

**Aufklärung neuer Funktionen
von Inositolphosphatkinasen
durch zelluläre Lokalisationsstudien**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Fachbereich Chemie

vorgelegt von
Maria Alexandra Brehm
aus Hamburg

Hamburg 2006

Für Opa

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Dezember 2002 bis November 2005 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst

2. Gutachter: Prof. Dr. G. W. Mayr

Datum der Disputation: 16.06.2006

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg W. Mayr für die Überlassung des Themas, anregende Diskussionen und Ideen, die nette Arbeitsatmosphäre sowie die Bereitstellung der räumlichen, apparativen und finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Bredehorst danke ich sehr für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Chemie und seine freundliche Unterstützung.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Mayr, insbesondere Marcus Nalaskowski, Sabine Windhorst und Christine Blechner danke ich für die freundliche und produktive Zusammenarbeit.

PD Dr. Evita Mohr danke ich für die Bereitstellung des anti-PABP-Antikörpers.

Vielen Dank der DFG für die finanzielle Förderung der Arbeit durch ein Doktorandenstipendium im Rahmen des GRK 336.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des GRK 336 danke ich für die gute Zusammenarbeit und viele experimentelle Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Tobias Schenk, Xuefei Zhou, Werner Fanick und Hongying Lin für die freundliche und fachkundige experimentelle Unterstützung dieser Arbeit.

Birgit Flügge danke ich herzlich für die freundschaftliche und gastronomische Unterstützung.

Danke an meine Familie.

Ulrich Marcks danke ich herzlich für die freundschaftliche und grammatikalische Hilfe bei dieser Arbeit.

Jörg, danke für alles!

Abkürzungsverzeichnis

3D	3-dimensional
A	Adenosin
Aa	amino acid
ABD	Aktinbindungsdomäne
ABP	Aktin bindendes Protein
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalziumionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DAG	Diazylglyzerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	enhanced cyan fluorescent protein
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F-Aktin	filamentöses Aktin
G	Guanosin
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hsp	Hitzeschockprotein

Abkürzungsverzeichnis

HuR	human RNA stabilizing protein
IF	Initiationsfaktor
IPK	Inositolphosphatkinase
Ins(1,4,5)P ₃	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat
Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
InsP	Inositolphosphat
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
IP3K	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
IP3K-A	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform A
IP3K-B	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B
IP3K-C	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform C
IP ₅ -2K	Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase
IP6K	Inositolhexakisphosphatkinase
IPMK	Inositolphosphatmultikinase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
m	Meter
M	molar
μ	mikro
MCS	multiple cloning site
MDa	Megadalton
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano
NES	Kernexportsignal (nuclear export signal)
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end-joining)
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization sequence)
NPC	Kernporenkomplex (nuclear pore complex)
nM	nanomolar

Abkürzungsverzeichnis

PABP	poly(A) bindendes Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pdt	Phosphatidyl-
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
RanGAP	Ran spezifisches GTPase aktivierendes Protein
Ran GEF	Ran spezifischer Guaninnukleotidaustauschfaktor
Rn	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SD	Nukleozytoplasmatische Pendeldomäne (shuttling domain)
SG	Stressgranula
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SRP	Signalerkennungspartikel
T	Thymidin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TCE	Trichloressigsäure
TIA-1	T-Zell internes Antigen 1
TIAR	TIA-1 related protein
tRNA	transfer RNA
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
wt	Wildtyp
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

	Danksagung _____	A
	Abkürzungsverzeichnis _____	B
	Inhaltsverzeichnis _____	E
1	<i>Einleitung</i> _____	1
	1.1 Inositolphosphate _____	1
	1.1.1 Nomenklatur _____	2
	1.1.2 Aufgaben nukleärer Inositolphosphate _____	2
	1.1.3 Aufgaben zytosolischer Inositolphosphate _____	4
	1.2 Inositolphosphat umsetzende Enzyme _____	5
	1.2.1 Die Inositolphosphatphosphatasen _____	6
	1.2.2 Die Inositolphosphatkinasen _____	7
	1.2.2.1 Die PDKG-Kinasen _____	8
	1.2.2.1.1 Die Inositoltrisphosphatkinasen _____	9
	1.2.2.1.2 Die Inositolphosphatmultikinase _____	10
	1.2.2.1.3 Die Inositolhexakisphosphatkinasen _____	11
	1.2.2.2 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase _____	12
	1.3 Intrazelluläre Zielsteuerungsmechanismen _____	13
	1.3.1 Funktionsbedingte Proteinzielsteuerung über Signalsequenzen _____	13
	1.3.2 Proteinzielsteuerung zu Aktin _____	15
	1.3.3 Zielsteuerungsmechanismen für den Transport von Makromolekülen zwischen Kern und Zytoplasma _____	18
	1.3.3.1 Fundamentale Aspekte des nukleozytoplasmatischen Transports _____	18
	1.3.3.1.1 Nukleäre Importsysteme und Exportsysteme _____	20
	1.3.3.1.2 Kernexport und Kernimport vermittelnde Signalbereiche _____	22
	1.3.4 Transport und Zielsteuerung von RNA _____	25
	1.3.4.1 Mit RNA-Transport assoziierte nukleozytoplasmatische Pendelproteine _____	25
	1.3.4.2 Der Crm1 abhängige nukleäre RNA-Export _____	27
	1.3.4.3 Der nukleäre Export von mRNA _____	29
	1.3.4.4 Extranukleäre Zielsteuerung von mRNA _____	32
	1.3.4.5 Zusammenspiel von Protein- und mRNA-Zielsteuerung zur Bewältigung zellulären Stresses _____	32
	1.3.4.5.1 Zusammensetzung und Bildung von Stressgranula _____	34
	1.3.4.5.2 Induktion und Dynamik von Stressgranula _____	36
	1.4 Chromatinstrukturen und ihre Organisation _____	36
	1.5 Zielsetzung dieser Arbeit _____	39
2	<i>Material und Methoden</i> _____	40
	2.1 Material _____	40
	2.1.1 Geräte _____	40
	2.1.2 Software _____	41
	2.1.3 Verbrauchsmaterialien _____	41
	2.1.4 Chemikalien _____	42
	2.1.5 Enzyme _____	42
	2.1.6 Kits _____	42
	2.1.7 Bakterienstämme _____	42

2.1.8	Zelllinien _____	43
2.1.8.1	NCI-H1299-Zellen (<i>Homo sapiens</i>) _____	43
2.1.8.2	COS7-Zellen (<i>Cercopithecus aethiops</i>) _____	43
2.1.8.3	NRK 52E Zellen (<i>Rattus norvegicus</i>) _____	43
2.1.9	Puffer und Lösungen _____	44
2.1.9.1	Puffer für DNA-Polymerasen und -Ligasen _____	44
2.1.9.2	Puffer für Agarosegelelektrophorese _____	44
2.1.9.3	Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien _____	44
2.1.9.4	Lösungen für SDS-PAGE _____	44
2.1.9.5	Lösungen für Western Blotting _____	45
2.1.9.6	Lösungen für TCE-Lyse _____	45
2.1.9.7	Puffer für Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung _____	45
2.1.9.8	Sonstige Puffer _____	45
2.1.10	Oligonukleotide _____	45
2.1.11	Vektoren _____	47
2.1.12	Kulturmedien _____	49
2.1.13	Molekulargewichtsstandards _____	49
2.2	Methoden _____	50
2.2.1	Molekularbiologische Methoden _____	50
2.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) _____	50
2.2.1.1.1	Analytische PCR zur Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen _____	50
2.2.1.1.2	Fusions-PCR zur Klonierung der vollständigen cDNA humaner IP3K-B in den Expressionsvektor pEGFP-N1 _____	51
2.2.1.1.3	Quik-Change TM -Mutagenese _____	51
2.2.1.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen _____	53
2.2.1.3	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen _____	53
2.2.1.4	Ligation _____	54
2.2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen (Miniprep) _____	54
2.2.1.6	Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA _____	54
2.2.1.7	Sequenzierung von DNA _____	54
2.2.2	Mikrobiologische Methoden _____	55
2.2.2.1	Herstellung chemisch-kompetenter Zellen _____	55
2.2.2.2	Hitzeschocktransformation _____	56
2.2.2.3	Wachstum und Lagerung der Bakterienstämme _____	56
2.2.3	Zellbiologische Methoden _____	56
2.2.3.1	Kontinuierliche Kultivierung von NRK 52E-, COS7- und H1299-Zellen _____	56
2.2.3.2	Aussaat eukaryotischer Zellen in Kammerdeckgläser _____	57
2.2.3.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen _____	57
2.2.3.4	Fixierung eukaryotischer Zellen _____	57
2.2.3.5	Färbung eukaryotischer Zellkerne _____	57
2.2.3.6	Färbung von F-Aktin _____	58
2.2.3.7	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) von poly(A)-RNA _____	58
2.2.3.8	Transiente Herunterregulierung der IP ₅ -2K-Expression durch si-RNA _____	59
2.2.3.9	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung _____	59
2.2.4	Proteinchemische Methoden _____	59
2.2.4.1	Immunfluoreszenz _____	59
2.2.4.2	Immunadsorption von EGFP-Fusionsproteinen _____	60
2.2.4.3	Kinetikmessungen und Bestimmung der Substratspezifität der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase _____	60
2.2.4.4	MDD-HPLC-Analyse von InsP _x -Isomeren in COS7-Zellen nach Überexpression von EGFP/IP ₅ -2K _____	61

	2.2.4.5 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)_____	62
	2.2.4.6 Western Blotting und Antikörpernachweis von Proteinen _____	62
	2.2.4.7 TCE-Lyse von NRK-Zellen und Detektion endogener Inositol-1,4,5- trisphosphat 3-Kinase _____	63
	2.2.4.8 Bakterielle Expression und Reinigung der Aktinbindungsdomäne aus Ratten Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B und ihrer Mutanten als GST- Fusionsproteine _____	63
	2.2.4.9 Aktinpräparation und <i>in vitro</i> Bindungstest _____	64
	2.2.4.10 Nicht-enzymatische Asp-Pro-Spaltung einer N-terminal trunkierten Form von IP3K-B _____	64
	2.2.5 Computergestützte Methoden _____	65
3	<i>Ergebnisse</i> _____	66
	3.1 Die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B unterliegt Zielsteuerungsmechanismen zu verschiedenen zellulären Strukturen ____	66
	3.1.1 NRK-Zellen exprimieren zu mindestens 99% die Isoform B der Inositol-1,4,5- trisphosphat 3-Kinase _____	66
	3.1.2 Detektion von endogener Ratten Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B bestätigt Colokalisation mit F-Aktin, dem ER, und weist auf Kernlokalisierung hin _____	68
	3.1.3 Die Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B an F-Aktin bedarf der korrekten Sekundärstruktur ihrer Aktinbindungsdomäne _____	71
	3.1.4 Die putative Aktinbindungsdomäne, bestehend aus den Aminosäuren 108-170, ist die einzige Aktinbindungsregion im N-Terminus der Inositol-1,4,5- trisphosphat 3-Kinase B _____	73
	3.1.5 Die Deletion der Aktinbindungsdomäne aus dem Volllängenprotein der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B führt zum Verlust der F- Aktinlokalisierung und zur Identifizierung des Kernlokalisierungssignals ____	74
	3.2 Charakterisierung neuer Funktionen humaner Inositol-1,3,4,5,6- pentakisphosphat 2-Kinase durch Untersuchung ihrer intrazellulären Lokalisation _____	77
	3.2.1 Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase unterliegt einer Zielsteuerung aus dem Zytoplasma in den Kern zu aktiven Genregionen _____	77
	3.2.2 Die Zielsteuerung der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase reguliert ein zeitabhängiges zytoplasmatisches Pendeln der Kinase _____	82
	3.2.2.1 Identifizierung der Zielsteuerungsdomänen der Inositol-1,3,4,5,6- pentakisphosphat 2-Kinase _____	85
	3.2.2.1.1 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase besitzt ein nicht- kanonisches Kernlokalisierungssignal in ihrer N-terminalen Domäne _	85
	3.2.2.1.2 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase besitzt ein Exportin unabhängiges Kernexportsignal _____	88
	3.2.3 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase colokalisiert mit nukleärer poly(A)-RNA _____	90
	3.2.4 Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ist Bestandteil von zytosolischen mRNA-Akkumulationen, die durch Protein-überexpression hervorgerufen werden _____	91
	3.2.5 Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase colokalisiert mit mRNA- Bindeproteinen in Stressgranula _____	94
	3.2.6 Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ist eine Komponente von Puromycin induzierten Stressgranula _____	95

3.2.7	Katalytisch inaktive Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase colokalisiert nicht mit Stressgranula _____	99
3.2.8	Eliminierung von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase durch siRNA verändert die Kernmorphologie und beeinflusst den Kernimport von TIAR _____	100
3.2.8.1	TIAR ist ein Bindungspartner der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase _____	103
3.2.9	In COS7-Zellen überexprimierte Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ist ein hochaktives oligomeres Enzym _____	105
4	<i>Diskussion</i> _____	111
4.1	Charakterisierung der Zielsteuerungen von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B _____	111
4.1.1	Die Aktinbindungsdomänen von Inositoltrisphosphatkinasen gehören einer neuen ABD-Familie an _____	111
4.1.2	F-Aktinbindungseigenschaften und Charakteristika der Aktinbindungsdomäne von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B _____	116
4.1.3	Die Aktinbindungsdomäne der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B enthält ein kanonisches monopartites Kernlokalisierungssignal, welches einen Kernimport des Enzyms vermitteln kann _____	118
4.1.4	Mögliche funktionale Bedeutung alternativer Zielsteuerungs-domänen in der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B _____	122
4.2	Die umfangreiche Charakterisierung von Lokalisation und Funktion der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase _____	126
4.2.1	Die Kernlokalisierung der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ergänzt das Bild eines unabhängigen InsP-Metabolismus' im Zellkern _____	126
4.2.2	Ist die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ein TAP-Homologes? _____	128
4.2.2.1	Das nukleozytoplasmatische Pendeln der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase _____	132
4.2.2.1.1	Putative Zielsteuerungsdomänen der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase _____	133
4.2.2.2	Die strukturierte Anlagerung von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase an Euchromatin und ihre Colokalisation mit mRNA _____	140
4.2.3	Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphatkinase 2-Kinase, mRNA-Export und Stressgranula _____	144
4.2.4	Die intrazellulären Lokalisationen der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase im Überblick _____	146
4.2.5	Möglicherweise ist die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase das bisher unbekannte Glied zwischen Stressabbau und gleichzeitigem Schutz vor Apoptose _____	147
5	<i>Zusammenfassung</i> _____	153
6	<i>Summary</i> _____	155
7	<i>Literaturverzeichnis</i> _____	157
8	<i>Anhang</i> _____	I
8.1	Gefahrstoffe _____	I
8.2	Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren _____	I
8.3	Aminosäuresequenzalignierung von zehn Vertebraten-IP₅-2K-Sequenzen und 18 Pilz-Ipk1p-Sequenzen. _____	III

Inhaltsverzeichnis

8.4	Zur Modellierung der N-terminalen Domäne von HsIP3K-B verwendete Sequenz: _____	IV
8.5	Zur Modellierung der putativen 3D-Struktur von HsIP₅-2K verwendete Sequenzen: _____	V
8.6	Hinweis zur Rechtschreibung: _____	V

1 Einleitung

Jedes Protein innerhalb einer eukaryotischen Zelle ist Zielsteuerungsmechanismen unterworfen, die von seiner Funktion abhängig sind und die es ermöglichen, dass diese Funktion spezifisch in bestimmten Zellkompartimenten wirkt. Von ganz besonderer Bedeutung ist dies bei Signaltransduktionsproteinen, d.h. Proteinen, deren Hauptfunktion die zelluläre bzw. subzelluläre Informationsübertragung ist. Die Beobachtung der dynamischen intrazellulären Lokalisation eines Enzyms kann deshalb zur Klärung seiner Funktion beitragen. Diesen Ansatz verfolgend wurden in der vorliegenden Arbeit zwei besonders wichtige mit Signaltransduktion durch Inositolphosphate befasste Enzyme untersucht: Die Isoform B der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (IP3K-B), die der Familie der sogenannten PDKG-Kinasen angehört (Bertsch et al. 2000) und die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase (IP₅-2K), die keinerlei Homologie zu anderen Inositolphosphatkinasen aufweist. Die untersuchten Zielsteuerungen dieser beiden sowohl zytosolisch als auch nukleär lokalisierten Kinasen unterscheiden sich im Detail drastisch. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass dies durch die unterschiedlichen Funktionen der beiden Kinasen bedingt wird.

Insbesondere für die IP₅-2K konnten sowohl neuartige Lokalisationen identifiziert als auch starke Hinweise auf bisher unbekannte Funktionen des Enzyms gewonnen werden. Diese stehen in engem Zusammenhang mit nukleozytoplasmatischem Transport, mRNA-Export und der zellulären Stressbewältigung durch Bildung von Stressgranula.

1.1 Inositolphosphate

Inositol ist ein Zyklhexanhexol, das an seinen sechs Hydroxylgruppen durch Inositolphosphatkinasen (IPKs) phosphoryliert werden kann (**Abbildung 1A-C**). Darüber hinaus kann es zu Pyrophosphorylierungen kommen. Nachdem zunächst angenommen wurde, es handele sich bei den Inositolphosphaten (InsPs) um Phosphatspeichermoleküle, wurden immer neue Funktionen dieser Moleküle und ihrer Kinasen bekannt (Irvine and Schell 2001).

1.1.1 Nomenklatur

Aus den sechs möglichen Phosphorylierungspositionen am Inositolring ergeben sich theoretisch 63 Inositolmonophosphatisomere ($= 2^n - 1$, $n = 6$). Um diese zu definieren, werden die Isomere nach der vereinfachten IUPAC-Nomenklatur benannt. Agranoffs Schildkröte (**Abbildung 1A**, (Agranoff 1978)) ist eine Hilfestellung bei der Nummerierung der Phosphatgruppen von InsPs. Das rechte Vorderbein der Schildkröte, die das *myo*-Inositol in Sesselkonformation (**Abbildung 1C**) darstellt, markiert die D-1-Position. Von hier aus erfolgt die Nummerierung gegen den Uhrzeigersinn, so dass der Kopf der Schildkröte der D-2-Position entspricht.

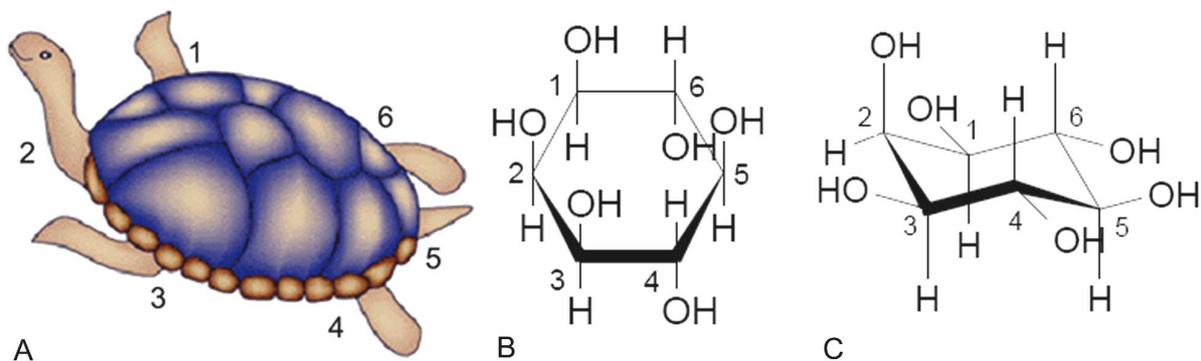


Abbildung 1: Drei Darstellungsmöglichkeiten für *myo*-Inositol.

(A) zeigt Agranoffs Schildkröte; eine Gedächtnishilfe bei der Nummerierung der InsPs. Das rechte Vorderbein markiert die D-1-Position, von dort aus wird gegen den Uhrzeigersinn nummeriert (Agranoff 1978). (B) gibt die Strukturformel von *myo*-Inositol an, das in (C) in der Sesselkonformation gezeigt wird.

1.1.2 Aufgaben nukleärer Inositolphosphate

Für verschiedene Inositolpolyphosphate wurde eine regulatorische Rolle in der Chromatinremodellierung beschrieben. Dabei erfolgt die Regulation in Eukaryoten durch Bindung der InsPs an ATP abhängige Chromatinremodellierungskomplexe. Diese Komplexe vermitteln die Neuordnung von DNA und Histonen, wodurch es zu einer nicht-kovalenten Konformationsänderung von Nukleosomen während der Transkription kommt (Stryer 1999). Es konnte gezeigt werden, dass InsP_6 die Nukleosomenmobilisierung durch NURF, ISW2 und INO80 inhibiert. Im Gegensatz dazu wird der Chromatinremodellierungskomplex SWI/SNF der Hefe *in vitro* durch Bindung von $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ stimuliert (Shen et al. 2003, Steger et al. 2003).

In Säugern ist InsP_6 des weiteren essentiell an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt. So wird durch die Bindung von InsP_6 an die Ku-Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) die nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end-joining,

NHEJ) stimuliert (Byrum et al. 2004). In der Hefe ist InsP_6 außerdem essentiell für den Gle1 medierten mRNA-Export. Wird eines der Enzyme, die an der Produktion von InsP_6 beteiligt sind, ausgeschaltet, so kommt es zu einer Störung des mRNA-Exportes. Diese Wirkung wird bisher ausschließlich dem InsP_6 zugeschrieben, da eine künstliche Plasmamembranverankerung der Ipk1, die InsP_5 zu InsP_6 phosphoryliert, keine Störung hervorruft. Eine Beteiligung des Enzyms selbst am Gle1 vermittelten mRNA-Export wurde ausgeschlossen (Miller et al. 2004, York et al. 1999).

In eukaryotischen Zellen führt die Erhöhung der InsP_6 -Konzentration zu einer niedrigeren Anfälligkeit gegenüber Apoptose: In HEK293-Zellen wurde nach Erhöhung der Produktion von InsP_6 , durch Überexpression der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase (IP_5 -2K) eine stark verminderte $\text{TNF}\alpha$ und Fas induzierte Apoptose beobachtet. Der gegenteilige Effekt konnte durch die Herunterregulation der IP_5 -2K erzielt werden. Die resultierende Verringerung der InsP_6 -Konzentration verursachte eine Verstärkung der $\text{TNF}\alpha$ und Fas induzierten Apoptose in diesen Zellen (Verbsky and Majerus 2005).

Ein besonders interessanter Befund ist die essentielle Rolle von InsP_6 als struktur- und aktivitätsvermittelnder Faktor bei mRNA und tRNA editierenden Adenosindesaminasen vom Typ ADAR2 und ADAT1. Hier wirkt das irreversibel in die Proteinstruktur eingebaute InsP_6 als essentieller Struktur bildender Faktor in der Nähe des aktiven Zentrums (Macbeth et al. 2005).

Für $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$, InsP_6 und die direkten metabolisch verwandten InsP -Isomere wurden in Säugern Zellzyklus abhängige Konzentrationsschwankungen beschrieben. In der G_1 -Phase sind die Konzentrationen besonders hoch. Synchron zum Zyklus fallen sie in der S-Phase auf ein niedrigeres Niveau ab, um spät im Zyklus wieder auf höhere Pegel zu steigen. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass diese InsPs an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Ein möglicher Mechanismus dieser Regulation konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden (Balla et al. 1994, Barker et al. 2004).

Die pyrophosphorylierten Inositolphosphate wurden als ein kritischer Faktor in der Regulation der Telomerlänge beschrieben. Die selektive Eliminierung von PP-InsP_5 und $[\text{PP}]_2\text{-InsP}_4$ durch Deletion der Ipk1 in Hefe führte zu einer erhöhten Synthese von PP-InsP_4 und der Verkürzung der Telomerenenden. Im Gegensatz dazu entstanden verlängerte Telomere, wenn PP-InsP_4 durch die Deletion der InsP_6 -Kinase Ksc1 eliminiert wurde (Saiardi et al. 2005, Shears 2005, York et al. 2005).

InsP_7 kann als Phosphatlieferant für die nicht-enzymatische Phosphorylierung der Hefepoteine NRS1 und SRP40, sowie Nopp140 und TCOF1 in Mammalia dienen. Diese

nukleären Proteine sind an der Biogenese von Ribosomen beteiligt. Außerdem wird die Untereinheit $\beta 3A$ von Adaptin, einem Regulator der Vesikelwanderung, durch InsP_7 phosphoryliert, was auf eine regulatorische Rolle von Inositolpyrophosphaten in der Endozytose schließen lässt (Saiardi et al. 2004).

1.1.3 Aufgaben zytosolischer Inositolphosphate

Das wohl bekannteste zytosolische Inositolphosphat ist das Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP_3). Es wurde 1984 erstmals als ein neuer sekundärer Botenstoff in der Signaltransduktion beschrieben (Berridge and Irvine 1984). Inzwischen sind eine Vielzahl von Wirkungen dieses Botenstoffes auf Prozesse der Transkription, Translation und der Zellmigration bestimmt worden. Die am intensivsten untersuchte Funktion von InsP_3 ist aber die Regulation der Kalziumhomöostase. InsP_3 kann auf extrazelluläre Stimuli hin über zwei Signalwege entstehen. Der erste Weg führt über die Aktivierung von trimeren G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch Neurotransmitter wie Glutamat und Acetylcholin, Geruchsstoffe, Hormone oder Licht. Es erfolgt eine Stimulation der Phospholipase C β ($\text{PLC}\beta$) und damit die Katalyse der Hydrolyse von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) in Diazylglyzerol (DAG), welches in der Plasmamembran verbleibt, und das wasserlösliche InsP_3 . Auf dem zweiten Signalweg wird diese Hydrolyse durch die Aktivierung der Phospholipase C γ ($\text{PLC}\gamma$) bewerkstelligt. Stimulus ist hierbei die Bindung von z.B. Wachstumshormonen oder Antigenen an Rezeptor gekoppelte Tyrosinkinase. Durch Bindung an InsP_3 -Rezeptoren des ER vermittelt InsP_3 den Ausstrom von Kalziumionen (Ca^{2+}) aus intrazellulären Speichern (Krauss 2003).

Zur Inaktivierung dieses Signals wird InsP_3 entweder dephosphoryliert oder durch die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (IP3K) zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ phosphoryliert, das als Ausgangsprodukt zur Synthese aller höher phosphorylierten InsPs dient. InsP_4 werden Aufgaben in der Regulation von InsP_3 -Rezeptoren, Ca^{2+} -Signalen und der Frequenz der Ca^{2+} -Oszillation in HeLa-Zellen zugeschrieben (Bird and Putney 1996, Cullen et al. 1995, Irvine and Schell 2001, Zhu et al. 2000). Die Ras-Proteine $\text{RasGAP}^{\text{IP4BP}}$ und GAP1^{m} sind InsP_4 -Bindungsproteine, deren Aktivität von InsP_4 moduliert wird (Cullen et al. 1995, Fukuda and Mikoshiba 1996, Nalaskowski and Mayr 2004). In pankreatischen β -Zellen und Neuronen wurde auch für InsP_6 eine Beeinflussung von Ca^{2+} -Signalen beschrieben (Barker and Berggren 1999, Hoy et al. 2003). Außerdem wird InsP_6 als zytosolischer Effektor in einer Vielzahl von Zellfunktionen diskutiert, wie z.B. in der Ca^{2+} abhängigen Exozytose von Neurotransmittern (Lu et al. 2002) und der Bildung des Clathrinkäfigs bei der Endozytose

(Mizutani et al. 1997, Norris et al. 1995, Voglmaier et al. 1992, Ye et al. 1995). In pankreatischen β -Zellen werden die Serin/Threonin Proteinphosphatasen Typ 1, 2A und 3 konzentrationsabhängig von InsP_6 inhibiert. Dies könnte möglicherweise der Regulation des Ca^{2+} -Einstroms durch die Plasmamembran dienen (Larsson et al. 1997).

Extrazelluläre Effekte von InsP_6 , welches zuvor aus Zellen z.B. durch Nekrose freigesetzt wurde, können sich auf die Immunantwort und apoptotische Prozesse auswirken, wie es in Zellkulturen beobachtet werden konnte, deren Medium mit InsP_6 versetzt wurde (Eggleton 1999, Ferry et al. 2002, Morrison et al. 2002, Morrison et al. 2001, Singh et al. 2003, Zi et al. 2000).

1.2 Inositolphosphat umsetzende Enzyme

Der Inositolphosphatmetabolismus wird durch eine Vielzahl von Inositolphosphatkinasen (IPKs) und Inositolphosphatphosphatasen (IPPs) kontrolliert.

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 PLC-vermittelte Spaltung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ in DAG und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ stellt das Bindeglied zwischen dem PtdInsP -Metabolismus und dem InsP -Metabolismus in Tieren dar, denn auf diese Weise gelangt das hydrophile InsP_3 in das Zytoplasma der Zelle, wo es als Substrat zur Synthese einer Vielzahl von InsPs dient. Die Dephosphorylierung bis hin zum unphosphorylierten Inositol wird von den IPPs durchgeführt, während die IPKs für die Synthese hochphosphorylierter InsPs verantwortlich sind. Wie **Abbildung 2** zeigt, gibt es mehrere alternative Wege zur Herstellung jedes InsP -Isomers. In Pflanzen, Hefen und Schleimpilzen werden die hochphosphorylierten InsPs über einen alternativen Syntheseweg hergestellt, da diese Organismen über andere IPKs verfügen als Tiere. Die Produktion von InsP_6 erfolgt hier ausgehend von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ über die Phosphorylierung zu $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$. Nach dessen Umsetzung zu $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ wird dann InsP_6 erhalten (Shears 2004).

