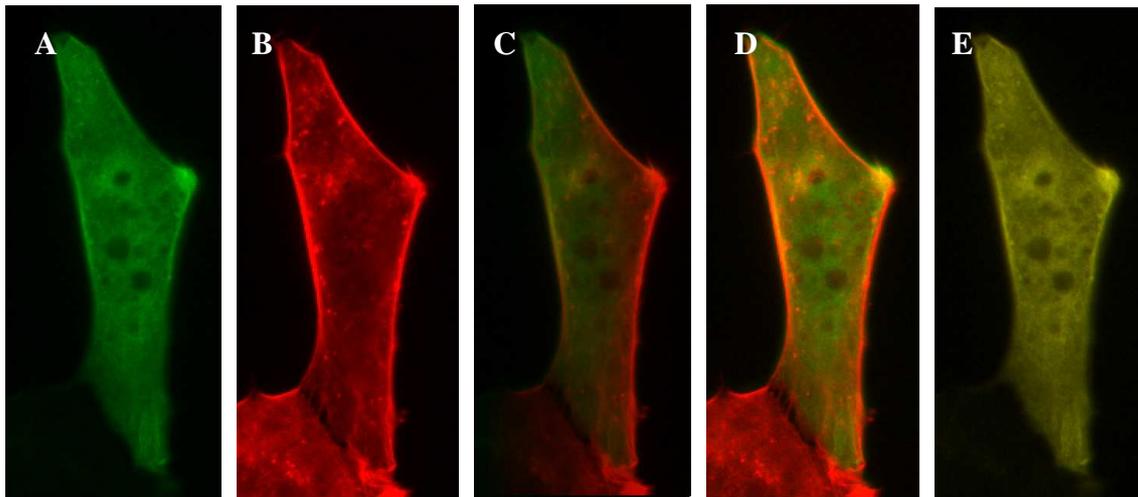


Abbildung 4.1: Einzel- und Doppelfluoreszenzbilder von einer mit einem EGFP-Fusionsgen transfizierten H1299-Zelle

Gezeigt sind GFP- (A), Phalloidin-Fluoreszenzbild (B) und drei GFP-Phalloidin-Überlagerungsbilder (C-E) einer mit einem EGFP-Fusionsgen transfizierten H1299-Zelle. Nach 24 h Expression wurde mit Paraformaldehyd fixiert, mit TRITC-markiertem Phalloidin inkubiert und abschließend die Lokalisation mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Die Overlays wurden mit den Bildbearbeitungsprogrammen Corel PHOTO-PAINT 11 (C), Photoshop 7.0 (D) und Corel PHOTO-PAINT 9 (E), erstellt (Funktion: Hinzufügen). (1000-fache Vergrößerung)

In der Doktorarbeit von Isabell Schreiber [Schreiber, 2002] lassen die mit Triton-X-100 permeabilisierten PC12- und NRK52E- Zellen deutliche F-Aktinfilamente erkennen. Daher kam im Rahmen dieser Arbeit die Idee auf, H1299-Zellen ebenfalls mit Triton-X-100 zu permeabilisieren, um anschließend überschüssiges, nicht an F-Aktin gebundenes EGFP herauszuwaschen. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms *ImageJ*. Dabei wurde die gesamte Zelle mittels der Freihandform-Funktion umrahmt und die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt (siehe Abbildung 4.2). Somit wurde dann die Gesamtfluoreszenz der Zellen errechnet, die auf die Menge der F-Aktinbindung schließen lassen soll. Das Problem dieser Methode besteht u.a. in der Aufwendigkeit der Durchführung, da jede Zelle nur mit einem durch etliche Mausklicks gezogenen Vieleck umrahmt werden kann und somit die Zellgrenzen schwer einzuhalten sind. Außerdem können auch mit dieser Methode die unterschiedlichen Expressionsraten der EGFP-Fusionsproteine nicht in der Auswertung berücksichtigt werden. Ein weiterer Punkt ist, dass nach Permeabilisierung und Waschung eine noch vorhandene Bindung von EGFP an Zellstrukturen wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) u.ä. nicht auszuschließen ist (persönliche Mitteilung von Prof. Mayr). Zum anderen sind die F-Aktinfilamente nach der Triton-X-100-Behandlung nicht deutlicher als am Anfang zu erkennen gewesen. Aufgrund dieser Mängel der Methode konnte sie nicht für die F-Aktinbestimmung etabliert werden.

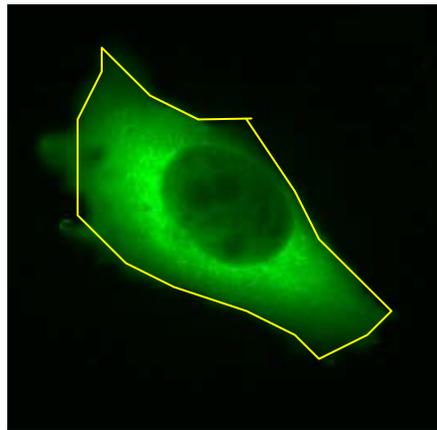


Abbildung 4.2: Demonstration der Gesamtfluoreszenz-Messung einer H1299-Zelle nach Permeabilisierung mit Triton-X-100

Gezeigt ist ein GFP-Fluoreszenzbild einer mit einem EGFP-Fusionsgen transfizierten H1299-Zelle nach Permeabilisierung mit Triton-X-100. Mittels der Freihandform-Funktion (*ImageJ*) wird die gesamte Zelle umrahmt (gelbe Linie) und somit die mittlere Gesamtfluoreszenzintensität der Zelle bestimmt. (1000-fache Vergrößerung)

Ein weiterer Ansatz bestand darin, eine Ratio zwischen der Phalloidin- und der GFP-Fluoreszenzintensität am kortikalen F-Aktin zu bilden (persönliche Mitteilung von Prof. Mayr). Hierbei ist der Gedanke, eine direkte Bestimmung des an den kortikalen F-Aktinfilamenten gebundenen EGFP-Fusionsproteins durchzuführen, wobei ein Ratiowert von 1 als eine Bindung des mit EGFP-markierten Proteins am F-Aktin, zu verstehen ist (siehe Abbildung 4.3). Ein Nachteil dieser Methode stellen die unterschiedlich hohen Phalloidin-Fluoreszenzintensitäten zwischen den Zellbildern dar. Sie resultiert aus der jeweiligen Anpassung der Beleuchtungszeit, die nötig ist, um eine Überbelichtung und somit eine Verfälschung der Fluoreszenzwerte, zu verhindern. Daraus ergeben sich notwendigerweise Ratio-Werte, die nicht immer das korrekte Maß der F-Aktinbindung widerspiegeln. Ein weiterer Nachteil ist die Benutzer-Unfreundlichkeit, da man für die Durchführung dieser Methode jeweils drei Fluoreszenzbilder pro Zelle machen (GFP-, DAPI- und Phalloidin-Fluoreszenzbild) und währenddessen stets den Filter wechseln musste. Ein weiterer Punkt ist die Verfälschung der GFP-Intensität durch die durchdringende intensive Phalloidin-Färbung über den FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)-Filter. Dabei wurden die GFP-Fluoreszenzintensitäts-Werte durch die durchbrechende rote Phalloidin-Fluoreszenz erheblich verfälscht. Mittlerweile sind neue Filter vorhanden, bei denen dieser Effekt nicht mehr auftritt. Aus den genannten Gründen konnte sich auch diese Methode zur Bestimmung der F-Aktin-Lokalisation im Rahmen dieser Studien nicht bewähren.

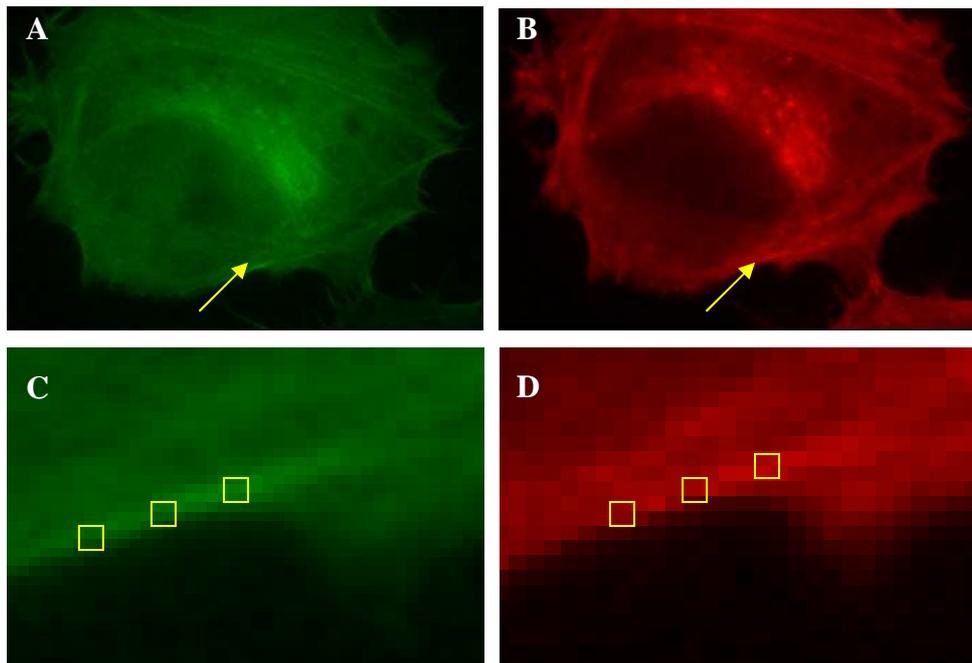


Abbildung 4.3: Demonstration der Auswertungsmethode der Phalloidin_{Aktin}/GFP_{Aktin}-Ratio

Gezeigt sind GFP- und Phalloidin-Fluoreszenzbilder einer mit einem EGFP-Fusionsgen transfizierten H1299-Zelle (**A-D**). Jeweils ein Bereich am kortikalen F-Aktin (s. Pfeil, **A** und **B**) der H1299-Zelle wird stark vergrößert dargestellt (**C** und **D**). Nach 24 h Expression wurde mit Paraformaldehyd fixiert, mit TRITC-markiertem Phalloidin inkubiert und anschließend die Lokalisation mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Mittels *ImageJ* wird durch das Legen von jeweils drei größendefinierte „Area of interest“ einmal die mittlere GFP- (**C**) und einmal die mittlere Phalloidin-Fluoreszenzintensität (**D**) am selben kortikalen F-Aktinstrang bestimmt. Damit wird eine Phalloidin_{Aktin}/GFP_{Aktin}- Ratio gebildet, wobei ein Ratiowert von 1 eine Bindung des mit EGFP-Fusionsproteins am F-Aktin bedeutet. (1000-fache Vergrößerung)

Die wohl direkteste Methode zur Bestimmung der F-Aktinbindung ist die Bildung einer Ratio zwischen der GFP-Fluoreszenz an den F-Aktinfilamenten und der GFP-Fluoreszenz im Zytoplasma. Wie die HsIP3K-B, ist die humane Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform A (HsIP3K-A) ebenfalls eine Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase, die eine F-Aktin-Lokalisation aufweist [Schell *et al.*, 2001; Dewaste *et al.*, 2003]. Zur Kalibrierung dieser Methode wurde die Expression einiger EGFP-Fusionsproteine der HsIP3K-A in H1299-Zellen herangezogen. In den mit pEGFP/HsIP3K-A (Wildtyp) transfizierten H1299-Zellen sind die „stress fibers“ (Bündel von F-Aktinfilamenten) deutlicher als in den mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299-Zellen, zu erkennen. Hier wurde die F-Aktinbindung, sowie der Ausschluss einer F-Aktinbindung anhand der Expression jeweils zweier Fusionsproteine EGFP/HsIP3K-A (Wildtyp) und EGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) bzw. EGFP/ABD (HsIP3K-A) und dem EGFP, analysiert (Vektoren hergestellt von Marcus Nalaskowski).

Eine signifikant geringere F-Aktinbindung ist bei den Fusionsproteinen EGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) und EGFP zu erwarten, da keine Aktinbindungsdomäne (ABD) vorhanden ist. Es wurden jeweils Aktin/Zytoplasma-Ratios und Plasmamembran/Zytoplasma-Ratios der EGFP-Fusionsproteine ermittelt und die Werte miteinander verglichen (siehe Methoden 2.2.3.11 und 2.2.3.12). Wie erwartet weisen die Ergebnisse signifikante Unterschiede der jeweiligen Ratios zwischen EGFP/HsIP3K-A (Wildtyp) und EGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) bzw. EGFP/ABD (HsIP3K-A) und EGFP (siehe Ergebnisse 3.1 und Tabelle 3.1 im Ergebnisteil) auf. Die Mittelwerte der Aktin/Zytoplasma-Ratio der mit pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) und pEGFP-N1 transfizierten H1299-Zellen waren nicht bestimmbar, da aufgrund der homogenen GFP-Fluoreszenzverteilung innerhalb der gesamten Zelle keine F-Aktinstränge identifiziert werden konnten. Eine Phalloidin-Färbung zur genauen Identifizierung der F-Aktinstränge wurde nicht durchgeführt, weil die Phalloidin-Fluoreszenz durch den FITC-Filter durchbrechen und somit die Werte verfälschen würde. Die Mittelwerte der Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio der mit pEGFP/HsIP3K-A (Δ ABD) und pEGFP-N1 transfizierten H1299-Zellen sind kleiner als 1 (siehe Tabelle 3.1 im Ergebnisteil). Dies lässt sich dadurch erklären, dass einige „Area of interest“ aus Versehen statt vollständig auf der Plasmamembran, zum Teil außerhalb der Zelle gelegt wurden. Somit wurde der schwarze Hindergrund der Zellbilder mit in die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität einbezogen.

Insgesamt lieferten die beiden unterschiedlichen Ratio-Bestimmungen vergleichbare Ergebnisse. Es zeigt sich also, dass sowohl die Aktin/Zytoplasma-, als auch die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio auf die Menge der F-Aktinbindung in der Zelle schließen lassen. Aufgrund der Filter-Problematik sollten diese Versuche in zukünftigen Studien mit neuen Filtern wiederholt und die beiden Ratios erneut verglichen werden. Für die HsIP3K-B und ihrer Mutanten wurden zur Bestimmung der F-Aktinbindung die jeweilige Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio gebildet, da dort das Phänomen der durchbrechenden Phalloidin-Färbung durch den FITC-Filter nicht auftritt (keine Phalloidin-Färbung nötig). Außerdem ist das kortikale F-Aktin an der Plasmamembran nach Transfektion mit pHsIP3K-B/EGFP (im Gegensatz zur Transfektion mit pEGFP/HsIP3K-A) in H1299-Zellen deutlicher zu identifizieren als die „stress fibers“. Die Bildung einer Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio konnte zur Bestimmung der kortikalen F-Aktin-Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen der HsIP3K-B etabliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde sie als Standard-Methode zur Bestimmung der F-Aktinbindung verwendet.