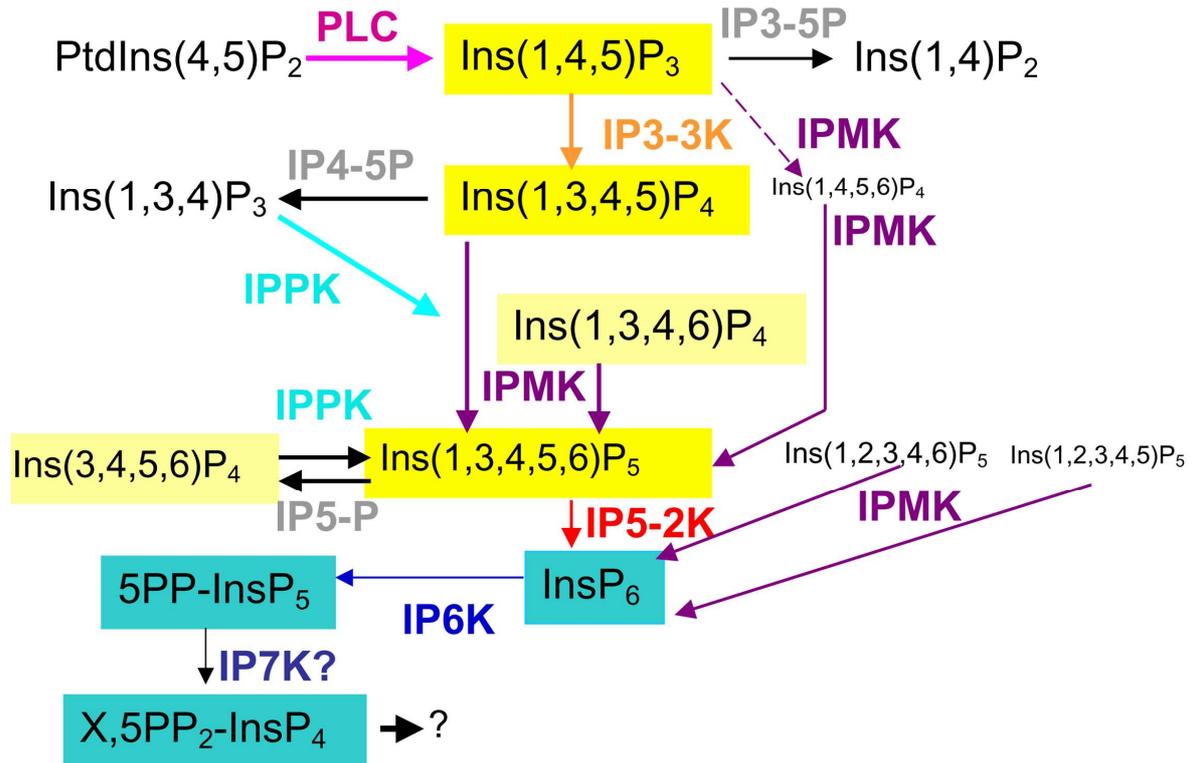


Abbildung 2: Der Inositolphosphatmetabolismus in Vertebraten.

Überblick über Substrate und Produkte von zytosolischen IPKs und IPPs. Nebensubstrate und -produkte sind gegenüber den Hauptsubstraten und -produkten durch kleinere Schriftgrößen abgehoben. PLC: Phospholipase C; IP3-3K: Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (Isoformen A, B); IPMK: Inositolphosphatmultikinase; IP6K: Inositolhexakisphosphatkinase (Isoformen 1, 3); IPPK: InsP_{3/4} 5/6/1-Kinase = Inositolpolyphosphat 5/6/1-Kinase; IP5-2K: Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase; IP7K: 5PP-InsP₅ Kinase; IP3-5P: Ins(1,4,5)P₃ 5-Phosphatase; IP4-5P: Ins(1,3,4,5)P₄ 5-Phosphatase; IP5-P: Ins(1,3,4,5,6)P₅ 1-Phosphatase.

1.2.1 Die Inositolphosphatphosphatasen

Die größte Gruppe der bisher charakterisierten Inositolphosphatphosphatasen (IPPs) dephosphorylieren InsP-Substrate an D-5-Position. Abhängig von ihrem Substrat werden sie in drei Klassen unterteilt. Die *D*-Ins(1,4,5)P₃/*D*-Ins(1,3,4,5)P₄ 5-Phosphatasen des Typs I sind im Zytosol frei diffusibel und hydrolysieren wasserlösliches InsP₃ und InsP₄. Die Typ II-IPPs liegen häufig membranständig vor und dephosphorylieren *D*-Ins(1,4,5)P₃, *D*-InsP(1,3,4,5)P₄, PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ in der Nähe des inneren Blattes der Plasmamembran. SHIP (SH2-domain-containing inositol phosphatase) und SHIP2 bilden die Typ III-IPPs, die weitere InsP- und PtdInsP-Substrate an 5-Position dephosphorylieren. Der Name stammt von der charakteristischen SH2-Domäne (Scr homology 2) in ihrem N-Terminus. Bisher nur unzureichend charakterisiert wurden die Typ IV-IPPs (Majerus et al. 1999).

1.2.2 Die Inositolphosphatkinasen

Die Inositolphosphatkinasen (IPKs) regulieren die intrazellulären InsP-Konzentrationen durch Phosphorylierung der verschiedenen InsP-Isomere. Hierbei kann in unterschiedlichen Geweben eine Isoform spezifische Expression der IPKs vorliegen, 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 je nach Spezies bis zu drei Isoformen umfassenden Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP3K), die in der Regel nur mit einer Isoform vertretene Inositolphosphatmultikinase (IPMK) und die je nach Spezies in bis zu drei Isoformen exprimierten Inositolhexakisphosphatkinasen (IP6K).

Die PDKG-Kinasen ähneln sich stark in dem Aufbau ihrer katalytischen Domänen. Wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben wird, sind ihre N-terminal gelegenen funktionalen Domänen für Regulation und Zielsteuerung verantwortlich. Im C-Terminus befinden sich die katalytischen Domänen.

Über die Struktur der IP₅-2K und der IP₃-5/6-K/IP₄-1-K hingegen ist bisher nur wenig bekannt. Sie weisen keine Homologien zu den typischen IPK-Domänen auf, wie sie für die PDKG-Kinasen beschrieben wurden, und die kritischen Aminosäurereste für die Katalyse der InsP-Phosphorylierung konnten ebenfalls noch nicht eindeutig bestimmt werden. Lediglich eine für die ATP-Bindung verantwortliche grasp-Domäne in der IP₃-5/6-K/IP₄-1-K wurde bereits identifiziert (**Abbildung 3**, (Abdullah et al. 1992, Shears 1989)).

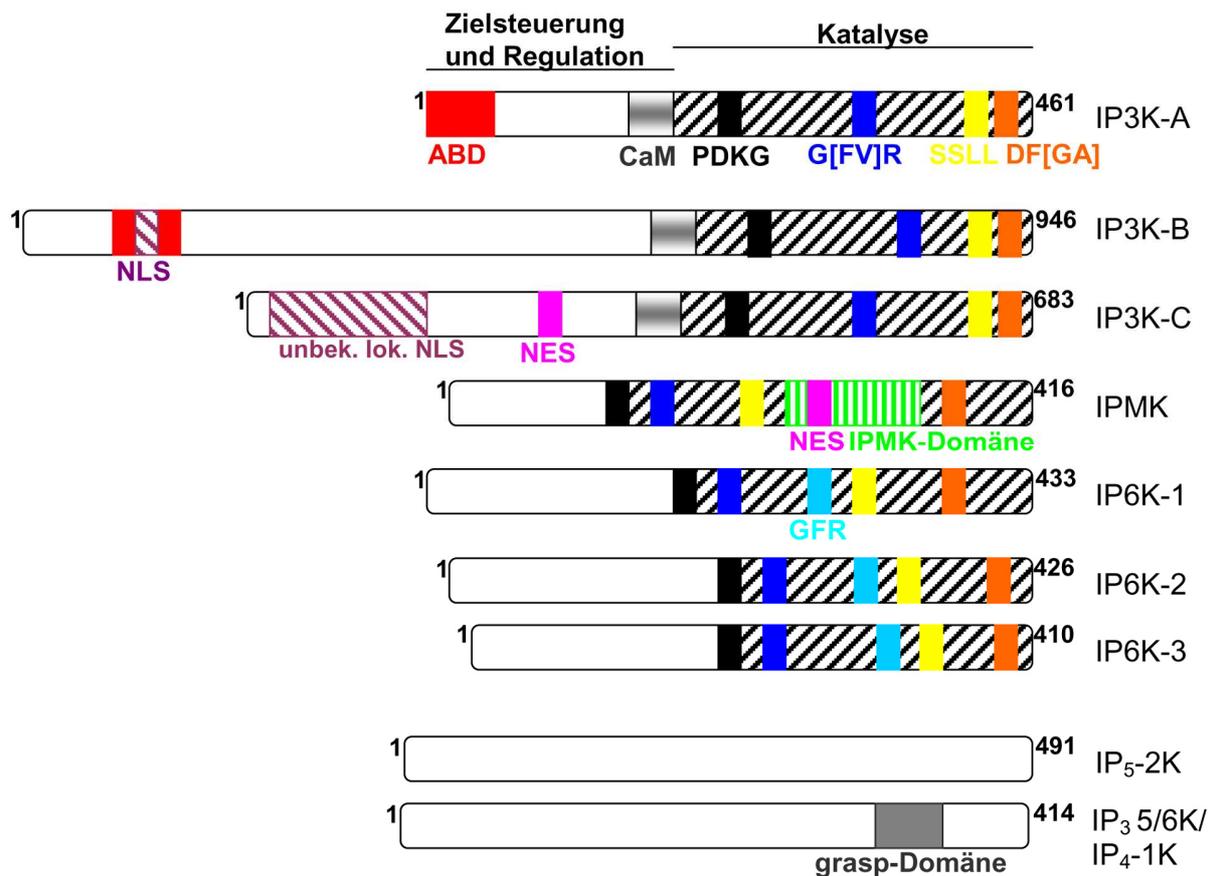


Abbildung 3: Schematische Darstellung funktionaler Bereiche humaner Inositolphosphatkinasen.

ABD (rot): Aktinbindungsdomäne; CaM (grau): Calmodulinbindungsdomäne; PDKG-Motiv (schwarz): Substratausrichtung und Phosphattransfer; G[FV]R-Motiv (blau) und GFR-Motiv (türkis): InsP-Bindung; SSSL-Motiv (gelb): Katalyse; DF[GA]-Motiv (orange): ATP-Bindung; NES (weinrot-weiß schraffiert): nukleäres Exportsignal; NLS (rosa): nukleäres Lokalisationssignal, IPMK-Domäne (grün-weiß gestreift); Grasp-Domäne (dunkelgrau): ATP-Bindung. Die katalytischen Domänen sind durch eine schwarz-weiße Schraffierung markiert.

1.2.2.1 Die PDKG-Kinasen

Die IP3K, die IPMK und die IP6K werden zu einer Kinasefamilie, den **PDKG**-Kinasen zusammengefasst, da sie, in ihrem C-Terminus, alle ein bestimmtes Aminosäuremotiv der Form (**P-C-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G**) enthalten. Das PDKG-Motiv spielt eine essentielle Rolle in der Positionierung von InsP und ATP sowie im Phosphattransfer (Bertsch et al. 2000). Weitere katalytisch essentielle Konsensusmotive sind das GFR-Motiv, welches für die Bindung der InsPs verantwortlich ist (Nalaskowski and Mayr 2004), das essentiell an der Katalyse beteiligte SSSL-Motiv (Saiardi et al. 2000) und das DFG/A-Motiv, das eine kritische Rolle in der ATP-Bindung spielt. Starke Unterschiede in Länge und Sequenz weisen hingegen die N-Termini auf. Hier befinden sich meist die Zielsteuerungsdomänen der Kinasen (**Abbildung 3**, (Nalaskowski and Mayr 2004)).

1.2.2.1.1 Die Inositoltrisphosphatkinasen

Die nur im Tierreich vorkommende Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (IP3K) phosphoryliert $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in 3-Position zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$. In Vertebraten wurden die cDNAs für drei Isoformen dieser Kinase identifiziert sowie ein alternativ gespleißtes Gen in *Cenorhabditis elegans* (Bertsch et al. 1999, Choi et al. 1990, Takazawa et al. 1990, Takazawa et al. 1991, Thomas et al. 1994). Weitere Isoformen beispielsweise in der Honigbiene und *Drosophila melanogaster* wurden aus den genomischen Sequenzen vorhergesagt (Clandinin et al. 1998, Kucharski and Maleszka 2002) und mittlerweile im Labor von Prof. Mayr rekombinant und katalytisch aktiv hergestellt. Insekten besitzen eine Isoform ohne und eine mit Calmodulinbindungsdomäne (CaM-BD, persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Mayr), höhere Würmer ein Gen für Isoformen vermutlich mit aktiver CaM-BD und *C. elegans* ein Gen für drei verschiedene Spleißformen ohne aktive CaM-BD. Die Vertebraten A-Isoform wird hauptsächlich Neuronen spezifisch exprimiert, konnte aber auch in Hoden und den roten Blutkörperchen von Hühnern nachgewiesen werden (Bertsch et al. 1999, Vanweyenberg et al. 1995). Die Isoformen B und C wurden durch Northern Blot Analysen in einer größeren Anzahl von Geweben detektiert, wie z.B. Gehirn, Herz, Lunge, Hoden und Niere (Dewaste et al. 2000, Nalaskowski et al. 2003, Vanweyenberg et al. 1995). Die C-terminale Region aller drei Isoformen der IP3K ist über alle Vertebraten hochkonserviert. Sie beinhaltet die Domänen, die an der Bindung, Ausrichtung und Phosphorylierung der InsP -Substrate beteiligt sind (**Abbildung 3**). N-terminal der katalytischen Domäne befindet sich die CaM-BD, die durch Bindung von Ca^{2+} die IPK-Aktivität stimuliert. Die Sensibilität der Isoformen A und B gegenüber Ca^{2+} /CaM-Stimulation und ihre Kinaseaktivitäten werden über Phosphorylierungen durch PKA und PKC reguliert (Nalaskowski and Mayr 2004). Der CaM-BD geht eine weitere konservierte Domäne voraus, reich an sauren Aminosäuren sowie Serin- und Threoninresten. Sie stellt eine Spaltstelle für bestimmte Proteasen, die Calpaine, dar, die PEST-Sequenz genannt wird (Rechsteiner and Rogers 1996). Die N-Termini der drei Isoformen hingegen zeigen große Unterschiede in Länge und Aminosäuresequenz, wodurch sich die unterschiedlichen Größen der Isoformen (Isoform A: 52 kD, B: 102 kD; C: 75 kD) erklären lassen. In diesen N-terminalen Bereichen befinden sich die Zielsteuerungsdomänen der IP3Ks (**Abbildung 3**). Irvine und Kollegen identifizierten eine Aktinbindungsdomäne (ABD) im N-Terminus der A-Isoform, bestehend aus den ersten 66 Aminosäuren, die das Enzym an die Aktin reichen dendritischen Dornen von Neuronen lenkt (Irvine and Schell 2001). Die B-Isoform weist mehrere intrazelluläre Lokalisationen auf. Sie ist sowohl am ER, als auch in der Nähe der Plasmamembran und an F-Aktin detektierbar (Brehm et al. 2004,

Dewaste et al. 2003, Soriano et al. 1997). Die ABD der Rattenform konnte von Dr. Isabell Schreiber (aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayr) 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 Prolin reiche Verbindungssequenz vorausgeht. Die C-Isoform ist überwiegend nukleär lokalisiert (Nalaskowski et al. 2003).

Knock-Out-Experimente in Mäusen haben gezeigt, dass der Ausfall einer IP3K-Isoform durch Überexpression einer anderen Isoform in den meisten Geweben kompensiert werden kann. Allerdings zeigen die Mäuse eine schwere Störung der T-Zellentwicklung in Abwesenheit der B-Isoform, was auf eine gestörte Selektion von Thymozyten zurückgeführt wird. Diese Störung kann offensichtlich nicht durch die kompensatorisch überexprimierten Isoformen A und C ausgeglichen werden (Jun et al. 1998, Nalaskowski and Mayr 2004, Pouillon et al. 2003). Der Knock-Out der Isoform A führt im ZNS zu milden Symptomen mit Zeichen vermehrter Erregbarkeit, ansonsten sind die Mäuse relativ normal (Jun et al. 1998).

1.2.2.1.2 Die Inositolphosphatmultikinase

Die Inositolphosphatmultikinase (IPMK) ist bei Tieren, Pflanzen und Hefen weit verbreitet und wahrscheinlich der Urform der PDKG-Kinasen am ähnlichsten (Nalaskowski and Mayr 2004, Shears 2004). Die als erste identifizierte IPMK aus Hefe (Ipk2) ist eine $\text{InsP}_3/\text{InsP}_4$ 3/6 Kinase und identisch mit Arg82/ArgRIII, einem unverzichtbaren Bestandteil des Arg82-Mcm1-Transkriptionskomplexes (Odom et al. 2000, Saiardi et al. 1999). Der Arg82-Mcm1-Komplex kontrolliert die Transkription von Genen, die in den Argininmetabolismus involviert sind (Bercy et al. 1987, Dubois and Messenguy 1994). Durch die humane IPMK werden die selben Phosphorylierungsschritte katalysiert wie durch das Hefeenzym, sie kann aber zusätzlich $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ zu $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ zu PP-InsP_4 phosphorylieren (Saiardi et al. 2001a). Das 47-kD-Protein, bestehend aus 416 Aminosäuren, ist überexprimiert als EGFP-Fusionsprotein in NRK-Zellen vorwiegend nukleär lokalisiert. Im Gegensatz zu den IP3Ks befindet sich die Zielsteuerungsdomäne hier im C-Terminus des Enzyms (**Abbildung 3**). Das Kernlokalisierungssignal (NLS) der IPMK entspricht der Konsensussequenz des monopartiten NLS aus c-Myc (Nalaskowski et al. 2002). Die Kernlokalisierung der IPMK untermauert die Diskussion um einen unabhängigen InsP-Metabolismus im Kern, denn sie könnte die in manchen Geweben nicht exprimierte nukleäre IP3K-C ersetzen und so für die Synthese aller hochphosphorylierten InsPs sorgen. Eine solche Substitution findet auch in Protisten, Pilzen und Pflanzen statt, die über keine IP3Ks verfügen (Nalaskowski and Mayr 2004).

Das IPMK-Homolog in *Drosophila melanogaster*, die *DmIpk2*, wurde als das Schlüsselenzym in der Synthese von InsP_6 beschrieben. In Insekten soll die Biosynthese von InsP_6 nicht vornehmlich über die Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ durch die IP3K stattfinden, sondern eine bevorzugte Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ über $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$, durch die *DmIpk2* zu InsP_6 führen. Die intrazelluläre Lokalisation wurde als nukleär beschrieben. In Polytäanchrosomen der Fruchtfliege ist die *Ipk2* hauptsächlich in der Euchromatinfraction detektierbar (Seeds et al. 2004).

1.2.2.1.3 Die Inositolhexakisphosphatkinasen

Die Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphatkinase (IP6K) katalysiert die Phosphorylierung von InsP_6 zu PP- InsP_5 sowie die Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ zu PP- InsP_4 . Es wurden bisher drei Isoformen dieser PDKG-Kinasesubfamilie identifiziert (Saiardi et al. 2000, Saiardi et al. 1999, Saiardi et al. 2001a, Saiardi et al. 2001b). Die Molekulargewichte der einzelnen Isoformen betragen: 50 kD (*HsIP6K-1*, 433 AS), 49 kD (*HsIP6K-2*, 426 AS) und 47 kD (*HsIP6K-3*, 410 AS). Zusätzlich zu dem für PDKG-Kinasen typischen GFR-Motiv enthalten die IP6Ks ein GF[RK]-Motiv (**Abbildung 3**), welches vermutlich an der Bindung hochphosphorylierter InsPs beteiligt ist (Deschermeier 2002). Durch Northern Blot Analysen wurden in Mausgeweben große Mengen der Transkripte aller IP6K Isoformen im Gehirn nachgewiesen. Die Isoformen 1 und 2 treten außerdem in Hoden, Herz, Niere, Leber, Lunge und Milz auf (Saiardi et al. 1999). Ähnlich wie bei den IP3Ks weisen die Isoformen der IP6Ks unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen auf. Exprimiert als GFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen zeigt Isoform 1 eine gleichmäßige Verteilung in der Zelle, während Isoform 2 exklusiv im Kern und Isoform 3 hauptsächlich zytosolisch vorliegen (Saiardi et al. 2001b).

Für die IP6K-2 wurde eine Translokation aus dem Kern in Mitochondrien beobachtet, die mit der Initiation von Apoptose einherging. Die Induktion des Zelltods soll dabei durch die vermehrte Produktion von InsP_7 stattfinden. Auf welche Art und Weise InsP_7 proapoptotisch wirkt, konnte bisher nicht geklärt werden (Nagata et al. 2005).

1.2.2.2 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

Die Kinaseaktivität, die nach Zugabe von 2-Phosphat zu InsP_5 zur Produktion von InsP_6 führt, wurde zuerst in *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben (Ongusaha et al. 1998, Ongusaha et al. 1997). Das entsprechende Enzym wurde Ipk1 genannt. In *Saccharomyces cerevisiae* wurde die Ipk1 später als eines von drei Enzymen im Phospholipase C abhängigen Inositolphosphatmetabolismus identifiziert, das essentiell für einen effizienten Gle1-medierten mRNA-Export ist. Diese Ergebnisse basieren auf einer genetischen Suche nach Mutationen, die in Verbindung mit einer Temperatur sensitiven *gle1*-Mutante einen gestörten mRNA-Export zeigten. Die Analyse der intrazellulären Lokalisation von Ipk1 erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz, indem Protein A markierte Ipk1 mit anti-Protein-A-Antikörper im Kern, in der Nähe der Kernporen und der Kernhülle detektiert wurde (York et al. 1999). Um die intrazelluläre Lokalisation der Ratten IP_5 -2K zu bestimmen, wurde sie als GFP-Fusionsprotein in Rattenzellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Lokalisation wurde als gleichmäßig über die Zelle verteilt beschrieben (Fujii and York 2005).

Die Biosynthese von InsP_6 durch ScIpk1 wurde durch Kinetikexperimente mit bakteriell überexprimiertem GST-Fusionsprotein nachgewiesen. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter ergab einen apparenten K_m von 644 nM für InsP_5 und V_{\max} von 0,020 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ für $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ bei 40 ng eingesetztem Enzym und 5 mM ATP (Zhu et al. 2000). Der apparente V_{\max} für die Hs IP_5 -2K, überexprimiert als FLAG-Fusionsprotein in Sf21-Zellen unter Verwendung des BacPAK[®] Baculovirus Expressionssystems, war mit 30 nmol gebildetem $\text{InsP}_6/\text{min}/\text{mg}$ Protein recht gering.

Das humane Homolog wurde erst 2002 durch seine Ähnlichkeit mit den Ipk1s aus *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans*, *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces servazzi* identifiziert (Verbsky et al. 2002). Die 51 kD große Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase (IP_5 -2K) zeigt keinerlei Ähnlichkeit zu anderen IPKs. Durch Northern Blot Analysen konnte eine ubiquitäre, aber sehr schwache Expression in allen Geweben mit höheren Konzentrationen des Transkripts in Herz, Gehirn, Hoden und Plazenta nachgewiesen werden.

Die Regulation der IP_5 -2K wurde kürzlich von der Gruppe um York untersucht. Die Überexpression der Ratten- IP_5 -2K in Rat-1-Zellen führte zu einer 2,5-fachen Erhöhung der InsP_6 -Konzentration. $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ hingegen war nicht mehr detektierbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass endogene IP_5 -2K-Aktivität einer Feinregulation unterliegt (Fujii and York 2005). Der entgegengesetzte Effekt wurde von der Gruppe um Majerus erreicht, nachdem die IP_5 -2K-Expression durch siRNA-Techniken auf ein Minimum reduziert wurde.

Es ergab sich hierbei eine Verringerung der InsP_6 -Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg des InsP_5 -Pegels (Verbsky et al. 2005b).

Um Informationen über die physiologische Relevanz der IP_5 -2K zu erhalten, wurde die Expression der Kinase in Zebrafischembryonen durch Antisense-Morpholino-Oligonukleotid-Injektion inhibiert. Das Fehlen der IP_5 -2K führte in den Embryonen zu einer gestörten Rechts/Links-Asymmetrie, die vermutlich durch eine negative Beeinflussung des asymmetrischen Ca^{2+} -Flusses hervorgerufen wurde (Sarmah et al. 2005). Eine weitere essentielle Funktion der IP_5 -2K wurde für HEK293-Zellen beschrieben. Die Sensitivität dieser Zellen gegenüber $\text{TNF}\alpha$ und Fas induzierter Apoptose sinkt bei Überexpression der IP_5 -2K, was auf eine erhöhte Produktion von InsP_6 zurückgeführt wird (Verbsky and Majerus 2005). Die kürzlich etablierte Knock-Out-Maus für IP_5 -2K ist vor Tag 8,5 embryonal letal (Verbsky et al. 2005a).

Um die Zusammenhänge dieser verschiedenen Funktionen der für so zahlreiche Prozesse und die Vitalität essentiellen IP_5 -2K besser verstehen zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit die intrazelluläre Zielsteuerung der Kinase eingehend untersucht werden.

1.3 Intrazelluläre Zielsteuerungsmechanismen

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Inositolphosphatkinasen untersucht, die unterschiedlichen Translokationen zwischen mehreren zellulären Substrukturen unterliegen. Solche Veränderungen der intrazellulären Lokalisation von Proteinen in eukaryotischen Zellen können durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert werden, die auf den verschiedenen Ebenen der Proteinbiosynthese wirken können. Damit Proteine zu ihrem Bestimmungsort gelangen, kann bereits ihre mRNA einer Zielsteuerung unterliegen. Auf Proteinebene können Signalsequenzen innerhalb der Enzyme oder posttranslationale Modifikationen effizient den subzellulären Transport der Proteine koordinieren.

1.3.1 Funktionsbedingte Proteinzielsteuerung über Signalsequenzen

Nahezu alle Proteine entstehen an den Ribosomen im Zytosol, nur sehr wenige werden an den Ribosomen der Mitochondrien gebildet. Abhängig von ihrer Funktion wird die Lokalisation der Proteine durch Sortiermerkmale koordiniert, die für den Weitertransport aus dem Zytosol in den Zellkern, die Mitochondrien oder die Peroxysomen sorgen (**Abbildung 4**, gestrichelte Pfeile). Eine große Anzahl von Proteinen aber hat kein spezielles Sortiermerkmal und verbleibt deshalb frei oder komplexiert mit anderen Proteinen im Zytosol. Signalpeptide hingegen dienen der Zielsteuerung von Proteinen, die sezerniert werden, und außerdem auch

von solchen, deren Bestimmungsort im ER, im Golgi-Apparat, in der Plasmamembran oder in den Lysosomen liegt (**Abbildung 4**, durchgezogene Pfeile).

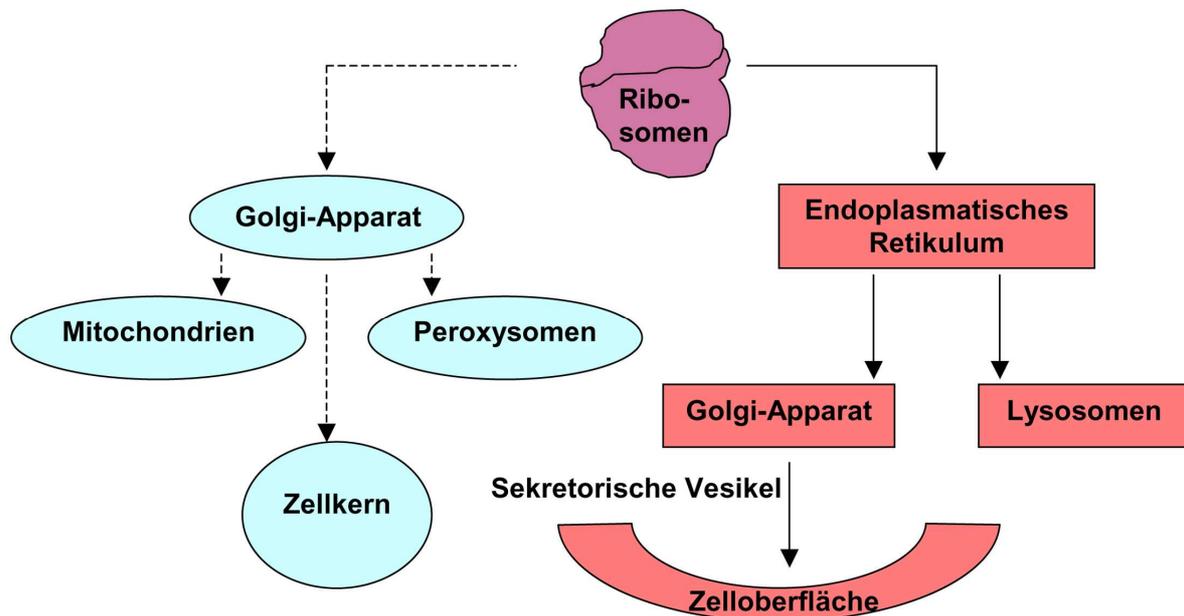


Abbildung 4: Die intrazelluläre Zielsteuerung von Proteinen.

Abhängig von ihrer Funktion können Proteine nach ihrer Synthese zwei Wege einschlagen. Liegt ihr Bestimmungsort innerhalb der Zelle, so verbleiben sie im Zytoplasma oder werden durch Signalmerkmale in die Mitochondrien, Peroxysomen oder in den Zellkern transportiert (gestrichelte Pfeile). Sekretorische Proteine werden über das ER, den Golgi-Apparat und sekretorische Partikel aus der Zelle ausgeschleust. Fehlerhafte Proteine werden in Lysosomen entsorgt (durchgezogene Pfeile).

Die Zielsteuerung der Proteine wird durch bestimmte Sortiermerkmale geleitet. Man unterscheidet bei derartigen Signalen auf Peptidebene zwei Arten solcher Sortiermerkmale: terminale Signalpeptide und Signaldomänen.

Signalpeptide im klassischen Sinne sind kurze Aminosäuresequenzen am N-Terminus eines neu synthetisierten Polypeptids. Diese Signalsequenzen lenken, ohne dass sie weiter kovalent modifiziert werden, ein Protein zu seinem Bestimmungsort, wie z.B. ins ER oder in die Mitochondrien, und werden während des Transportes oder kurz danach entfernt. Ein Beispiel für eine C-terminale Signalsequenz ist das CAAX-Motiv, das u.a. für die Isoprenylierung von Laminen verantwortlich ist. Hierbei handelt es sich nicht um klassische Signalpeptide, da sie für ihre Funktion kovalent modifiziert werden müssen. Die Isoprenylierung ist essentiell für die Assoziation von B-Typ Laminen mit der inneren Kernmembran (Kitten and Nigg 1991). Andere Membranzielsteuerungssignale, die kovalent in Proteine eingeführt werden, sind die N-terminale Myristoylierung, die C-Terminus nahe Palmitoylierung und die Glykosylierung (Stryer 1999) sowie der Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, der Proteine an die

äußere Schicht der Plasmamembran koppelt (Caras et al. 1989). 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 zur Translokation in bestimmte Zellkompartimente. Signaldomänen, die den Import eines Proteins in den Zellkern mediiieren, werden Kernlokalisierungssignale (nuclear localization signals, NLS) genannt. Aber auch die Zielsteuerung zu intrazellulären Substrukturen, wie z.B. den Filamentstrukturen F-Aktin und Mikrotubuli, wird über Signaldomänen gesteuert, die Aktinbindungsdomänen (ABD) bzw. Mikrotubuli assoziierende Domänen (MAD) genannt werden.

1.3.2 Proteinzielsteuerung zu Aktin

Das Zytoskelett einer eukaryotischen Zelle wird aus Aktinmikrofilamenten, Mikrotubuli und intermediären Filamenten gebildet. Die wichtigste Eigenschaft von Aktin ist seine Fähigkeit in Abwesenheit von Motorproteinen Bewegung erzeugen zu können. Aktin ist eine ATPase, die bei niedriger Ionenstärke als 42-kD-Monomer vorliegt, das wegen seiner globulären Gestalt G-Aktin genannt wird. Bei physiologischer Ionenstärke polymerisiert G-Aktin zu einer Faserform, dem filamentösen Aktin (F-Aktin, (Stryer 1999)). Vor gut 40 Jahren beschrieben Hanson und Lowy erstmals die helikale Struktur von F-Aktin. In diesem Modell kann es entweder als eine einfache linksgewundene Helix aus Monomeren angesehen werden oder als eine rechtsgewundene Doppelhelix (**Abbildung 5A**).

Obwohl bis heute bereits über 160 Aktin bindende Proteine (ABPs) identifiziert werden konnten, wurden nur wenige ABDs beschrieben wie z.B. die CH-Domäne (Calponin homologe Domäne), die Gelsolin homologe Domäne, die WH2-Domäne (WASP homologe Domäne 2), die ADF-H-Domäne (ADF homologe Domäne) und das I/LWEQ Modul (Dominguez 2004, Lappalainen et al. 1998, McCann and Craig 1999, Paunola et al. 2002).

Abbildung 5B veranschaulicht die Kristallstruktur der ABD von Cofilin aus der Hefe. Sie ist eine ADF-H-Domäne, bestehend aus einem gemischten β -Faltblatt, welches zwischen zwei Paaren von α -Helices liegt (Lappalainen et al. 1998). **Abbildung 5C** zeigt Severin, das Hefehomolog von Gelsolin in seiner inaktiven Form. Das Protein besteht aus zwei homologen Tandemsequenzen (Segment 1-3 und 4-6), die beide dreifache Wiederholungen aus einem vierfachen β -Faltblatt zwischen zwei α -Helices enthalten. Die N-terminale Hälfte des Proteins kann zwei Aktinmonomere binden und in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen F-Aktin spalten. Der C-Terminus hingegen besitzt eine Ca^{2+} abhängige Aktinbindungsstelle (Dos Remedios et al. 2003).

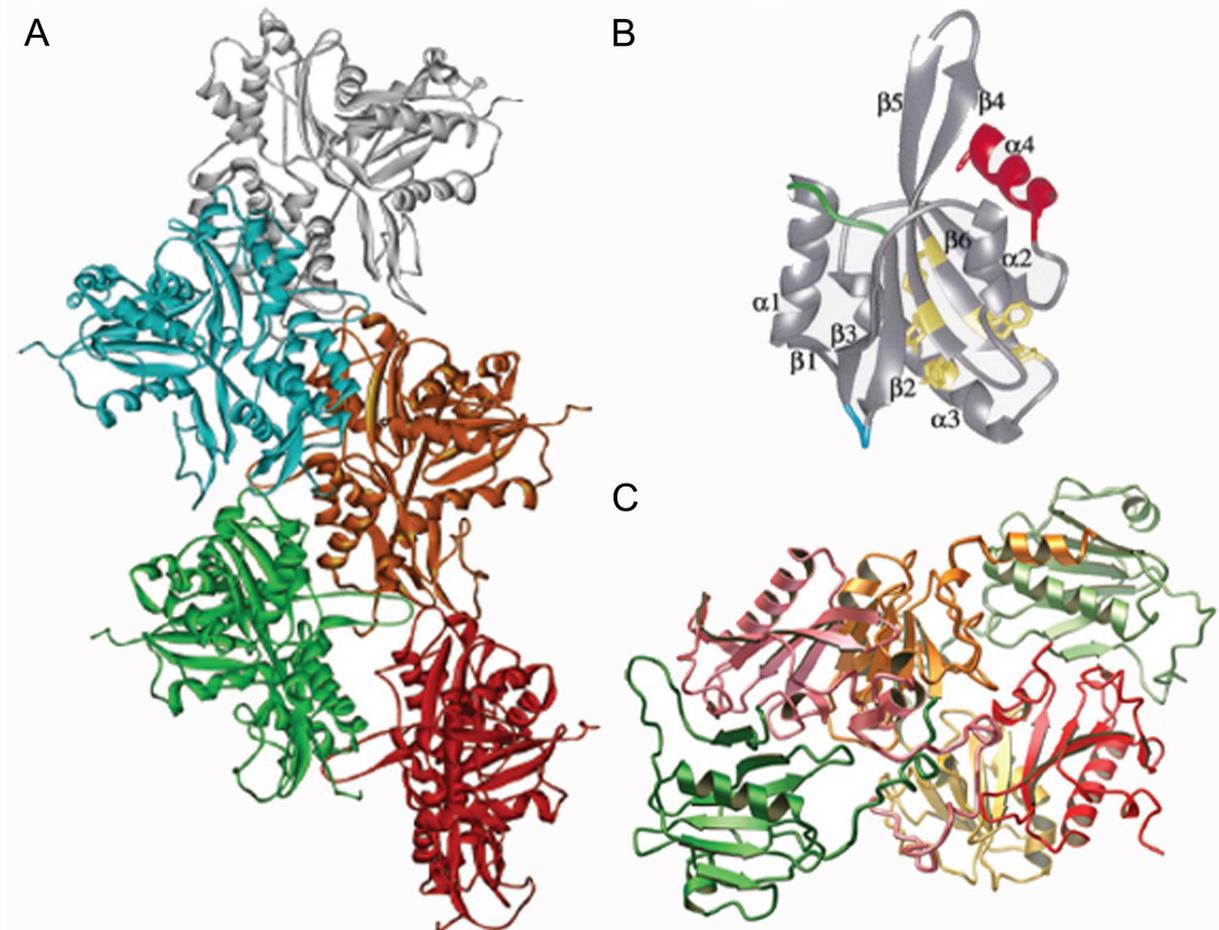


Abbildung 5: Kristallstrukturen von F-Aktin und Aktinbindungsdomänen.

(A): Das Holmes Modell für F-Aktin als rechtsgewundene Doppelhelix (Holmes et al. 1990).

(B): Kristallstruktur der ADF-H Aktinbindungsdomäne des Aktin bindenden Proteins Cofilin. Insertionen im Säugerhomolog des Proteins sind blau und grün markiert. Eine im Vergleich zu Twinfilin abweichende Helix wurde rot gekennzeichnet (Lappalainen et al. 1998).

(C): Kristallstruktur der CH Aktinbindungsdomäne von Severin, dem Hefehomolog des Aktin bindenden Proteins Gelsolin (Dos Remedios et al. 2003).

Die meisten der Aktin bindenden Proteine haben Aufgaben in Bildung, Vernetzung oder Bündelung und Abbau von F-Aktin und werden nach ihrer Funktion in sieben Gruppen unterteilt (**Abbildung 6**, (Dos Remedios et al. 2003)).

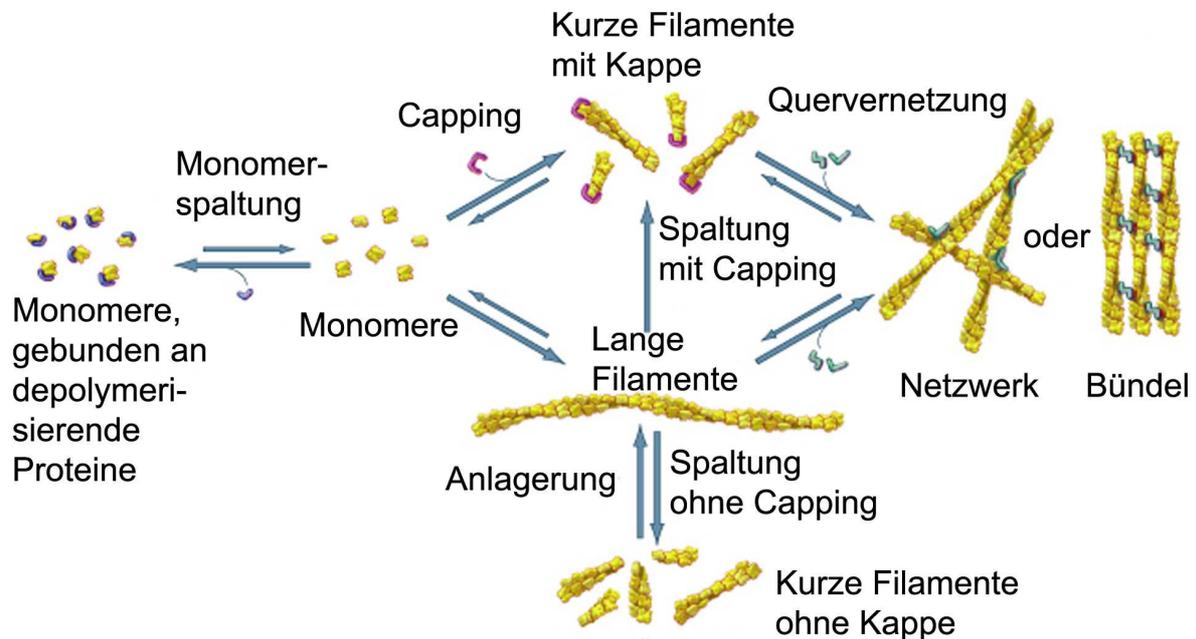


Abbildung 6: Die sieben Gruppen von F-Aktin bindenden Proteinen und ihre Funktionen.

- 1) Filament endbindende Proteine (capping proteins), die die Enden von F-Aktin binden und den Austausch von Monomeren verhindern (z.B. Tropomodulin).
- 2) Quervernetzungsproteine (branched nucleation), die mindestens zwei Aktinbindungsdomänen besitzen und so die Bildung von Filamentbündeln, verzweigten Filamenten und dreidimensionalen Netzwerken unterstützen (z.B. der Arp 2/3 Komplex, Abp1, Coronin).
- 3) Stabilisierungsproteine (bundling proteins), die an F-Aktin binden und so die Depolymerisierung verhindern, (z.B. Tropomyosin, Caldesmon, Fimbrin) oder die Polymerisierung fördern (z.B. Profilin).
- 4) Monomerbindepoteine (monomer sequestering proteins), die G-Aktin stabilisieren und „abkapseln“ und so seine Polymerisierung verhindern (z.B. Twinfilin, Thymosin β 4, Gelsolin).
- 5) Filament depolymerisierende Proteine (depolymerizing proteins), die die Umwandlung von F- zu G-Aktin induzieren (z.B. Cofilin, CapZ).
- 6) Filament auflösende Proteine (severing proteins), die die Durchschnittslänge der F-Aktinfilamente verkürzen, indem sie sie in zwei Teile schneiden (z.B. Gelsolin).
- 7) Motorproteine, die F-Aktin als „Gleise“ zur Fortbewegung nutzen (z.B. die Motorproteine der Myosinfamilie, wie Myosin Typ I).

1.3.3 Zielsteuerungsmechanismen für den Transport von Makromolekülen zwischen Kern und Zytoplasma

Intrazelluläre Zielsteuerungsmechanismen von biologischen Makromolekülen sind unerlässlich für den koordinierten Ablauf aller lebensnotwendiger Reaktionen in tierischen Zellen. Erst die Abtrennung des Zellkerns vom Zytoplasma ermöglichte die Entwicklung höher organisierter multizellulärer Lebewesen mit weit über 5000 Genen, dem häufig beobachteten Maximum bei Bakterien. Deshalb ist das Vorhandensein von Zellkompartimenten das Hauptcharakteristikum tierischer Zellen. Eukaryoten sind in der Lage, eine weit größere Vielfalt an genetischer Information zu organisieren als Prokaryoten, deren DNA wesentlich einfacher strukturiert ist. Das Fehlen einer Kernhülle erlaubt hier offensichtlich nahezu keine Organisation der Gene in Introns und Exons. Die Kompartimentierung ermöglicht außerdem die Regulation zellulärer Schlüsselreaktionen auf einem für Prokaryoten unerreichbaren Niveau, z.B. durch den kontrollierten Zugang von Transkriptionsregulatoren zum Chromatin. Diese evolutionären Vorteile erforderten aber auch die Entwicklung zahlreicher komplexer Transportsysteme und die Aufwendung von chemischer Energie für den aktiven Transport zwischen Kern und Zytoplasma durch die Poren der Kernhülle. Alle nukleären Proteine, Chromatinstrukturproteine, Enzyme des Polynukleotidstoffwechsels sowie Transkriptionsfaktoren müssen aus dem Zytoplasma in den Kern importiert werden.

Kernexportsysteme mussten für makromolekulare Polynukleotide wie transfer RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA) und Boten-RNA (mRNA) entwickelt werden, da sie nach ihrer Produktion im Kern ins Zytoplasma gebracht werden müssen, um ihre Aufgaben in der Translation erfüllen zu können. Die Organisation dieser gewaltigen Umverteilung zellulärer Ressourcen bedingt den nukleozytoplasmatischen Transfer von hundert bis zweihundert unterschiedlichen Proteinen (Gorlich and Kutay 1999).

1.3.3.1 Fundamentale Aspekte des nukleozytoplasmatischen Transports

Mit Ausnahme der kurzen Perioden, in denen die Kernmembran während der Mitose zusammenbricht, muss jeglicher Transport zwischen Kern und Zytoplasma über die Kernporenkomplexe (nuclear pore complexes, NPC) stattfinden (Allen et al. 2000, Ryan and Wente 2000). Humane Zellen besitzen durchschnittlich ~ 4000 NPCs, diese Zahl variiert aber abhängig von der Größe der Zelle, dem Niveau der Proteinbiosynthese und der Proliferationsaktivität. NPCs von Vertebratenzellen zeigen eine achtfache Rotationssymmetrie, sind große, ~ 125 MDa Strukturen, eingebettet in die Kernmembran, aus

der sie ca. 100 nm mit ihrer Korbstruktur in den Zellkern ragen. Acht Fibrillen stehen ~ 50 nm in das Zytoplasma hinein. Diese Verlängerungen des NPC fungieren als initiale Bindungsstellen während des nukleozytoplasmatischen Transports. Für die Hefe sind rund 30 Proteine bekannt, die den NPC bilden (Rout et al. 2000). Sie werden Nukleoporine (Nups) genannt. In Metazoen bestehen die NPCs aus mehr als 50 Komponenten (Cullen 2003) (**Abbildung 7**). Die meisten Nukleoporine sind dauerhaft am NPC lokalisiert, einige aber sind mobil und interagieren mit Transportfaktoren, bevor diese den NPC passieren. Eine Reihe von Nukleoporinen enthält sogenannte FG-Sequenzen (Phenylalanin-Glycin-Sequenzen), die als hydrophobe Bindungsstellen für nukleozytoplasmatische Transportfaktoren fungieren. Der NPC besitzt einen hydrophilen Kanal von 9 nm Durchmesser im Ruhezustand, der aber während des Transportes auf 25 nm vergrößert werden kann. Die Tatsache, dass der Kanal immer partiell geöffnet ist, bedeutet, dass kleine Proteine bis zu einer Größe von 40 kD und kleine RNAs wie tRNAs und snRNAs durch passive Diffusion durch die NPCs gelangen können. Dieser Prozess ist aber sehr ineffektiv, weshalb auch diese kleineren Makromoleküle aktiv transportiert werden (Breeuwer and Goldfarb 1990, Zasloff 1983)

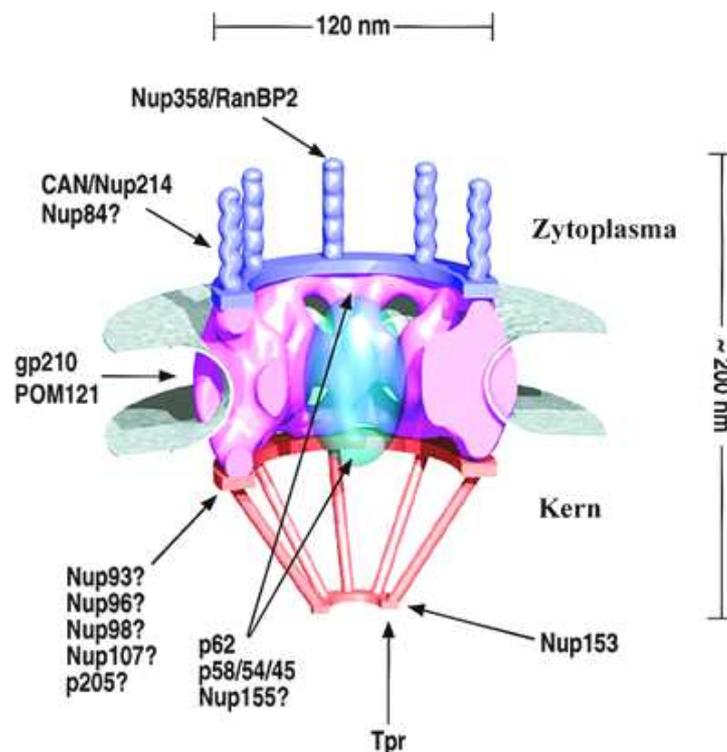


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes einer eukaryotischen Zelle (Nakielny and Dreyfuss 1999).

1.3.3.1.1 Nukleäre Importsysteme und Exportsysteme

Der zelluläre nukleozytoplasmatische Transport der meisten Proteine, ribosomaler Untereinheiten und vieler RNAs wird von einer großen, hochkonservierten Gruppe von Transportfaktoren mediiert, der Karyopherin- β Familie. Die meisten Karyopherine vermitteln entweder den nukleären Import (auch Importine genannt) oder den Kernexport (auch Exportine genannt). Nahezu alle Importine binden direkt an die meist basischen NLS der zu transportierenden Frachtproteine (engl. cargo proteins). Solche NLS wurden in Histonen (Mosammaparast et al. 2002, Mosammaparast et al. 2001, Muhlhauser et al. 2001) und ribosomalen Proteinen (Jakel and Gorlich 1998) identifiziert, und sowohl das Arginin/Glycin reiche NLS einiger RNA-Bindeproteine (Leslie et al. 2004, Senger et al. 1998) als auch das 38 Aminosäuren umfassende Glycin reiche NLS M9 des RNP Proteins A1, ohne basische Reste, werden durch Karyopherin- β erkannt (Pollard et al. 1996).

Einige Karyopherine benötigen Adapterproteine, um das Frachtprotein transportieren zu können. Das am besten charakterisierte Adapterprotein Karyopherin- α (auch Importin- α genannt) formt eine Superhelix, bestehend aus zehn Armadillo (ARM)-Wiederholungen, die eine Bindungstasche für das NLS des Frachtproteins bildet (Conti et al. 1998, Kobe 1999). Dabei erfolgt die Erkennung des NLS durch Interaktionen mit Karyopherin- α , die sowohl auf Ladung als auch auf Hydrophobizität beruhen (Conti and Kuriyan 2000, Conti et al. 1998, Fontes et al. 2003, Fontes et al. 2000, Kobe 1999).

Kernimportfaktoren der Karyopherinfamilie binden ihr Frachtprotein im Zytoplasma durch Erkennung des NLS (**Abbildung 8B**). Der Karyopherin/Fracht-Komplex wird unter Interaktion des Karyopherin- β mit den FG-Wiederholungen der Nups, bestehend aus mehreren FxFG- und GLFG-Motiven, transportiert (Bayliss et al. 2002, Cullen 2003). Im Kern erfolgt die Bindung von RanGTP, woraufhin das Frachtprotein auf eine Konformationsänderung des Importins hin entlassen wird. Anschließend verlässt Karyopherin- β eigenständig den Kern, Karyopherin- α wird durch das Exportin CAS wieder in das Zytoplasma exportiert (**Abbildung 8C**). Ein wichtiges Charakteristikum der meisten Karyopherine ist ihre Abhängigkeit von der biologischen Aktivität eines Schlüsselcofaktors, der kleinen GTPase Ran (Allen et al. 2000, Gorlich and Kutay 1999, Nakielny and Dreyfuss 1999). Das Ran spezifische GTPase aktivierende Protein (Ran-specific GTPase-activating protein, RanGAP) befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran, wo es RanGTP zu RanGDP hydrolysiert. Der Ran spezifische Guaninnukleotidaustauschfaktor (Ran-specific guaninenucleotide-exchange factor, RanGEF) ist im Zellkern an Chromatin lokalisiert und sorgt dort für den Austausch von RanGDP zu RanGTP. Dies führt dazu, dass

zytoplasmatisches Ran vornehmlich in seiner inaktiven, GDP bindenden Form vorliegt, während nukleäres Ran hauptsächlich mit GTP assoziiert vorkommt. Auf diese Weise entsteht ein Konzentrationsgradient für RanGTP von nukleär nach zytoplasmatisch.

Der Kernimport von RanGDP wird durch den Kerntransportfaktor 2 (nuclear transport factor, NTF2) vermittelt (**Abbildung 8A**). Die Bindung von RanGDP findet in der Switch II Region statt, die sich von RanGTP unterscheidet. Die schnelle Translokation des NTF2/RanGDP-Komplexes aus dem Zytoplasma in den Kern ist möglich, weil NTF2, wie die Karyopherine, direkt (und mit niedriger Affinität) mit FG-Wiederholungen von Nukleoporinen interagiert.

Der Kernexport NES tragender Proteine wird durch das Karyopherin Crm1 vermittelt. Der ternäre Komplex aus Crm1, Frachtprotein und RanGTP verlässt den Kern ebenfalls durch Interaktion mit dem NPC und zerfällt nach der Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP im Zytoplasma (**Abbildung 8D**).

Auf die essentielle Rolle von Crm1 im RNA-Export und anderer RNA-Transportmechanismen wird in **Kapitel 1.3.4** näher eingegangen.

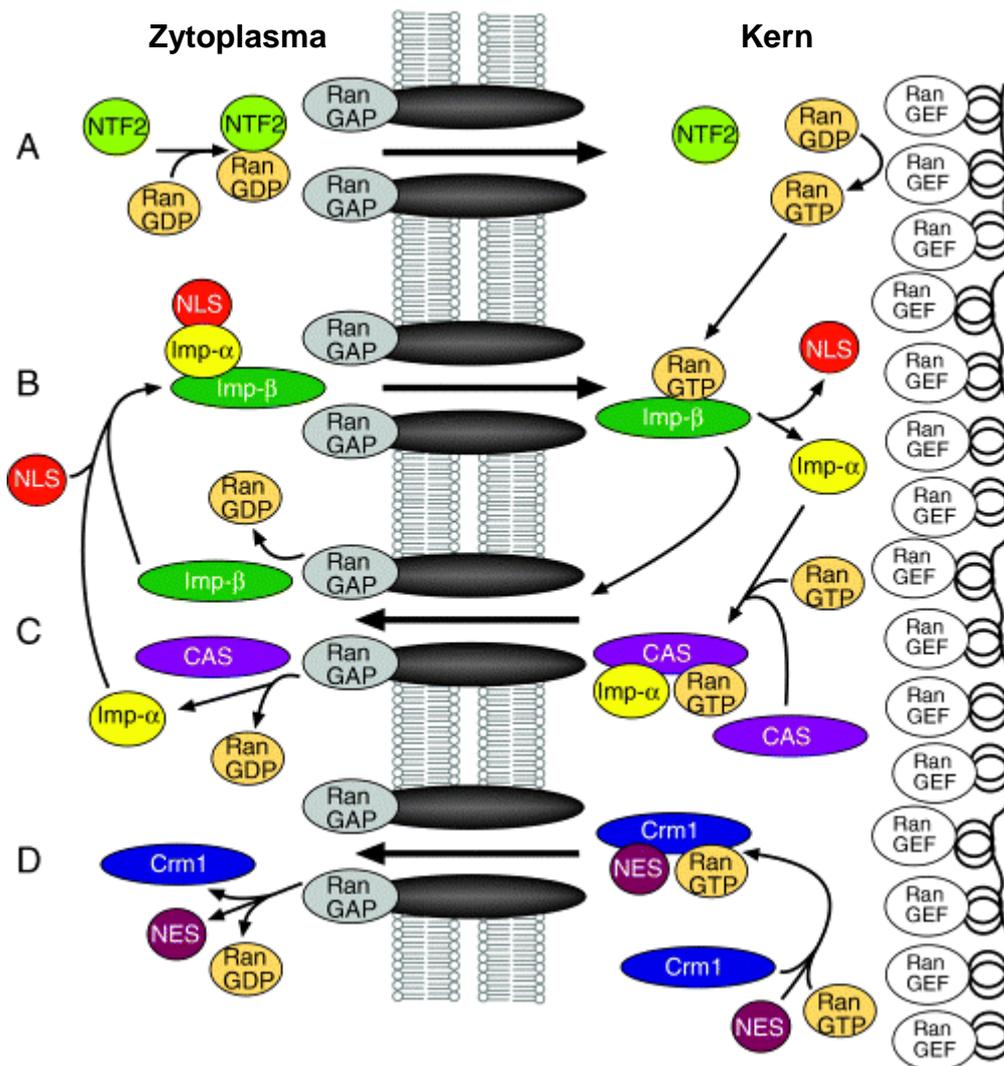


Abbildung 8: Überblick über die wichtigsten nukleären Import- und Exportmechanismen für Proteine in tierischen Zellen.

(A): NTF2 (nuclear transport factor 2) vermittelter nukleärer Import von RanGDP. (B): Nukleärer Import von NLS tragenden Frachtproteinen, mediiert durch das Karyopherin- α /Importin- β 1-Heterodimer (abgekürzt imp- α und imp- β). (C): Nukleärer Export von Importin- β 1 und Karyopherin- α . Letzterer benötigt CAS als Exportrezeptor. (D): Nukleärer Export von NES tragenden Frachtproteinen, vermittelt durch Crm1. RanGAP liegt gebunden an der zytosolischen Seite des NPCs vor, RanGEF ist am Chromatin lokalisiert (Pemberton and Paschal 2005).

1.3.3.1.2 Kernexport und Kernimport vermittelnde Signalbereiche

Viele Frachtproteine, die aus dem Kern exportiert werden sollen, besitzen ein klassisches Leucin reiches Kernexportsignal (nuclear export signal, NES), welches die Erkennung und Bindung durch Exportine ermöglicht. Die Konsensussequenz dieses NES wird folgendermaßen definiert: L-X(2-3)-[LIVFM]-X(2-3)-L-X-[LI] (Bogerd et al. 1996, Ohno et al. 1998). **Abbildung 9** stellt diese Konsensussequenz als Sequenzlogo dar.

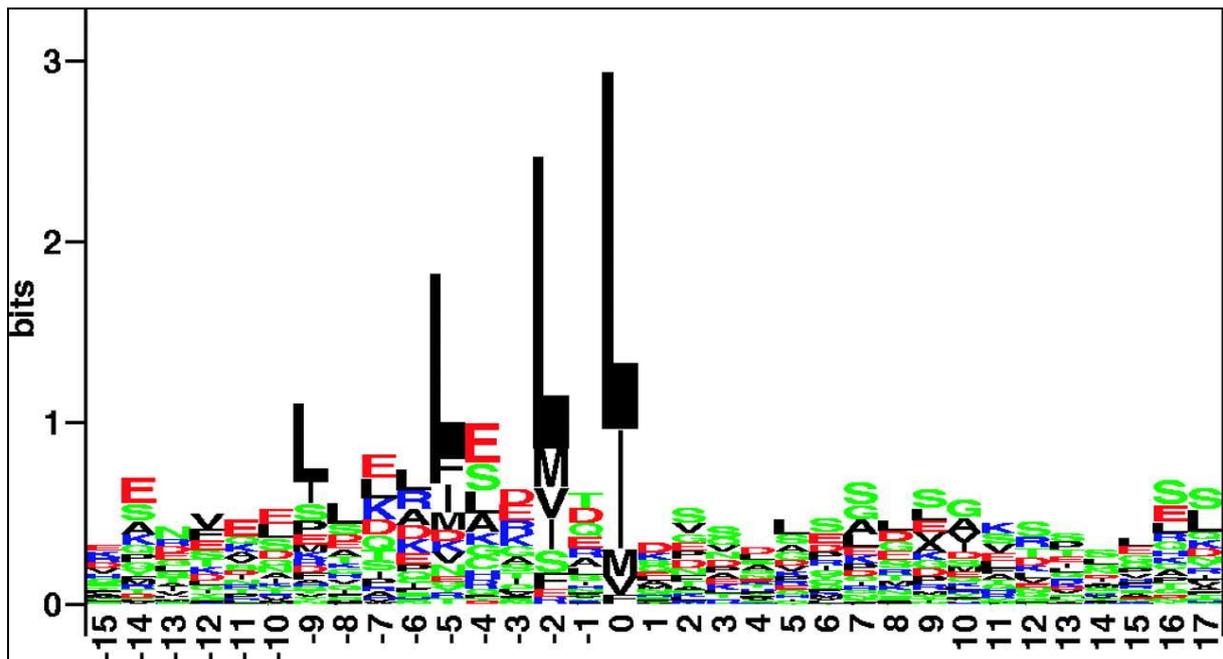


Abbildung 9: Sequenzlogo zur Darstellung der Konsensussequenz Leucin reicher Kernexportsignale.

Sequenzlogo von 67- experimentell verifizierten Leucin reichen NES. Die Größe der Buchstaben gibt die relative Häufigkeit der entsprechenden Aminosäuren an einer bestimmten Position innerhalb einer Sequenz an. Auf diese Weise veranschaulichen Sequenzlogos Konsensussequenzen in alignierten Aminosäuresequenzen. Die vier groß dargestellten Leucine sind die charakteristischen Aminosäuren für Leucin reiche NES (la Cour et al. 2004).