Diese Methode zeichnet sich durch eine quantitative Analyse aus. Zudem ist der Beobachter-Effekt im Vergleich zur Bestimmungsmethode „per Auge“ deutlich reduziert. Trotzdem lässt sich dieser Effekt nicht ganz ausblenden, da, wie bei der Bestimmung der Kern/Zytoplasma-Ratio, die Auswahl des Selektionsbereichs subjektiv sein kann. Auch hier sollten die Versuche durch Verblindung überprüft werden. Die Zellbilder könnten beispielsweise durch einen projektfremden Mitarbeiter nochmals ausgewertet und die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratios verglichen werden.

Es sollte bei dieser Methode jedoch nicht die notwendige Annahme außer Acht gelassen werden, dass sich die gemessene GFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran vollständig auf die Fluoreszenz der EGFP-Fusionsproteine am kortikalen F-Aktin zurückführen lässt. Nach Dewaste *et al.* besitzt die HsIP3K-B möglicherweise sowohl eine Zielsteuerungsdomäne an das F-Aktin, als auch an die Plasmamembran [Dewaste *et al.*, 2003]. Maria Brehm führt hingegen die Lokalisation der HsIP3K-B unmittelbar unter der Plasmamembran, auf die Lokalisation am kortikalen F-Aktin zurück [Brehm, 2006]. Eine Klärung dieser Frage steht noch aus. Um zu zeigen, ob es sich bei der gemessenen GFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran tatsächlich um das GFP-Signal des EGFP-Fusionsproteins am kortikalen F-Aktin handelt, wurden H1299-Zellen nach Transfektion mit Cytochalasin B behandelt (Daten nicht gezeigt). Cytochalasin B ist ein Pilzgift, das die Polymerisation des Aktins unterbindet. Durch die daraus resultierende Inhibierung der Zellteilung wird die Apoptose eingeleitet. Falls also die gemessene GFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran tatsächlich auf das GFP-Signal der EGFP-Fusionsproteine am kortikalen F-Aktin zurückzuführen ist, müsste die Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio nach Cytochalasin B-Behandlung deutlich abnehmen. In diesem Rahmen wurde die Cytochalasin B-Behandlung in zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils unterschiedlichen Cytochalasin B-Konzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt. Dabei wurde zum Teil die methodische Durchführung zweier Forschungsarbeiten benutzt bzw. diese leicht modifiziert [Theodoropoulos *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1994]. Die größte Problematik dieses Versuchs bestand jedoch in der Auswahl einer Inkubationszeit und einer Cytochalasin B-Konzentration, bei denen das kortikale F-Aktin zerstört, aber die H1299-Zellen nicht apoptotisch werden. Leider konnten in dieser Arbeit die Bedingungen nicht vollständig erfüllt werden, sodass der Versuch abgebrochen wurde. Es bleibt zukünftige Arbeiten überlassen mit einer optimierten methodischen Durchführung dieser Fragestellung nachzugehen.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung eines funktionellen Kernlokalisierungssignals (NLS) der HsIP3K-B

Im Rahmen der Doktorarbeit von Maria Brehm konnte ein aktives Kernlokalisierungssignal (NLS) innerhalb der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B identifiziert werden [Brehm, 2006]. Das NLS ist ein bestimmtes Motiv in der Aminosäuresequenz eines Proteins, das Importin-abhängig den Transport in den Zellkern vermittelt. In den meisten Fällen bestehen diese Motive überwiegend aus basischen Aminosäuren (Lysine, Arginine). Chelsky *et al.* bestimmten die Konsensussequenz des kanonischen monopartiten Kernlokalisierungssignals als ein aus vier Aminosäuren bestehendes Peptid, das wie folgt definiert wird: K-[RK]-X-[RK]. X steht vorzugsweise für ein Lysin, Arginin, Prolin, Valin oder Alanin [Chelsky *et al.*, 1989].

In dieser Arbeit wurde das erstmals von Maria Brehm beschriebene funktionelle Kernlokalisierungssignal (NLS) in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B, experimentell identifiziert und genau charakterisiert (R¹²⁹KLR). Es sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob sich die Daten aus der Doktorarbeit von Maria Brehm bestätigen lassen. Des Weiteren sollte eine genaue Identifizierung und Charakterisierung der NLS-Sequenz durchgeführt werden, wobei zu untersuchen war, welche Aminosäure-Reste der Sequenz tatsächlich für den Kernimport essentiell sind. Außerdem sollte geklärt werden, ob das identifizierte NLS notwendig und hinreichend für den Kernimport ist. Notwendig wäre es dann, wenn nach Deletion bzw. funktioneller Inaktivierung (z.B. durch gezielte Mutagenese), kein Kernimport mehr stattfindet, sodass ein deutlicher Kernausschluss beobachtet werden kann. Das NLS ist für den Kernimport hinreichend, wenn ausschließlich das isolierte NLS schon eine Kernanreicherung bewirkt. Ist dies nicht der Fall, besteht z.B. die Möglichkeit, dass erst über eine Ko-Aktivierung zweier räumlich auseinander gelegener Kernlokalisierungssignale der Kernimport vermittelt wird. In diesem Zusammenhang sollte auch gezeigt werden, ob es bei dem identifizierten NLS um das einzige Kernlokalisierungssignal der HsIP3K-B handelt. Zusätzlich sollte die Frage nach der Stärke dieses Kernlokalisierungssignals beantwortet werden.

Für die intrazellulären Lokalisationsstudien wurde die Vollängen cDNA der HsIP3K-B mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert, über das man unter dem Fluoreszenzmikroskop direkt auf die Lokalisation des Proteins schließen kann. Um die für die Zielsteuerung verantwortlichen Bereiche zu identifizieren wurden die Fusionsgene durch gezielte Mutagenese verändert und anschließend in zwei menschlichen Zelllinien (H1299 und HeLa) exprimiert.

Es hat sich gezeigt, dass das Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) zwischen Zytoplasma und Zellkern gleichverteilt ist (siehe Ergebnisse 3.2.1.1). Nach der LMB-Behandlung konnte eine deutliche Verschiebung in den Zellkern beobachtet werden (siehe Ergebnisse 3.2.1.2). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die HsIP3K-B sowohl ein Kernlokalisierungssignal (NLS) als auch ein Kernexportsignal (NES) besitzt. Die aktiven NLS und NES bewirken einen ständigen Transport des Proteins zwischen Zytoplasma und Zellkern. Wird der Exportin-abhängige Kernexport durch Leptomycin B gehemmt [Ernst, 2007], kann das HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) nicht mehr aktiv aus dem Zellkern transportiert werden. Folglich findet ausschließlich Kernimport statt, sodass sich das Protein im Zellkern anreichert.

Um zu zeigen, ob das identifizierte NLS notwendig für den Kernimport ist, wurde die Lokalisation zweier mutierter Fusionsproteine der HsIP3K-B untersucht: das HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) und das HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR). Das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) kodiert eine Mutante der HsIP3K-B, bei der die Aktinbindungsdomäne (ABD) deletiert wurde. Wird von der Annahme ausgegangen, dass sich das Kernlokalisierungssignal in der ABD befindet, wird durch die Deletion das NLS entfernt [Brehm, 2006]. Demnach müsste dieses Fusionsprotein, verglichen mit dem Wildtyp, eine deutlich geringere Kernlokalisation aufweisen. Tatsächlich ist dies der Fall, wobei die Lokalisation doppelt so hoch im Zytoplasma als im Zellkern ist (siehe Ergebnisse 3.2.1.4). Diese Ergebnisse bestätigen die Aussage in der Arbeit von Maria Brehm, dass sich in der Aktinbindungsdomäne der HsIP3K-B ein Kernlokalisierungssignal befindet. Wie erwartet, hat sich nach LMB-Behandlung keine signifikante Lokalisationsänderung ergeben (siehe Ergebnisse 3.2.1.5). Durch die Deletion der ABD wurde nicht nur das NLS, sondern auch das NES [Ernst, 2007], entfernt. Somit kann zwar der Kernexport nicht inhibiert, aber auch kein Kernimport stattfinden.

Das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLR) ist eine Mutante der HsIP3K-B, bei der innerhalb des Kernlokalisierungssignals drei Punktmutationen eingeführt wurden (NLS-Tripelmutante). Dabei wurde angenommen, dass die Sequenz K¹²⁸RKLR für das monopartite NLS kodiert. Es wurden die Aminosäuren Lysin¹²⁸, Arginin¹²⁹, Lysin¹³⁰, in Glutamine mutiert. Glutamin weist, im Vergleich zu Lysin bzw. Arginin, eine ähnliche Hydrophobizität und ähnliche sterische Ansprüche auf. Aber im Gegensatz zu den basischen Eigenschaften der beiden anderen Aminosäuren ist Glutamin neutral. Diese Eigenschaft wurde hier gezielt genutzt, um das mögliche Kernlokalisierungssignal funktionell zu inaktivieren, ohne die 3D-Struktur zu verändern.

Diese funktionelle Inaktivierung bietet gegenüber der Deletion den Vorteil, dass mögliche Faltungsdefekte umgangen werden können.

Die Tripelmutante zeigte nach Expression eine signifikante Änderung der Lokalisation, verglichen mit dem Wildtyp. Wie bei der Mutante HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) wurde eine deutliche Verschiebung aus dem Zellkern beobachtet (siehe Ergebnisse 3.2.2.1). Nach LMB-Behandlung konnte keine Veränderung des Mittelwertes der Kern/Zytoplasma-Ratio-Werte festgestellt werden. Es ließ sich jedoch eine signifikante Veränderung der Verteilungen dieser Kern/Zytoplasma-Ratio-Werte ermitteln (siehe Ergebnisse 3.2.2.2). Ein ähnlicher Effekt wurde auch beim EGFP allein nach LMB-Behandlung beobachtet (persönliche Mitteilung von Olga Ernst). Auch dort zeigt sich eine Rechtsverschiebung der Kern/Zytoplasma-Ratio-Verteilung zu höheren Werten nach einer LMB-Behandlung. Die Ursache dieser Beobachtungen lässt sich womöglich auf einen unspezifischen Effekt vom LMB auf die Zellen zurückführen. Aus den Ergebnissen kann insgesamt geschlossen werden, dass dieses NLS das einzige in der HsIP3K-B ist. Im Falle eines weiteren aktiven Kernlokalisierungssignals hätte sich nach LMB-Behandlung eine deutliche Kernanreicherung beobachten lassen müssen, weil ein weiteres, intaktes NLS für den Kernimport gesorgt hätte.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass sich in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B ein funktionelles monopartites Kernlokalisierungssignal (NLS) befindet. Das identifizierte NLS befindet sich in der Aminosäuresequenz K¹²⁸RKLR und ist für den Kernimport notwendig.

In der Doktorarbeit von Maria Brehm wurde aus der Inhibierung des Kernimportes nach ABD-Deletion geschlossen, dass zwei weitere putative NLS-Sequenzen (R⁶⁴⁹KIK und K⁶⁶⁵KK), die sich in der N-terminalen bzw. C-terminalen Hälfte der CaM-Bindungsdomäne befinden, im Kontext der gefalteten Form der HsIP3K-B nicht aktiv sind. Aufgrund der hohen Konservierung des NLS der HsIP3K-B in verschiedenen Spezies, wird angenommen, dass es sich hierbei tatsächlich um funktionale NLS-Sequenzen handeln könnten, die aber durch gebundenes Calmodulin (CaM) verdeckt und damit inhibiert wären. Eine Aktivierung könnte durch Modifikationen am Enzym erfolgen, die eine Calmodulin-Bindung verhindern und so die NLS freilegen [Brehm, 2006]. Es bleibt also zukünftigen Arbeiten zu zeigen, ob sich tatsächlich mehrere funktionale, jedoch inaktive Kernlokalisierungssignale in der HsIP3K-B befinden.

Um die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren des NLS für den Kernimport zu ermitteln, wurden vier NLS-Einzelmutanten hergestellt und die entsprechenden Fusionsproteine in H1299-Zellen exprimiert (NLS 1: HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸RKLR), NLS 2: HsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸QKLR), NLS 3: HsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸RQLR), NLS 4: HsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸RKLQ)).

Die Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸QKLR) (NLS 2), HsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸RQLR) (NLS 3) und HsIP3K-B/EGFP (K¹²⁸RKLQ) (NLS 4) zeigten nach Expression eine gegenüber der NLS-Tripelmutante HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QQLQ) identische Lokalisation, wohingegen bei dem Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸RKLR) (NLS 1) die intrazelluläre Lokalisation mit der des Wildtyps vergleichbar ist (siehe Ergebnisse 3.2.3).

Die Daten deuten darauf hin, dass die Aminosäuren R¹²⁹KLR für den Kernimport essentiell sind, da die Mutation jeder einzelnen ihrer Aminosäure (außer Leucin¹³¹; nicht untersucht), zu einer funktionellen Inaktivierung des NLS führt. Außerdem scheint das Lysin¹²⁸ keine Rolle für den Kernimport zu spielen, da die Lokalisation des Proteins nach dessen Mutation sich gegenüber dem Wildtyp nicht verändert.

Ein Vergleich der NLS-Sequenz der humanen IP3K-B (K¹²⁸RKLR) mit der aus der Ratten IP3K-B (Q¹³³RKLR) hat ergeben, dass die beiden Sequenzen sich lediglich in einer Aminosäure unterscheidet. Interessanterweise entspricht diese Aminosäure genau dem mutierten Rest in der NLS-Einzelmutante pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸RKLR), bei der sich Lysin¹²⁸ als bedeutungslos für die Funktion des NLS herausgestellt hat. Wahrscheinlich ist aus diesem Grund das Lysin an Position 128 beim Menschen phylogenetisch nicht konserviert.

Um zu zeigen, ob das identifizierte NLS auch hinreichend für den Kernimport der HsIP3K-B ist, wurde die Lokalisation zweier anderer mutierter Fusionsproteine der HsIP3K-B untersucht: das ABD(HsIP3K-B)/EGFP und das NLS(HsIP3K-B)/EGFP. Das Plasmid pABD(HsIP3K-B)/EGFP kodiert eine Mutante der HsIP3K-B, bei der ausschließlich die isolierte Aktinbindungsdomäne (ABD) mit dem darin enthaltenen Kernlokalisationsignal (NLS) in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde. Unter der Annahme, dass das in der ABD lokalisierte NLS hinreichend für den Kernimport ist, müsste das Fusionsprotein nach Expression in H1299- und HeLa-Zellen eine signifikante Kernanreicherung gegenüber dem Wildtyp aufweisen können. Tatsächlich zeigte sich eine deutlich erhöhte Kernlokalisierung (siehe Ergebnisse 3.2.4.1). Die Verschiebung in den Zellkern war noch deutlicher als beim Wildtyp. Dieser Effekt lässt sich allein durch die geringe Größe der ABD gegenüber dem Vollängenprotein erklären, da beide Konstrukte über ein NLS bzw. NES verfügen. Eine LMB-Behandlung bewirkte eine zusätzliche Anreicherung im Zellkern (siehe Ergebnisse 3.2.4.4 und). Dieser Effekt lässt sich, wie beim Wildtyp, durch den inhibierten Kernexport und den daraus resultierenden einseitigen Kernimport, erklären. Das Plasmid pNLS(HsIP3K-B)/EGFP kodiert eine Mutante, bei der ausschließlich das isolierte Kernlokalisationsignal (NLS) in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurde.