Eine Vielzahl von Proteinen, die in den Zellkern transportiert werden müssen, besitzen ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS), welches von den Importinen erkannt und gebunden wird. Das kanonische monopartite NLS zeichnet sich durch eine Anhäufung basischer Aminosäuren (Lysin, K und Arginin, R) aus, bipartite NLS tragen zwei solcher basischen Sequenzen, welche durch eine Verbindungssequenz aus beliebigen Aminosäuren getrennt sind. Der Prototyp des monopartiten NLS ist die sieben Aminosäuren umfassende kanonische NLS-Sequenz des großen T-Antigens von SV40 (PKKKRKV). Hieraus wurden folgende Konsensussequenzen abgeleitet: **(R/K)(R/K)(R/K)((R/K)/H/P)** oder **P-X(3)-(R/K)(R/K)(R/K)(X/R/K)**. Ein Beispiel für ein bipartites NLS liefert das Kernlokalisierungssignal von Nukleoplasmin: **KRPAATKKAGQAKKKK**. Hier lautet die Konsensussequenz **(KRR-X(10)-KR)**. Inzwischen wurde eine Vielzahl nicht-kanonischer basischer NLS identifiziert, die keiner Konsensussequenz folgen, für deren Funktionalität aber ebenfalls Anhäufungen basischer Aminosäuren essentiell sind (Christophe et al. 2000). Das NLS von c-Myc (PAAKRVKLD) z.B. enthält innerhalb von neun Aminosäuren nur drei basische Reste und sogar einen sauren. Die Wichtigkeit saurer und neutraler Reste in der Umgebung von NLS wird ebenfalls diskutiert. So kann die als NLS inaktive Sequenz KKKK

durch Flankierung mit spezifischen neutralen und sauren Resten aus der c-Myc-Sequenz in ein aktives NLS überführt werden (Makkerh et al. 1996).

Die humane DNA Topoisomerase besitzt neben einem kanonischen basischen NLS ein neuartiges saures NLS, das allein hinreichend ist, um das Enzym in den Kern zu transportieren. Die Kernimportaktivität dieses NLS erfordert zwei saure Reste innerhalb der Sequenz DEDDAD (Mo et al. 2000).

In einigen RNA-Bindeproteinen wurden Arginin und Glycin reiche NLS identifiziert (**Abbildung 10**). Der Kernimport von Npl3p benötigt ein RGG-Fragment der folgenden Konsensussequenz: RGG-(X)₃₋₅-RGDYGP. Zusätzlich muss ein nicht-repetitiver Abschnitt von 18 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins vorhanden sein, damit das Protein erfolgreich in den Kern transportiert werden kann (Senger et al. 1998).

Der Kernimport des humanen RNP Proteins A1 wird durch eine spezifische Domäne vermittelt, die M9 genannt wird. Dieses Proteinfragment, das 38 Aminosäuren umfasst, mediiert nicht nur den nukleären Import von A1, sondern auch den Kernexport des Proteins. Derartige Domänen, die den nukleozytoplasmatischen Transport von RNA-Bindeproteinen vermitteln, werden Pendeldomänen (shuttling domains, SDs) genannt. M9 ist reich an Glycinen und enthält keine basischen Reste. Ein GMP-Triplett ist essentiell für eine effiziente Transportaktivität der M9-Domäne (Pollard et al. 1996). Das humane mRNA-Exportprotein Gle1 besitzt eine SD, die geringe Ähnlichkeiten mit M9 aufweist, der aber die GMP-Sequenz fehlt (**Abbildung 10**, (Kendirgi et al. 2003)). Für den Kernimport des RNA-Bindeproteins hnRNP K wird kein bekannter Importrezeptor benötigt. Die SD von hnRNP K, KNS genannt, fungiert unabhängig von Importin und Transportin (Michael et al. 1995, Michael et al. 1997). Die vierte bisher bekannte SD wurde im RNA-Bindeprotein HuR identifiziert und als HNS bezeichnet (**Abbildung 10**, (Fan and Steitz 1998)).

Das RNP Protein hRNP C gehört zu einer Gruppe von prä-mRNA assoziierten Proteinen, die in Zellen während der Interphase strikt im Kern verbleiben. hRNP C wird dabei nicht im Kern zurückgehalten, weil es kein NES besitzt, sondern weil sein NES von einem nukleären Retentionssignal (nuclear retention signal, NRS) maskiert wird (Nakielny and Dreyfuss 1996).

Pendeldomänen (shuttling domains, SDs)

hGle1 (SD) IFDKIHSLLSGKPVQSGGSSVSVTLNPQGLDFVQYKLAE

hnRNP A1 (M9) SQSSNFGPMKGGAFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQQGY

hnRNP K (KNS) GFSADETWDSAIDTWSPSEWQMAY

HuR (HNS) RRFGGPVHHQAQRFRFSPMGVDHMSGLSGVNVP

Alignment der SD von hGle1 mit der SD M9 von hnRNP A1

hnRNP A1 (M9) SQSSNF^{***}GPMKGGAF--GGRSSG-PYGGGGQYFAKPRNQQGY

hGle1 (SD) IFDKIHSLLSGKPVQSGGSSVSVTLNPQGLDFVQYKLAE--

Abbildung 10: Die Aminosäuresequenzen nukleozytoplasmatischer Pendeldomänen.

Gezeigt werden die Aminosäuresequenzen der Arginin und Glycin reichen Pendeldomänen (shuttling domains, SDs) der RNA-Bindeproteine hGle1 (SD), hnRNP A1 (M9), hnRNP K (KNS) und HuR (HNS). Unten: Vergleich der SDs von A1 und Gle1. Die Gle1 SD zeigt geringe Ähnlichkeiten mit M9 (Kästchen), es fehlt aber die für den effizienten nukleozytoplasmatischen Transport von A1 essentielle GMP-Sequenz (Sternchen), Arginine sind violett, Glycine rot markiert. Abbildung modifiziert nach (Kendirgi et al. 2003).

1.3.4 Transport und Zielsteuerung von RNA

Viele verschiedene Typen von RNA müssen aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert werden. Hierzu gehören die Transkripte, die von den folgenden Polymerasen synthetisiert werden: Transkripte der RNA Polymerase I (Pol I; große rRNAs), Polymerase II (Pol II; mRNAs, einige uridinreiche kleine Kern-RNAs (U snRNAs)) und Polymerase III (Pol III; tRNAs, 5S rRNAs und die meisten U snRNAs). Bei dem nukleären Export nahezu aller Arten von RNA spielen die Karyopherine eine große Rolle.

1.3.4.1 Mit RNA-Transport assoziierte nukleozytoplasmatische Pendelproteine

Nukleozytoplasmatische Pendelproteine (engl. nucleocytoplasmic shuttling proteins), die mit RNA-Transport verbunden sind, können in vier Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe wird von mRNA-Bindeproteinen gebildet, die ein NES besitzen, wie z.B. RNA-Bindeprotein A1 (Npl3p/Nop3p in Hefe, (Rebane et al. 2004)), mGle1 (Gle1p in Hefe, (Watkins et al. 1998)), Yra1/ALY (Yra1p in Hefe, (Maniatis and Reed 2002)) und TAP (Mex67p in Hefe), das mit p15/NXT1 assoziiert ist (Katahira et al. 2002). Diese Proteine repräsentieren die

mRNA-Exporter. In Hefe ist Gle1p assoziiert mit der RNA Helikase Dbp5p/Rat8p, die ihrerseits auch ein Pendelprotein ist, das mit mRNA assoziiert und deren Sekundärstruktur während des Exportes entfaltet wird (Dbp5 im Menschen, (Zhao et al. 2002)). Dbp5 interagiert mit Rat7p/Nup159p (Hodge et al. 1999). Der nukleäre Export dieser NES tragenden mRNA-Transporter im allgemeinen ist von Crm1/Exportin 1 abhängig, welches durch das Ran-bindende Protein 1 (RanBP1) und Kerntransportfaktor 2 (NTF2) stimuliert wird (Englmeier et al. 1999).

Die zweite Gruppe wird von den Cap bindenden Proteinen gebildet, die ebenfalls in den mRNA-Export involviert sind. Zwei Mitglieder dieser Proteinfamilie sind CBP80 und CBP20 (Maniatis and Reed 2002).

Die dritte Gruppe der Pendelproteine interagiert mit den mRNA-Exportern, um diese, nach ihrer Produktion im Zytoplasma, in den Kern zu importieren, damit sie dort ihre Aufgabe erfüllen können. RNA-Bindeproteine, die ein NLS besitzen, können von Kopplungsproteinen des NPC gebunden werden, die die Interaktion mit diesem Komplex vermitteln. Ein Protein der Größe 54/56 kD, welches direkt an das NLS bindet, ist bekannt als NLS-Rezeptor/Importin- α /Karyopherin- α /PTAC58 in Vertebraten und als SRP1 in Hefe (Maniatis and Reed 2002). Ein hiermit interagierendes 97-kD-Protein, welches den Rezeptor und das NLS-tragende Protein an den NPC koppelt, wird p97/Importin- β /Karyopherin- β /PTAC97 in Vertebraten bzw. Kap95p in Hefe genannt (Maniatis and Reed 2002). Transportin 1 (Kap 104p in Hefe) kann sein Frachtprotein, z.B. RNP A1, direkt binden und ohne Interaktion mit einem Karyopherin- α aus dem Kern in das Zytoplasma transportieren, wo A1 nach Bindung von RanGTP an Transportin entlassen wird (Izaurrealde and Adam 1998). Kap121p/Pse1p und Kap123p sind Rezeptoren für den Import ribosomaler Proteine in der Hefe (Rout et al. 1997). Ein putatives humanes Homolog namens RanBP7 wurde bereits beschrieben, eine essentielle Rolle in einem Importprozess wurde jedoch nicht nachgewiesen (Gorlich et al. 1997).

Die vierte Gruppe der nukleozytoplasmatischen RNA transportierenden Pendelproteine sind Spleißfaktoren, die in der Lage sind den Kern zu verlassen. Spleißfaktor U2AF bindet direkt an TAP (Zolotukhin et al. 2002). Aly interagiert mit dem Spleißfaktor UAP (Sub2 in Hefe, (Maniatis and Reed 2002)). Serin/Arginin reiche Proteine (SR-Proteine) wie ASF fungieren als Spleißfaktoren für Vorläufer-mRNA (prä-mRNA) und können als Adaptoren für den mRNA-Export wirken (Lai and Tarn 2004). Das Zusammenspiel all dieser Proteine im RNA-Export hängt von der Art der zu exportierenden RNA ab. Aber auch Umwelteinflüsse wie Stress können Art und Anzahl der am RNA-Transport beteiligten Proteine beeinflussen.

Die vier Gruppen nukleozytoplasmatischer Pendelproteine, die mit RNA-Transport assoziiert sind			
Mammalia	Bindungspartner	Hefe	Bindungspartner
1. Gruppe: RNA-Bindeproteine			
RNA-Bindeprotein RNP A1		Npl3p/Nop3p	Rat8p
Gle1	RNA Helicase Dbp5, NUP155, Nab2, Gfdl	Gle1p/Rss1p	Dbp5p, Gfd1
Yra1/ALY	mRNA, SR-Proteine wie 9G8, ASF/SF2, SRp20, UAP56	Yra1p/Aly	Sub2, Np13p
TAP/NXF1	p151, p152, NXT1/p15, NXT2 und Homologe, NUP62, E1B-AP5	Mex67p	Mtr2p, spNup159, spNup98
NXF2	MAP, U2AF		
TFIIla	tRNA, 5SRNA		
2. Gruppe: Cap bindende Proteine (CBP)			
CBP80	5' Cap von mRNA, U snRNA, tRNA, CBP20		
CBP20	5' Cap von mRNA, U snRNA, tRNA, CBP80		
3. Gruppe: Import- und Exportproteine			
Karyopherin- α /Importin- α /NLS-Rezeptor/PTAC58	Karyopherin- β , NLS tragende Frachtproteine	SRP1	Kap95p
Karyopherin- β /Importin- β /p97/PTAC97	RanGTP, Karyopherin- α , snurportin, NUP358, RanBP2, RanGAP1	Kap95p	SRP1
Karyopherin- β 2/Transportin1	Ran, RNP A1, TAP	Kap104	
NTF2	Ran		
Crm1/Exportin 1	Ran, Leucin reiche NES tragende Frachtproteine, NTF2, RanBP1	Crm1	
Exportin-t	Ran	Los1	
CAS	Ran	Cse1	
RanBP7	t-RNA	Kap121p/Pse1p	t-RNA
4. Gruppe: Spleißfaktoren			
U2AF	TAP		
UAP56	mRNA, Yra/ALY	Sub2	Aly, mRNA
SR-Proteine z.B. ASF	mRNA, Aly		

Tabelle 1: Übersicht über nukleozytoplasmatische Pendelproteine, die in den RNA-Transport involviert sind.

Synonyme werden durch (/) getrennt. Für Literaturreferenzen siehe Text.

1.3.4.2 Der Crm1 abhängige nukleäre RNA-Export

Das Karyopherin Crm1 vermittelt nicht nur den Kernexport der Mehrzahl aller nukleozytoplasmatischen Pendelproteine, sondern ist auch verantwortlich für den Export einiger U snRNAs, aller rRNAs und einiger mRNAs. **Abbildung 11** veranschaulicht die zentrale Rolle von Crm1 im Export von RNAs.

Die kleinen nukleären Ribonukleoproteinpartikel (snRNPs) sind RNA-Proteinkomplexe, die eine wichtige Rolle beim Spleißen von nukleärer prä-mRNA spielen. Die U snRNA ist eine

Komponente der snRNPs, die im Kern synthetisiert, aus ihm heraus exportiert wird und sich erst im Zytoplasma mit den anderen Komponenten der snRNPs vereint, woraufhin der gesamte Komplex reimportiert wird. Für ihren Export wird die Kappe der U snRNA vom nukleären Kappenbindungskomplex (nuclear cap-binding complex, CBC), bestehend aus CBP20 und CBP80, gebunden. In Metazoen vermittelt der Exportadapter PHAX (phosphorylated adapter for RNA export) die Interaktion dieses Komplexes mit RanGTP gebundenem Crm1 in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsgrades (Ohno et al. 2000).

Außerdem schematisiert **Abbildung 11** die Zusammensetzung und den Export der ribosomalen Untereinheiten. Drei rRNAs (28S, 18S und 5.8S) werden im Kern von Polymerase I als ein einzelnes großes prä-rRNA-Transkript synthetisiert. Anschließend erfolgt die Prozessierung zu den drei reifen rRNAs. Die vierte rRNA, die 5S RNA, wird von Polymerase III hergestellt und erfordert einige posttranslationale Modifikationen. Die 28S, 5.8S und 5S rRNAs werden dann mit 50 ribosomalen Proteinen im Kern, speziell im Nukleolus zur 60S präribosomalen Untereinheit vereint. Die 40S präribosomale Untereinheit wird im Nukleolus aus der 18S rRNA und 33 ribosomalen Proteinen gebildet. Diese werden dann über unterschiedliche Mechanismen in das Zytoplasma exportiert. Der Transportfaktor, der die Interaktion der präribosomalen 60S Untereinheit mit RanGTP-Crm1 vermittelt, heißt Nmd3. Ein entsprechender Faktor für den Export der präribosomalen 40S Untereinheit wurde noch nicht identifiziert. Aufgrund der Größe bzw. des kleinsten Durchmessers der präribosomalen Untereinheiten und des maximalen Durchmessers der Kernpore stellt man sich vor, dass beim nukleären Export dieser Komplex aus rRNA und Proteinen perlschnurartig entrollt durch die Pore transportiert wird.

5S rRNA verlässt normalerweise nur im Komplex mit anderen rRNPs den Kern, außer in Amphibien. Dort fungiert der Transkriptionsfaktor TFIIIA als 5S rRNA Exporter.

tRNAs werden von dem Karyopherin Exportin t (exp-t) RanGTP abhängig exportiert. Der nukleäre Exportmechanismus von adenoviralen RNAs (VA RNA) wird ebenfalls von kleinen uncodierenden RNAs wie der Y RNA, die Teil des humanen Ro RNP ist, und möglicherweise auch von prä-microRNAs genutzt (Cullen 2003).

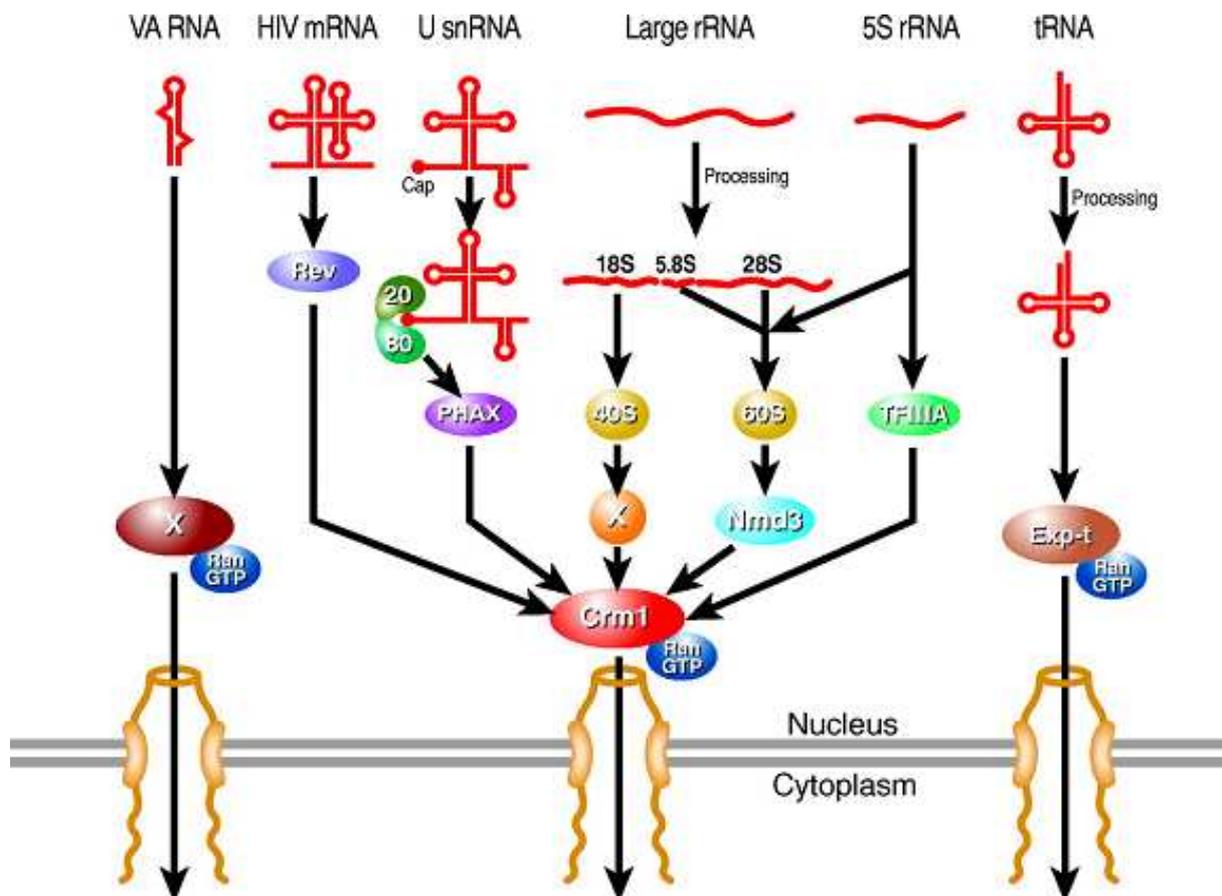


Abbildung 11: Die Karyopherin vermittelten nukleären RNA Exportwege.

Dieses Schema bietet einen Überblick über die Schlüsselfaktoren, die den Kernexport verschiedener Klassen nicht-codierender RNAs sowie einer Minderheit von mRNAs vermitteln. Hypothetische Faktoren, die noch nicht identifiziert wurden, sind mit „X“ gekennzeichnet. Details siehe Text (Cullen 2003).

1.3.4.3 Der nukleäre Export von mRNA

Der nukleäre Export der meisten mRNAs verläuft im Gegensatz zum oben beschriebenen Crm1 vermittelten Export von rRNAs, tRNAs und U snRNAs Ran unabhängig. Der Schlüsselmediator des mRNA-Exports ist stattdessen ein Heterodimer aus dem mRNA-Exporter TAP und einem Cofaktor namens NXT oder p15. TAP (NXF1) ist ein Vertreter der NXF (nuclear export factor)-Familie, die im Menschen etliche Mitglieder umfasst (Yang et al. 2001). Erstmals identifiziert wurde TAP, das nicht zu den Karyopherinen zählt, bei der Untersuchung des Kernexports unvollständig gespleißter mRNA des Retrovirus Mason Pfizer Monkey Virus (MPMV, (Cullen 2003)).

Abbildung 12 veranschaulicht den Kernexport tierischer mRNA und die Entsorgung fehlerhafter mRNAs durch „nonsense mediated decay“ (NMD). Hierzu erfolgt zunächst die Rekrutierung des Spleißfaktors UAP56 an die prä-mRNA, die durch Spleißen bestimmter RNA-Strukturen oder Bildung des 3' poly(A)-Schwanzes initiiert wird. Während der

Formierung des Spleißosoms werden außerdem weitere Spleißfaktoren wie RNPS1 und andere SR-Proteine an die prä-mRNA gebunden (**Abbildung 12a**). UAP56 vermittelt nach dem Spleißen sowohl die Interaktion der reifen mRNA mit NMD-Komponenten wie Y14 und UPF3 als auch mit dem Exportfaktor ALY, welcher in der Lage ist mit dem TAP-NXT-Dimer zu interagieren (**Abbildung 12b**). Alle diese Komponenten bilden einen Komplex, welcher in der Nähe der Exon-Exon-Verbindung mit der mRNA assoziiert ist. Als ein weiterer Bestandteil dieses Komplexes wurde auch der Cap bindende Komplex (cap binding complex, CBC) aus den Cap bindenden Proteinen (cap binding proteins, CBP) CBP80 und CBP20 beschrieben. Die genaue Funktion dieses Komplexes im NMD konnte noch nicht geklärt werden (McKendrick et al. 2001). UAP56 dissoziiert nach dem Spleißen von der mRNA und wird durch das TAP-NXT-Dimer ersetzt. TAP besitzt zwei NPC-Interaktionsdomänen, die eine wichtige Rolle im TAP vermittelten nukleären Export des mRNP durch den NPC spielen (**Abbildung 12c**, (Braun et al. 2002, Kang and Cullen 1999)). Im Zytoplasma entlässt die Exportmaschinerie die mRNA, während der NMD-Komplex zunächst mit der Exon-Exon-Verbindung assoziiert bleibt. Entspricht die mRNA dem Wildtyp, so wird der NMD-Komplex durch das translatierende Ribosom ersetzt. Befindet sich aber durch einen Transkriptions- oder Prozessierungsfehler ein vorzeitiges Stopcodon in der mRNA, so findet ein Translationsarrest statt und die NMD-Maschinerie rekrutiert weitere Komponenten, was zu einem beschleunigten Abbau der mRNA führt (**Abbildung 12d**, (Maniatis and Reed 2002)).

Im Gegensatz zu TAP-NXT ist Aly nicht essentiell für den mRNA-Export, was darauf schließen lässt, dass es einen weiteren bisher unbekanntem Faktor gibt, der in der Lage ist die Rekrutierung des TAP-NXT-Dimers an RNA gebundene UAP56 Moleküle zu vermitteln. Der Großteil aller natürlichen mRNAs wird TAP vermittelt exportiert. Wie dieser Mechanismus aber genau abläuft, bleibt unklar, denn mRNAs besitzen keine offensichtliche Sequenzübereinstimmung, abgesehen vom 5' m⁷G Cap und dem 3' poly(A)-Schwanz. Trotzdem sind diese beiden posttranskriptionalen Modifikationen nicht unbedingt notwendig für den mRNA-Export, wie eine Untersuchung in Oozyten ergab (Jarmolowski et al. 1994). Es wird deshalb vermutet, dass die Bindung des TAP-NXT-mRNA-Exportkomplexes während der Synthese und/oder der posttranskriptionalen Modifizierung stattfindet (Cullen 2003).

Das TAP-NXT-Dimer bindet außerdem das cis-agierende Element CTE (constitutive transporter element) von ungespleißter Intron enthaltender RNA des Mason Pfizer Monkey Virus (MPMV). In eukaryotischen Zellen führt diese Bindung zum Kernexport der MPMV RNA und zu einer erhöhten Expression der Virusproteine (Jin et al. 2003).

In der Hefe ist der Export ungespleißter monoexonischer RNA die Regel. Nur 5% der Hefe-RNAs enthalten Introns. Die mRNA des nukleozytoplasmatischen Pendelproteins Yra1p enthält z.B. ein Intron, das autoregulatorisch auf die Expression des codierten Proteins wirkt (Preker et al. 2002).

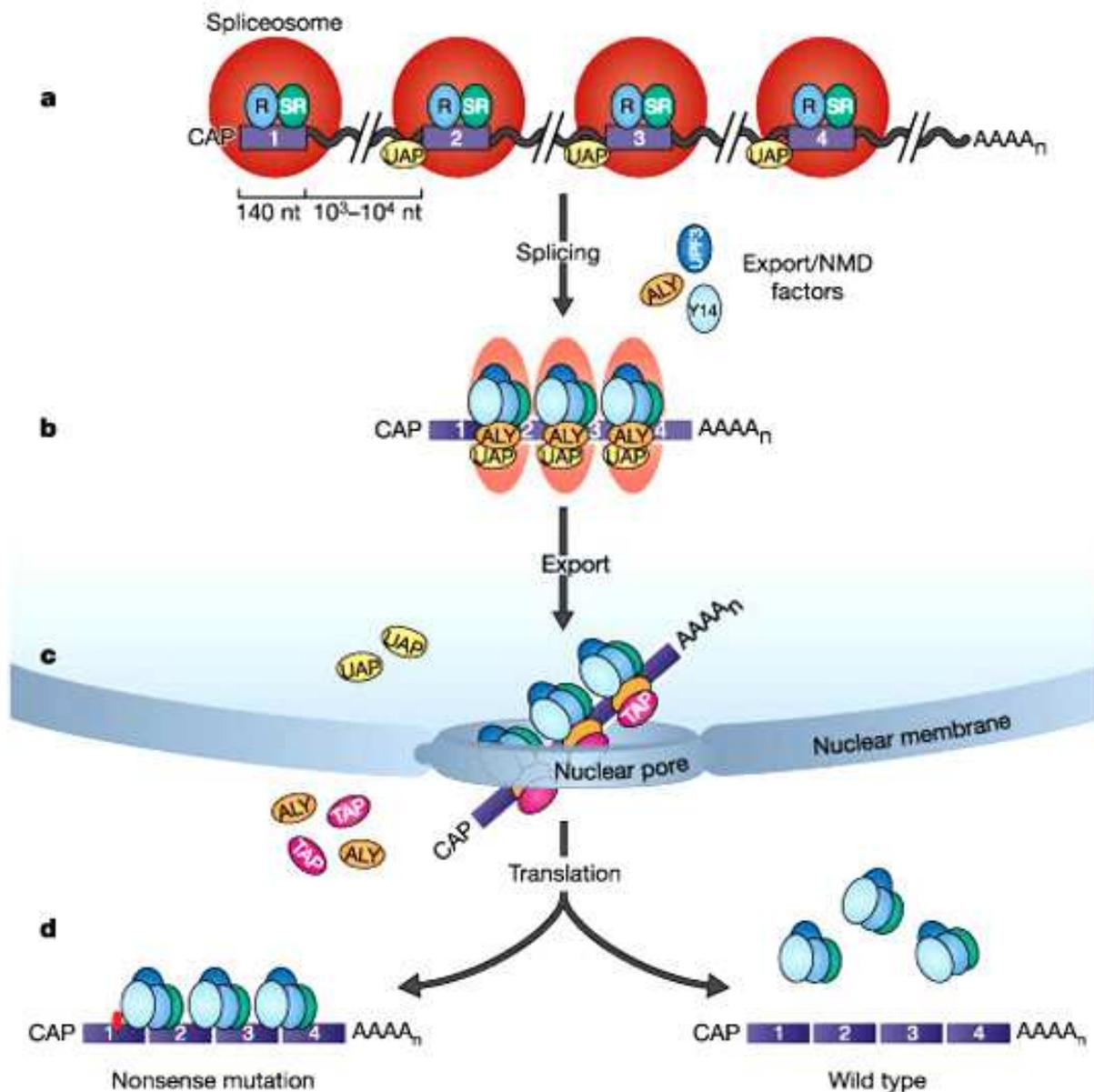


Abbildung 12: Modell für die Zusammenhänge zwischen dem Spleißen von prä-mRNA, mRNA-Export und „nonsense mediated decay“ (NMD).

Nach dem Spleißen der prä-mRNA durch Spleißfaktoren wie UAP56 (UAP, gelb), RNPS1 (R) und andere SR-Proteine (SR) (a), rekrutiert UAP56 den Exportfaktor ALY und NMD-Komponenten (Y14, UPF3) (b). In der reifen mRNA wird UAP56 durch TAP ersetzt, welches den mRNA-Export vermittelt (c). Wildtyp-mRNA wird im Zytoplasma translatiert, fehlerhafte mRNA, die ein frühzeitiges Stopcodon enthält (rote Markierung links in (d)), wird durch die NMD-Maschinerie degradiert. Details siehe Text (Maniatis and Reed 2002).

1.3.4.4 Extranukleäre Zielsteuerung von mRNA

Es gibt mRNAs, die auch einer extranukleären Zielsteuerung unterliegen. So werden diese mRNAs erst am Wirkort des codierten Proteins, z.B. in der Nähe neuronaler Synapsen translatiert, wodurch das Protein direkt dort entsteht, wo es benötigt wird. In Neuronen unterliegt z.B. die Vasopressin mRNA einer Zielsteuerung in die Dendriten, wo die Sekretion des translatierten Hormons stattfindet (Mohr and Richter 2004). Bei der Zielsteuerung von RNA wirken cis-agierende Elemente und trans-agierende Proteinfaktoren zusammen. Sie sorgen für den Transport dieser distinkten mRNAs an ihren Bestimmungsort und den gleichzeitigen Translationsarrest. Cis-agierende Elemente sind Sequenzen in der 3' untranslatierten Region (3'-UTR), die von der Transportmaschinerie erkannt werden. In der Vasopressin mRNA wird dieser Bereich dendritische Lokalisationssequenz (dendritic localizer sequence, DLS) genannt (Mohr and Richter 2004). Ein weiteres Beispiel für zielgesteuerte mRNAs ist die *oskar* RNA in *Drosophila* Oozyten. Die Translation unlokalisierter *oskar* RNA führt zu schweren Entwicklungsstörungen. Es besteht somit eine wichtige Verbindung zwischen Lokalisation und Translationskontrolle von *oskar* RNA. Elemente, die als Bruno response elements (BREs) bekannt sind, wurden in der 3'-UTR dieser RNA identifiziert. Sie sind nötig und hinreichend für die Inhibierung der Translation. Drei Segmente A-C in diesem Abschnitt der mRNA binden ein 80-kD-Protein (Bruno), welches die Translation verhindert. Diese Segmente haben eine 7-9 Basen lange Sequenz gemeinsam [U(G/A)U(A/G)U(G/A)U]. Bruno wirkt hierbei als trans-agierender Faktor. Für die Vasopressin mRNA wurde das poly(A) bindende Protein PABP als ein solcher Faktor identifiziert (Mohr and Richter 2004).