Ist diese Sequenz hinreichend für den Kernimport, sollte bei der Expression dieses Fusionsproteins ebenfalls eine deutliche Kernanreicherung beobachtet werden. Diese Kernanreicherung konnte tatsächlich festgestellt werden und ist signifikant gegenüber dem EGFP erhöht (Vergleich aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts) (siehe Ergebnisse 3.2.5.1 und 3.2.5.2). Es wurde also gezeigt, dass das in der Aktinbindungsdomäne (ABD) lokalisierte monopartite Kernlokalisierungssignal (NLS) der HsIP3K-B, sowohl notwendig als auch hinreichend für den Kernimport ist.

Zusätzlich wurde die Stärke dieses Kernlokalisierungssignals bestimmt. Dabei wurde das NLS der HsIP3K-B mit dem Kernlokalisierungssignal der IPMK und dem dreifach kodierten NLS aus dem Simianes Virus 40 (SV40) [Kalderon *et al.*, 1984; Lanford *et al.*, 1986], einem der stärksten Kernlokalisierungssignale überhaupt, verglichen. Das entsprechende Fusionsprotein wurde schon in der Diplomarbeit von Olga Ernst verwendet und diente aufgrund seiner eindeutigen Kernlokalisierung als Positiv-Kontrolle [Ernst, 2007]. In dieser Arbeit wurden diese Lokalisationsstudien zum Vergleich der NLS-Stärke herangezogen. Es hat sich herausgestellt, dass die ähnlich starken Kernlokalisierungssignale der HsIP3K-B und der IPMK, verglichen mit dem Fusionsprotein pEGFP/3xNLS (SV40), eine deutlich geringere Kernanreicherung aufweisen (siehe Ergebnisse 3.2.6.1 und 3.2.6.2). In dem Zusammenhang wurde auch die intrazelluläre Zielsteuerung des EGFPs allein untersucht. In Arbeiten von Wei *et al.* konnte kein durch NLS oder NES vermittelter aktiver Transport des EGFPs beobachtet werden. Folglich sollte das EGFP (27 kD) allein durch passive Diffusion zwischen Zytoplasma und Zellkern transportiert werden [Wei *et al.*, 2003]. Somit wäre eine homologe Verteilung des EGFPs nach Expression in der Zelle zu erwarten, da keine gezielte Regulation der Zielsteuerung stattfindet. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass das EGFP eine Anreicherung im Zellkern zeigt, die auf eine nukleäre bzw. kinetische Falle beruhen könnte. Zum einen wäre es denkbar, dass das EGFP während der Wiederherstellung des Zellkerns nach einer Zellteilung in den Zellkern eingelagert und darin gefangen wird (nukleäre Falle) [Seibel *et al.*, 2007]. Zum anderen könnten im Falle einer räumlichen Nähe der Proteinbiosynthese des GFPs zum Zellkern, GFP-Monomere in den Zellkern diffundieren und dort durch Dimerisierung gefangen werden. Aufgrund des größeren Volumens im Zytoplasma wäre die Konzentration an dimerisiertem GFP geringer, wodurch das GFP im Zellkern angereichert wird (kinetische Falle) [Seibel *et al.*, 2007]. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten EGFP, kann die kinetische Falle eine Kernanreicherung des EGFP nicht erklären, da diese Variante des GFP nicht dimerisiert [Clontech, Living Colors AcGFP1 Fluorescent Protein (brochure), www.clontech.com/images/brochures/AcGFP1.pdf].

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass nicht nur das EGFP, sondern auch EGFP-Homomultimere eine Kernlokalisierung aufweisen [Seibel *et al.*, 2007]. Demnach ist der Gebrauch von Fusionskonstrukten aus einem kleinen Protein und dem EGFP, nicht ausreichend, um Kernimport-Vorgänge zu beweisen. Daher wurde in diesem Rahmen zusätzlich ein Fusionsgen hergestellt, bei dem das NLS der HsIP3K-B in einen p4xEGFP-N1-Vektor kloniert wurde. Es hat sich gezeigt, dass die Fusion mit einem 4xEGFP in vielen Fällen ausreichend ist, um einen signifikanten Unterschied zwischen dem fusionierten Protein und dem 4xEGFP zu identifizieren und daraus das Vorliegen eines Kernlokalisierungssignals abzuleiten. Der Fusionsvektor p4xEGFP-N1 besitzt vier aufeinander folgende GFPs, wodurch es dementsprechend ein größeres Fusionsprotein kodiert als das pEGFP-N1 und somit eine geringere Kernlokalisierung aufweist. In den Arbeiten von Seibel *et al.* konnte gezeigt werden, dass das 4xEGFP in H1299-Zellen nahezu gleichverteilt ist zwischen Zytoplasma und Zellkern [Seibel *et al.*, 2007]. Diese intrazelluläre Verteilung sollte mit dem hergestellten Fusionsprotein NLS(HsIP3K-B)/4xEGFP verglichen werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund methodischer Problematik wurden die Versuche abgebrochen. Nach Optimierung der Durchführungsmethodik, indem das 4xEGFP mit dem sehr starken Kernlokalisierungssignal 3xNLS (SV40) fusioniert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Kernlokalisierung dieses Fusionsproteins signifikant stärker ist, als die des 4xEGFP (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen deutlich, dass ein monopartites Kernlokalisierungssignal (NLS) in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B identifiziert und genau charakterisiert werden konnte. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Sequenz **R¹²⁹KLR** ein funktionales NLS kodiert. Es handelt sich um das einzige NLS der HsIP3K-B. Die Stärke dieses Kernlokalisierungssignals ist ähnlich dem der HsIPMK, wobei beide NLS signifikant schwächer sind als das dreifach kodierte NLS (SV40) im Fusionsprotein pEGFP/3xNLS (SV40). Die für den Kernimport essentielle Sequenz unterscheidet sich von der von Chelsky *et al.* prädizierten monopartiten NLS-Konsensussequenz lediglich in Lysin¹²⁸ [Chelsky *et al.*, 1989]. Das NLS der HsIP3K-B entspricht am ehesten der NLS-Peptidsequenz aus der Fruchtfliege *Drosophila Antennapedia* (RRRR), die interessanterweise jedoch keinen Kernimport vermitteln kann und somit eine fast reine zytoplasmatische Lokalisation aufweist [Chelsky *et al.*, 1989] (siehe Abbildung 4.4). Es handelt sich bei dem NLS der HsIP3K-B also offensichtlich um ein nicht-kanonisches Kernlokalisierungssignal.

Peptide	Origin of sequence: residue no. (reference)	Peptide sequence ^a	Cellular localization ^b
P1	SV40 large T; 126–132 (10)	C G G <u>P K K R K V</u> G CONH ₂	N
P2	Polyomavirus large T; 189–196 (22)	C G Y G <u>V S R K R P R P</u> G CONH ₂	N
P3	<i>X. laevis</i> nucleoplasmin; 164–172 (1, 4)	C G <u>O A K K K L D</u> CONH ₂	N
P4	<i>X. laevis</i> lamin L ₁ ; 409–421 (12)	C <u>V R T T K G K R K R I D V</u> COOH	N
P5	Human c-myc-encoded protein; 321–328 (24)	C G G <u>A A K R V K L D</u> CONH ₂	N
P6	Adenovirus type 2/5 E1a; 282–289 (16)	C G G <u>L S S K R P R P</u> COOH	N
P7	Adenovirus type 2/5 E1a; 282–289 (16)	C G Y G <u>L S S K R P R P</u> G CONH ₂	C > N
P8	Polyomavirus large T; 279–286 (22)	C G <u>P P K K A R E D</u> CONH ₂	C > N
P9	SV40 large T (K→T); 126–132 (10)	C G G <u>P K T K R K V</u> G CONH ₂	C ≫ N
P10	Adenovirus type 7 E1a; 254–261 (11)	C G G <u>S T R K L P R Q</u> COOH	C ≫ N
P11	Adenovirus type 7 E1a; 254–261 (11)	C G Y G <u>S T R K L P R Q</u> G CONH ₂	C
P12	SV40 VP1; 1–11 (26)	<u>A P T K R K G S S P G</u> C CONH ₂	C
P13	SV40 VP1; 1–8 (26)	C G Y G <u>A P T K R K G S</u> CONH ₂	C
P14	<i>Drosophila Antennapedia</i> ; 26–33 (17)	C G Y G L T <u>R R R R I E G</u> CONH ₂	C
P15	Human p53; 369–377 (9)	C L K S K K G O S T CONH ₂	C
P16	Human p53; 316–324 (9)	C G G <u>P Q P K K K P L D</u> CONH ₂	C
P17	Human immunodeficiency virus gp120; 504–511 (21)	C G G <u>A P T K A K R R</u> CONH ₂	C
P18	<i>S. cerevisiae</i> MATa2-encoded protein; 1–13 (8)	<u>M N K I P I K D L L N P Q</u> C CONH ₂	C

Abbildung 4.4: Charakterisierung des kanonischen monopartiten NLS

Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisation von dem jeweiligen CSA-konjugierten synthetischen Peptid aus einer Vielzahl von Spezies (P1-P18). Die unterstrichenen Sequenzen, die ein putatives NLS nachahmen sollen, stammen aus dem Genom der entsprechenden Spezies. Die Sequenz des putativen Kernlokalisierungssignal aus *Drosophila Antennapedia* (roter Kasten) gleicht am ehesten der identifizierten NLS-Sequenz der HsIP3K-B (nach [Chelsky *et al.*, 1989]).

4.3 F-Aktinbindung von EGFP-Fusionsproteinen der HsIP3K-B

In der Doktorarbeit von Maria Brehm konnte die Aktinbindungsdomäne (ABD) der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP3K-B) vollständig charakterisiert werden [Brehm, 2006]. Es wurde gezeigt, dass die von Isabell Schreiber [Schreiber, 2002] identifizierte Aktinbindungsdomäne (Aminosäuren 108-170) der Ratten Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B auch in der humanen Form (Aminosäuren 103-193) hinreichend und notwendig für die F-Aktinbindung des Enzyms ist. Diese Aktinbindungsdomäne ist die einzige funktionale F-Aktin-Zielsteuerungsdomäne in der HsIP3K-B. Für ihre Bindung am F-Aktin benötigt sie keine weiteren unterstützenden Proteine, ist jedoch abhängig von der korrekten Sekundärstruktur zweier prädizierter α -Helices. In einem von Prof. Dr. Mayr modellierten, putativen Tertiärstrukturmodell für den N-terminalen Bereich der HsIP3K-B stellte sich heraus, dass diese beiden α -Helices eine wichtige Rolle für die F-Aktinbindung des Enzyms zu spielen scheinen [Brehm, 2006]. Es wird vermutet, dass das saure Aktinmolekül durch die basische α -Helix I (Aminosäuren 125-141) gebunden wird, wobei die amphipatische α -Helix II (Aminosäuren 149-161) wahrscheinlich eine unterstützende Wirkung auf diese Bindung ausübt.

Das charakteristische Segment der Aktinbindungsdomäne (ABD) von HsIP3K-B ist eine Prolin-reiche Region, die drei Proline (Prolin¹²¹, Prolin¹²², Prolin¹²⁴) beinhaltet und an die sich die zwei prädierte α -Helices I und II anschließen. Ein Motiv im α -helikalen C-terminalen Bereich, welches von den Aminosäuren „FEA“ in der IP3K-B gebildet wird, ist hochkonserviert („FEA-Motiv“). Aus der Alignierung wird deutlich, dass es sich bei dieser Peptidsequenz um einen in Vertebraten hochkonservierten Aminosäurebereich handelt, der höchstwahrscheinlich essentiell für die F-Aktinbindung ist (siehe Abbildung 4.5) [Brehm, 2006]. Mithilfe von sogenannten Helixbrechermutanten konnte in der Doktorarbeit von Maria Brehm nachgewiesen werden, dass die Eigenschaft der F-Aktinbindung dieser ABD, auf dem Vorhandensein von α -Helices beruht. In diesem Rahmen wurden zwei solcher Mutanten hergestellt (pABD(RnIP3K-B)/EGFP (P¹³⁹QREP) und pABD(RnIP3K-B)/EGFP (P¹⁵⁹QAQP)). Proline besitzen strukturbrechende Eigenschaften, die zwar Flexibilität zwischen den beiden α -Helices und den angrenzenden Sekundärstrukturbereichen gewährleisten, in diesem Fall jedoch die Sekundärstrukturen innerhalb der α -Helices zerstören sollten. Tatsächlich zeigten diese Mutanten eine gleichmäßige Verteilung in der Zelle. Das heißt, wie bei vielen anderen ABDs beruht die Bindung von F-Aktin auch bei der ABD der IP3K-B auf dem Vorhandensein von korrekt gefalteten α -Helices, welche die Bindung an F-Aktin vermitteln. Diese Mutationen wurden in der Ratten (*Rattus norvegicus*) IP3K-B vorgenommen [Brehm, 2006].

In dieser Arbeit wurde die zweite Helixbrechermutation von Maria Brehm in der humanen Volllänge IP3K-B eingeführt (FEA 1: HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP)) und die intrazelluläre Lokalisation in H1299-Zellen beobachtet. Zusätzlich wurde das „FEA-Motiv“ direkt mutiert (FEA 2: HsIP3K-B/EGFP (Q¹⁵⁰AA)), da vermutet wurde, dass diese zwischen den Spezies hochkonservierte und in der α -Helix II liegende Sequenz, eine essentielle Rolle für die F-Aktinbindung spielen könnte. Die intrazelluläre Lokalisation beider Fusionsproteine zeigten eine gegenüber den Wildtyp signifikant geringere kortikale F-Aktinbindung (siehe Ergebnisse 3.3.3). Diese Daten bestätigen die Arbeiten von Maria Brehm.