Ein weiterer Vertreter der trans-agierenden Faktoren ist das Staufen Protein, welches in *Drosophila* an der Lokalisation von *oskar* RNA beteiligt ist (Bashirullah et al. 1998). Das humane Ortholog ist ebenfalls ein RNA-Bindeprotein, das als eine Komponente von Stressgranula beschrieben wurde, die dem Translationsarrest während zellulärer Stresssituationen dienen (Thomas et al. 2005). Es wird angenommen, dass zahlreiche mRNAs zytosolisch zielgesteuert sind.

1.3.4.5 Zusammenspiel von Protein- und mRNA-Zielsteuerung zur Bewältigung zellulären Stresses

Änderungen in der Umgebung zwingen Zellen kontinuierlich sich anzupassen, um ihr Überleben zu sichern. Umgebungsstress ist ein uralter Stimulus, der die Evolution aller tierischen Zellen geformt hat. Er kann durch oxidativen Stress, Hitzeschock, UV-Strahlung,

osmotischen Schock, ER-Stress, virale Infektion, Sauerstoffmangel, Stoffwechselveränderungen, Schwermetalle, Ethanol und andere toxische Chemikalien hervorgerufen werden (Morimoto 1993). Als Antwort auf Stress verändern Zellen ständig das Repertoire an zu synthetisierenden Proteinen. Prokaryotische Zellen kontrollieren ihre Proteinsynthese hauptsächlich durch transkriptionale Regulation, eukaryotische Zellen hingegen haben eine Reihe posttranskriptionaler Mechanismen entwickelt, um ihre Genexpression den äußeren Bedingungen anpassen zu können. Diese Mechanismen kommen insbesondere unter Einwirkung von Stress zum Tragen, denn die Stressantwort resultiert in einer globalen Repression der Proteintranslation. Doch gerade jetzt ist es für das Überleben der Zellen unabdingbar, dass spezifische Stress induzierte Transkripte mit höchster Priorität exprimiert werden. 1962 wurde erstmals die Bildung von Stressproteinen beschrieben, nachdem Fliegenlarven hitzebedingtem Stress ausgesetzt wurden. Sie werden daher meistens als "Hitzeschockproteine" oder kurz "Hsps" bezeichnet und nach ihrem Molekulargewicht in die Familie der kleinen Hsps (z.B. HSP27) und die Hsp70-Familie unterteilt (SAFER WORLD 2005, WIKIPEDIA 2005).

Hitzeschockproteine sind die am besten untersuchten Stressproteine. In Situationen zellulären Stresses dienen Hsps entweder der Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der korrekten dreidimensionalen Struktur zellulärer Proteine, um sie vor Denaturierung zu schützen. Diese Faktoren werden dann Chaperone genannt (Arrigo 2005). Auch direkt posttranslational und bei Kompartimentwechseln (z.B. zwischen Zytosol und Mitochondrien oder zwischen ER-Lumen und Zytosol) spielen Chaperone eine wichtige Rolle. Geschädigte Proteine werden durch Hsps dem beschleunigten Abbau über das Proteasom zugeführt.

Um zu gewährleisten, dass Stressproteine wie die Hsps mit höchster Priorität exprimiert werden, bedienen sich eukaryotische Zellen des Systems der Stressgranula (SG). Diese Ribonukleoproteinpartikel (RNPs) sorgen dafür, dass die mRNAs von Haushaltsgenen nicht oder in reduziertem Umfang translatiert werden, solange die Zelle mit der Stressbewältigung und hierbei mit der Überexpression stressrelevanter mRNAs beschäftigt ist.

In gestressten Zellen beobachtete die Gruppe von Anderson eine stark veränderte intrazelluläre Lokalisation des multifunktionalen mRNA-Bindeproteins TIA. Es wanderte aus dem Kern ins Zytoplasma, wo es sich in Partikeln hoher Dichte anreicherte, die Stressgranula genannt wurden (Kedersha et al. 1999). Entsprechende Strukturen wurden erstmals in Zellen der Tomate beschrieben, die einem Hitzeschock unterzogen wurden (Nover et al. 1983). Als Bestandteile dieser Strukturen wurden später mRNAs und kleine Hsps identifiziert. Die gefundenen mRNAs codierten ausschließlich Haushaltsgene, neusynthetisierte Hitzeschock

mRNAs waren von den Stressgranula ausgeschlossen (Nover et al. 1989). Die mRNAs in den Stressgranula waren translational inaktiv, konnten aber *in vitro* ebenso translatiert werden wie nach Erholung der Zelle *in vivo*. Die Autoren schlugen deshalb vor, dass es sich bei SG um Orte handele, an denen mRNAs für eine spätere Translation gelagert werden. SG in Säugerzellen sind durch Antikörpermarkierung der mRNA-Bindeproteine TIAR (TIA-1 related protein) oder PABP (poly(A) binding protein) nachweisbar (Kedersha and Anderson 2002).

1.3.4.5.1 Zusammensetzung und Bildung von Stressgranula

Etwa 50% aller poly(A)-RNAs werden unter geeigneten Stressbedingungen aktiv zu SG transportiert. Es wurde bereits eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die an der Formierung dieser Ribonukleoproteinpartikel beteiligt sind. Dazu gehören die folgenden mRNA-Bindeproteine: das T-Zell interne Antigen 1 (T-cell internal antigen-1, TIA-1), das TIA-1 verwandte Protein (TIA-1 related protein, TIAR), das poly(A) bindende Protein (poly(A) binding protein, PABP) und das humane RNA stabilisierende Protein (human RNA stabilizing protein, HuR). Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass auch kleine, nicht aber große ribosomale Untereinheiten Bestandteil von SG sind. Es ist also wahrscheinlich, dass die dort inaktivierte mRNA in Form inaktiver translationaler Präinitiationskomplexe vorliegt. Von den getesteten Initiationsfaktoren werden eIF3, eIF4E und eIF4G in SG rekrutiert. eIF2 und eIF5 konnten niemals in SG gefunden werden. eIF5 dient normalerweise dazu, den eIF2-GTP-tRNA_i^{Met}-Komplex an eIF3 zu binden. Kedersha und Anderson schlagen ein Modell vor, in dem unter Stress eIF5/eIF2-GTP-tRNA_i^{Met} und die Proteine der TIA-Familie um die selbe Bindungsstelle des Präinitiationskomplexes kompetieren, wodurch es zur Bildung von SG kommt (**Abbildung 13**). Die allgemeine molekulare Antwort auf Stress ist die Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF2, einer Komponente von eIF2-GTP-tRNA_i^{Met}. Dieser ternäre Komplex belädt die kleinen Ribosomenuntereinheiten mit dem Initiator-Methionin, um eine Translationsrunde zu starten (Kedersha and Anderson 2002). Die Phosphorylierung von eIF2 α verhindert seine Dissoziation von eIF2 β , dem Enzym, das den ternären Komplex regeneriert, indem es den GDP/GTP-Austausch unterstützt. Durch die verminderte Zahl an ternären Komplexen wird die translationale Initiation angehalten.

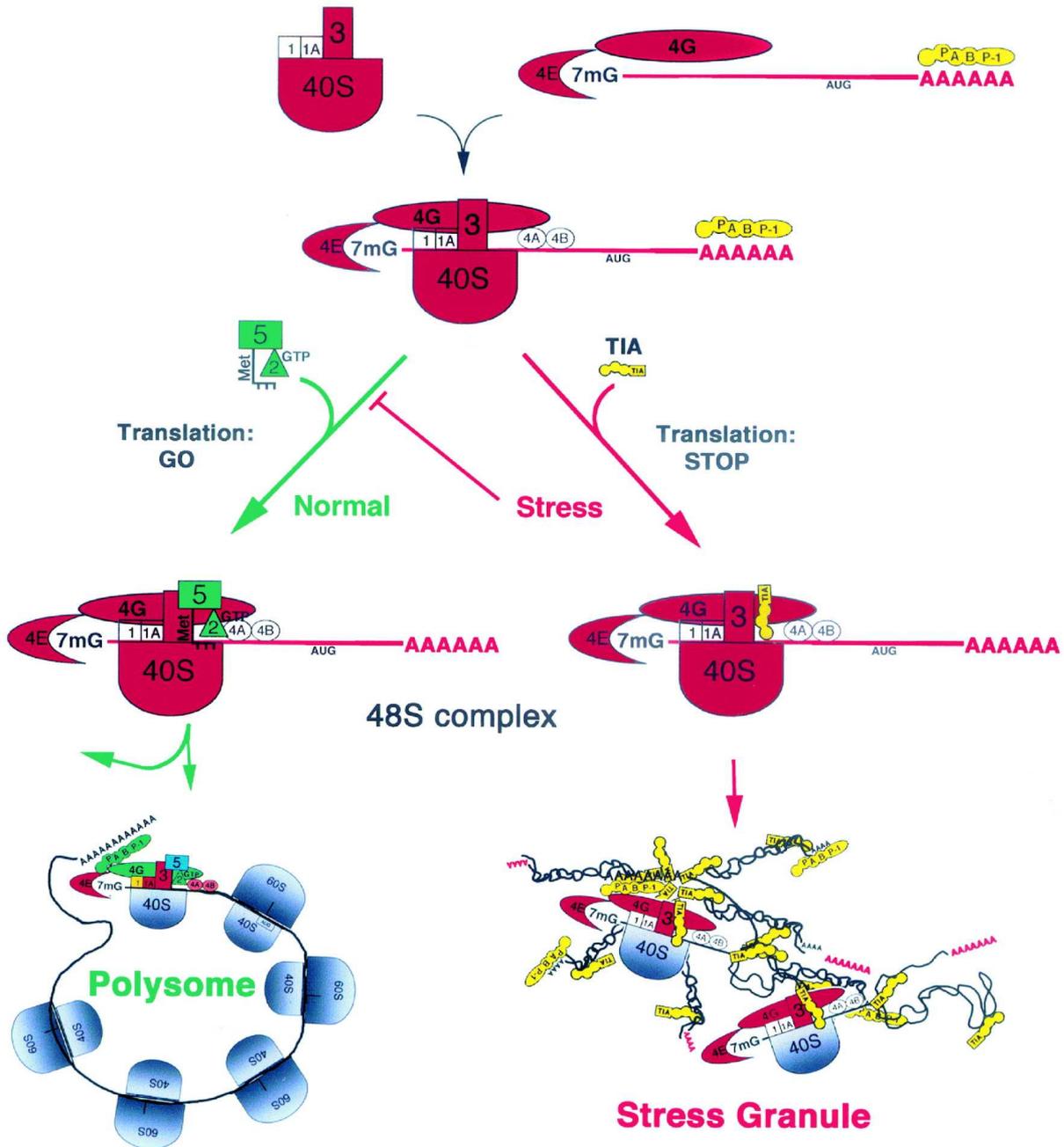


Abbildung 13: Translationale Initiation in Gegenwart oder Abwesenheit von Stress.

In Abwesenheit von Stress ist der ternäre Komplex eIF2-GTP-tRNA^{Met} (grün) verfügbar, um einen kanonischen Präinitiationskomplex am 5'-Ende des Transkripts (grüner Pfeil: Normal) zu formen. Nach der Erkennung des Initiationscodons durch das Anticodon der tRNA^{Met} fördert eIF5 die Hydrolyse von GTP, und frühe Initiationsfaktoren werden durch die 60S Untereinheit des Ribosoms ersetzt. Durch die Anlagerung weiterer Ribosomen wird aus der mRNA ein Polysom (unten links). In gestressten Zellen führt die Phosphorylierung von eIF2 zu einem Verbrauch des eIF2/GTP/tRNA^{Met}-Vorrates und die Konzentration an zyttoplasmatischem TIA-1 (gelb) steigt. Unter diesen Umständen ist TIA-1 Bestandteil eines alternierten, inaktiven eIF2/eIF5-defizienten Präinitiationskomplexes, der translational inaktiv ist. Die Aggregation von TIA-1 führt dann zur Bildung von Stressgranula (bestehend aus allen Komponenten des 48S-Präinitiationskomplexes außer eIF2 und eIF5). Translationskomponenten, die in SG vorkommen, werden in Rot gezeigt, Proteine die nicht mit Translation zusammenhängen, sind gelb markiert. Proteine, die keine Bestandteile von SG sind, werden in Grün dargestellt.

1.3.4.5.2 *Induktion und Dynamik von Stressgranula*

Stressgranula in Mammaliazellen zeigen ein dynamisches Verhalten. Die Behandlung der Zellen mit 1 mM Arsenit (NaAsO_2) führt zur Translokation von TIAR aus dem Kern ins Zytoplasma und zur Akkumulationen in SG. Dieser Prozess beansprucht ca. 15 Minuten. Nach dem Entfernen des Arsenits werden die SG größer, doch ihre Zahl verringert sich. Dies ist vermutlich auf eine Vereinigung mehrerer kleiner SG zurückzuführen. Abhängig vom Zelltyp sind die SG nach ein bis zwei Stunden vollständig verschwunden. Der Wirkmechanismus von Arsenit wurde noch nicht vollständig aufgeklärt. In kultivierten Zellen aus *Drosophila melanogaster* führte aber eine Inkubation mit Arsenit zu stärkerer Deacetylierung von Corehistonen und die Methylierung der Histone H3 und H4 wurde inhibiert (Arrigo 1983). Außerdem induziert Arsenit die Produktion einer Vielzahl von Hsps (Wang et al. 1981). Diese Befunde lassen vermuten, dass Arsenit in eukaryotischen Zellen die selben Reaktionen hervorruft wie ein Hitzeschock: Nämlich die Verdichtung von Chromatin durch Histondeacetylierung, um die DNA vor Schädigungen zu schützen, und die Expression von Hsps, die zum Abbau des Stresses beitragen. Die Bildung von SG kann durch Inkubation mit Elongationsinhibitoren wie Cycloheximid rückgängig gemacht werden. Hierbei wird aber die Konzentration an phospho-eIF α nicht wieder erniedrigt. Mit Hilfe von Reagenzien, die eine vorzeitige Termination der Proteinbiosynthese verursachen (z.B. Puromycin), ist es möglich, SG zu induzieren, ohne dass eine Vermehrung von phospho-eIF α stattfindet (Kedersha et al. 2000). Puromycin ähnelt in seiner Struktur sehr stark Aminoacyl-tRNA. Es wirkt deshalb während der Proteinsynthese als Analogon für veresterte tRNAs. Auf diese Weise kommt es zum Zerfall der Ribosomen, die Peptidyl-tRNAs gebunden haben. Damit erfolgt die Freisetzung unvollständiger Polypeptide (Nathans 1964) und mRNA assoziierter kleiner Untereinheiten der Ribosomen, von denen letztere dann offensichtlich in Stressgranula verpackt werden.

1.4 Chromatinstrukturen und ihre Organisation

Da in der vorliegenden Arbeit eine neuartige strukturierte Lokalisation der IP₅-2K an Chromatinstrukturen beschrieben wird und das Produkt der IP₅-2K, das InsP₆, in die Chromatinremodellierung involviert ist (Rando et al. 2003, Shen et al. 2003, Steger et al. 2003), wird nachfolgend auf die Organisation von Chromatinstrukturen eingegangen. Die DNA eukaryotischer Zellen liegt nicht nackt und ungeordnet im Zellkern vor, sondern gebunden an kleine basische Proteine, die als Histone bezeichnet werden. Dieser Histon/DNA-(Nukleoprotein)-Komplex wird Chromatin genannt. Chromatin wird in

unterschiedliche Strukturen mit ansteigender Organisation und steigendem Verpackungsgrad unterteilt. Die unterschiedlichen Strukturen sind zum größten Teil nach ihrem Durchmesser benannt. **Abbildung 14A** veranschaulicht diese verschiedenen Chromatinstrukturen: In der einfachsten Organisationsform stellt man sich die DNA ohne Proteine als unkomprimierten Strang vor. In diesem Stadium beinhaltet ein Millimeter 3 Millionen Basenpaare. Die nächste Organisationsstufe ist die 11-nm-Faser. In dieser Struktur sind 140 DNA-Basenpaare so um ein Oktamer aus Histonen (bestehend aus je zwei Molekülen der Histogruppen H2A, H2B, H3 und H4) gewunden, dass 1 $\frac{3}{4}$ Windungen einer linksgängigen Superhelix mit einer Ganghöhe von 2,8 nm entstehen (**Abbildung 14B**). Das Histon H1 befindet sich auf der Außenseite dieser Helix. Sechzig weitere DNA-Basenpaare dienen als Verbindungs-DNA zwischen den Nukleosomen. So entsteht im Elektronenmikroskop der Eindruck einer Perlenschnur. In dieser Form sind 20 Millionen Basenpaare in einem Millimeter verpackt. Das Solenoidmodell beschreibt den nächsten Komprimierungsgrad. In dieser Faser werden die Nukleosomen helikal aufgewunden, wobei 6-8 Nukleosomen eine Windung ausmachen. Das meiste Chromatin der Zelle liegt in dieser Organisationsform vor. In der 30-nm-Faser sind 120 Millionen Basenpaare pro Millimeter aufgewunden. Die 30-nm-Faser liegt im Zellkern nicht als ungeordnetes Knäuel vor, sondern in vielen 1000 definierten Schleifen. Dabei geht man davon aus, dass diese Schleifen, die 60-150 kb umfassen, an die Kernmatrix ("scaffold") assoziiert sind. Diese Assoziation erfolgt über die SAR ("scaffold attached region"). Dies sind Bereiche, die viele Adenosin-Thymidin-Basenpaare enthalten und spezifisch an die Kernmatrix binden. In weiteren Verdichtungsschritten erhält man das Chromosom. Chromosomen sind je nach Phase des Zellzyklus unterschiedlich stark kondensiert (FIZ 2004, Stryer 1999). Stark kondensiertes Chromatin ist transkriptionell völlig inaktiv und wird als Heterochromatin bezeichnet. Der transkriptionsaktive genreiche Teil des Chromatins, der nach der Kondensation der Interphase des Zellzyklus' wieder dekondensiert wird, heißt Euchromatin. Um die Transkription zu ermöglichen muss eine Umwandlung von Heterochromatin zu Euchromatin stattfinden, die Chromatinremodellierung genannt wird. Sie wird durch DNA bindende Proteine und Histonacetylierung bewerkstelligt. Wie bereits in **Kapitel 1.1.2** beschrieben, sind InsPs wichtige Regulatoren der Chromatinremodellierung. In Eukaryoten inhibiert InsP₆ die Nukleosomenmobilisierung durch NURF, ISW2 und INO80. Ins(1,4,5,6)P₄ und Ins(1,3,4,5,6)P₅ dagegen zeigen *in vitro* eine Stimulation des Chromatinremodellierungskomplexes SWI/SNF der Hefe (Shen et al. 2003, Steger et al. 2003).

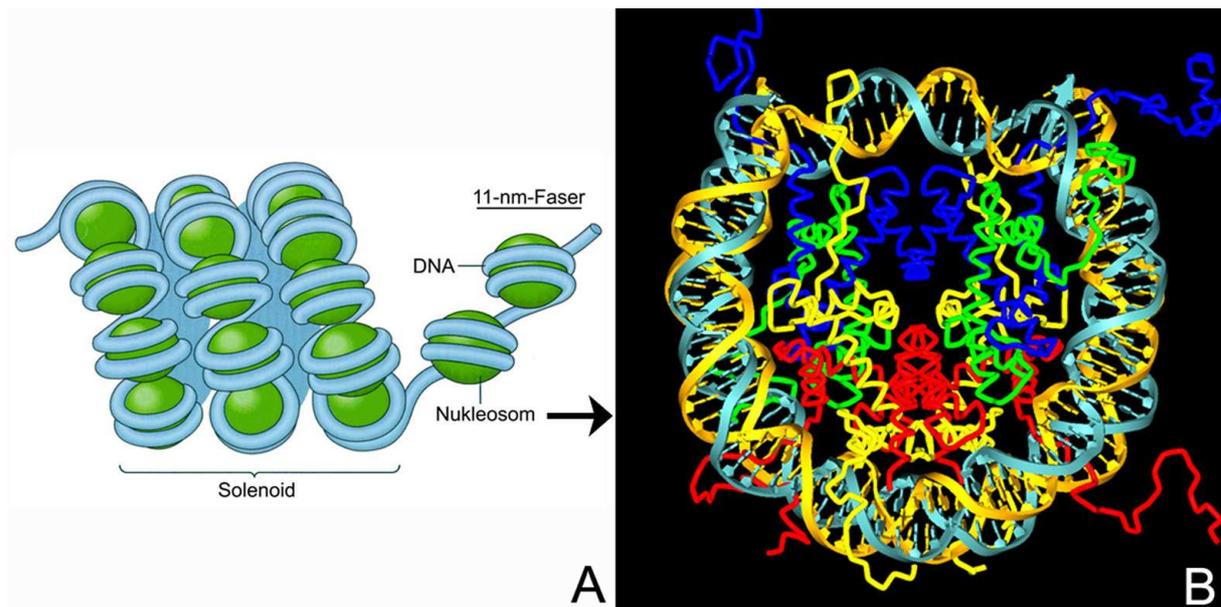


Abbildung 14: Die Organisation von Chromatin.

(A): Die Organisationsebenen von Chromatin (Waterborg 1999).

(B): Die Kristallstruktur eines Nucleosomencores bei einer Auflösung von 2,8 Å. Die DNA ist um ein Histonoktamer aus je zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4 gewunden (Richmond 2006).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die intrazelluläre Zielsteuerung zweier Enzyme untersucht werden, die maßgeblich am InsP-Metabolismus beteiligt sind, um Hinweise auf neue, bisher nicht beschriebene Funktionen dieser Inositolphosphatkinasen zu erhalten. Als erstes Untersuchungsobjekt wurde die B-Isoform der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase ausgewählt. Sie gehört zur Familie der PDKG-Kinasen, so genannt nach einem konservierten Sequenzmotiv (siehe **Abbildung 3** und **Kapitel 1.2.2.1**). Sie hat eine zentrale Rolle in der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion inne und wird ubiquitär in fast allen Geweben exprimiert. Im Vergleich mit den Isoformen A und C unterliegt die Kinaseaktivität der B-Isoform der feinsten Regulation. *In vitro* Studien zeigten, dass sie unstimuliert nahezu inaktiv ist, durch Ca^{2+} -Calmodulin aber weit stärker aktiviert wird als die beiden anderen Isoformen (Nalaskowski and Mayr 2004). Außerdem erfolgt nur bei der B-Isoform eine Prozessierung durch Calpain (Pattni et al. 2003). Diese Tatsachen sprechen für die allgemeine Wichtigkeit der IP3K-B bei der Aufrechterhaltung zellulärer Prozesse.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die funktionalen Zusammenhänge ihrer unterschiedlichen Lokalisationen, an F-Aktin und dem ER, zu klären. Die vollständige Charakterisierung der ABD und die Klonierung des humanen Vollängenproteins der IP3K-B waren weitere Ziele dieser Arbeit.

Als zweite wichtige InsP-Kinase sollte die humane Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase untersucht werden. Sie gehört nicht zur homologen Familie der PDKG-Kinasen und weist auch sonst keinerlei Homologien zu anderen IPKs auf. Zu Beginn dieser Arbeit waren die Funktionen und die Substratspezifität der Kinase nur unzureichend charakterisiert worden. Darüber hinaus war die intrazelluläre Lokalisation der IP₅-2K in Säugerzellen noch weitgehend unbekannt. In früheren Studien wurde von Dr. Marcus Nalaskowski lediglich sowohl zytosolische als auch nukleäre Lokalisation in NRK-Zellen beobachtet, die das IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein überexprimierten. Ihre indirekte Rolle im mRNA-Export der Hefe (York et al. 1999) wies aber bereits daraufhin, dass diese Kinase Funktionen erfüllt, die essentiell für das Überleben von Zellen sind. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb umfangreiche Lokalisationsstudien Aufschluss über die zellulären Funktionen der humanen IP₅-2K bringen. Die Kinase abhängigen Enzymaktivitäten sollten nach Anreicherung des Enzyms in optischen Tests untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage <i>BP 221S</i>	Sartorius
Autoklav <i>5075 ELV</i>	Systemec
Brutschrank für Bakterienkultur	Memmert
Duran Glasgeräte	Schott, Brand
Feinwaage <i>PM 480 Delta range</i>	Mettler
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiovert 25 CFL</i>	Zeiss
Gelkammer für horizontale Elektrophorese	MWG-Biotech
Gelkammer <i>SE 250</i> für vertikale Elektrophorese	Hoefer
Heizblock <i>Thermomixer 5436</i>	Eppendorf
Inkubator mit CO ₂ -Begasung für Zellkultur	Heraeus
Kamera <i>DX30</i>	Kappa
Laborschüttler	Gerhardt
Magnetrührer <i>MR 3001K</i>	Heidolph
Mischer <i>Vortex Genie 2</i>	Scientific Industries
Monitor	Panasonic
PCR-Maschinen: <i>Mastercycler Gradient / personal</i>	Eppendorf
Netzanschlussgerät <i>Gene Power Supply GPS 200/400</i>	Pharmacia
Netzanschlussgerät <i>Power Supply E835</i>	Consort
Netzanschlussgerät <i>Power Supply 2197 LKB</i>	Bromma
pH-Meter <i>pH526</i>	WTW
pH-Elektroden <i>SenTix mic</i> und <i>Sentix 41</i>	WTW
Photometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf
Pipette, <i>Model Reference</i> , 1 - 10 µl	Eppendorf
Pipette, <i>Model Reference</i> , 10 - 100 µl	Eppendorf
Pipette, <i>Model Reference</i> , 100 - 1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe <i>accu-jet</i>	Brand
<i>Semi-dry-Blot-Kammer</i>	BioRad
Schüttelinkubator <i>Serie 25</i>	New Brunswick, Scientific Co. Ins.

Sterile Werkbank <i>Microflow Biological Safety Cabinet</i>	MDH
Sterile Werkbank <i>HeraSafe</i>	Heraeus
Tischzentrifuge <i>Biofuge pico</i> und <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus
Ultraschallhomogenisator <i>Sonopuls GM 70</i> mit Sonode <i>UM 70</i>	Bandelin electronic
UV-Tisch (312nm)	Bachhofer
Videodokumentationssystem, Kamera <i>VarioCam</i>	Phase
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge <i>Sorvall RC 5C plus</i> mit <i>GSA-</i> und <i>SS-34</i> -Rotor	Sorvall

2.1.2 Software

Kappa ImageBase Kappa	Kappa
Photoshop 7.0	Adobe
PyMol	DeLano Scientific LLC
ImageJ	Wayne Rasband, NIH, USA
BioEdit	Tom Hall

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Kammerdeckgläser (2, 4 oder 8 Kammern)	Nalgen Nunc International
Chromatographiepapier	Whatman
<i>ECLTM</i> Hyperfilm	Amersham
Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (steril), 25 cm ² und 75 cm ²	Greiner
Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (steril), 175 cm ²	Nunc
Injektionskanüle 0,55/25 mm	Braun
Küvetten, Halb-Mikro, Polystyrol,	Greiner
Küvetten <i>Uvette 220</i> (50–2.000 µl)	Eppendorf
Membrandeckel Eppendorf <i>Lid[®]Bac</i>	Eppendorf
Mikrotiterplatten <i>Nunc-Immuno Module Maxisorb V16</i>	Nunc
Nitrozellulose Transfer Membran 0,45 µm	Protran
Pipetten (steril, 1, 2, 5, 10 und 25 ml)	Beckton Dickinson
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße aus Polypropylen (0,2; 0,5; 1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf
pH-Papier, Universalindikator	VWR International
Probenröhrchen mit Schraubverschluss aus Polypropylen, Spitzboden (steril, 50 ml, <i>BlueMax</i>)	Greiner
Probenröhrchen mit Schraubverschluss aus Polypropylen,	

Spitzboden (steril, 15 ml, <i>BlueMax</i>)	Greiner
Probenröhrchen aus Polypropylen (steril, 14 ml)	Greiner
Spritzen (steril, 20 und 60 ml)	Braun
Spritze <i>Omnifix 40 Solo</i> (steril, 1 ml)	Braun
Sterilfilter <i>Millex 0,22 µm</i>	Millipore

2.1.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien werden von den folgenden Firmen bezogen:

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), GIBCO BRL (Eggenstein, Deutschland), VWR International (Darmstadt, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland) und Biomol (Hamburg, Deutschland).

2.1.5 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen werden von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) oder New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland) bezogen. Die *Taq*-DNA-Polymerase wird von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und die *PfuTurbo*[®] DNA Polymerase von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) bezogen. Zur Ligation wird die T4-DNA-Ligase von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die zugehörigen Arbeitspuffer für Polymerasen und Ligasen werden stets mitgeliefert.

Zu den verwendeten Restriktionsendonukleasen gehören: BamHI (Erkennungssequenz: 5'...G ↓GATCC...3'), BglIII (5'...A ↓GATCT...3'), HindIII (5'...A ↓AGCTT...3'), NheI (5'...G ↓CTAGC...3') und SacII (5'...C↓CGCGG...3'). Für alle Enzyme wurde der Reaktionspuffer Y⁺ eingesetzt.

2.1.6 Kits

Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland)
NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit [®]	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
QIAEX Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.1.7 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 (Tet¹)]; (Bullock 1987); Stratagene (Amsterdam, Niederlande).

Stamm zur rekombinanten Proteinexpression:

BL21(DE3)pLyS, pREP4 Stamm^a: *E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal* λ(DE3)[pLyS Cam^r]; Stratagene (Amsterdam, Niederlande).

2.1.8 Zelllinien

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

NCI-H1299-Zellen (ATCC#: CRL-5803, LGC Promochem, Wesel, Deutschland) sind humane epitheliale Lungenkarzinomzellen. Die Zellen besitzen eine homozygote Deletion des p53 Gens, weshalb sie das p53 Protein nicht herstellen können. Diese Zelllinie wird für siRNA-Versuche genutzt, weil es sich um eine humane Zelllinie mit guten Eigenschaften zum Mikroskopieren handelt. Sie ist relativ groß (Durchmesser ca. 25 µm) und wächst flach auf dem Objektträger.

2.1.8.2 COS7-Zellen (*Cercopithecus aethiops*)

Zur Etablierung von COS7-Zellen (ATCC#: CRL-1651, Cell Lines Service and Cellbank, Heidelberg, Deutschland) wurde eine CV-1-Zelllinie, eine etablierte Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze, die für die Vermehrung des SV40-Virus permissiv ist, mit einer SV40-Mutante transfiziert, die eine Deletion von 6 bp im Replikationsursprung aufweist und somit nicht mehr replikationsfähig ist (Gluzman 1981). Die COS7-Zellen werden zur Überexpression großer Mengen von GFP-Fusionsproteinen genutzt, da sie hohe Transfektionsraten aufweisen. Mittels transienter Transfektion mit dem Reagenz fuGENE6 können Raten von bis zu 70% erreicht werden. Für NRK-Zellen hingegen liegt die Transfektionseffizienz nur um 10%.

2.1.8.3 NRK 52E Zellen (*Rattus norvegicus*)

NRK 52E Zellen (ATCC# CRL-1571; Cell Lines Service and Cellbank, Heidelberg, Deutschland) sind Rattennierenzellen (NRK, normal rat kidney), die sich von Epithelzellen des proximalen Tubulus (PTE, proximal tubule epithelium) der Niere ableiten. Die Zelllinie ist nicht tumorigen und hat viele morphologische und physiologische Eigenschaften der ursprünglichen epithelialen Nierenzellen bewahrt. Diese Zelllinie wird vornehmlich für die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen genutzt, da sie sich sehr gut für Fluoreszenzmikroskopie eignet. NRK-Zellen wachsen flach auf dem Objektträger, wodurch es nur zu wenig Streuung des Lichtes kommt. Außerdem sind sie mit ca. 30 µm Durchmesser sehr groß, so dass Kernstrukturen gut erkennbar sind.

2.1.9 Puffer und Lösungen

2.1.9.1 Puffer für DNA-Polymerasen und -Ligasen

Pfu-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0,1% Triton X-100 (w/v), 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA (w/v)),

Taq-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,4, 50 mM KCl),

Ligationspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 $\mu\text{g/ml}$ BSA (w/v)).

2.1.9.2 Puffer für Agarosegelelektrophorese

6x DNA-Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau (w/v), 0,25% Xylencyanol FF (w/v), 15% Ficoll 400 (w/v), in wässriger Lösung),

TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,3).

2.1.9.3 Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

RF I (100 mM RbCl, 50 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30 mM K-Acetat, 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15% Glycerol (w/v), pH auf 5,8 mit Essigsäure),

RF II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15% Glycerol (w/v), pH auf 6,8 mit Essigsäure).

2.1.9.4 Lösungen für SDS-PAGE

Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% N,N-Methylbisacrylamid),

Laemml-Laufpuffer (0,025 M Tris/HCl, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS (w/v)),

4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl, 0,4% SDS (w/v), pH 8,8),

4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl, 0,4% SDS (w/v), pH 6,8),

4x SDS-Probenpuffer (0,25 M Tris/HCl, 200 mM DTT, 35% Glycerol (w/v), 4% SDS (w/v), 0,04% Bromphenolblau (w/v), pH 7,6),

Färbelösung (0,5% Coomassieblau (w/v), 9% Eisessig, 45,2% Methanol in dH_2O),

Entfärber (8% Eisessig, 25% Ethanol, 67% dH_2O),

APS: Ammoniumpersulfat-Lösung (10% (w/v)),

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin-Lösung (10% (v/v)),

Sammelgel (5% Acrylamid, 0,05% (w/v) APS, 0,1% TEMED in 1x Sammelgelpuffer),

Trenngel (12,5% Acrylamid, 0,05% (w/v) APS, 0,1% TEMED in 1x Trenngelpuffer).

2.1.9.5 Lösungen für Western Blotting

Blotpuffer (0,25 M Tris, 2 M Glycin, ad 1 l dH₂O),

Ponceau-Lösung (0,2% Ponceau-S, 3% Essigsäure in dH₂O),

TBS (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5),

TTBS (TBS mit 0,1% Tween 20 (v/v), pH 7,5),

Blockierlösung (3% BSA (w/v) in TBS),

Färbelösung BCIP-Lösung (5% 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in 100% DMF) und

NBT-Lösung (7,7% Nitroblautetrazoliumchlorid in 100% DMF) in 5 ml **Alkalische**

Phosphatase-Puffer (100 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 9,5).

2.1.9.6 Lösungen für TCE-Lyse

Lyselösung (TCA (10% (v/v)), 2% 1 M DTT in Aceton),

Waschlösung (2% 1M DTT in Aceton).

2.1.9.7 Puffer für Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

20x SSC (3,0 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, in DEPC-H₂O, pH 7,0),

Prähybridisierungspuffer (2x SSC, 20% Formamid (v/v), 0,2% BSA (w/v), 10% Dextransulfat (w/v) und 1 mg/ml Hefe-tRNAs),

Hybridisierungspuffer (Prähybridisierungspuffer mit 1 pmol/ml poly(dT)₅₀ Alexa Fluor 555-Sonde).

2.1.9.8 Sonstige Puffer

Puffer A in F-Aktinbindungstests (0,5 mM ATP, 0,2 mM CaCl₂, 200 mg/l NaN₃, 5 mM Triethanolamin/HCl pH 7,5),

Puffer E für Asp-Pro-Spaltungstests (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin).

2.1.10 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide werden von der MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Für Sequenzieroligonukleotide wird in Klammern die erste hybridisierende Base in der Matrix angegeben. Reverse Sequenzieroligonukleotide werden durch „ 3' “ gekennzeichnet. Basen, die nicht an die Matrix binden, sind klein geschrieben, Basendeletionen werden mit (/) gekennzeichnet, und nicht-hybridisierende Basen in Mutageneseoligonukleotiden, die im exprimierten Protein zu Aminosäureaustauschen führen, sind durch Unterstreichung markiert. Es werden nur die 5'-

Oligonukleotide angegeben, die entsprechenden 3'-Oligonukleotide besitzen die komplementär-reverse Basensequenz.

Sequenzieroligonukleotide für HsIP3K-B:

SB3 (bp1400):	5'-GGG ACC ACT AGT GTG GAG GCG GGA ATT CCT TCT GGC-3'
SB4 (3' bp2500):	5'-GTG GGC CTC GAG GGC GAG TGG GGC ATC CTG GGA CAT C-3'
SB7 (3' bp2840):	5'-AGA TGC GCT AGC TCA GGC GAG TGG GGC ATC CTG GGA C-3'
SB8 (bp1890):	5'-CTG GAC TGA TCA TCA GCT TTC CTG CAT ACC CTG GAC-3'
SB10 (bp2000):	5'-TGG ATC TGA TCA GCA GGA CAC GCA GGG AGT TTC AAG-3'
SB15 (3' bp1460):	5'-GGT TCT TTC AGA TCT TTC-3'
UB231 (bp1):	5'-GAG GTC TCG AAT GGC TGT GTA CTG CTA TGC-3'
MB001 (bp462):	5'-CCA GGC ACA GAG CTC CGC CA-3'
MB002 (3' bp290):	5'-AGC CCA ACT TGG GCT GCT CA-3'
MB003 (bp2110):	5'-ATG GTG GAT GTG CTG AGG CCC-3'
MB004 (bp2700):	5'-ACC ACG CCC CTG CCT GAG GGC CA-3'

Klonierungsoligonukleotide für HsIP3K-B:

MB006:	5'-TCA GCT TTC CTG CAT ACC CTG-3'
MB007:	5'-atc cgc ggT CAG GCG AGT GGG GCA TCC TG-3'
MB008:	5'-atc cgc ggGG GCG AGT GGG GCA TCC TGG GA-3'
MB009:	5'-tca agc ttC GAT GGC TGT GTA CTG CTA TGC G-3'
MB010:	5'-CAC TCT AGG TTT CTG CTG GTC-3'

Mutageneseoligonukleotide für die ADB der IP3K-B:

MB24 MutH1:	5'-GCC AAG AGG AAG <u>CCG</u> CGG ATC TTG CAG CGC GAG <u>CCG</u> CAG AAC GTG CAG-3'
MB26 MutH2:	5'-TTT GAG GCG CAC <u>CCC</u> CAG GCA CAG AGC <u>CCC</u> GCC ATT CAA GCG-3'

MB29 RnMutH1: 5'- AGG AAG CTG AGG ATT CCG CAG CGC GAA CCG CAA
AAT GTG CAG GTG-3'

MB31 RnMutH2: 5'-CGC TTG AAT AGC AGA GGG CTG TGC CTG GGG TTG CGC
CTC GAA CAT-3'

MB13 DEL: 5'-AGC GTG AGC AGC CCA AGT TGG / AGC CCG CGT TTG
GGC AGG GCT-3'

Oligonukleotide für RT-PCR HsIP3K-B:

MB18: 5'-GCT CCC TGC ATG TCC TGC CAG CTG GAT CCA G-3'

MB19: 5'-TCA TTA CAG ATA TGG GTG CTC AGG AGG ATG G-3'

MB20: 5'-TGT GGA GAC AGG CAT TAG TTG TGG CAG AAT G-3'

Sequenzieroligonukleotide für HsIP₅-2K:

MN117 (bp1) : 5'-AGC TAG CAT GGA AGA GGG GAA GAT GGA-3'

MN118 (3' bp1474): 5'- GAG ATC TGA GAC CTT GTG GAG AAC TAA TG-3'

MN121 (bp 473): 5'- TCT GTC GAT ACT GCA TGC AC-3'

MN124 (bp980): 5'- TGC AGA TGT TGG ACC TGC TG-3'

MN125 (3' bp601): 5'- TTG TTC TGT GCC TCC TGC AG-3'

Mutageneseoligonukleotide für HsIP₅-2K:

Deletion1: 5'-CAC TTT GCC TTG AAG AGT TTG CTG / TTC AGT AGG AGC CTT CGC
TGC CAA GG-3'

Deletion2: 5'-GCA GAT GTT GGA CCT GCT GGA CAA / GGT GCA GCA GTA CCG
CG-3'

2.1.11 Vektoren

Die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1 werden von BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Dr. Marcus Nalaskowski hat die cDNA der HsIP₅-2K in die multiple Klonierungssequenz unter Verwendung der Schnittstellen BglII und NheI bzw. BamHI und HindIII kloniert. Zum Erhalt von IP₅-2K-Mutanten wurden die Vektoren mittels Quik-ChangeTM-Mutagenese modifiziert.

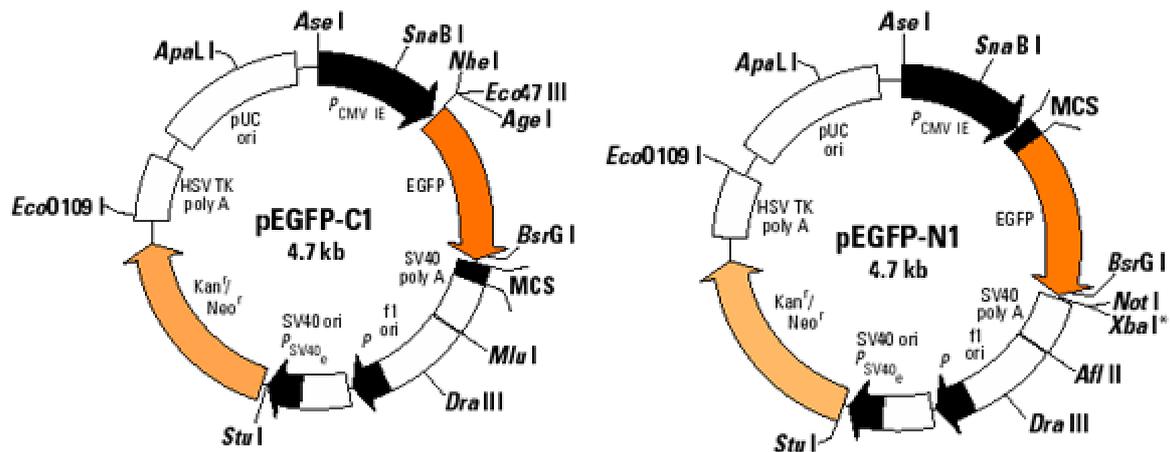


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Vektorkarten von pEGFP-C1 und pEGFP-N1. EGFP= Enhanced Green Fluorescent Protein codierende Sequenz, f1ori= Replikationsursprung des Phagen f1, HSV TK polyA= Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Polyadenylierungssignal, Kan^r/Neo^r= Kanamycin/Neomycin Resistenzgene, MCS= multiple cloning site, PCMV IE= Cytomegalovirus immediate early gene promotor, pUC ori= Replikationsursprung aus pUC-Plasmiden, SV40 ori= Replikationsursprung des Simian Virus 40, SV40 polyA= Simian Virus 40 Polyadenylierungssequenz.

Um das ER von eukaryotischen Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können werden die Zellen mit dem Vektor pECFP-ER transfiziert, der zur Expression des verbesserten Cyan farbenen fluoreszierenden Proteins (enhanced cyan fluorescent protein, ECFP) führt, das N-terminal die ER-Zielsteuerungssequenz von Calreticulin und C-terminal die ER-Rückhaltesequenz KDEL trägt.

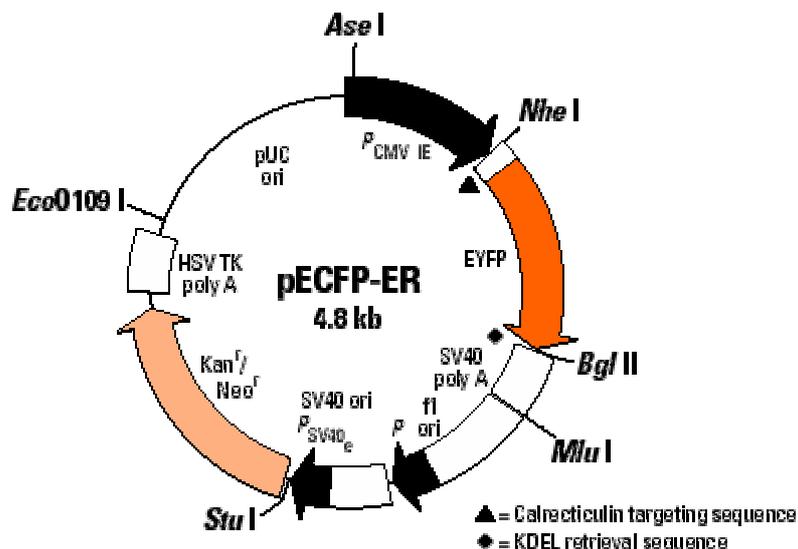


Abbildung 16: Restriktionskarte des Vektors pECFP-ER.

Die Expression des mit ER-Zielsteuerungssequenzen gekoppelten blau fluoreszierenden Proteins ECFP führt zu Markierung des ER einer transfizierten Zelle.

Der bakterielle Expressionsvektor pGEX-4T-2 wurde verwendet, um die Aktinbindungsdomäne der IP3K-B und Mutanten dieser Domäne als Fusionsproteine mit N-terminalem Glutathion-S-Transferase-Anhang (GST-Anhang) herzustellen.

Der Vektor pGEM-Teasy ist ein bakterielles Expressionsplasmid, das für schnelle effiziente Klonierungen optimiert ist. Es wurde zur A/T-Klonierung der HsIP3K-B cDNA genutzt.

2.1.12 Kulturmedien

Die Anzucht des *E. coli*-Stammes XL1-Blue erfolgt entweder in flüssigem Medium (4 g Bacto-Trypton, 2 g Hefeextrakt, 4 g NaCl, ad 400 ml dH₂O, pH auf 7,2 mit NaOH, alle Reagenzien von Luria Broth Base, GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland) oder auf LB-Agar-Platten (4 g Bacto-Trypton, 2 g Hefeextrakt, 6 g Bacto-Agar, 0,5 ml 4 M NaCl, ad 400 ml dH₂O, alle Reagenzien von Luria Broth Base/Select Agar, GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland). Abhängig von dem Vektor, mit dem die Bakterien transformiert werden, erfolgt die Selektion durch Zusatz von 30 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampillicin (VWR International, Darmstadt, Deutschland).

Für die Kultivierung der NRK- und H1299-Zellen wird das Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin, verwendet. COS7-Zellen werden in dem gleichen Medium, unter Zusatz von 0,5% Fungizone, kultiviert (alle Komponenten von GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland).

2.1.13 Molekulargewichtsstandards

Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten zwischen 500 und 10.000 bp wird die GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Werden kleinere Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt, wird die 100 bp Leiter (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Zur Abschätzung der Molekulargewichte von Proteinen in SDS-Gelen wird die vorgefärbte BenchMark Protein Leiter (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) genutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Saiki et al. 1988) ist eine Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zwischen zwei bekannten, flankierenden Sequenzen. Das Prinzip beruht auf der Fähigkeit einer hitzestabilen DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA mittels zweier an den DNA-Strang hybridisierender Oligonukleotide zu doppelsträngiger DNA aufzufüllen. Oft wird die *Taq*-DNA-Polymerase, eine thermostabile Polymerase aus *Thermus aquaticus*, verwendet.

2.2.1.1.1 Analytische PCR zur Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen

Die PCR-Ansätze werden in einem 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wie folgt aus Stammlösungen angesetzt:

Menge	Komponente
X µl	Plasmid-DNA (10-50 ng)
0,5 µl	5'-Oligonukleotid (100 µM)
0,5 µl	3'-Oligonukleotid (100 µM)
0,5 µl	dNTP's (40 mM)
2,0 µl	10x <i>Taq</i> PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)
0,8 µl	MgCl ₂ (10 mM)
0,2 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
ad 20 µl (Endvolumen)	dH ₂ O

Alternativ werden die zu untersuchenden Klone direkt zum PCR-Ansatz gegeben. Die PCR wird nach folgendem Programm im Thermocycler (Mastercycler *personal*, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt:

Schritt	Zeit [sec]	Temperatur [°C]
Denaturierung	30	95
Hybridisierung	30	52-57 (5 °C unter der Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids)
Elongation	90	72

Der Zyklus, bestehend aus den Schritten Denaturierung, Hybridisierung und Elongation, wird 24 mal wiederholt. Die Charakterisierung des DNA-Amplifikates erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese.

2.2.1.1.2 Fusions-PCR zur Klonierung der vollständigen cDNA humaner IP3K-B in den Expressionsvektor pEGFP-N1

Die cDNA der humanen IP3K-B lag im Arbeitskreis Mayr in zwei Fragmenten vor. Der N-Terminus (bp 1-1932) in einem pET-Vektor mit Ampicillinresistenz und der C-Terminus (bp 1892-2840) in dem pVCMSport-Vektor mit Chloramphenicolresistenz. Nach erfolgreicher Vermehrung der Plasmide in XL1-Blue-Bakterien wurden die Plasmide mittels Minipräparation isoliert und die IP3K-B-Fragmente sequenziert. Die cDNAs enthielten keine Mutationen. Durch Polymerasekettenreaktion wurde dann am 5'-Ende des N-Terminus eine HindIII-Schnittstelle und am 3'-Ende des C-Terminus eine SacII-Schnittstelle eingefügt. Diese modifizierten IP3K-B-Segmente wurden mit dem QIAEX-Kit aus einem präparativen Agarosegel eluiert und durch Fusions-PCR zu einer vollständigen HsIP3K-B cDNA vereinigt. Hierzu wurden in einem 20- μ l-Ansatz jeweils 10 ng der beiden DNA-Fragmente, 2 μ l 10x *Pfu*-Puffer, 1 μ l *Pfu*-Polymerase und 0,5 μ l dNTPs (40 mM) zusammengegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde 30 mal folgendem Temperaturprogramm unterzogen: 94 °C für 30 sec, 68 °C für 4 min. 5 μ l des Produktes wurden dann einer PCR unterzogen, wie sie in **Kapitel 2.2.1.1.1** beschrieben wurde. Eine analytische Agarosegelelektrophorese bestätigte den Erfolg der PCR. Das Produkt wurde in den pGEM-Teasy-Vektor zwischenkloniert. Anschließend wurde die HsIP3K-B-cDNA mittels der HindIII- und SacII-Schnittstellen in den pEGFP-N1-Vektor kloniert.

2.2.1.1.3 Quik-ChangeTM-Mutagenese

Es wird die von Wang (Wang and Malcolm 1999) modifizierte, auf dem Quik-ChangeTM-Mutageneseprotokoll von Stratagene basierende Mutagenesestrategie angewendet. Dabei werden Mutageneseoligonukleotide eingesetzt, welche eine oder mehrere Mutationen tragen. Sowohl 3' als auch 5' von der Mutation bzw. den Mutationen befinden sich jeweils 20 zur Matrix komplementäre Basen. Diese lagern sich an die Matrix an, und die eingesetzte *Pfu*-Polymerase vervollständigt dann den Vektor anhand der Matrix. Als Matrix dient ein Plasmid mit der zu mutierenden cDNA. Auf diese Weise entfallen Umklonierungsschritte, da nach der PCR und Transformation von Bakterien mit dem Mutageneseansatz wieder ein vollständiger Expressionsvektor erhalten wird. Der verwendete Matrixvektor ist methyliert, da er durch Vervielfältigung in *dam*⁺ *E. coli*-Zellen erhalten wird, (dazu gehören die meisten kommerziell

Material und Methoden

erhältlichen Stämme, z.B. XL1-Blue). Das *dam* Gen codiert eine Methyltransferase, die Adenin in der Zielsequenz GATC an Position N6 methyliert (Urig et al. 2002). Parentale (methylierte) Plasmide werden durch Hydrolyse mittels des Restriktionsenzym *DpnI* eliminiert, welches eine Restriktionsendonuklease ist, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet (Zielsequenz: 5'-Gm⁶ATC-3'). Der durch die Mutagenese erhaltene neue Vektor ist unmethyliert und wird deshalb nicht von *DpnI* angegriffen. Anschließend werden *E. coli* (XL1-Blue) Zellen mit dem Mutageneseansatz transformiert. Da die verwendete *Pfu*-Polymerase keine Ligaseaktivität besitzt, befindet sich zwischen Start und Ende der Polymerasereaktion noch eine Lücke, deren Ligation durch Ligasen in den Bakterienzellen erfolgt.

Das hier verwendete modifizierte Protokoll unterscheidet sich vom Quik-ChangeTM-Mutageneseprotokoll von Stratagene darin, dass zunächst in getrennten Ansätzen je ein Strang des Matrixplasmids durch Einsatz jeweils nur eines Oligonukleotids (entweder vorwärts oder rückwärts) amplifiziert wird. So entstehen Hybridplasmide aus einem parentalen Strang ohne Mutation und einem neusynthetisierten Strang, der die Mutation bereits trägt. Nach der Vereinigung der getrennten Ansätze stehen die Hybridplasmide als Matrix zur Verfügung. Die Hybridisierung der Oligonukleotide wird so erleichtert, da diese nun bevorzugt an den Strang des Hybridplasmids binden, der bereits die gewünschten Mutationen enthält.

Die Quik-ChangeTM-Mutagenese wird in zwei 25- μ l-Ansätzen mit je einem Oligonukleotid durchgeführt.

Menge	Komponente
X μ l	Plasmid-DNA (50 ng)
1,5 μ l	Mutageneseoligonukleotid (entweder 5' oder 3', 100 μ M)
1,5 μ l	dNTP's (40 mM)
0,5 μ l	<i>PfuTurbo</i> [®] DNA Polymerase (aus <i>Pyrococcus furiosus</i> , 5 U)
2,5 μ l	10x <i>Pfu</i> -Puffer
ad 25 μ l	dH ₂ O

Im Thermocycler (Mastercycler *gradient* oder *personal*, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) werden zehn präPCR-Amplifikationszyklen durchgeführt:

Schritt	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Bezeichnung
1	30	95	Initiale Denaturierung
2	30	95	Denaturierung
3	60	55	Hybridisierung
4	X	68	Elongation (1 min/kb)

Die entsprechenden Ansätze werden vereinigt und es erfolgt die Zugabe von nochmals 5 U *Pfu*-Polymerase. Anschließend werden 18 Amplifikationszyklen (Schritt 2-4) des gleichen Programms durchlaufen. Die Hydrolyse durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* erfolgt, nach Entnahme eines Kontrollaliquots von 10 µl für die analytische Agarosegelelektrophorese, durch Zugabe von 10 U Enzym und anschließender Inkubation bei 37 °C für 3 h.

2.2.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Agarosegelelektrophorese wird zur analytischen Charakterisierung von DNA-Fragmenten genutzt. Zur Auftrennung werden 1%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose (SeaKem LE Agarose, BMA Rockland, ME USA) wird 3 min in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen auf unter 60 °C wird sie mit Ethidiumbromid (2 mg/ml) versetzt und in eine Gelkammer mit Kamm zum Aushärten überführt. Die DNA wird mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des ausgehärteten Agarosegels pipettiert. Als Standard wird eine 1 kb DNA Leiter eingesetzt. Die DNA-Fragmente werden bei einer Spannung von 130 V für circa 25 min (Richtwert ist etwa 5 V pro cm Elektrodenabstand) in der mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt, anschließend auf einem UV-Transilluminator (312 nm, Bachofer, Reutlingen, Deutschland) sichtbar gemacht und mit einem Videodokumentationssystem (VarioCam, Phase, Lübeck, Deutschland) festgehalten.

2.2.1.3 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifisch kurze DNA-Sequenzen (typischerweise Palindrome von 4-6 Nukleotiden) und spalten diese in der Regel unter Entstehung überhängender Enden. Analytische Hydrolysen von DNA durch diese Enzyme werden in einem 20-µl-Ansatz durchgeführt. 0,5 µg DNA werden mit 10 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease hydrolysiert. 1 U entspricht der Enzymmenge, welche 1 µg DNA bzw. 0,1 µg supercoiled DNA in einem 50-µl-Reaktionsansatz in 60 min hydrolysiert. Es wird jeweils das vom Hersteller empfohlene Puffersystem eingesetzt. Die Inkubation erfolgt über

3 h bei 37 °C im Thermoschüttler. Anschließend werden die Restriktionsansätze mittels Gelelektrophorese überprüft. Ansätze, die für eine Ligation weiterverwendet werden, werden 25 min bei 65 °C einer Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen unterzogen.

2.2.1.4 Ligation

Die T4-Ligase katalysiert unter Verbrauch von ATP die Bildung eines Phosphodiesters aus einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe. Die Ligation wird mit dem durch die Restriktionsendonuklease hydrolysierten Klonierungsvektor und dem ebenso hydrolysierten PCR-Produkt durchgeführt. Dazu werden je 10 µl der jeweiligen Ansätze vereint und nach Zugabe von 1 µl ATP (20 mM) und 1 U T4-DNA-Ligase 20 min bei RT inkubiert.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen (Miniprep)

Alle Plasmid-DNA Extraktionen werden nach der Anleitung des NucleoSpin® Kits durchgeführt. Die Methode beruht auf einer DNA-bindenden Matrix. Die Zellen werden mittels NaOH/SDS-Lösung lysiert. Der optionale für Weiterverwendung der DNA in Sequenzierreaktionen oder enzymatischen Anwendungen empfohlene Waschschrift mit dem AW Puffer wird stets durchgeführt. Eluiert wird die an die Matrix gebundene DNA mit TE-Puffer oder dH₂O (50 µl bzw. 100 µl).

2.2.1.6 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA

Die isolierte Plasmid-DNA wird 1:20 in dH₂O verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 100 µl in eine Küvette gegeben und bei 260 nm im Photometer vermessen. Dabei entspricht die optische Dichte von 1 bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 µg DNA/ml. Reine DNA sollte ein Verhältnis OD_{260/280} von 1,8 bis 2,0 aufweisen.

2.2.1.7 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Die Sequenzierreaktion wird mit dem Big Dye Terminator Sequencing Kit und dem *Taq*-Polymerase Half-Term-Puffer (Genpak/Genetix, New Milton, UK) durchgeführt. Da die vier Terminatoren durch unterschiedliche Fluorophore markiert sind, kann die Sequenzierung als eine Ein-Ansatz-Reaktion durchgeführt werden. Zu 500 ng Plasmid-DNA werden 1,5 µl (15 pmol) des entsprechenden Sequenzieroligonukleotids, 5 µl Half-Term-Puffer und 3 µl Big Dye Terminator Ready Reaction Mix gegeben und mit dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Zur

Sequenzierung der DNA erfolgt eine Zyklusreaktion im Thermocycler (Mastercycler *personal*, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach dem folgenden Programm:

Schritt	Zeit [sec]	Temperatur [°C]
Denaturierung	10	96
Hybridisierung	5	50
Elongation	240	60

Es werden 25 Zyklen durchlaufen.

Die Reinigung des Sequenzieransatzes erfolgt durch Ethanol-fällung. Die DNA wird in 100 µl 96%igem Ethanol aufgenommen und durch Zentrifugation (30 min, 16.000 xg bei 4 °C) gesammelt. Danach wird der Überstand abgenommen und die DNA durch Zugabe von 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wird 5 min bei 16.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wird der Niederschlag für 1 h an der Luft bei RT getrocknet. Die Gelelektrophorese und die Sequenzbestimmung erfolgen im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Arbeitskreis Dr. Buck, UKE Hamburg, in einem automatischen Sequenzierer (*ABI-Sequenator 377*, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland).

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

5 ml LB-Medium werden mit einem, auf einer Agarplatte mit Tetracyclin (12,5 µg/ml) gewachsenen, Klon *E. coli* XL1-Blue angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Um das Tetracyclin zu entfernen, werden die Bakterien bei 5.000 xg und 4 °C 5 min gesammelt, das Medium entfernt und die Zellen in 1 ml antibiotikumfreiem Medium resuspendiert. Mit dieser Suspension werden 50 ml LB-Medium angeimpft und unter den eben beschriebenen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend werden die Zellen 15 min auf Eis gekühlt. Die Sedimentation erfolgt durch Zentrifugation bei 4 °C, 2.000 xg für 15 min. Die Zellen werden in 1/3 des Ausgangsvolumens (16,7 ml) kaltem RF1 Puffer vorsichtig resuspendiert und wiederum 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird erneut 15 min bei 2.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die Zellen in 1/12 des Ausgangsvolumens (4 ml) kaltem RF2 Puffer äußerst vorsichtig resuspendiert. Nach einem Inkubationsschritt von 15 min auf Eis werden Aliquots von 100 µl abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

2.2.2.2 Hitzeschocktransformation

Ein Aliquot (100 µl) chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen (XL1-Blue) wird 20 min auf Eis aufgetaut. Danach werden die Zellen mit 10-100 ng Plasmid-DNA vermischt und weiter für 30 min auf Eis inkubiert. Gemäß der Hitzeschockmethode wird das Eppendorfgefäß dann für 60 sec auf 42 °C erhitzt und nachfolgend 2 min auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz werden 900 µl LB-Medium pipettiert. Das Wachstum der Zellen erfolgt 1 h im Thermoschüttler (220 rpm, 37 °C). Anschließend werden 200 µl der Zellen auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Die restliche Kultur wird zentrifugiert (5 min, 2.100 xg, RT) und 700 µl des Überstandes werden verworfen. Die verbliebenen 100 µl werden zur Resuspension der Zellen genutzt und dann ebenfalls auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Die Selektion der Bakterien erfolgt durch ein entsprechendes Antibiotikum. Die Platten werden invertiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.3 Wachstum und Lagerung der Bakterienstämme

Das Wachstum der Bakterienzellen erfolgt entweder in flüssigem LB-Medium bei 220 rpm oder auf LB-Agar-Platten bei 37 °C über Nacht. Die Platten werden mit Parafilm abgedichtet und maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert. Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien werden zu 750 µl einer Flüssigkultur 250 µl Glycerin (80%) zugegeben. Der vorsichtig vermischte Ansatz wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten werden keimarm an der sterilen Werkbank durchgeführt. Verwendete Lösungen und Geräte werden entweder steril vom Hersteller bezogen oder bei 121 °C und 1,2 bar für 35 min autoklaviert. Die Desinfektion von Oberflächen erfolgt mit 70%igem Ethanol.