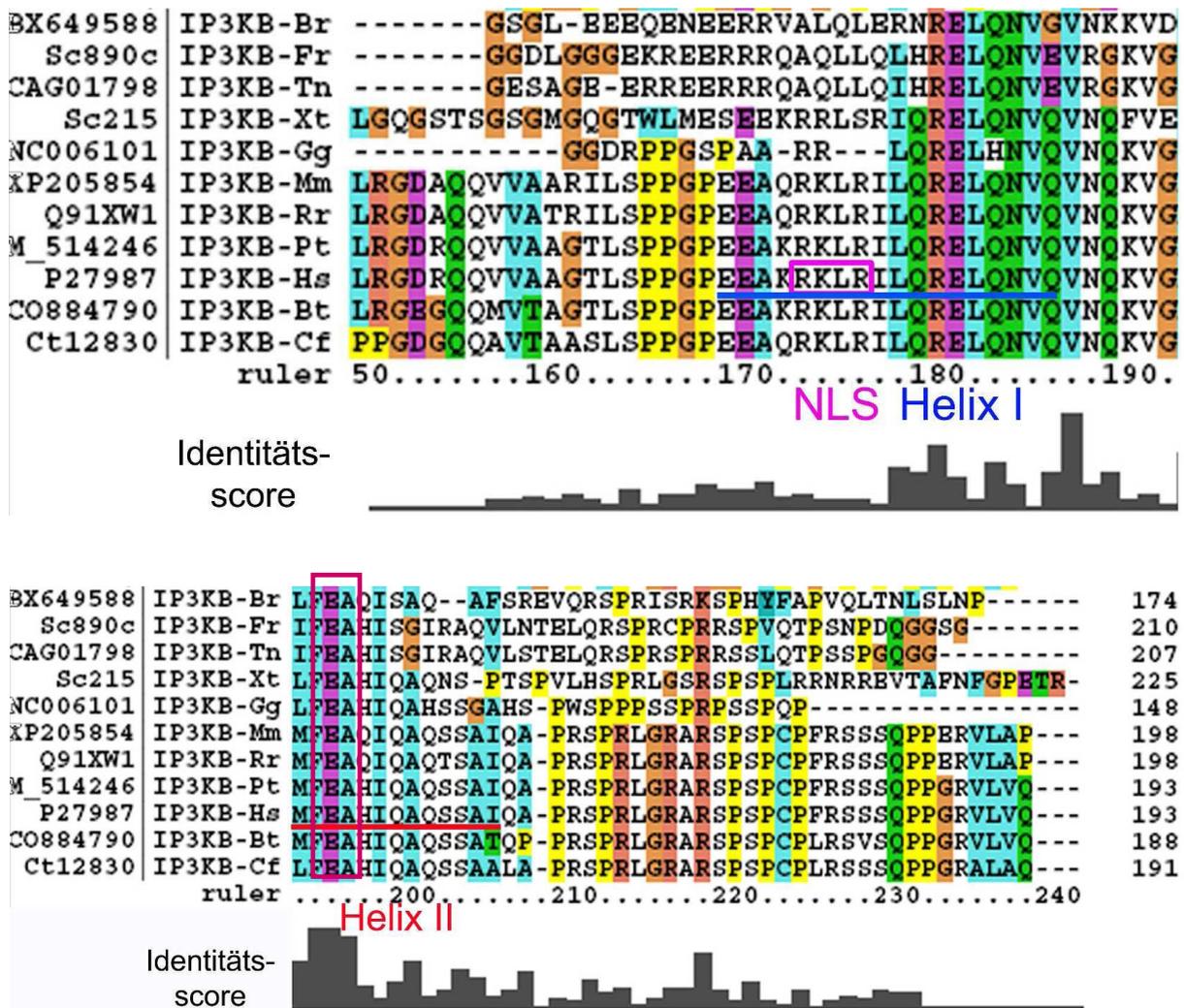


Abbildung 4.5: Aminosäuresequenzalignierung der Aktinbindungsdomänen der B-Isoformen von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen verschiedener Spezies, entsprechend den Aminosäuren 106 bis 193 der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B mit Hilfe von ClustalX

Proline sind gelb unterlegt. Identische bzw. ähnliche Aminosäuren sind farblich markiert und im „Identitätsscore“ (unterste Reihe) durch hohe Säulen angegeben. Das NLS der humanen IP3K-B ist Magenta farben umrandet. Balken unterstreichen den Aminosäurebereich der α -Helices I (blau) und II (rot) der ABD in der humanen Form. Das „FEA-Motiv“ ist violett umrahmt.

Die Spezies sind: Gg, *Gallus guallus* (Huhn); Xt: *Xenopus tropicalis* (Krallenfrosch); Mm: *Mus musculus* (Maus); Rr: *Rattus rattus* (Ratte); Cf: *Canis familiaris* (Haushund); *Homo sapiens* (Mensch); Bt: *Bos taurus* (Rind); Br: *Danio rerio* (*Brachydanium rerium*, Fisch); Tn: *Tetraodon nigroviridis* (Fisch); Pt: *Pan troglodytes* (Schimpanse) (modifiziert nach [Brehm et al., 2006]).

Im Rahmen der F-Aktinbindungsstudien wurde außerdem die kortikale F-Aktinbindung folgender Mutanten der HsIP3K-B untersucht: pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD), pABD(HsIP3K-B)/EGFP und pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QLR). Das Plasmid pHsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) kodiert eine Mutante der HsIP3K-B, bei der die Aktinbindungsdomäne (ABD) deletiert wurde, wohingegen das Plasmid pABD(HsIP3K-B)/EGFP eine Mutante kodiert, bei der ausschließlich die isolierte ABD in den pEGFP-N1-Vektor inkloniert wurde. Die NLS-Tripelmutante pHsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QLR) besitzt in der NLS-Sequenz drei punktmutierte Aminosäuren, die das Kernlokalisierungssignal funktionell inaktivieren.

Wie erwartet, weist das Fusionsprotein HsIP3K-B/EGFP (Δ ABD) eine gleichverteilte Lokalisation zwischen dem kortikalen F-Aktin und dem Zytoplasma, auf (siehe Ergebnisse 3.3.1 und 3.3.2). Dies bestätigt die Arbeiten von Maria Brehm, in denen sie zeigen konnte, dass die ABD die einzige funktionale F-Aktin-Zielsteuerungsdomäne in der HsIP3K-B darstellt. Sie ist notwendig für die F-Aktinbindung [Brehm, 2006]. Die kortikale F-Aktinbindung der Fusionsproteine HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp), ABD(HsIP3K-B)/EGFP und HsIP3K-B/EGFP (Q¹²⁸QLR) ist in H1299-Zellen vergleichbar stark (siehe Ergebnisse 3.3.1). Dadurch wird gezeigt, dass diese ABD auch hinreichend für die F-Aktinbindung ist [Brehm, 2006]. Es wäre im Zusammenhang mit der NLS-Tripelmutante interessant zu erfahren gewesen, ob sich die durch die Mutation verringerte Kernanreicherung, auf die Quantität der F-Aktinbindung auswirkt. In den bisherigen Versuchen konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (siehe Ergebnisse 3.3.1). Interessanterweise weist die Mutante HsIP3K-B/EGFP (P¹⁵⁴QAQP) (FEA 1) in einigen Fällen eine verstärkte ER-Bindung auf (Daten nicht gezeigt). Es konnte jedoch sowohl in der Doktorarbeit von Maria Brehm [Brehm, 2006], als auch in den Arbeiten von Yu *et al.* [Yu *et al.*, 2005] gezeigt werden, dass die ER-Bindungsdomäne außerhalb der Aktinbindungsdomäne der HsIP3K-B (AS 262-399) liegt, und somit die innerhalb der ABD liegende Mutationen keinen Einfluss auf die ER-Lokalisation haben dürften. Trotzdem lässt sich bis dato dieser domänenübergreifende Effekt nicht ausschließen. Es stellt sich die Frage, ob die Aktinbindungsdomäne, das Kernlokalisierungssignal, sowie die ER-Bindungsdomäne, einem bislang noch nicht aufgeklärten, integralen Regulationsmechanismus, unterliegen.

4.4 Modell der „Pseudo-Phosphorylierung“ und „Pseudo-Dephosphorylierung“

In diesem Teil der Arbeit wurden konstitutive Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen an *in silico* prädizierten, putativen Phosphorylierungsstellen durch die Substitution jeweils einer Aminosäure durch Glutaminsäure (E) oder Alanin (A), simuliert. Als eine Form der posttranslationalen Modifikation können Phosphorylierungen in der Regulation der Zielsteuerung und Funktion von Proteinen eine Rolle spielen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung die Affinität des Kernlokalisierungssignals (NLS) zum nukleären Transportrezeptor Importin α durch Konformations- bzw. Ladungsänderungen verändert [Harreman *et al.*, 2004]. Senter *et al.* fanden heraus, dass eine durch aktivierte Proteinkinasen verursachte Phosphorylierung in der Nähe oder im Bereich der Aktinbindungsdomäne von Dystrophin die Interaktion der Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett beeinflusst [Senter *et al.*, 1995]. Es zeigte sich, dass eine Phosphorylierung durch PKA eine 3-fache Erhöhung der Bindungsaffinität von Dystrophin zum Aktin ergab, wohingegen eine Phosphorylierung durch CK-II bzw. PKC die Aktinbindung inhibierte. Interessanterweise lag keine der sieben *in silico* prädizierten Phosphorylierungsstellen durch PKA in der ABD-lokalisierten N-terminalen Region des Proteins. Wahrscheinlich wird also durch Phosphorylierung die Modulation der Bindungsaffinität über einen indirekten Einfluss der N-terminalen Konformation oder über den Aggregations-Grad von Dystrophin, bewirkt [Senter *et al.*, 1995]. In der Diplomarbeit von Philip Hartjen wurde durch PKC-Phosphorylierungs-Assays mit rekombinanten, affinitätsgereinigten HsIP3K-B Fragmenten nachgewiesen, dass zwei Serinreste (Serin⁶⁷⁹ und Serin⁷⁶⁴) innerhalb der katalytischen Domäne *in vitro* durch die Proteinkinase C erkannt und phosphoryliert werden [Hartjen, 2002]. Die von Christina Deschermeier gewonnenen Daten zu den Auswirkungen der Pseudo-Phosphorylierungsmutante S764D auf die Aktivierbarkeit der HsIP3K-B durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, deuten auf eine mögliche wichtige Funktion als „Gedächtnisschalter“ der Phosphorylierung von Serin⁷⁶⁴ hin [Deschermeier, 2002].

In den hier vorliegenden Studien wurden die Mutanten sowohl auf ihre kortikale F-Aktinbindung, als auch auf ihre nukleäre Lokalisation hin untersucht. Es darf bei der Bewertung dieser Ergebnisse jedoch nicht vernachlässigt werden, dass die durch eine jeweilige Punktmutation verursachte „Pseudo-Phosphorylierung“ bzw. „Pseudo-Dephosphorylierung“ nicht das gleiche ist wie eine durch Proteinkinasen (PKs) bzw. Phosphatasen (PPs) bewirkte *in vivo* Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung. Der durch Proteinkinasen eingebrachte Phosphatrest trägt zwei negative Ladungen, Glutaminsäure an seiner Carboxylgruppe jedoch nur eine negative Ladung (siehe Abbildung 4.6).

Auch unterscheiden sich eine Phosphatgruppe und Glutamat in ihrer Drehbarkeit und Konformation. Die Simulation einer Phosphorylierung durch diese „Pseudo-Phosphorylierung“ ist also nur bedingt möglich. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, scheint die Einbringung schon einer negativen Ladung jedoch hinlänglich für eine veränderte Stärke der kortikalen F-Aktinbindung der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP3K-B) zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die drei Pseudo-Phosphorylierungsmutanten S166E, S174E und S176E eine gegenüber dem Wildtyp signifikant stärkere kortikale F-Aktinbindung, besitzen (siehe Ergebnisse 3.4.2).

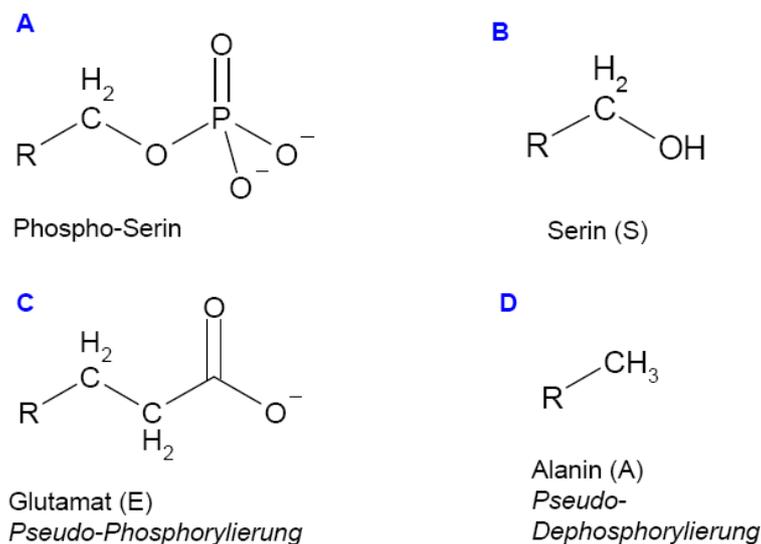


Abbildung 4.6: Molekulare Unterschiede von Phospho-Serin, Glutamat, Serin und Alanin

Gezeigt sind die molekularen Unterschiede der jeweiligen räumlichen Struktur von Phospho-Serin und Serin (*in vivo* Phosphorylierung und Dephosphorylierung) bzw. Glutamat und Alanin (Pseudo-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung) in zweidimensionaler Darstellung (**A-D**). Das Phospho-Serin (**A**) zeichnet sich durch zwei negative Ladungen aus, wohingegen Glutamat (**C**) nur eine negative Ladung besitzt. Gegenüber dem Serin (**B**) fehlt dem Alanin (**D**) die Hydroxylgruppe.

Dabei haben sich die Mutante S166E und S174E als besonders interessant herausgestellt, da nur dort die stärkere kortikale F-Aktinbindung mit einer Kernaussparung einherzugehen scheint (siehe Tabelle 3.5 im Ergebnisteil). Dieser Effekt konnte jedoch in der HeLa-Zelllinie nicht festgestellt werden (siehe Ergebnisse 3.4.4).

Die unterschiedliche Auswirkung von „Pseudo-Phosphorylierung“ auf die Verteilung der HsIP3K-B in menschlichen Tumorzelllinien spricht wahrscheinlich für eine gewebsspezifische Regulation der nukleären Translokation bzw. der F-Aktinbindung. In unterschiedlichen Geweben können zum einen die Zytoskelett-Strukturen sich stark voneinander unterscheiden, zum anderen kann das Expressionsmuster von Importinen bzw. Exportinen oder verschiedener Proteinkinasen stark variieren. Sie liegen in verschiedenen Isoformen vor und auch die Regulation ihrer enzymatischen Aktivität ist abhängig von der Art des Gewebes. Zu bemerken ist, dass der Unterschied bisher ausschließlich anhand einer einzigen Pseudo-Phosphorylierungsmutante beurteilt wurde. Um jedoch die Aussagekraft dieses wahrscheinlich Zelllinien-abhängigen Effektes zu überprüfen, sollten die intrazellulären Lokalisationen weiterer Pseudo-Phosphorylierungsmutanten zwischen der H1299- und HeLa-Zelllinie verglichen werden. Interessant ist, dass alle drei signifikanten Pseudo-Phosphorylierungsmutanten (S166E, S174E und S176E) in sogenannten „SP-Sites“ liegen. Es handelt sich um zwischen den Vertebraten hochkonservierte Stellen in der Aminosäuresequenz der HsIP3K-B, die aus einem Serin und dem darauffolgenden Prolin bestehen und die laut Prädiktion von einer Vielzahl von Proteinkinasen phosphoryliert werden können (CDKs, CaMKs, PKA, PKG und SP-spezifische Kinasen) (siehe Abbildung 4.7). Dennoch erfüllen die Ergebnisse nicht die *a priori* Erwartungen, dass eine eingeführte negative Ladung mit einer erhöhten Azidität, zu einer stärkeren Affinität des ebenfalls sauren Aktinmoleküls, führt. Die mit der Phosphorylierung verbundene Affinitätserhöhung zum F-Aktin kann also nicht durch die Ladungsänderung erklärt werden, sondern liegt vermutlich in einer damit verbundenen Änderung der Stereometrie des Proteins.