2.2.3.1 Kontinuierliche Kultivierung von NRK 52E-, COS7- und H1299-Zellen

Die Kultivierung der eukaryotischen Zellen erfolgt in Gewebekulturflaschen (75 cm² Fläche) im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂. Alle drei Tage erreichen die adhärent wachsenden Zellen vollständige Konfluenz und werden passagiert. Alle Lösungen werden auf 37 °C vorgewärmt. Das Medium wird abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin-EDTA von der Flaschenoberfläche abgelöst und in 8,5 ml Zellmedium aufgenommen. 3 ml (NRK), bzw. 1,5 ml (COS7, H1299)

der Zellsuspension werden in eine neue Gewebekulturflasche überführt und mit Medium auf 15 ml aufgefüllt. Die verbleibende Zellsuspension steht zur Aussaat in Kammerdeckgläser für Transfektionsexperimente zur Verfügung.

2.2.3.2 Aussaat eukaryotischer Zellen in Kammerdeckgläser

Von dem Rest der Zellsuspension, der bei der Passage der Zellen übrigbleibt, wird eine neue Verdünnung zur Aussaat in Kammerdeckgläser (2, 4 oder 8 Kammern) vorbereitet. Hierzu wird von der Zellsuspension der NRK-Zellen 1 ml auf 10 ml Vollmedium gegeben. Bei den H1299- und den COS7-Zellen genügen 0,5 ml. Anschließend werden 2 ml Zellsuspension gleichmäßig auf die Kammern des Deckglases verteilt. Es erfolgt eine Inkubation von 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ bevor die Zellen weiter verwendet werden.

2.2.3.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die DNA, mit der die eukaryotischen Zellen transfiziert werden sollen, wird in serumfreiem Medium (OptiMEM) mit dem Transfektionsreagenz vorinkubiert. Für ein Kammerdeckglas werden zu 100 µl OptiMEM zuerst 2,5 µl fuGENE6 (Roche, Mannheim, Deutschland) pipettiert und erst dann 1 µg DNA. Das Medium muss stets vorgelegt werden und der Ansatz darf weder gevortext noch geschüttelt werden, da sonst das fuGENE6 an der Gefäßwand haftet und nicht mehr im Transfektionsansatz zur Verfügung steht. Die Mischung des Transfektionsansatzes erfolgt durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze. Bei RT wird der Ansatz 20 min inkubiert. Danach werden gleiche Mengen des Transfektionsansatzes in jede Kammer des Deckglases hinzugegeben und leicht auf- und abpipettiert. Es erfolgt eine erneute Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂, bevor die Zellen fixiert werden.

2.2.3.4 Fixierung eukaryotischer Zellen

Paraformaldehyd ist ein polymeres Formaldehyd. Formaldehyd neigt zu vielen Anlagerungs-, Kondensations-, Redox- und Polymerisationsreaktionen. Die Fixierung erfolgt durch kovalente Bindung freier Aminogruppen, was zur Vernetzung benachbarter Proteine führt. Die Fixierung erfolgt mit 3%igem (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 10 min im Brutschrank bei 37 °C. Danach werden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen (37 °C).

2.2.3.5 Färbung eukaryotischer Zellkerne

4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) ist ein 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 die Zellen mit frisch angesetzter DAPI-Lösung (10 µg/ml in PBS) für 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und mit PBS überschichtet. Es erfolgt entweder sofort die fluoreszenzmikroskopische Auswertung oder eine Lagerung im Dunkeln bei 4 °C für maximal drei Tage.

2.2.3.6 Färbung von F-Aktin

Phalloidin, das Toxin des Weißen Knollenblätterpilzes, bindet an Aktin. Durch Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an das Phalloidin lässt sich Aktin fluoreszenzmikroskopisch in Zellen nachweisen. Nach der Fixierung werden die Zellen für 2-3 min bei 37 °C in 0,3% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit FITC (grün) oder TRITC (rot) markiertem Phalloidin für 10 min bei 37 °C. Um ungebundenes Phalloidin zu entfernen wird dann 2 mal mit 1x PBS gewaschen. Zur Lagerung werden die Zellen mit 1x PBS überschichtet.

2.2.3.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) von poly(A)-RNA

Zur Detektion von mRNA kann der poly(A)-Schwanz genutzt werden. Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wird eine poly(dT)₅₀-Sonde eingesetzt, die mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Alex Fluor 555 markiert ist (MWG, Ebersberg, Deutschland). Um Reagenzien zu sparen, werden die zu untersuchenden Zellen in 8-Kammerdeckgläsern ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank kann dann eine Transfektion erfolgen oder direkt mit der FISH begonnen werden. Bevor die Sonde auf die zu untersuchenden Zellen gegeben wird, werden diese fixiert und 2-3 min mit 0,3% Triton X-100 in PBS bei 37 °C permeabilisiert. Dann erfolgt die Prähybridisierung zur Minimierung von Hintergrundfluoreszenz in 100 µl Prähybridisierungspuffer für 20 min bei 37 °C. Zur Hybridisierung wird 1 pmol/ml Sonde zu dem Prähybridisierungspuffer gegeben und die Zellen mit 100 µl dieser Hybridisierungslösung überschichtet. Es erfolgt eine Inkubation für 4 h bei 37°C oder über Nacht im Kühlraum. Anschließend wird jeweils 2 mal für 5 min bei 37 °C mit 0,5 ml 2x SSC mit 10% Formamid, 2x SSC, 1x SSC und 1x PBS gewaschen. Zur Lagerung werden die Zellen mit 1 x PBS überschichtet und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.3.8 Transiente Herunterregulierung der IP₅-2K-Expression durch siRNA

Die IP₅-2K-siRNA-Zielsequenz kann aus (Verbsky et al. 2005b) übernommen werden. Um eine siRNA-Haarschleifenmatrix zu erhalten, wird die Zielsequenz in den folgenden Konverter eingegeben: www.ambion.com/techlib/misc/psilencer_converter.html. Die erstellten vorwärts und rückwärts Oligonukleotide werden bei MWG (Ebersberg, Deutschland) bestellt und in den pSilencer 3.1 puro siRNA Expressionvektor (Ambion, Huntingdon, UK) nach Anleitung des Herstellers kloniert. Der Vektor wird in XL1-Blue-Bakterien vermehrt und über Minipräparation gewonnen. Anschließend werden H1299-Zellen mit diesem Vektor transfiziert, wie in **Kapitel 2.2.3.3** beschrieben.

2.2.3.9 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der fixierten Zellen erfolgt an einem inversen Fluoreszenzmikroskop *Axiovert 25 CFL*. Die Bilddokumentation basiert auf einer digitalen Kamera *Kappa DX30* und der Software *Kappa ImageBase*. Es werden von jeder Zelle jeweils zwei Aufnahmen mit unterschiedlichen Filtern gemacht. Die EGFP-Fluoreszenz-Bilder werden mit einem FITC-Filter (Exzitationsfilter 450-490, Strahlteiler *FT-510*, Emissionsfilter *LP 520*, Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen, die DAPI-Fluoreszenz wird durch den DAPI-Filter (Exzitationsfilter *G365*, Strahlteiler *FT-395*, Emissionsfilter *LP 420*, Zeiss, Jena, Deutschland) sichtbar gemacht. Die Zellen werden bei 1000-facher Vergrößerung (100x Ölimmersionsobjektiv, 10x Okular) betrachtet und fotografiert.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Immunfluoreszenz

Die zu untersuchenden Zellen werden nach dem Fixieren für 2 min bei 37 °C mit 250 µl 0,3% Triton in PBS permeabilisiert (Mengenangaben pro Kammer eines 8-Kammerdeckglases). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird mit 250 µl 3% (w/v) Gelatine in PBS für 20-30 min bei 37 °C geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (100 µl einer Verdünnung in PBS) erfolgt für 3 h bei RT oder über Nacht bei 10 °C im Kühlraum. Vor Zugabe von 100 µl einer entsprechenden Verdünnung des Sekundärantikörpers in PBS wird 3 mal 10 min mit PBS gewaschen. Nach einstündiger Inkubation bei RT mit dem zweiten Antikörper wird das Waschen wiederholt. Die Antikörper werden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: Kaninchen anti-PABP (freundlicherweise zur

Verfügung gestellt von PD Dr. Evita Mohr, 1:1.000); Maus anti-TIAR (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland, 1:1.750); Kaninchen anti-IP₅-2K (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, 1:100); Kaninchen anti-IP3K-B (1:100); Ziege anti-Maus (rot fluoreszierend, Molecular Probes, 1:2.000); Ziege anti-Kaninchen (grün fluoreszierend, Molecular Probes-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, 1:4.000); Ziege anti-Kaninchen (rot fluoreszierend, Molecular Probes-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, 1:2.000).

2.2.4.2 Immunadsorption von EGFP-Fusionsproteinen

Um EGFP-Fusionsproteine anzureichern, werden sie über ihren EGFP-Anhang immunpräzipitiert. Dazu wird zunächst eine große Zellkulturflasche (175 cm² Fläche) mit COS7-Zellen oder H1299-Zellen, die ca. 50% konfluent gewachsen sind, mit dem entsprechenden Expressionsvektor transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ werden sie mit 10 ml PBS gewaschen und durch Zugabe von 2 ml MPER Reagenz (Pierce, Bonn, Deutschland) lysiert. Nach 10 min bei RT werden die Zellen im Homogenisator zusätzlich aufgebrochen. Durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 15.000 xg werden die Membranen abgetrennt. Der Überstand wird mit einem GFP-Antikörper/Protein-G-Agarose-Komplex (12,5 µl anti-GFP-Antikörper (Roche, Mannheim, Deutschland) und 50 µl Protein-G-Agarose (Roche, Mannheim, Deutschland) über Nacht im Kühlraum vorinkubiert) für 4 h im Kühlraum geschwenkt. Anschließend werden die Agarosekügelchen durch Zentrifugation für 20 sec bei 4.000 xg und 4 °C gesammelt und 3 mal mit PBS gewaschen. Pufferreste werden nach Zentrifugation bei 15.000 xg für 20 sec abpipettiert.

Zur Vorbereitung der Probe für die SDS-Gelelektrophorese werden 40 µl 4x Proteinprobenpuffer hinzupipettiert und die Probe für 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.2.4.3 Kinetikmessungen und Bestimmung der Substratspezifität der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

Die Kinetikmessungen der über Immunadsorption angereicherten IP₅-2K werden in 100 µl oder 200 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Die Ansätze enthalten Messpuffer (50 mM HEPES/Na pH 7,0, 100 mM KCl, 0,5 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20-40 ng immunadsorbierte IP₅-2K (bestimmt durch Densitometrie des Fusionsproteins nach SDS Gelelektrophorese) und zwischen 0,05 und 25 µM Ins(1,3,4,5,6)P₅). Die Reaktion wird nach 120 min bei 37 °C durch die Zugabe von Stopplösung (eiskalte TCE (Endkonzentration: 10% (w/v)), 0,5 M EDTA (Endkonzentration: 5 mM) und 1 M NaF (Endkonzentration: 1 mM))

angehalten. Nach Zentrifugation werden die Proteinniederschläge zur Quantifizierung in einem SDS-Gel aufgetrennt. Um die TCE aus dem Überstand zu entfernen, werden drei Diethyletherextraktionen durchgeführt. Anschließend wird mit 2 M Tris auf einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7,0 neutralisiert. Die so extrahierten InsPs werden durch Metal dye detection (MDD)-HPLC analysiert, wie beschrieben in (Guse et al. 1995, Mayr 1988, Mayr 1990). Sowohl Substrate als auch Produkte werden über interne Standards quantifiziert. Um Fehler durch abweichende Reaktionsvolumina oder Verluste bei der Extraktion auszugleichen, wird die Summe der Substrate und Produkte auf 100% normalisiert. Die Auftragung der Abhängigkeit der IP₅-2K-Aktivität von der Konzentration des Substrates erfolgt mit dem Programm PRISM. Aufgrund einer sich daraus ergebenden sigmoidalen Abhängigkeit wird v gegen $[S]$ an die folgende Hill-Funktion angepasst $v = Vmax * S^H / (K + S^H)$ (Segel 1975).

2.2.4.4 MDD-HPLC-Analyse von InsP_x-Isomeren in COS7-Zellen nach Überexpression von EGFP/IP₅-2K

COS7-Zellen ($5 * 10^6$) werden entweder mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-C1 mit und ohne die cDNA der IP₅-2K fusioniert mit dem 3'-Ende der cDNA von EGFP oder mit einem eukaryotischen Kontrollexpressionsvektor ohne Promotor (pEGFP-d2) transfiziert. Die Transfektion wird mit fuGENE6 (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Die Zellen werden für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die Gesamtzellzahl und die Transfektionsrate werden in einer 'Neubauer' Zählkammer bestimmt. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 4.000 xg, 4 °C) gesammelt, in eiskalter Trichloressigsäure aufgenommen (TCA, 8% (w/v) mit EDTA (0,5 M), und NaF (1 M) in finaler Konzentration von 2 mM bzw. 1 mM).

Die Zellyse erfolgt durch zweifaches Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff. Nach Zentrifugation (5 min, 15.000 xg, 4°C) wird der Überstand 15 min bei 40 °C inkubiert. Die TCA wird durch dreifache Etherextraktion entfernt und die Lösung neutralisiert, bevor die InsP_x-Isomere durch MDD-HPLC wie in (Guse et al. 1995, Mayr 1988, Mayr 1990) beschrieben analysiert werden.

2.2.4.5 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wird die diskontinuierliche Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen angewandt (Laemmli 1970, Ornstein 1964). Die dafür verwendeten Gele bestehen aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine aufgrund des pH-Gradienten zwischen Sammel- und Trenngel fokussiert, bevor sie im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Es werden 12,5%ige Gele der Dicke 1 mm genutzt. Die Gele werden in eine vertikale Gelelektrophoresekammer (Hoefler, San Francisco, CA, USA) eingespannt, die mit Laemmli-Laufpuffer befüllt wird. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden, erfolgt die Zugabe von 4x Probenpuffer und die Denaturierung der Proteine bei 95 °C für 5 min. Die Geltaschen werden mit Hilfe einer Hamilton-Spritze mit den Proben befüllt. Die Elektrophorese wird bei 120 V durchgeführt, bis die Proteinfront das Trenngel erreicht hat. Anschließend wird die Spannung auf 150 V erhöht.

Zur Färbung der Proteine werden die Gele für 20 min in Färbelösung geschwenkt. Überschüssige Farbe wird anschließend durch Schwenken in Entfärber (2 x 30 min) entfernt.

2.2.4.6 Western Blotting und Antikörpernachweis von Proteinen

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen können diese von einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden (Western Blotting). Die Detektion der Proteine erfolgt durch entsprechende Antikörper. Sichtbar gemacht werden die Protein/Antikörper-Komplexe durch Sekundärantikörper, die mit einem Enzym (Alkalische Phosphatase) gekoppelt sind, das nach Zugabe seines Substrates eine Farbreaktion hervorruft.

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgt in einem Blotter der Firma BioRad. Es werden zwei 0,5 cm dicke Whatman-Papiere, das Gel und die Membran in Blotpuffer getränkt und in der Reihenfolge: Papier, Membran, Gel, Papier im Blotter luftblasenfrei gestapelt. Bei einer Stromstärke von 0,7 mA/cm² Gelfläche und konstanter Spannung dauert der Transfer 1 h.

Nach erfolgreichem Transfer können die Proteine auf der Membran durch Ponceau-Färbung sichtbar gemacht werden. Dazu wird die Membran für 5 min in Ponceau-Lösung geschwenkt und ungebundene Farbe durch Waschen mit dH₂O entfernt. Der Molekulargewichtsstandard wird mit einem Bleistift nachgezeichnet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran dann für 30 min in Blockierlösung geschwenkt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper über Nacht bei 10 °C. Nachdem überschüssige Reste des Primärantikörpers durch 3 maliges Waschen mit TTBS für 15 min entfernt wurden,

erfolgt die Inkubation mit dem passenden Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Dann wird wieder 3 mal 15 min mit TTBS gewaschen. Um die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase zu entwickeln, wird die Membran mit Färbelösung inkubiert, bis der gewünschte Färbegrad erreicht ist und die Reaktion durch Spülen mit dH₂O gestoppt. Es werden die folgenden Antikörperverdünnungen eingesetzt:

Anti-IP₅-2K: 1:100; anti-TIAR: 1:1.000; anti-PAPB: 1:1.500; anti-GFP: 1:1.000; Alkalische Phosphatase anti-Maus: 1:4.000; Alkalische Phosphatase anti-Kaninchen: 1: 1.000.

2.2.4.7 TCE-Lyse von NRK-Zellen und Detektion endogener Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase

Es werden $2 \cdot 10^7$ bis 10^8 NRK-Zellen durch Zugabe von 1 ml Lysislösung lysiert und die Proteine 1 h auf Eis präzipitiert. Anschließend wird 7 min bei 6.000 xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag 3 mal mit 500 µl Aceton/DTT-Waschlösung gewaschen. Der Niederschlag wird an der Luft getrocknet und dann in 500 µl Proteinprobenpuffer und 50 µl 1 M Tris, pH 8,4, resuspendiert. 40 µl dieser Lösung werden einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die IP3K-B mit dem Antikörper kin4 (Verdünnung: 1:500) nachgewiesen.

2.2.4.8 Bakterielle Expression und Reinigung der Aktinbindungsdomäne aus Ratten Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B und ihrer Mutanten als GST-Fusionsproteine

E. coli BL21 (DE3) RIL Zellen werden mit dem Expressionsvektor pGEX-2T transformiert, der die wtABD bzw. ihre Helixbrechermutanten mit GST-Anhang codiert. Das Wachstum der Bakterien erfolgt in 500 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) bei 37 °C. Bei einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm wird die Expression der GST-Fusionsproteine durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-thio-β-D-Galactosid (IPTG) induziert. Nach 2-stündiger Proteinexpression werden die Zellen durch Zentrifugation bei 11.000 xg für 15 min gesammelt. Die Resuspension erfolgt in 30 ml Lysispuffer (50 mM Hepes, 1 mM EDTA (pH 7,5)). Durch Zugabe von 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,5 mM Benzamidin, 1 mM Dithiothreitol, 0,5% (w/v) Triton X-100 und anschließender Sonifizierung bei 4 °C werden die Zellen lysiert. Nach Zentrifugation bei 11.000 xg und 4 °C für 10 min wird das GST/ABD-Fusionsprotein über eine Glutathion-Sepharose 4B Affinitätschromatographiesäule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gereinigt. Die Reinheit wird durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt und die

Proteinkonzentration im Photometer gemessen. Die Proteine werden direkt in *in vitro* Bindungstests eingesetzt.

2.2.4.9 Aktinpräparation und *in vitro* Bindungstest

Die Aktinpräparation wird im Vorfeld von Prof. Dr. A. Wegner an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Aktin aus den Skelettmuskeln von Kaninchen werden wie bei (Rees and Young 1967) beschrieben präpariert. Ein Teil des Proteins wird an C374 mit N-Ethylmaleimid und anschließend mit 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBT-Cl) an K373 modifiziert, um fluoreszierendes monomeres Aktin zu erhalten (Detmers et al. 1981). Die Aktinkonzentration wird photometrisch bei 290 nm, unter Verwendung eines Absorptionskoeffizienten von $24.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, bestimmt (Wegner 1976). Das Protein wird über eine Sephacryl S-200-Säule (2,5 x 70 cm), die mit Puffer A equilibriert wurde, gereinigt. 10% markiertes monomeres Aktin (1 μM) wird dann mit unmodifiziertem Aktin (9 μM) in Puffer A mit 1 mM MgCl_2 und 100 mM KCl für 1 h bei 37 °C copolymerisiert (Rees and Young 1967). Für die F-Aktinbindungstests werden unterschiedliche Konzentrationen von IP3K-B-ABD/GST-Fusionsprotein (1-20 μM) mit 1 μM F-Aktin inkubiert. Die Assoziation des Fusionsproteins wird durch Anstieg der Fluoreszenzintensität für 20 min aufgezeichnet. Die Fluoreszenz wird mit einem Perkin-Elmer LS-50 Fluorimeter gemessen. Die Extinktionswellenlänge ist 480 nm, die Fluoreszenzintensität wird bei 540 nm gemessen. Alle Messungen werden bei 37 °C in Puffer A mit 1 mM MgCl_2 und 100 mM KCl durchgeführt.

2.2.4.10 Nicht-enzymatische Asp-Pro-Spaltung einer N-terminal trunkierten Form von IP3K-B

Ein trunkiertes cDNA-Fragment (bp 1665-2802) zur Expression einer N-terminal trunkierten katalytischen Domäne von IP3K-B, bestehend aus den Aminosäuren 555-934, wurde von Dr. Sabine Windhorst und Christine Blechner in den pASK IBA3-Vektor (IBA, Göttingen, Deutschland) kloniert. Die Proteinexpression in *E. coli* XL1-Blue und die Reinigung über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (Strep Tag starter kit C3, IBA, Göttingen, Deutschland) wird entsprechend der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Je 500 ng der so prokaryotisch exprimierten N-terminal trunkierten Form von IP3K-B werden in 50 μl Puffer E mit 5 μl 10% TCE für 3 min bei 4, 37, 60 und 95 °C inkubiert. Anschließend wird die TCE durch Zugabe von 50 μl 1M Tris, pH 8,0 neutralisiert. Die Proben werden in einem SDS-Gel getrennt, durch Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und durch einen anti-Strep-Antikörper oder den anti-IP3K-B-Antikörper kin4 nachgewiesen.

2.2.5 Computergestützte Methoden

Doppelfluoreszenzbilder bieten die Möglichkeit, anhand der Verteilung der beiden Fluoreszenzen das Lokalisationsverhalten beider Fluorophore in einem Bild zu betrachten. Zu ihrer Erzeugung werden unterschiedliche Fluoreszenzbilder desselben Bildausschnitts der selben Zelle in Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) geladen. Über die Registerkarte „Bild/Einstellungen/Helligkeit-Kontrast“ werden die Intensitäten der beiden Einzelfluoreszenzbilder einander angeglichen. Über die Registerkarte „Bild/Bildberechnungen“ wird durch adaptive Farbmischung das Doppelfluoreszenzbild erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B unterliegt Zielsteuerungsmechanismen zu verschiedenen zellulären Strukturen

Die intrazelluläre Lokalisation der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (IP3K-B) wurde von der Gruppe um Erneux ausschließlich für das überexprimierte GFP-Fusionsprotein beschrieben. Es wurde dabei eine Lokalisation am ER, an F-Aktin und an der Plasmamembran beobachtet (Dewaste et al. 2003). Die verantwortlichen Zielsteuerungsdomänen wurden jedoch nicht identifiziert. Dr. Isabell Schreiber (aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayr) ist es im Rahmen ihrer Doktorarbeit gelungen, die Aktinbindungsdomäne für die Rattenform der IP3K-B zu identifizieren (Schreiber 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte sich die vollständige Charakterisierung dieses Zielsteuerungsbereiches anschließen. Zuvor musste aber geklärt werden, ob die von Erneux bestimmte intrazelluläre Lokalisation der humanen Form mit der der Ratten-IP3K-B korreliert.

3.1.1 NRK-Zellen exprimieren zu mindestens 99% die Isoform B der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase

Zur Untersuchung der Lokalisation endogener RnIP3K-B wurde die Methode der Immunfluoreszenz gewählt. Der hierfür verwendete hochaffine monoklonale Antikörper kin4 bindet die bakteriell exprimierte katalytische Domäne der IP3K-B aus der Ratte (AS 570-934) an der InsP_3 -Bindungstasche mit einem $K_d < 1 \text{ nM}$, wie in ELISA-Studien bestimmt wurde (Bertsch et al. 2000). Kin4 zeigt keine Kreuzreaktivität mit der C-Isoform von IP3K, erkennt aber Isoform A aus *Gallus gallus* mit einem K_d von 0,1 nM. Daten zur Erkennung der IP3K-A aus Ratten liegen leider nicht vor, da dieses Enzym in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayr nicht prokaryotisch exprimierbar vorliegt. Um kin4 trotz seiner Kreuzreaktivität für die Immunzytochemie in NRK-Zellen verwenden zu können, musste das Expressionsmuster dieser Zellen für die Isoformen A und B bestimmt werden.

Das Expressionsprofil wurde durch Western Blot Analysen von Zelllysaten unter Verwendung des Antikörpers kin4 bestimmt. Da neutrale Lysetechniken, wie z.B. mit kaltem oder heißem SDS Puffer, immer zu einem komplexen Bandenmuster aus IP3K-Fragmenten von niedriger Reproduzierbarkeit führten, waren derartige Techniken für diese Art der

Anwendung ungeeignet. Nur die Lyse mit eiskalter TCE führte zu reproduzierbaren distinkten Banden fast ohne Proteolyse. Wie in **Abbildung 17A** gezeigt, konnten in diesen NRK-Zellextrakten hauptsächlich B-Isoform spezifische Banden nachgewiesen werden. Interessanterweise war aber nur eine kleine Menge an ungeschnittenem IP3K-B-Vollängenprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kD nachweisbar (ca. 3%). 97% des Proteins wurden offenbar geschnitten. Die TCE-Behandlung verursachte anscheinend eine Spaltung an Asp-Pro-Spaltstellen. Diese Art der nicht-enzymatischen Spaltung, bei der zwischen den Aminosäuren Aspartat (Asp, D) und Prolin (Pro, P) sauer gespalten wird, wurde bereits für viele Proteine beschrieben und kann schon unter leicht sauren Bedingungen erfolgen (Marcus 1985).

Dass es sich bei der Fragmentierung der IP3K-B tatsächlich um Asp-Pro-Spaltung handelte, wurde mittels eines prokaryotisch exprimierten trunkierten Fragmentes (AS 555-934, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Sabine Windhorst) verifiziert, welches nur die drei Asp-Pro-Sequenzen an den Positionen 610, 617 und 765 enthielt. Die Inkubation dieses Fragmentes für drei Minuten bei einem pH-Wert zwischen 2 und 3 und Temperaturen von 4, 37, 60 bzw. 95 °C führte zu den erwarteten Banden bei 18 und 22 kD, nachgewiesen im Western Blot mit dem Antikörper kin4. Bereits bei 37 °C lag eine starke Spaltung vor (Daten nicht gezeigt). IP3K-B enthält vier Asp-Pro-Sequenzen (**Abbildung 17B**), deren Spaltung zu sieben Fragmenten der Größen 82,3, 58,5, 39,1, 37,5, 36,8, 18,1 und 17,4 kD führt, welche das Epitop für kin4 enthalten. Die vorausgesagten Fragmente mit den Molekulargewichten 82,3, 58,5 und 37,5 und 36,8 kD konnten nachgewiesen werden, wobei die beiden letzteren zusammen in einer breiteren Bande erschienen (**Abbildung 17A**). Die Banden der Größen 39,1 kD und > 20 kD wurden nicht detektiert, wahrscheinlich, weil die Spaltung an mehreren Spaltstellen in den kurzen Inkubationszeiten bei 4 °C bzw. RT während der TCE-Lyse limitiert ist. Außerdem wurde eine schwache Bande von 55 kD detektiert, dem Molekulargewicht der IP3K-A. Die A-Isoform enthält eine Asp-Pro-Spaltstelle an Aminosäureposition 285, die der in Isoform B an Position 765 entspricht. Bei saurer Spaltung an dieser Stelle würde ein Fragment der Größe 31,5 kD entstehen, welches das Epitop von kin4 enthält. Dieses IP3K-A-Segment wurde aber nicht detektiert. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der 55-kD-Bande nicht um IP3K-A handelt, sondern vielmehr um ein proteolytisches Spaltprodukt der B-Isoform. Unter Berücksichtigung dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass nicht mehr als 1% IP3K-A in den Zellen vorhanden ist. Außerdem konnte auch nach wiederholten Versuchen keine mRNA von IP3K-A in NRK-Zellen durch RT-PCR nachgewiesen werden. In der Literatur wurde ebenfalls nur

das Vorhandensein von IP3K-B für diese Zelllinie beschrieben (Soriano and Banting 1997). Zusammenfassend kann eine Expression von bis zu einem Anteil von 1% nicht ausgeschlossen werden, der die hier durchgeführten Versuche aber nicht beeinflussen sollte.

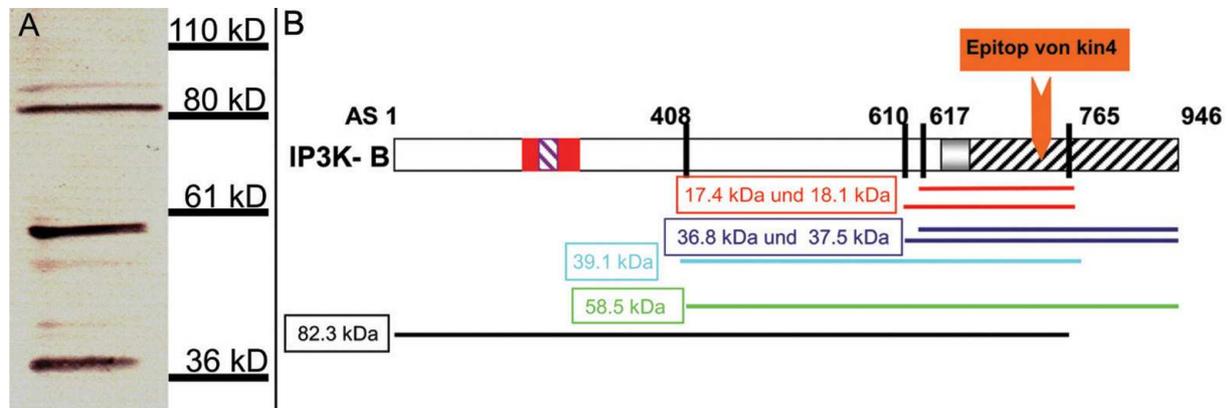


Abbildung 17: Detektion endogener Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-kinase B durch Antikörper kin4 und IP3K-B-Asp-Pro-Spaltung.