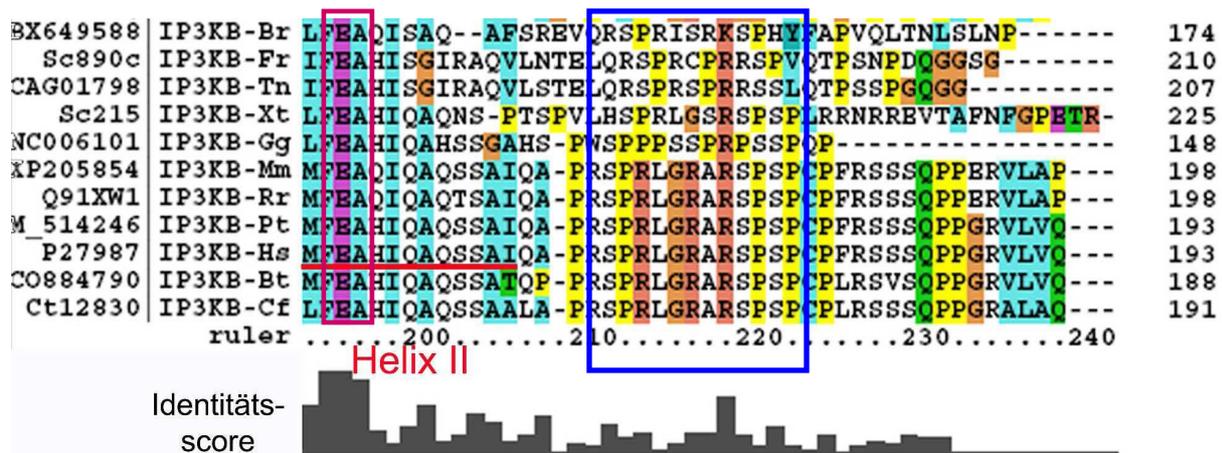


Abbildung 4.7: Aminosäuresequenzalignierung der Aktinbindungsdomänen der B-Isoformen von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen verschiedener Spezies, entsprechend den Aminosäuren 149 bis 193 der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B mit Hilfe von ClustalX

Proline sind gelb unterlegt. Identische bzw. ähnliche Aminosäuren sind farblich markiert und im „Identitätsscore“ (unterste Reihe) durch hohe Säulen angegeben. Der rote Balken unterstreicht den Aminosäurebereich der α -Helices II (rot) der ABD in der humanen Form. Das „FEA-Motiv“ ist violett umrahmt. Der blau umrahmte Bereich zeigt den zwischen den Spezies hochkonservierten Bereich mit „SP-Sites“.

Die Spezies sind: Gg, *Gallus gallus* (Huhn); Xt: *Xenopus tropicalis* (Krallenfrosch); Mm: *Mus musculus* (Maus); Rr: *Rattus rattus* (Ratte); Cf: *Canis familiaris* (Haushund); *Homo sapiens* (Mensch); Bt: *Bos taurus* (Rind); Br: *Danio rerio* (*Brachydanium rerium*, Fisch); Tn: *Tetraodon nigroviridis* (Fisch); Pt: *Pan troglodytes* (Schimpanse) (modifiziert nach [Brehm *et al.*, 2006]).

Zur Simulation einer konstitutiven Dephosphorylierung wurde die putative Phosphorylierungsstelle durch Alanin (A) substituiert (siehe Abbildung 4.6). Aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe des Alanins kann der substituierte Aminosäurerest durch Proteinkinasen nicht mehr phosphoryliert werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, hat auch die „Pseudo-Dephosphorylierung“ deutliche Auswirkungen auf die Stärke der kortikalen F-Aktinbindung der HsIP3K-B. Dabei wurde festgestellt, dass alle sieben untersuchten Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten eine gegenüber dem Wildtyp signifikant schwächere kortikale F-Aktinbindung besitzen. Diese Daten lassen, zumindest für die drei Aminosäuren Serin¹⁶⁶, Serin¹⁷⁴ und Serin¹⁷⁶, vermuten, dass sie möglicherweise durch Phosphorylierungen in ihrem Lokalisationsverhalten am F-Aktin reguliert werden (siehe Ergebnisse 3.4.3). Durch die Einführung der „Pseudo-Phosphorylierungen“ und „Pseudo-Dephosphorylierungen“ konnten putative Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Regulation ihres Phosphorylierungsgrades, Einfluss sowohl auf die nukleäre Translokation, als auch auf die Bindung an das kortikale F-Aktinfilament der HsIP3K-B, haben.

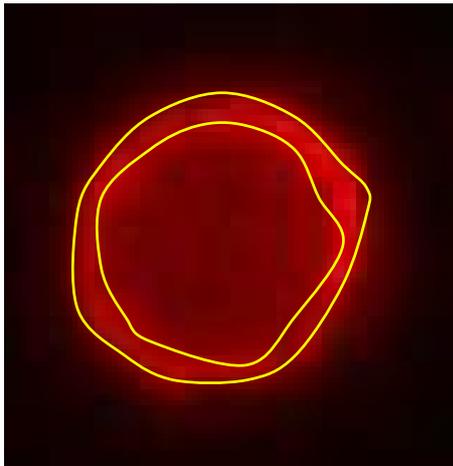
Alle putativen Phosphorylierungsstellen wurden durch Algorithmen prädiziert, die den Vergleich der Primärstruktur der HsIP3K-B mit Proteinsequenzmotiven, die durch Proteinkinasen selektiv phosphoryliert werden, erlauben. Die hohe phylogenetische Konservierung der einzelnen putativen Phosphorylierungsstellen lässt jedoch vermuten, dass einige tatsächlich funktionelle Phosphorylierungsstellen *in vivo* darstellen. Aufgrund der fehlenden Kristallstruktur der HsIP3K-B lässt sich mit diesen „Pseudo-Phosphorylierungs-“ bzw. „Pseudo-Dephosphorylierungs“-Studien bis dato keine verlässlichen Aussagen über die putativen Phosphorylierungsstellen, sowie deren Regulation über Proteinkinasen bzw. Proteinphosphatasen, treffen.

Durch weiterführende Versuche mit Hilfe von Proteinkinase Aktivatoren wie z.B. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Forskolin (persönliche Mitteilung, Rüdiger Meyer, UKE), gezielte Überexpression von Proteinkinasen sowie durch den Einsatz von Proteinkinase Inhibitoren zur Reduktion von prädizierten, *in vivo* bereits konstitutionell vorhandenen Phosphorylierungen, muss in Zukunft geklärt werden, welche der putativen Phosphorylierungsstellen *in vivo* tatsächlich phosphoryliert werden.

4.5 Mögliche physiologische Bedeutung von intrazellulären Zielsteuerungsmechanismen der HsIP3K-B

Die in dieser Arbeit vorgestellten Lokalisationsstudien wurden mithilfe von EGFP-Fusionsproteinen in humanen Tumorzelllinien durchgeführt. In der Doktorarbeit von Marcus Nalaskowski konnte gezeigt werden, dass das Anfügen eines EGFP-Tags an den N-Terminus der HsIPMK, keine Auswirkung auf deren intrazelluläre Zielsteuerung hat [Nalaskowski, 2003]. Bei der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform C (HsIP3K-C) hingegen, wird die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms durch den EGFP-Tag beeinflusst [Nalaskowski *et al.*, 2006]. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die Überexpression des Fusionsproteins nach transienter Transfektion der Zellen zu keiner Veränderung seiner intrazellulären Lokalisation führt. Dabei sollte bedacht werden, dass das EGFP-Fusionsgen im pEGFP-Vektor unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven und sehr starken CMV-Promotors [Clontech, Living Colors AcGFP1 Fluorescent Protein (brochure), www.clontech.com/images/brochures/AcGFP1.pdf.] aus dem Zytomegalie-Virus, steht. Dies kann unter Umständen zu nicht-physiologischen Veränderungen der Zielsteuerung führen, wenn beispielsweise zelluläre Transportmechanismen überbelastet werden oder spezifische Bindungspartner nicht in ausreichender Zahl vorhanden sind [Illies, 2002].

In diesem Zusammenhang wurde ein immunzytologischer Nachweis der intrazellulären Lokalisation der endogenen HsIP3K-B ohne und mit einer 20 nM LMB-Behandlung bzw. einer 160 nM LMB-Behandlung in Ratten-Thymozyten durchgeführt, wobei anzumerken ist, dass LMB den Kernexport hemmt. Es konnte in zwei unabhängigen Versuchen gezeigt werden, dass nach 20 nM LMB-Behandlung eine im Vergleich zu den unbehandelten Thymozyten, signifikant höhere Kernanreicherung beobachtet wurde, wobei die Wirkung der 160 nM LMB-Behandlung eine signifikant erhöhte Kernanreicherung gegenüber der 20 nM LMB-Behandlung zeigte (siehe Ergebnisse 3.5.1). Diese Daten bestätigen die Tendenz der EGFP-Lokalisationsstudien, dass nach LMB-Behandlung der mit pHsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) transfizierten H1299- und HeLa-Zellen, eine deutliche Verschiebung der Lokalisation in den Zellkern beobachtet wurde. Jedoch weisen die absoluten Werte dieser beiden Lokalisationsstudien signifikante Unterschiede voneinander. Hierbei muss beachtet werden, dass die Ratten-Thymozyten einen, im Vergleich zum Zytoplasma, sehr großen Zellkern aufweisen. Möglicherweise könnte aufgrund eines daraus resultierenden Verdünnungseffektes die Fluoreszenzintensität im Zellkern zu gering gemessen werden. Dieses Phänomen würde auch erklären, weshalb die mittleren Kern/Zytoplasma-Ratio-Werte der endogenen HsIP3K-B in Ratten-Thymozyten nur etwa halb so groß sind wie die des EGFP-Fusionsproteins HsIP3K-B/EGFP (Wildtyp) in H1299- und HeLa-Zellen. Diese Verfälschung der Ergebnisse könnte dadurch umgangen werden, dass die Auswertungsmethode optimiert wird. Eine Möglichkeit wäre statt dem Legen von jeweils drei „Area of interest“ im Zellkern und Zytoplasma, über die Gesamtfluoreszenz des Zellkerns und der Gesamtfluoreszenz der Zelle eine Ratio zu bilden (siehe Abbildung 4.8). Diese Auswertungsmethode bietet den Vorteil, dass bei der Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität, die Größe des Zellkerns mitberücksichtigt wird. Ein Nachteil stellt die umständliche Durchführung sowie die Ungenauigkeit beim Eingrenzen der jeweiligen Kompartimente mit der Freihandform-Funktion (*ImageJ*), dar.



$$\text{Ratio } F_{\text{GKern}}/F_{\text{GZelle}} = (\sum I_{\text{Kern}}/n)/(\sum I_{\text{Zelle}}/n)$$

F_{GKern} = mittlere Gesamtfluoreszenz im Zellkern
 F_{GZelle} = mittlere Gesamtfluoreszenz in der Zelle
 I_{Kern} = Fluoreszenzintensität im x
 I_{Zelle} = Fluoreszenzintensität im y
 n = Anzahl der Messungen

Abbildung 4.8: Alternative Auswertungsmethode zur Bestimmung der Kern- bzw. Zytoplasma-Lokalisation der endogenen HsIP3K-B in Ratten-Thymozyten

Gezeigt ist eine alternative Auswertungsmethode zur Bestimmung der Kern- bzw. Zytoplasma-Lokalisation der endogenen HsIP3K-B in Ratten-Thymozyten. Mithilfe der Freihandform-Funktion von *ImagJ* wird der gesamte Thymozyt bzw. dessen Zellkern, umrahmt (gelbe Ringe). Durch Bildung eines Verhältnisses von F_{GKern} und F_{GZelle} wird eine Ratio ermittelt.

Die genaue intrazelluläre Lokalisation von Proteinen ist deshalb von großer Relevanz, weil ihre Funktion und somit ihre physiologische Bedeutung unmittelbar damit verbunden sind. Yu und Kollegen haben sich mit der physiologischen Bedeutung verschiedener Lokalisationen der IP3K-B beschäftigt [Yu *et al.*, 2005]. Zunächst wurde die Lokalisation verschiedener IP3K-B-Fragmente in Rattenastrozyten und COS7-Zellen untersucht. Erwartungsgemäß war die IP3K-B¹⁻⁹³⁴ sowohl am F-Aktin als auch am ER, und das Fragment IP3K-B¹⁻²⁶¹ ausschließlich an F-Aktin lokalisiert, während IP3K-B²⁶²⁻⁹³⁴ hauptsächlich an das ER zielgesteuert wurde. Die Segmente IP3K-B³⁹⁹⁻⁹³⁴ und IP3K-B⁶³³⁻⁹³⁴ lagen gleichmäßig im Zytosol verteilt vor. Aus diesen Daten konnte geschlossen werden, dass sich die ER-Lokalisationsdomäne im zentralen Bereich des Enzyms befindet. Des Weiteren wurde der Einfluss einer Überexpression der verschiedenen IP3K-B-Konstrukte auf die Ca²⁺-Mobilisierung untersucht. Dabei hat sich ergeben, dass die Ca²⁺-Mobilisierung durch die Überexpression von IP3K-B¹⁻⁹³⁴ vollständig aufgehoben worden ist. Entsprechend früherer Berichte ist die Kinase damit in der Lage die Ca²⁺-Antwort abzuschwächen [Millard *et al.*, 2000]. Die Überexpression von IP3K-B¹⁻²⁶² hatte erwartungsgemäß keinen Effekt, da dem Fragment die katalytische Domäne fehlt. Interessanterweise zeigte das C-terminale Fragment IP3K-B²⁶²⁻⁹³⁴, welches primär am ER lokalisiert ist, gegenüber dem Vollängenprotein einen stark verminderten Effekt.

Dies impliziert, dass die Lokalisation des Enzyms am F-Aktin, d.h. in der Nähe des Entstehungsorts von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in der Plasmamembran, die Effektivität der IP3K-B signifikant erhöht. Durch Behandlung mit Cytochalasin D ($1 \mu\text{M}$; 10 min), einem toxischen Pilzmetabolit, welches die Polymerisation des F-Aktins inhibiert und somit das Zytoskelett auflöst, konnte ebenfalls die Ca^{2+} -Mobilisierung verringert werden. Diese Befunde lassen vermuten, dass die Lokalisation neben der enzymatischen Aktivität für die Funktion der IP3K-B verantwortlich ist. In dem Zusammenhang konnte außerdem eine physiologische Relevanz der von Pattni *et al.* beschriebenen Abspaltung des N-Terminus der IP3K-B in der PEST-Sequenz vor der katalytischen Domäne durch Ca^{2+} -abhängige Calpaine [Pattni *et al.*, 2003], aufgeklärt werden. PEST-Sequenzen stellen konservierte Domänen dar, die reich an sauren Aminosäuren sind (Prolin-Glutaminsäure-Serin-Threonin). Rechsteiner und Rogers konnten zeigen, dass sie Spaltstellen für bestimmte Proteasen, die Calpaine, darstellen [Rechsteiner & Rogers, 1996]. In den Arbeiten von Isabell Schreiber [Schreiber, 2002] wurde eine limitierte Proteolyse durch Calpaine im N-terminalen Bereich der Ratten IP3K-A und IP3K-B (*Rattus norvegicus*) beobachtet. Anscheinend erfolgt bei hoher Ca^{2+} -Konzentration *in vivo* eine Abspaltung der katalytischen Domäne der IP3K-B vom N-Terminus und ihr Transport an das ER. Diese damit geschaffene räumliche Nähe der katalytischen Domäne der IP3K-B zum ER ermöglicht durch eine negative Rückkopplungsschleife die Regulation der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration, und somit der Ca^{2+} -Homöostase der Zelle. Es wäre aber andererseits auch denkbar, dass die Abspaltung der katalytischen Domäne als ein „Gedächtnis“ für vorangegangene Stimuli fungiert. Demnach bewirkt der erste Stimulus eine geringe Ca^{2+} -Antwort, da die IP3K-B an der Plasmamembran lokalisiert ist und dadurch unmittelbar das in der Nähe entstandene $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ umwandelt. Folglich kann nur eine geringe Menge von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ an die ER-Rezeptoren gelangen und damit einen ebenso geringen Ca^{2+} -Ausstrom aus intrazellulären Speichern bewirken. Der zweite Stimulus ruft eine starke Ca^{2+} -Antwort hervor. Die Zelle befindet sich nun in einem Zustand mit erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. Nachdem die Ca^{2+} -abhängigen Calpaine die katalytische Domäne der IP3K-B abgespalten haben, kann das an der Plasmamembran entstandene $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ nicht sofort metabolisiert werden, u.a. auch aufgrund der Übersättigung der 5'-Phosphatase. Insgesamt steht eine größere Menge an $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zur Verfügung, die einen stärkeren Ca^{2+} -Ausstrom bewirkt. Da die Aktivität der IP3K-B sehr stark durch Ca^{2+} -Calmodulin reguliert wird, ist es sinnvoll, dass das Enzym an den Orten der höchsten Ca^{2+} -Konzentrationen lokalisiert: an der Plasmamembran (bzw. am kortikalen F-Aktin), durch welche Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen können, und am ER, wo sie aus intrazellulären Speichern entlassen werden.

Neben der Lokalisation, könnte zusätzlich auch die Aktivität des Enzyms durch Calpain-abhängige Proteolyse beeinflusst werden. Möglicherweise wirkt die Proteolyse nach einem ähnlichen Mechanismus wie für Isoformen der PKC beschrieben, aktivitätssteigernd auf die IP3K-B [Schreiber, 2002].

Eine streng regulierte Ca^{2+} -Homöostase ist unerlässlich für die physiologischen Funktionen von Zellen. Zum Beispiel wurde für pankreatische β -Zellen beschrieben, dass die Ca^{2+} -Konzentration von entscheidender Wichtigkeit für die Exozytose bzw. die Insulinsekretion ist. Nach Stimulation dieser Zellen mit Glucose erfolgt ein Anstieg der intrazellulären InsP_6 -Konzentration, der mit einem erhöhten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen über spannungsabhängige Kalziumkanäle einhergeht. Dabei findet eine indirekte Regulation des Ca^{2+} -Einstroms durch InsP_6 statt, indem einerseits eine Serin/Threonin-Phosphatase inhibiert wird, die spannungsabhängige Kalziumkanäle dephosphoryliert und so die Kanäle desensibilisiert oder inhibiert. Andererseits stimuliert gleichzeitig InsP_6 die PKC ϵ , was zu einer Phosphorylierung und damit zu einer Aktivitätssteigerung des Kanals führt [Barker & Berggren 1999; Hoy *et al.*, 2003]. Der Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol bewirkt letzten Endes die Exozytose der Insulin-enthaltenden Granula.

Die intrazelluläre Lokalisation der IP3K-B kann neben der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase auch stromabwärts gelegene Signaltransduktionskaskaden beeinflussen. Eine gesteigerte Produktion von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ in der Nähe der Plasmamembran durch am kortikalen F-Aktin lokalisierte IP3K-B könnte zu einer sehr effizienten Regulation von GAP-sensitiven Proteinen in dieser Region genutzt werden. GAP1 wurde als ein $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Rezeptorprotein beschrieben. Es wird vermutet, dass GAP1 durch eine Interaktion mit R-Ras/GTP, die $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ induzierte Ca^{2+} -Freisetzung reguliert [Loomis-Husselbee *et al.*, 1998]. Nach welchem Mechanismus dieser Vorgang abläuft, ist bisher noch unbekannt. Außerdem konnte in den Arbeiten von Wen *et al.* gezeigt werden, dass die Bindung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ an GAP1 zu einer Initiierung des Ras/MAPK/Erk-Signalweges in T-Lymphozyten führt und dadurch die positive Selektion moduliert wird [Wen *et al.*, 2004]. Knock-Out-Mäuse mit einer IP3K-B-Defizienz wiesen demnach eine stark gestörte T-Lymphozyten-Selektion und -Entwicklung auf. Die Forschungsgruppe um Topham und Kollegen fand in Zusammenhang mit einem neuen Mechanismus zur Regulation der Ras-Aktivierung durch Diacylglycerolkinase ζ heraus, dass der Ras/MAPK/Erk-Signalweg durch einen an der Plasmamembran lokalisierten Komplex aus RasGRP, PLC γ 1 und DGK ζ , reguliert wird [Topham *et al.*, 2001].

Dabei hat sich gezeigt, dass dieser Regulationskomplex am Ort intensiven Aktin-Remodellings in Glioblastomzellen lokalisiert ist [Topham *et al.*, 2001]. Es wäre in diesem Zusammenhang denkbar, dass die am kortikalen F-Aktin lokalisierte IP3K-B aufgrund der räumlichen Nähe zu diesem Regulationskomplex, ebenfalls in diesen Komplex eingreift. Eine kontrollierte Ras-Aktivierung durch reguliertes DAG Signaling ist unabdingbar für das physiologische Zellwachstum, da ein kontinuierlich hoher DAG-Spiegel zu einer Daueraktivierung von Ras führt und damit maligne Zelltransformationen hervorruft [Topham *et al.*, 2001]. Es hat sich herausgestellt, dass 30% aller humanen Tumore auf eine aktivierende Mutation des Ras zurückzuführen sind [Vojtek & Der, 1998; Chin *et al.*, 1999]. Li und Kollegen bemerkten, dass RasGRP ein potentiell Leukämie-Gen darstellt und seine Überexpression in kultivierten Zellen einen transformierten Phänotyp induziert [Li *et al.*, 1999; Ebinu *et al.*, 1998; Tognon *et al.*, 1998].

Auch eine niedrige Affinität der IP3K-B zum F-Aktin könnte einen Vorteil bieten, wie z.B. das flexible Pendeln des Enzyms zwischen F-Aktin, Zellkern und ER, um so im schnellen Wechsel dort zu wirken, wo es benötigt wird [Brehm *et al.*, 2006]. Diese Eigenschaft könnte vor allem für die in dieser Arbeit beschriebenen HsIP3K-B von großem Nutzen sein, da sie im Besitz einer multifunktionalen Zielsteuerungsdomäne ist, die die interessante Eigenschaft einer alternativen Zielsteuerung zwischen F-Aktin und Zellkern aufweist. Die Lokalisation des NLS und des NES in der Aktinbindungsdomäne der HsIP3K-B spricht für die in den letzten Jahren viel diskutierte Existenz von nukleärem Aktin [Pederson & Aebi, 2005]. In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass durch die kolokalisierten NLS-, NES- und ABD-Sequenzen eventuell ein Transport der HsIP3K-B zu Aktinstrukturen im Kern stattfinden kann. Es wäre auch denkbar, dass das NLS in der ABD der HsIP3K-B zu einer Aufnahme des Enzyms in den Zellkern führt, wenn es zu einer erhöhten Depolymerisierung von zytoplasmatischem F-Aktin kommt [Brehm *et al.*, 2006].

Obwohl in den letzten Jahren viele neue Kenntnisse über die HsIP3K-B und ihren physiologischen Bedeutungen gewonnen wurden, ist unser bisheriges Wissen über dieses Enzym noch immer sehr begrenzt. Es bleibt zukünftige Arbeiten überlassen den gesamten biochemischen Mechanismus aufzudecken, der die Regulation und die Wirkung der HsIP3K-B in zellulären Prozessen beschreibt. Durch dieses Gesamtverständnis könnte das Enzym eines Tages ein diagnostisches und therapeutisches Ziel in der Medizin darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde über die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der HsIP3K-B, ein Stück zum Verständnis dieses Enzyms beigetragen. Allerdings darf die Tatsache nicht vernachlässigt werden, dass die Versuche in dieser Arbeit mit EGFP-Fusionsproteinen in Gewebekulturen menschlicher Tumorzelllinien durchgeführt wurden. Die funktionelle Mitwirkung eines Enzyms in kultivierten Gewebezellen indiziert nicht notwendigerweise seine funktionelle Wichtigkeit im gesamten Organismus. Außerdem müssen Daten, die aus Tumorzellen gewonnen wurden, sich nicht unbedingt auf gesunde Zellen übertragen lassen. In einer Kooperation mit Prof. Sauer und Kollegen (The Scripps Research Institute, USA) soll daher die physiologische Bedeutung der intrazellulären Lokalisation der HsIP3K-B im Maus-Modell untersucht werden, um dort *in vivo*-Funktionen von ausgewählten Zielsteuerungssequenzen in Detail zu untersuchen. Dieses Modell hat den Vorteil, dass unmittelbar über den Phänotyp auf die physiologische Wichtigkeit des mutierten Genabschnitts geschlossen werden kann. Die Gruppe konnte in vorangegangenen Studien zeigen, dass Knock-Out-Mäuse mit einer HsIP3K-B-Defizienz, eine starke Störung der T-Zell-Entwicklung zeigten [Huang *et al.*, 2007]. Um diese Defizienz wieder aufzuheben wurde zunächst über einen retroviralen Gentransfer die HsIP3K-B Vollängen-cDNA in hämatopoetische Stammzellen transduziert. Die Stammzellen wurden zuvor mit IL-3, IL-6 und SCF kultiviert und interagierten anschließend mithilfe der „Spinoculation“, ein Verfahren, dass durch Zentrifugation die Interaktion von Viren mit Zielzellen erhöht, mit dem Retrovirusüberstand. Anschließend wurden die transduzierten hämatopoetischen Stammzellen in die Schwanzvenen der Knock-Out-Mäuse injiziert und danach die Mäuse 4 bis 8 Wochen beobachtet. Dabei stellte sich heraus, dass die Mäuse wieder klinisch gesund wurden.

Es ist im Rahmen dieser Kooperation geplant, die Mutante der HsIP3K-B mit dem Aminosäureaustausch R129Q, ebenfalls über einen retroviralen Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen zu transduzieren, um sie dann den HsIP3K-B-Knock-Out-Mäusen zu applizieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure R¹²⁹ essenziell für den Kernimport der HsIP3K-B ist (siehe Ergebnisse 3.2.3). In weitergehenden Studien sollen in diesem *in-vivo*-System neben der physiologischen Bedeutung des Kernimports auch die des Kernexports und der F-Aktinbindung untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte durch die Aufklärung der intrazellulären Zielsteuerung der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (HsIP3K-B) ein besseres Verständnis ihrer Funktion und Regulation ermöglicht werden. Die HsIP3K-B ist ein Schlüsselenzym bei der Umsetzung des zytoplasmatischen sekundären Botenstoffs $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ und somit ein Regulator von intrazellulären Kalziumsignalen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B eine multifunktionale Zielsteuerungsdomäne darstellt, die sowohl ein funktionales Kernlokalisierungssignal (NLS), als auch ein aktives Kernexportsignal (NES) besitzt [Ernst, 2007; Brehm, 2006; Brehm *et al.*, 2004, Dewaste *et al.*, 2003, Soriano *et al.*, 1997].

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation wurden zunächst Fusionsgene hergestellt, die aus der klonierten Vollängen cDNA der HsIP3K-B und dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) bestehen. Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie, sowie der Gegenfärbung mit Organell-spezifischen Farbstoffen, wurden Lokalisationsstudien durchgeführt. Dabei wurden durch gezielte Mutagenese die Fusionsgene verändert, um die für die Zielsteuerung verantwortlichen Bereiche zu identifizieren.

Es konnte in dieser Arbeit das von Maria Brehm [Brehm, 2006] entdeckte funktionelle monopartite Kernlokalisierungssignal (NLS) in der Aktinbindungsdomäne (ABD) der HsIP3K-B bestätigt werden. Durch eine experimentelle Identifizierung und eine genaue Charakterisierung dieses NLS konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz R^{129}KLR notwendig und hinreichend für den Kernimport des Enzyms ist. Diese Sequenz unterscheidet sich von der von Chelsky und *et al.* beschriebenen kanonischen monopartiten NLS-Konsensussequenz lediglich in der ersten Aminosäure [Chelsky *et al.*, 1989] und ist somit ein nicht-kanonisches monopartites Kernlokalisierungssignal der HsIP3K-B. Es handelt sich offensichtlich um das einzige NLS der HsIP3K-B. Die Stärke dieses Kernlokalisierungssignals ist ähnlich dem der humanen Inositolphosphatmultikinase (HsIPMK).

Im Rahmen intrazellulärer Lokalisationsstudien der HsIP3K-B am F-Aktinfilament eukaryotischer Tumorzelllinien (H1299 und HeLa) ist es gelungen eine neuartige Methode zur quantitativen Analyse der F-Aktinbindung von EGFP-Fusionsproteinen zu entwickeln und zu evaluieren. Die Anwendung dieser Methode über eine Plasmamembran/Zytoplasma-Ratio-Bestimmung diene der geplanten Untersuchung der ABD.

Dabei stellte sich heraus, dass das innerhalb der ABD lokalisierte hochkonservierte „F¹⁵⁰-E-A“-Motiv eine essentielle Rolle für die kortikale F-Aktinbindung spielt.

Darüber hinaus wurden mithilfe des Modells „Pseudo-Phosphorylierung“ und „Pseudo-Dephosphorylierung“ an sieben *in silico* prädizierte Stellen in der ABD-Region der HsIP3K-B, konstitutive Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen simuliert, um daraufhin die Auswirkung auf die intrazelluläre Lokalisation zu beobachten. Es konnten drei Serinreste (S¹⁶⁶, S¹⁷⁴ und S¹⁷⁶) identifiziert werden, die nach Mutation in Glutamat jeweils eine stärkere kortikale F-Aktinbindung, einhergehend mit einer geringeren Kernlokalisierung im Vergleich zum Wildtyp, aufwiesen. Hingegen zeigten alle untersuchten Pseudo-Dephosphorylierungsmutanten eine gegenüber dem Wildtyp signifikant schwächere kortikale F-Aktinbindung. Vermutlich erfolgt *in vivo* eine Regulation der intrazellulären Lokalisation der HsIP3K-B zwischen Zellkern und dem kortikalen F-Aktin über Änderung der Stereometrie des Enzyms durch Proteinkinasen. Die beobachteten Effekte bei Behandlung mit dem Kernexport-Inhibitor Leptomycin B stimmen zwischen den EGFP-Fusionsproteinen der HsIP3K-B und der endogenen Form der HsIP3K-B in Ratten-Thymozyten, überein.

Die Aminosäuresequenz 103-165 der HsIP3K-B stellt somit eine multifunktionale Zielsteuerungsdomäne dar, in der sowohl das NLS als auch das NES und die Aktinbindungsdomäne lokalisiert sind und die offensichtlich komplexen Regulationsmechanismen unterliegt.

6. Literaturverzeichnis

- Abel, K., Anderson RA, Shears SB (2001)**
Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism.
J Cell Sci 114:2207-8
- Abràmoff, M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. (2004)**
Image processing with Images.
Biophotonics International 11(2004) 36-42
- Asscher, Y., Pleban S., Ben-Shushan M., Levin-Khalifa M., Yao Z., Seger R. (2001)**
Leptomycin B: An Important Tool for the Study of Nuclear Export
Cell Biology
- Auer, A., von Blume J., Sturany S., von Wichert G., Van Lint J., Vandenheede J., Adler G., Seufferlein T. (2005)**
Role of the regulatory domain of protein kinase D2 in phorbol ester binding, catalytic activity, and nucleocytoplasmic shuttling.
Mol Biol Cell 16(9):4375-85
- Barker, C. J., and P. O. Berggren (1999)**
Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus-secretion coupling.
Anticancer Res 19: 3737-41
- Barnes, J.A., Gomes, A.V. (1995)**
PEST sequences in calmodulin-binding proteins.
Mol Cell Biochem. 1995 Aug-Sep; 149-150:17-27
- Batty, I.R., Nahorski, S. R., Irvine, R. F. (1985)**
Rapid formation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate following muscarinic receptor stimulation of rat cerebral cortical slices.
Biochem J. 1985 November 15; 232 (1): 211–215
- Berridge, M. J., and R. F. Irvine (1984)**
Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.
Nature 312: 315-21
- Bertsch, U., C. Deschermeier, W. Fanick, I. Girkontaite, K. Hillemeier, H. Johnen, W. Weglohner, F. Emmrich, and G. W. Mayr (2000)**
The second messenger binding site of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase is centered in the catalytic domain and related to the inositol trisphosphate receptor site.
J Biol Chem 275: 1557-64
- Bertsch, U., M. Haefs, M. Moller, C. Deschermeier, W. Fanick, A. Kitzerow, S. Ozaki, H. E. Meyer, and G. W. Mayr (1999)**
A novel A-isoform-like inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from chicken erythrocytes exhibits alternative splicing and conservation of intron positions between vertebrates and invertebrates.
Gene 228: 61-71

- Bird, G. S., J. W. Putney, Jr. (1996)**
Effect of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate on inositoltrisphosphate-activated Ca^{2+} signaling in mouse lacrimal acinar cells.
J Biol Chem 271: 6766-70
- Brehm, M. A. (2006)**
Aufklärung neuer Funktionen von Inositolphosphatkinasen durch zelluläre Lokalisationsstudien, Dissertation, Universität Hamburg
- Brehm, M. A., I. Schreiber, U. Bertsch, A. Wegner, and G. W. Mayr. (2004)**
Identification of the actin-binding domain of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase isoform B.
Biochem J 382: 353-62
- Chamberlain, P.P., Sandberg, M.L., Sauer, K., Cooke, M.P., Lesley, S.A., Spraggon, G. (2005)**
Structural insights into enzyme regulation for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B.
Biochemistry 44; 14486-14493
- Chelsky, D., Ralph, R., Jonak, G. (1989)**
Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus.
Mol. Cell. Biol. 1989, Vol. 9, No. 6, p. 2487-2492
- Chin, L., Tam, A., Pomerantz, M.W., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan R., Pantiginis, J., Zhou, H., *et al.*, (1999)**
Essential role for oncogenic ras in tumor maintenance.
Nature 400: 468-472
- Choi, K. Y., H. K. Kim, S. Y. Lee, K. H. Moon, S. S. Sim, J. W. Kim, H. K. Chung, and S. G. Rhee. (1990)**
Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase.
Science 248: 64-6
- Clandinin, T. R., J. A. DeModena, and P. W. Sternberg. (1998)**
Inositol trisphosphate mediates a RAS-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*.
Cell 92: 523-33
- Clontech, Living Colors AcGFP1 Fluorescent Protein [brochure]**
www.clontech.com/images/brochures/AcGFP1.pdf.
- Cole, C.N., Hammell CM (1998)**
Nucleocytoplasmic transport: driving and directing transport.
Curr Biol 8:R368-72
- Communi D, Vanweyenberg V, Erneux C. (1995)**
Molecular study and regulation of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase.
Cell Signal 1995;7:643-50. [PubMed: 8519593]
- Cormack, B.P., Valdivia R.H., Falkow S. (1996)**
FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).
Gene 173(1 Spec No):33-8

- Cozier, G., Sessions, R., Bottomley, J.R., Reynolds, J.S., and Cullen, P.J. (2000)**
Molecular modelling and site-directed mutagenesis of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding pleckstrin homology domain from the Ras GTPase-activating protein GAP1^{IP4BP}.
Biochem J 349, 333–342
- Cullen, P. J. H., J. Justin, O. Truong, A. J. Letcher, T. R. Jackson, A. P. Dawson, and R. F. Irvine (1995)**
Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P₄-binding protein as a member of the GAP1 family.
Nature 376: 527-530
- Dequiedt, F., Martin M., Von Blume J., Vertommen D., Lecomte E., Mari N., Heinen M.F., Bachmann M., Twizere J.C., Huang M.C., Rider M.H., Piwnicka-Worms H., Seufferlein T., Kettmann R. (2006)**
New Role for hPar-1 Kinases EMK and C-TAK1 in Regulating Localization and Activity of Class IIa Histone Deacetylases.
Mol Cell Biol 26(19): 7086–7102
- Deschermeier, C. (2002)**
Molekulare Erkennung von Inositolphosphaten durch ihre Rezeptorproteine – Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen am Beispiel der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase, Dissertation, Universität Hamburg
- Dewaste, V., C. Moreau, F. De Smedt, F. Bex, H. De Smedt, F. Wuytack, L. Missiaen, and C. Erneux (2003)**
The three isoenzymes of human inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase show specific intracellular localization but comparable Ca²⁺ responses on transfection in COS-7 cells.
Biochem J 374: 41-9
- Dewaste, V., Roymans, D., Moreau, C., and Erneux, C. (2002)**
Cloning and expression of a full-length cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 291, 400–405
- Dewaste, V., V. Pouillon, C. Moreau, S. Shears, K. Takazawa, and C. Erneux (2000)**
Cloning and expression of a cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C.
Biochem J 352 Pt 2: 343-51
- Dos Remedios, C. G., D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry, and N. J. Nosworthy (2003)**
Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments.
Physiol. Rev. 83: 433-473
- Drayer, AL, Pesesse X, De Smedt F, Communi D, Moreau C, Erneux C (1996)**
The family of inositol and phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatases.
Biochem Soc Trans 24:1001-1005

- Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y.W., Stang, S.L., Dunn, R.J., Stone, J.C., (1998)**
RasGRP, a ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs.
Science 280: 1082-1086
- Ernst, Olga (2007)**
Leptomycin B-abhängiger Kernexport der humanen Inositol-1,4,5 trisphosphat 3-Kinase Isoform B, Diplomarbeit, Universität Hamburg
- Fontes, M.R., Teh T, Kobe B (2000)**
Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha.
J Mol Biol 297:1183-94
- Fukuda, M., Asano S., Nakamura T., Adachi M., Yoshida M., Yanagida M., Nishida E. (1997)**
CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal.
Nature 390(6657):308-11
- Fukuda, M., Mikoshiba K (1997)**
The function of inositol high polyphosphate binding proteins.
Bioessays 19:593-603
- Gama-Carvalho, M., Carmo-Fonseca M. (2001)**
The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins.
FEBS Lett 498:157-63
- Gonzalez B, Schell MJ, Letcher AJ, Veprintsev DB, Irvine RF, Williams RL (2004)**
Structure of a human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase: substrate binding reveals why it is not a phosphoinositide 3-kinase.
Mol Cell 2004;15: 689–701 [PubMed: 15350214]
- Görlich, D., Kutay, U. (1999)**
Transport between the cell nucleus and the cytoplasm.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15: 607-60
- Hanahan, D. (1983)**
Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.
J Mol Biol 166(4):557-80
- Hanson & Lowy (1965)**
Molecular Basis of Contractility in Muscle
British Medical Bulletin 21: 264-271
- Harreman, MT, Kline TM, Milford HG, Harben MB, Hodel AE, Corbett AH (2004)**
Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localisation signals.
Journal of Biological Chemistry 279 (20): 20613-20621
- Hartjen, Philip (2002)**
Einfluss von Phosphorylierungen auf die katalytische Eigenschaften von Inositol-(1,4,5)-trisphosphat-3-Kinase B, Diplomarbeit, Universität Hamburg

- Hoy, M., P.-O. Berggren, and J. Gromada (2003)**
Involvement of Protein Kinase C- $\{\epsilon\}$ in Inositol Hexakisphosphate-induced Exocytosis in Mouse Pancreatic $\{\beta\}$ -Cells.
J. Biol. Chem. 278: 35168-35171
- Huang, Y.H., Grasis J.A., Miller A.T., Xu R., Soonthornvacharin S., Andreotti A.H., Tsoukas C.D., Cooke M.P., Sauer K. (2007)**
Positive regulation of Itk PH domain function by soluble IP4.
Science 316(5826):886-9
- Illies, C. (2002)**
In vivo Lokalisation der humanen Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat bindenden Proteine Centaurin alpha 1 und 2, Dissertation, Universität Hamburg
- Irvine, Robin F., Lloyd-Burton, Samantha M., Yu, Jowie C.H., Letcher, Andrew J., Schell, Michael J. (2007)**
The regulation and function of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases.
Adv Enzyme Regul. Author manuscript; available in PMC 2007 March 12
- Irvine, R. F., and M. J. Schell. (2001)**
Back in the water: the return of the inositol phosphates.
Nat Rev Mol Cell Biol 2: 327-38.
- Irvine RF, Letcher AJ, Heslop JP, Berridge MJ. (1986)**
The inositol tris/tetrakisphosphate pathway- demonstration of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase activity in animal tissues.
Nature 1986;320:631-4. [PubMed: 3010126]
- Jang, B.C., Muñoz-Najar U., Paik J.H., Claffey K., Yoshida M., Hla T. (2003)**
Leptomycin B, an inhibitor of the nuclear export receptor CRM1, inhibits COX-2 expression.
J Biol Chem 278(5):2773-6
- Jia, Y., Kulandayan, K. S., Erneux, C., Valerie Pouillon, Hidenori Hattori, Hakryul Jo, Jian You, Daocheng Zhu, Stephane Schurmans, and Hongbo R. Luo (2007)**
Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate Negatively Regulates Phosphatidylinositol-3,4,5 Trisphosphate Signaling in Neutrophils.
DOI 10.1016/j.immuni.2007.07.016
- Jun, K., G. Choi, S. G. Yang, K. Y. Choi, H. Kim, G. C. Chan, D. R. Storm, C. Albert, G. W. Mayr, C. J. Lee, and H. S. Shin (1998)**
Enhanced hippocampal CA1 LTP but normal spatial learning in inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase(A)-deficient mice.
Learn Mem 5: 317-30
- Kalderon, D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984)**
A short amino acid sequence able to specify nuclear location.
Cell 39(3 Pt 2):499-509
- Knippers, R. (2001)**
Molekulare Genetik
Thieme Verlag, Stuttgart

- Kong, A.M., Horan K.A., Sriratana A., Bailey C.G., Collyer L.J., Nandurkar H.H., Shisheva A., Layton M.J., Rasko J.E.J., Rowe T., Mitchell C.A. (2006)**
Phosphatidylinositol 3-Phosphate [PtdIns(3)P] Is Generated at the Plasma Membrane by an Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase: Endogenous PtdIns(3)P Can Promote GLUT4 Translocation to the Plasma Membrane.
Mol Cell Biol 26(16):6065-81
- Krauss, G. (2003)**
Biochemistry of signal transduction and regulation.
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Kucharski, R., and R. Maleszka (2002)**
Molecular profiling of behavioural development: differential expression of mRNAs for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoforms in naive and experienced honeybees (*Apis mellifera*).
Brain Res Mol Brain Res 99: 92-101
- Kudo, N., Matsumori N., Taoka H., Fujiwara D., Schreiner E.P., Wolff B., Yoshida M., Horinouchi S. (1999)**
Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region.
Proc Natl Acad Sci USA 96(16):9112-7
- Kudo, N., Wolff B., Sekimoto T., Schreiner E.P., Yoneda Y., Yanagida M., Horinouchi S., Yoshida M. (1998)**
Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1.
Exp Cell Res 242(2):540-7
- Lanford, RE, Kanda P, Kennedy RC (1986)**
Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal.
Cell 46(4):575-82
- Lee, S. Y., Sim, S. S., Kim, J. W., Moon, K. H., Kim, J. H. and Rhee, S. G. (1990)**
Purification and properties of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from rat brain. Susceptibility to calpain.
J. Biol. Chem 265, 9434–9440
- Leyman, A., Pouillon, V., Bostan, A., Schurmans, S., Erneux, C., Pesesse, X. (2007)**
The absence of expression of the three isoenzymes of the inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase does not prevent the formation of inositol pentakisphosphate and hexakisphosphate in mouse embryonic fibroblasts.
Cell. Signal doi:10.1016/j.cellsig.2007.01.024
- Li, J., Shen, K.I., Himmel, A.J., Dupuy, D.A., Largaespada, T., Nakamura, J.D. Shaughnessy, N.A., Jenkins and Copeland, N.G. (1999)**
Leukaemia disease genes large-scale cloning and pathway predictions.
Nat Genet 23:348-353

- Lloyd-Burton S.M, Yu J.C.H., Irvine, R.F., Schell, M.J. (2007)**
Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate 3-Kinases by Calcium and Localization in Cells.
J. Biol. Chem; 282: 9526-9535
- Löffler, Georg/ Petrides, Petro E. (Hrsg.)**
Biochemie und Pathobiochemie
7. Auflage, Springer-Verlag, 2003
- Loomis-Husselbee, J. W., C. D. Walker, J. R. Bottomley, P. J. Cullen, R. F. Irvine, and A. P. Dawson (1998)**
Modulation of Ins(2,4,5)P₃-stimulated Ca²⁺ mobilization by ins(1,3,4,5)P₄: enhancement by activated G-proteins, and evidence for the involvement of a GAP1 protein, a putative Ins(1,3,4,5)P₄ receptor.
Biochem J 331 (Pt 3): 947-52
- Maréchal, Y., Pesesse, X., Jia, Y., Pouillon, V., Perez-Morga, D., Daniel, J., Izui, S., Cullen, P.J., Leo, O., Luo, H.R., et al. (2007)**
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate controls proapoptotic Bim gene expression and survival in B cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press.
Published online August 20, 2007. 10.1073/pnas.0704312104.
- Michal, G. (1999)**
Biochemical Pathways. Biochemie-Atlas
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Millard, T. H., P. J. Cullen, and G. Banting (2000)**
Effects of elevated expression of inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase B on Ca²⁺ homeostasis in HeLa cells.
Biochem J 352 Pt 3: 709-15
- Miller, A.T., Sandberg, M., Huang, Y.H., Young, M., Sutton, S., Sauer & Cooke (2007)**
Production of Ins(1,3,4,5)P₄ mediated by the kinase Itpkb inhibits store-operated calcium channels and regulates B cell selection and activation.
Nature immunology, Vol. 8, No. 5, 2007
- Miller, A. L., M. Suntharalingam, S. L. Johnson, A. Audhya, S. D. Emr, and S. R. Wentz (2004)**
Cytoplasmic Inositol Hexakisphosphate Production Is Sufficient for Mediating the Gle1-mRNA Export Pathway.
J. Biol. Chem. 279: 51022-51032
- Nalaskowski, M.M., Windhorst, S., Stockebrand, M.C., Mayr, G.W. (2006)**
Subcellular localisation of human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C: species-specific use of alternative export sites for nucleo-cytoplasmic shuttling indicates divergent roles of the catalytic and N-terminal domains.
Biol Chem 387(5):583-93
- Nalaskowski, M. M., and G. W. Mayr (2004)**
The families of kinases removing the Ca²⁺ releasing second messenger Ins(1,4,5)P₃.
Curr Mol Med 4: 277-90

- Nalaskowski, M.M.** (2003)
Multifunktionelle Proteine im Inositolphosphat-Metabolismus, Dissertation,
Universität Hamburg
- Nalaskowski, M. M., U. Bertsch, W. Fanick, M. C. Stockebrand, H. Schmale, and G. W. Mayr** (2003)
Rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C is enzymatically specialized for basal cellular inositol trisphosphate phosphorylation and shuttles actively between nucleus and cytoplasm.
J Biol Chem 278: 19765-76
- Nalaskowski, M. M., C. Deschermeier, W. Fanick, and G. W. Mayr** (2002)
The human homologue of yeast ArgRIII protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization.
Biochem J 366: 549-56
- Pattni, K., T. H. Millard, and G. Banting** (2003)
Calpain cleavage of the B isoform of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase separates the catalytic domain from the membrane anchoring domain.
Biochem J 375: 643-51
- Pederson, T., and U. Aebi** (2005)
Nuclear Actin Extends, with No Contraction in Sight.
Mol.Biol. Cell 16: 5055-5060
- PESTfind**, Analysis Webtool, EMBnet Austria (2008)
<https://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>
- Pouillon, V., R. Hacakova-Bartova, B. Pajak, E. Adam, F. Bex, V. Dewaste, C. Van Lint, O. Leo, C. Erneux, and S. Schurmans** (2003)
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate is essential for T lymphocyte development.
Nat Immunol 4: 1136-43
- Rasband, W., ImagaJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland USA.**
Available from:<http://rsb.info.nih.gov/ij/> (1997-2006)
- Rechsteiner, M., and S. W. Rogers** (1996)
PEST sequences and regulation by proteolysis.
Trends Biochem Sci 21: 267-71
- Saiardi, A., R. Bhandari, A. C. Resnick, A. M. Snowman, and S. H. Snyder** (2004)
Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates.
Science 306: 2101-5
- Saiardi, A., A. C. Resnick, A. M. Snowman, B. Wendland, and S. H. Snyder** (2005)
Inositol pyrophosphates regulate cell death and telomere length through phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases.
Proc Natl Acad Sci USA 102: 1911-4
- Sanger, F., Nicklen S., Coulson A.R.** (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467

Sauer, K. (2008)

Sauer Lab Research: A novel function for soluble IP₄ in positively regulating PH domain recruitment to membrane phospholipids *in vivo*; *Untangling a second messenger conundrum*: IP₄ establishes a feedback loop of Diacylglycerol production that is essential for positive selection.

http://www.scripps.edu/imm/sauer/lab_login.html

Schell, MJ, Irvine RF. (2006)

Calcium-triggered exit of F-actin and IP₃ 3-Kinase A from dendritic spines is rapid and reversible.

Eur J Neurosci 2006;24:2491–503 [PubMed: 17100838]

Schell, M. J., C. Erneux, and R. F. Irvine (2001)

Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A associates with F-actin and dendritic spines via its N terminus.

J Biol Chem 276: 37537-46

Schreiber, I. (2002)

Regulation und subzelluläre Verteilung der Isoform B von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase aus *Rattus norvegicus* (BERKENHOUT, 1769), Dissertation, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion, Universität Hamburg

Seibel, N.M., Eljouni, J., Nalaskowski, M.M., Hampe, W. (2007)

Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers.

Anal. Biochem 368 (2007) 95-99

Senter, L., Ceoldo S., Petrusa M. M. and Salviati G. (1995)

Phosphorylation of Dystrophin: Effects on Actin Binding.

Biochemical and Biophysical Research Communications, pages 57-63, Vol. 206, No.1, 1995

Smith, CB, Anderson, JE, Fischer, RL, Webb, SR. (2002)

Stability of green fluorescent protein using luminescence spectroscopy: is GFP applicable to field analysis of contaminants?

Environ Pollut. 2002;120(3):517-20

Soriano, S., and G. Banting (1997)

Possible roles of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B in calcium homeostasis.

FEBS Lett 403: 1-4

Soriano, S., S. Thomas, S. High, G. Griffiths, C. D'Santos, P. Cullen, and G. Banting (1997)

Membrane association, localization and topology of rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B: implications for membrane traffic and Ca²⁺ homeostasis.

Biochem J 324 (Pt 2): 579-89

Stockebrand, M.C. (2002)

Einfluss nukleärer Import- und Export-Signale von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-kinase c auf deren intrazelluläre Lokalisation in Säugerzellen, Diplomarbeit, Universität Hamburg

- Stryer, L.** (1999)
Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Takazawa, K., J. Perret, J. E. Dumont, and C. Erneux** (1990)
Human brain inositol 1,4,5- trisphosphate 3-kinase cDNA sequence.
Nucleic Acids Res 18: 7141
- Takazawa, K., J. Perret, J. E. Dumont, and C. Erneux** (1991)
Molecular cloning and expression of a new putative inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme.
Biochem J 278 (Pt 3): 883-6
- Tanaka, Y., Yoshihara, K., Tsuyuki, M., Kamiya, T.** (1994)
Apoptosis Induced by Adenosine in Human Leukemia HL-60 Cells.
Experimental Cell Research 213: 242-252
- Theodoropoulos, P.A., Gravanis, A., Tsapara, A., Margioris, A.N., Paradogiorgaki, E., Galanopoulos, V., Stournaras, C.** (1993)
Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping.
Biochem. Pharmacol. 47, No. 10: 1875-1881
- Tognon, C.E., Kirk, H.E., Passmore, I.A., Whitehead, I.P., Der, C.J., and Kay, R.J.** (1998)
Regulation of RasGRP via a phorbol ester- responsive C1 domain.
Mol. Cell. Biol. 18: 6995-7008
- Topham, M.K., Prescott, S.M.** (2001)
Diacylglycerol Kinase ζ Regulates Ras Activation by a Novel Mechanism.
Journal of Cell Biology 152, No. 6
- Urig, S., H. Gowher, A. Hermann, C. Beck, M. Fatemi, A. Humeny, and A. Jeltsch** (2002)
The Escherichia coli dam DNA methyltransferase modifies DNA in a highly processive reaction.
J Mol Biol 319: 1085-96
- Vanweyenberg, V., D. Communi, C. S. D'Santos, and C. Erneux** (1995)
Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase isoenzymes.
Biochem J 306 (Pt 2): 429-35
- Vojtek, A.B., and Der, C.J.,** (1998)
Increasing complexity of the ras signalling pathway.
J Biol Chem 273: 19925-19928
- Wang, W., and B. A. Malcolm** (1999)
Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis.
Biotechniques 26: 680-2
- Wei, X., Henke V.G., Strubing C., Brown E.B., Clapham D.E.** (2003)
Real-time imaging of nuclear permeation by EGFP in single intact cells.
Biophys J 84(2 Pt 1):1317-27

-
- Wen, B.G., Pletcher, M.T., Warashina, M., Choe, S.H., Ziaee, N., Wiltshire, T., Sauer, K., and Cooke, M.P.** (2004) Inositol (1,4,5) trisphosphate 3 kinase B controls positive selection of T cells and modulates Erk activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 5604–5609
- Woodring, P. J. and Garrison, J. C.** (1997)
Expression, purification, and regulation of two isoforms of the inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase.
J. Biol. Chem. 272, 30447–30454
- Wolff, B., J. J. Sanglier, and Y. Wang** (1997)
Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA.
Chem Biol 4: 139-47
- Yoshida, M., Nishikawa M., Nishi K., Abe K., Horinouchi S., Beppu T.** (1990)
Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells.
Exp Cell Res 187(1):150-6
- Yu, J. C., S. M. Lloyd-Burton, R. F. Irvine, and M. J. Schell** (2005)
Regulation of the localization and activity of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B in intact cells by proteolysis.
Biochem J 392: 435-41
- Zhu, D. M., E. Tekle, C. Y. Huang, and P. B. Chock** (2000)
Inositol tetrakisphosphate as a frequency regulator in calcium oscillations in HeLa cells.
J Biol Chem 275: 6063-6

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

3D	3-dimensional
A	Adenosin
A	Alanin
ABD	Aktinbindungsdomäne
ABP	Aktin bindendes Protein
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaar
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalziumionen
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca ²⁺ /CaM-abhängige Proteinkinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAS	<i>cellular apoptosis susceptibility protein</i>
CDK	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cl ⁻	Chloridionen
CMV	Zytomegalievirus
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	epidermal growth factor
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	extrazellulären Signal-regulierten Kinase (<i>extracellular signalregulated kinase</i>)
F	Phenylalanin
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanosin
G	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
GEF	Guanylnukleotid-Austausch-Faktor
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hs	<i>Homo sapiens</i>
HsIP3K-A	humane Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform A
HsIP3K-B	humane Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B
HsIP3K-C	humane Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform C
I	Isoleucin
InsP	Inositolphosphat
Ins(1,4)P ₂	Inositol-1,4-bisphosphat
Ins(1,4,5)P ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Ins(1,3,4,5)P ₄	Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat
Ins(3,4,5,6)P ₄	Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphat
Ins(1,4,5,6)P ₄	Inositol-1,4,5,6-tetrakisphosphat
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat
InsP ₆	Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat
IPK	Inositolphosphatkinase
Ins(1,4,5)P ₃	3-Kinase <i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase

IP ₆ K	Inositolhexakisphosphatkinase
IPMK	Inositolphosphatmultikinase
Itk	Interleukin-2 Tyrosinkinase
K	Lysin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Leucin
l	Liter
LMB	Leptomycin B
M	molar
M	Meter
mM	millimolar
μ	mikro
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano
NES	Kernexportsignal (<i>nuclear export signal</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
nM	nanomolar
NPC	Kernporenkomplex (<i>nuclear pore complex</i>)
OD	optische Dichte
P	Prolin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
Pdt	Phosphatidyl-
PEST	Prolin-Glutaminsäure-Serin-Threonin
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PLCβ	β-Isoform der Phospholipase C

PLC γ	γ -Isoform der Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat
Q	Glutamin
R	Arginin
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RasGRP	Ras spezifisches GRP
Rn	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RV-BMT	<i>retroviral bone marrow transplantation</i>
S	Serin
SV40	Simianes Virus 40
T	Thymidin
T	Threonin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
tRNA	transfer RNA
UV	ultraviolett
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar
V	Volt
wt	Wildtyp
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

7.2 Tabellenübersicht der Aminosäuren und ihrer Eigenschaften

Aminosäure	Abkürzung	Code	Seitenkette	Azidität oder Basizität
Alanin	Ala	A	-CH ₃	neutral
Arginin	Arg	R	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-C(NH)NH ₂	basisch (stark)
Asparagin	Asn	N	-CH ₂ CONH ₂	neutral
Asparaginsäure	Asp	D	-CH ₂ COOH	sauer
Cystein	Cys	C	-CH ₂ SH	neutral
Glutamin	Gln	Q	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂	neutral
Glutaminsäure	Glu	E	-CH ₂ CH ₂ COOH	sauer
Glycin	Gly	G	-H	neutral
Histidin	His	H	-CH ₂ (C ₃ H ₃ N ₂)	basisch (schwach)
Isoleucin	Ile	I	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	neutral
Leucin	Leu	L	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	neutral
Lysin	Lys	K	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	basisch
Methionin	Met	M	-CH ₂ CH ₂ SCH ₃	neutral
Phenylalanin	Phe	F	-CH ₂ (C ₆ H ₅)	neutral
Prolin	Pro	P	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	neutral
Serin	Ser	S	-CH ₂ OH	neutral
Threonin	Thr	T	-CH(OH)CH ₃	neutral
Tryptophan	Trp	W	-CH ₂ (C ₈ H ₆ N)	neutral
Tyrosin	Tyr	Y	-CH ₂ (C ₆ H ₄)OH	neutral
Valin	Val	V	-CH(CH ₃) ₂	neutral

7.3 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

HUMAN INOSITOL 1,4,5-TRISPHOSPHATE 3-KINASE ISOFORM B (IP3KB) IS A NUCLEOCYTOPLASMIC SHUTTTLING PROTEIN SPECIFICALLY ENRICHED AT CORTICAL ACTIN FILAMENTS AND AT INVAGINATIONS OF THE NUCLEAR ENVELOPE.

Marcus M. Nalaskowski, Ralf Fliegert, Olga Ernst, Maria A. Brehm, Werner Fanick, Sabine Windhorst, Hongying Lin, Susanne Gehler, Jamin Hein, Yuan-Na Lin, and Georg W. Mayr (2011)

J Biol Chem. **286**:4500-4510

8. Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Georg. W. Mayr für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, sowie für die zahlreichen und anregenden Diskussionen, bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme in ihre Gemeinschaft, die gute Zusammenarbeit und die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. rer. nat. Marcus Nalaskowski für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, die stets interessanten und ergiebigen Diskussionen, Anregungen und Ideen, seine stete Unterstützung bei der Durchführung und nicht zuletzt seine engagierte Hilfe und geduldige Art bei Schwierigkeiten in Zusammenhang mit der Arbeit.

9. Lebenslauf

(entfällt aus datenschutztechnischen Gründen)

10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....