(A): Zum Nachweis endogener RnIP3K-B erfolgte die Herstellung eines Zelllysates aus unbehandelten NRK-Zellen. Die mit TCE gefällte Proteinfraktion wurde gelelektrophoretisch getrennt und durch Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion von IP3K-B-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des Antikörpers kin4. Das Volllängenpolypeptid der IP3K-B wurde bei ca. 100 kD detektiert. (B) verdeutlicht die Entstehung der nachgewiesenen IP3K-B-Fragmente durch saure Spaltung an einer oder mehreren der markierten Asp-Pro-Spaltstellen. Unterhalb der schematischen Darstellung der IP3K-B sind die Spaltprodukte aufgeführt, die das Epitop für kin4 enthalten.

3.1.2 Detektion von endogener Ratten Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B bestätigt Colokalisation mit F-Aktin, dem ER, und weist auf Kernlokalisierung hin

Nachdem eine signifikante Expression der IP3K-A in NRK-Zellen ausgeschlossen werden konnte, wurde der Antikörper kin4 zur Untersuchung der Zielsteuerung endogener RnIP3K-B verwendet. Die Bindungs- und Detektionsspezifität des Antikörpers wurde durch einen Wettbewerbsversuch bestätigt, indem kin4 zunächst 4 h mit rekombinanter katalytischer Domäne von IP3K-B (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Werner Fanick) vorinkubiert wurde. Nach Inkubation von NRK-Zellen mit diesem Antikörper/Antigen-Komplex führte die Zugabe des rot markierten sekundären Antikörpers zu keiner spezifischen Färbung mehr, was bedeutet, dass kin4 sehr spezifisch und hochaffin an die katalytische Domäne von IP3K-B bindet.

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation endogener Ratten-IP3K-B wurden NRK-Zellen mit kin4 inkubiert. Die Visualisierung des Kinase/kin4-Komplexes erfolgte durch Detektion mit einem rot fluoreszierenden sekundären anti-Maus-Antikörper aus der Ziege (**Abbildung 18A**). Zur Kontrolle wurde F-Aktin mit FITC-markiertem Phalloidin detektiert

(**Abbildung 18B**). Die Colokalisation der IP3K-B mit F-Aktin erscheint gelb in der Überlagerung (**Abbildung 18C**); dies insbesondere bei der Betrachtung von Stressfaserbündeln (weiße Pfeile in **Abbildung 18A-C**), welche sowohl durch die Detektion endogener IP3K-B als auch durch die F-Aktinfärbung markiert wurden. Eine Zielsteuerung zur Plasmamembran wurde nicht beobachtet, es ist vielmehr davon auszugehen, dass die IP3K-B in der Nähe der Plasmamembran mit subkortikalem Aktin colokalisiert (Nalaskowski and Mayr 2004). Um die ER-Lokalisation der IP3K-B zu untersuchen, wurden NRK-Zellen mit einem Vektor transfiziert, dessen Expression zur Produktion von ECFP führt, das von ER-Zielsteuerungssequenzen flankiert wird (**Abbildung 18E**). Anschließend erfolgte der Nachweis endogener IP3K-B mittels Immunfluoreszenz (**Abbildung 18D**). Durch die Überlagerung beider Bilder konnte die Colokalisation von IP3K-B mit dem ER bestätigt werden (**Abbildung 18F**). Um zu untersuchen, ob die ER-Zielsteuerungsdomäne sich ebenso wie die ABD, im N-Terminus der IP3K-B befindet, wurde eine Coexpression des ER-markierenden ECFP und des trunkierten N-Terminus der IP3K-B (AS 108-585) in NRK-Zellen durchgeführt. Im Vergleich zum Volllängenzym zeigte der IP3K-B-N-Terminus (**Abbildung 18G**) eine stark verminderte Colokalisation mit ER-zielgesteuertem ECFP (**Abbildung 18H**).

Zusätzlich zu den bereits bekannten Lokalisationen wurde eine neue Zielsteuerung der IP3K-B identifiziert, nämlich die Translokation kleiner Mengen der Kinase in den Zellkern. **Abbildung 18A** zeigt eindeutig IP3K-B innerhalb des Kerns, wie die rote Färbung innerhalb der weißen Markierung, die den Kern umrandet, beweist. Da es sich hierbei um ein konfokales Bild handelt, kann eine Lokalisation der IP3K-B ober- oder unterhalb des Kerns ausgeschlossen werden.

Nachdem bestätigt werden konnte, dass sowohl humane als auch Ratten-IP3K-B einer Zielsteuerung zu F-Aktin unterliegen, konnte davon ausgegangen werden, dass der gleiche Bereich in beiden Enzymen für die F-Aktinbindung verantwortlich ist. Es wurde deshalb eine ausführliche Charakterisierung der ABD sowohl im Rattenenzym als auch in humaner IP3K-B vorgenommen.

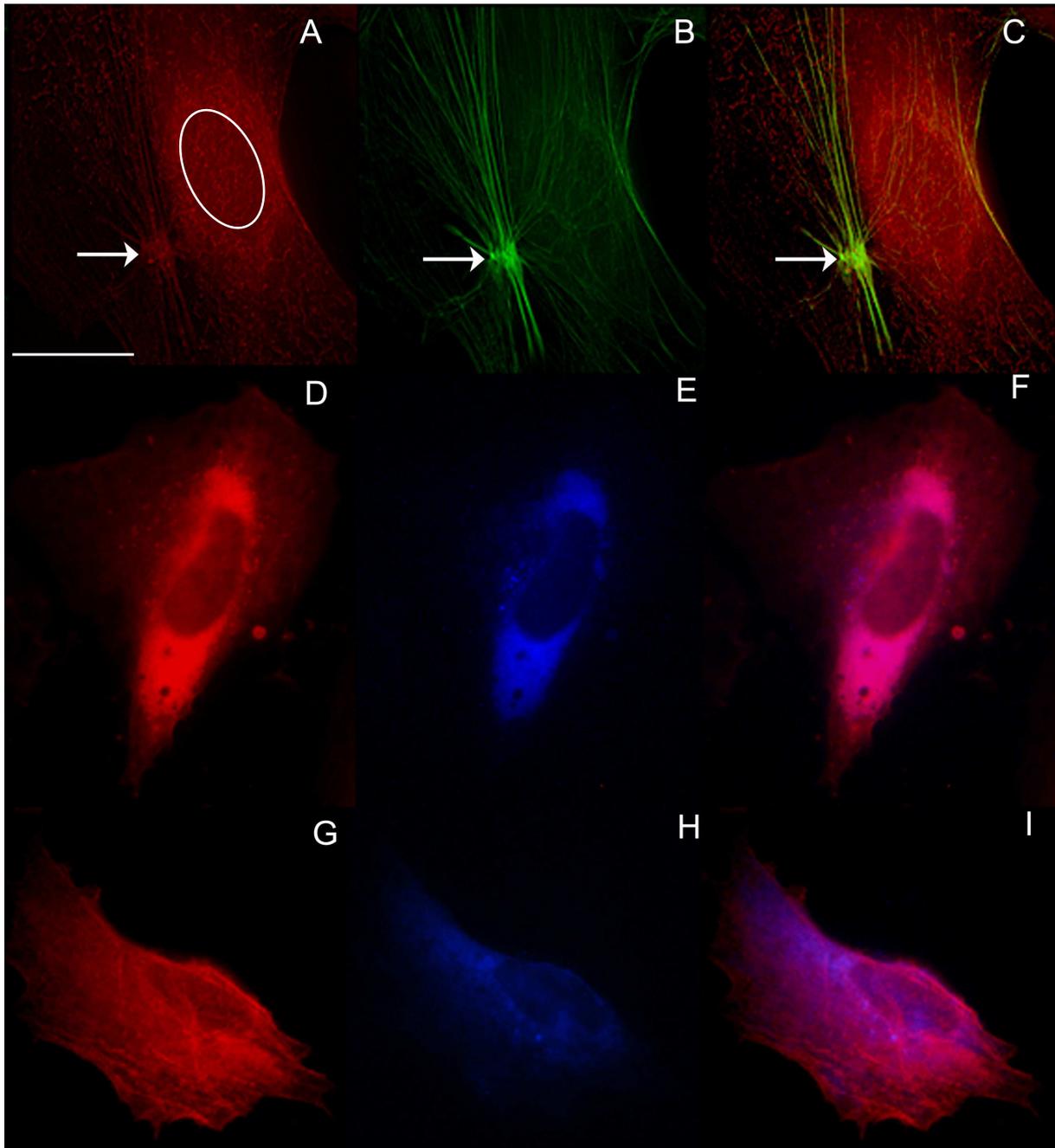


Abbildung 18: Intrazelluläre Lokalisation endogener Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B in NRK-Zellen.

(A): In NRK-Zellen erfolgte der immunhistochemische Nachweis von endogener IP3K-B unter Verwendung des anti-IP3K-Antikörpers kin4. Der Kinase/Antikörper-Komplex wurde mit einem rot fluoreszierenden sekundären anti-Maus-Antikörper aus der Ziege sichtbar gemacht (n=100). Das weiße Oval markiert den Zellkern. (B) zeigt F-Aktin, welches mittels FITC-markiertem Phalloidin detektiert wurde. Die Colokalisation von IP3K-B und F-Aktin erscheint gelb in der Überlagerung (C) (A-C: konfokale Aufnahmen, Dr. Isabell Schreiber). In NRK-Zellen (n=100), die mit ER-Zielsteuerungssequenzen flankiertes ECFP überexprimierten (E), wurde endogene IP3K-B immunhistochemisch unter Verwendung des anti-IP3K-Antikörpers kin4 und eines rot fluoreszierenden sekundären anti-Maus-Antikörpers aus der Ziege detektiert (D). Die Überlagerung von (D) und (E) wird in (F) gezeigt. (G) stellt eine NRK-Zelle nach 24-stündiger Überexpression des trunkeierten N-Terminus der IP3K-B (AS 108-585) dar. In der selben Zelle wurde ER-zielgesteuertes ECFP überexprimiert (H). Die Überlagerung dieser beiden Fluoreszenzen wird in (I) abgebildet. Die Größenskala entspricht 10 µm.

3.1.3 Die Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B an F-Aktin bedarf der korrekten Sekundärstruktur ihrer Aktinbindungsdomäne

Ein wichtiges allgemeines Merkmal von ABDs ist die Notwendigkeit der intakten Sekundärstruktur zweier α -Helices, welche die Bindung an F-Aktin vermitteln. Eine weiterführende Charakterisierung der ABD von IP3K-B (siehe **Kapitel 1.2.2.1.1**, (Schreiber 2002)) durch gezielte Mutagenesestudien sollte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigen, dass die ABD der IP3K-B ebenfalls dieses typische Kriterium erfüllt. Dass die ABD (AS 108-170) in eukaryotischen Zellen *in vivo* an F-Aktin bindet und als rekombinant hergestelltes Protein auch *in vitro* F-Aktinbindung aufweist, wurde bereits gezeigt (Schreiber 2002). Um ausschließen zu können, dass es sich bei der F-Aktinbindung der isolierter ABD um ein Artefakt handelte, welches durch eine im Vergleich zur IP3K-B abweichende Proteinfaltung entstand, musste geprüft werden, ob die isoliert exprimierte ABD in der selben Sekundärstruktur vorlag wie im Kontext des Volllängenenzym. Eine korrekt gefaltete isolierte ABD sollte mit der endogenen IP3K-B um die selben Bindungsstellen am F-Aktin konkurrieren und deshalb in der Lage sein, das endogene Enzym vom F-Aktin zu verdrängen. Nach 24-stündiger Überexpression der isolierten EGFP-markierten ABD zeigte diese eine deutliche Bindung an F-Aktin (**Abbildung 19A**). Wurde hingegen die endogene IP3K-B der selben Zelle mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen, so war sie nun ausschließlich am ER und im Kern lokalisiert (**Abbildung 19B**). Die korrekte Sekundärstruktur der isolierten ABD war somit hinreichend zur Verdrängung endogener IP3K-B vom F-Aktin. Anschließend sollte ihre Notwendigkeit für die F-Aktinbindung geprüft werden, indem ABD-Mutanten mit gestörter Sekundärstruktur auf ihre F-Aktinbindungseigenschaften untersucht wurden. Zur Generierung dieser Mutanten wurden durch gezielte Punktmutagenese einzelne Aminosäuren innerhalb der beiden prädictierten α -Helices der ABD gegen Proline ausgetauscht, da Proline α -helikale Strukturen brechen können. In die erste putative α -Helix wurden die „Helixbrechermutationen“ L139→P und L143→P eingefügt. Wie **Abbildung 19C** zeigt, war die Fähigkeit an F-Aktin zu binden bei dieser Mutante H1 stark reduziert. Mutante H2 enthielt die Punktmutationen I159→P und T163→P in der zweiten putativen α -Helix. Die so erzeugte ABD-Mutante zeigte keinerlei Bindung an F-Aktin mehr, sondern eine deutliche Gleichverteilung in der Zelle (**Abbildung 19D**).

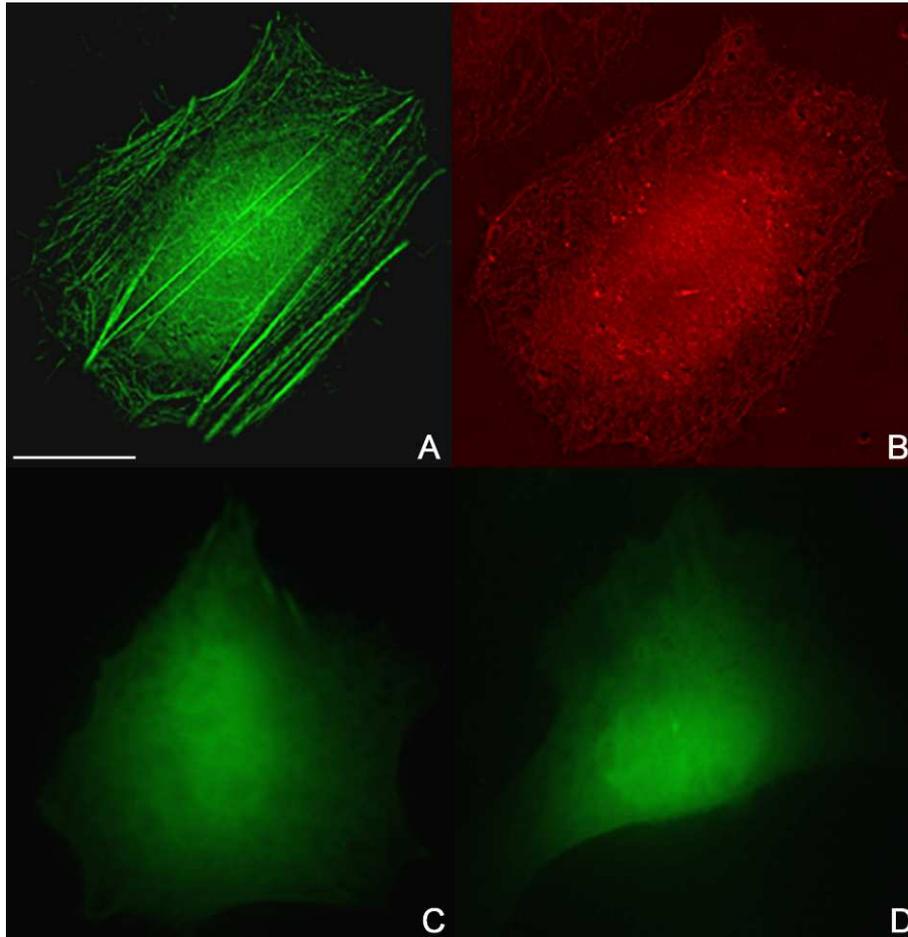


Abbildung 19: Intrazelluläre Lokalisation endogener Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B nach Überexpression der IP3K-B-ABD und intrazelluläre Lokalisation von ABD-Helixbrechermutanten.

In NRK-Zellen, die 24 h die isolierte ABD der IP3K-B als EGFP-Fusionsprotein überexprimierten, wurde die endogene IP3K-B mit dem Antikörper kin4 detektiert. Der Nachweis des Kinase/Antikörperkomplexes erfolgte mit einem rot fluoreszierenden anti-Maus-Antikörper aus der Ziege (n=100). Die EGFP-Fluoreszenz des EGFP/ABD-Fusionsproteins, in einer Beispielzelle, ist in (A) dargestellt, (B) zeigt die immunhistochemisch nachgewiesene endogene IP3K-B der selben Zelle.

Außerdem wurde in NRK-Zellen die intrazelluläre Lokalisation der Helixbrechermutanten, exprimiert als EGFP-Fusionsproteine, fluoreszenzmikroskopisch untersucht (jeweils n=100). (C) zeigt die EGFP-Fluoreszenz der Helixbrechermutante H1 (L139→P und L143→P), (D) die der Helixbrechermutante H2 (I159→P und T163→P). Die Größenskala entspricht 10 μm .

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Albrecht Wegner an der Ruhr-Universität Bochum wurden anschließend F-Aktinbindungsstudien durchgeführt, um auch *in vitro* die Notwendigkeit einer intakten Sekundärstruktur der ABD zu beweisen (Abbildung 20). Die Bindungsstudien beruhen auf einem Anstieg der Fluoreszenzintensität von fluoreszenzmarkiertem F-Aktin, der durch Bindung eines Proteins an das F-Aktin verursacht wird. Nach Inkubation steigender Konzentrationen der *wt*-ABD, rekombinant exprimiert als GST-Fusionsprotein, mit fluoreszierendem F-Aktin stieg die Fluoreszenzintensität stark an, was auf eine direkte Bindung der ABD an F-Aktin schließen ließ. Aus dem konzentrationsabhängigen Anstieg der

Fluoreszenzintensität konnte ein $K_{d,app}$ von etwa 10 μM berechnet werden. Die beiden Helixbrechermutanten der ABD verursachten keinen Anstieg in der Fluoreszenzintensität, sie besitzen somit auch *in vitro* keine F-Aktinbindungsaktivität.

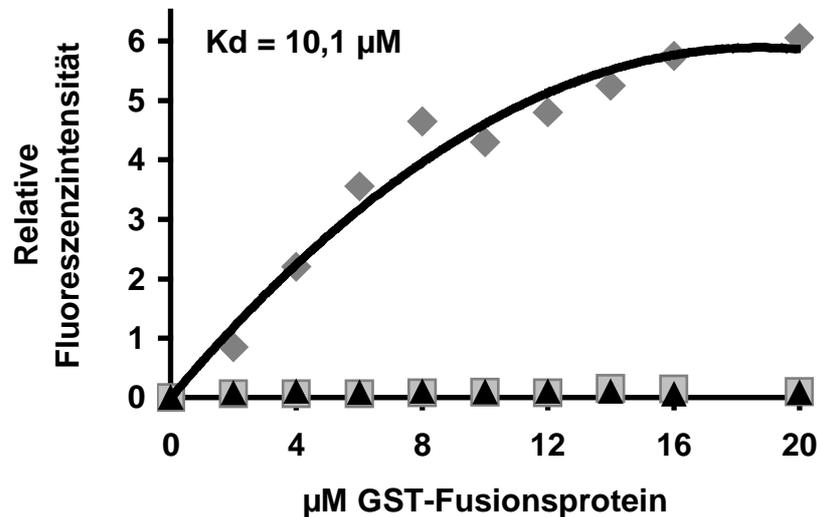


Abbildung 20: *In vitro* Bindungsstudien von *wt*Aktinbindungsdomäne und Helixbrechermutanten an F-Aktin.

Der Graph zeigt die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der Menge des eingesetzten Proteins: *wt*ABD/GST-Fusionsprotein (graue Rauten), Helixbrechermutante H1 (graue Quadrate) und Mutante H2 (schwarze Dreiecke). Die Bindungskurve, kalkuliert für $K_d = 10,1 \mu\text{M}$, wird durch die schwarze Linie dargestellt.

3.1.4 Die putative Aktinbindungsdomäne, bestehend aus den Aminosäuren 108-170, ist die einzige Aktinbindungsregion im N-Terminus der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B

Um zu beweisen, dass die ABD, die in der Rattenform aus den Aminosäuren 108-170 geformt wird, die einzige funktionale ABD in der N-terminalen Domäne von IP3K-B ist, wurden die oben beschriebenen Helixbrechermutationen ebenfalls in den trunkierten N-Terminus eingefügt. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Mayr liegt ein EGFP-Expressionsvektor vor, der für die Aminosäuren 108-585 codiert. Es wurden wieder durch Quik-Change-Mutagenese die Mutationen L139→P und L143→P in die erste putative α -Helix und die Mutationen I159→P und T163→P in die zweite putative α -Helix eingefügt. Überexprimiert in NRK-Zellen verhielten sich beide Mutanten wie die Helixbrechermutanten der isolierten ABD. In der ersten α -Helix führten die Mutationen zu einer stark reduzierten F-Aktinbindung (**Abbildung 21A**), in der zweiten α -Helix wurde durch die Mutationen eine Gleichverteilung des Proteins

in der Zelle erzielt (**Abbildung 21B**). Der unmutierte N-Terminus dagegen zeigte eine deutliche Zielsteuerung an F-Aktin (**Abbildung 21C**).

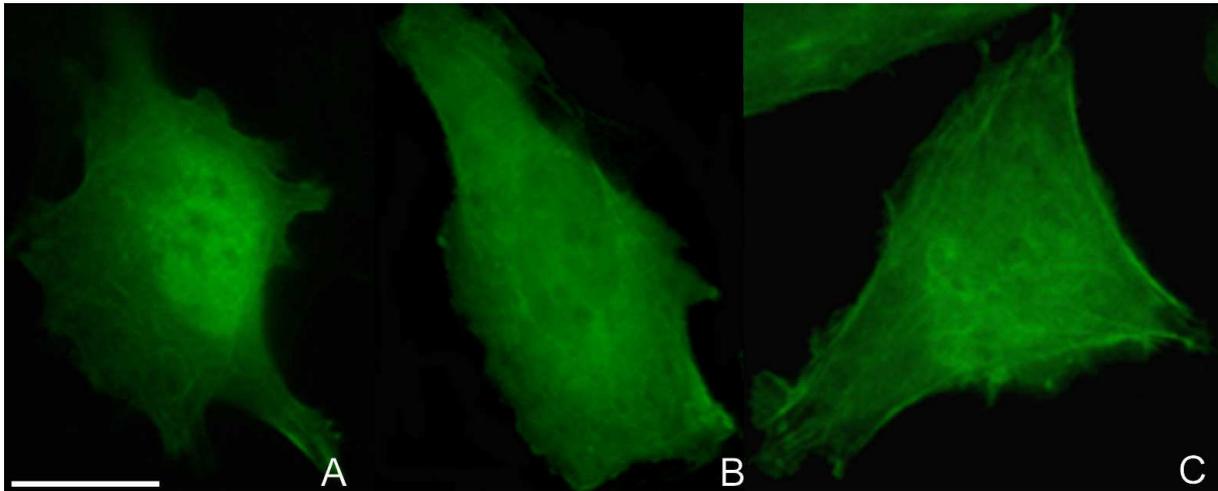


Abbildung 21: Intrazelluläre Lokalisation des N-Terminus der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B.

In den N-Terminus der IP3K-B wurden Helixbrechermutationen eingefügt. In die erste α -Helix (Mutante H1, L139→P und L143→P) bzw. in die zweite α -Helix (Mutante H2, I159→P und T163→P). Nach 24-stündiger Überexpression der Mutanten bzw. des IP3K-B-N-Terminus' in NRK-Zellen wurde die intrazelluläre Lokalisation der EGFP fusionierten Polypeptide fluoreszenzmikroskopisch untersucht (jeweils n=50). (A) zeigt die EGFP-Fluoreszenz von H1, (B) die von H2 und (C) die des IP3K-B-N-Terminus'. Größenskala entspricht 10 μ m.

3.1.5 Die Deletion der Aktinbindungsdomäne aus dem Volllängenprotein der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B führt zum Verlust der F-Aktinlokalisierung und zur Identifizierung des Kernlokalisierungssignals

Bei Lokalisationsstudien isolierter Zielsteuerungsdomänen kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese Segmente im Kontext des Volllängenproteins dieselben Eigenschaften aufweisen wie in isolierter Form. Da die putative ABD bisher nur als isoliertes Fragment oder flankiert von Segmenten des N-Terminus exprimiert untersucht wurde, sollte geprüft werden, ob durch die Deletion der ABD aus dem IP3K-B-Volllängenprotein jegliche Aktinbindung des Proteins eliminiert würde. Auf diese Weise könnte ausgeschlossen werden, dass es weitere funktionelle ABDs in der IP3K-B gibt und dass es sich bei der bisher identifizierten ABD nur um einen Teil einer größeren bzw. komplexer aufgebauten Domäne, ähnlich z.B. den I/LWEQ-Domänen (McCann and Craig 1999) handelt.

Hierzu wurde zunächst, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, ein eukaryotischer Expressionsvektor generiert, der die Volllängen-cDNA der humanen IP3K-B enthielt. Die ABD wird in der Rattenform der IP3K-B von den Aminosäuren 108-170 gebildet. Um die

ABD aus der humanen Form zu deletieren, wurde das entsprechende Fragment, bestehend aus den Aminosäuren 103-165, entfernt.

Die intrazelluläre Lokalisation des HsIP3K-B/EGFP-Fusionsproteins stimmte mit der oben beschriebenen Lokalisation der endogenen IP3K-B überein. Das Fusionsprotein wies ER-Lokalisation auf und bewirkte starke Fluoreszenz in und um den Kern. Die Colokalisation mit F-Aktin war deutlich sichtbar (**Abbildung 22A**). Zur Kontrolle wurde F-Aktin mit TRITC-markiertem Phalloidin und der Kern mit DAPI gefärbt (**Abbildung 22B**).

Erwartungsgemäß führte die Überexpression der Deletionsmutante, als EGFP-Fusionsprotein, nicht mehr zu einer Markierung von F-Aktinstrukturen (**Abbildung 22C**). Zusätzlich fiel auf, dass keine Translokation der Deletionsmutante in den Kern stattfand, während die ER-Lokalisation erhalten blieb. Tatsächlich lässt sich in der Primärstruktur der ABD ein kanonisches monopartites Kernlokalisierungssignal (NLS) vorhersagen, welches durch die Deletion der ABD ebenfalls entfernt wurde. Auf diese Weise kam es vermutlich zu einer ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisation der Mutante. Das NLS wird in der humanen Form von den Aminosäuren 128-131 gebildet, in der Ratte liegt es bei Aminosäureposition 134-137. Die Sequenz RKLR des NLS in der RnIP3K-B ist beim Menschen vollständig konserviert (**siehe auch Diskussion: Abbildung 40**). In der katalytischen Domäne der IP3K-B gibt es ein weiteres Segment, das der Konsensussequenz eines monopartiten NLS entspricht. Obwohl die katalytische Domäne durch die hier vorgenommene Deletion im N-Terminus nicht verändert wurde, fand kein Transport der Deletionsmutante in den Kern mehr statt. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass dieses putative NLS im Vollängenprotein der IP3K-B nicht aktiv ist. Es wurde aus diesem Grunde nicht weiter untersucht.

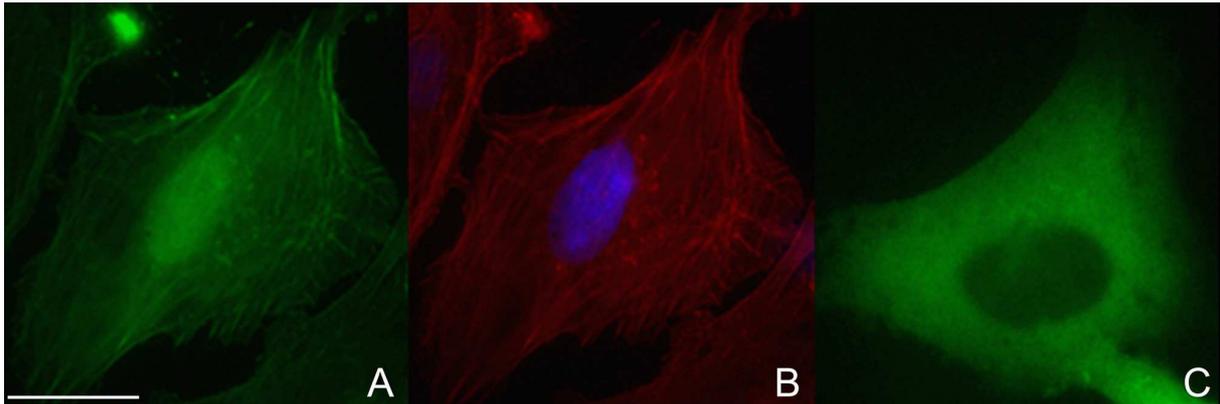


Abbildung 22: Intrazelluläre Lokalisation überexprimierter humaner Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B und der ABD-Deletionsmutante in NRK-Zellen.

(A) zeigt eine beispielhafte NRK-Zelle, die mit EGFP fusioniertes HsIP3K-B-Volllängenprotein (grün) überexprimiert (n=100). F-Aktin wurde mit TRITC markiertem Phalloidin (rot), der Kern mit DAPI (blau) gefärbt. (B) stellt die Überlagerung dieser beiden Fluoreszenzen dar. (C) zeigt die grüne Fluoreszenz eines Fusionsproteins aus EGFP und IP3K-B/ABD-Deletionsmutante, in einer NRK-Zelle, nach 24-stündiger Überexpression (n=100). Die Größenskala entspricht 10 μm .

3.2 Charakterisierung neuer Funktionen humaner Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase durch Untersuchung ihrer intrazellulären Lokalisation

Die Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ zu InsP_6 war, zu Beginn dieser Arbeit, die einzige bekannte Funktion der humanen Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ($\text{IP}_5\text{-2K}$). Für das Hefehomolog Ipk1 wurde aber bereits eine indirekte Rolle im Gle1 medierten mRNA-Export beschrieben. Die ihm zugewiesene Funktion wurde dabei allerdings auf die Produktion von InsP_6 beschränkt, welches als der aktive Effektor im mRNA-Export der Hefe bezeichnet wurde. Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Funktionen der $\text{IP}_5\text{-2K}$ durch die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation dieses Enzyms identifiziert werden.

3.2.1 Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase unterliegt einer Zielsteuerung aus dem Zytoplasma in den Kern zu aktiven Genregionen

Um Hinweise auf die physiologische Relevanz von $\text{IP}_5\text{-2K}$ im Menschen zu erhalten, wurde zunächst die intrazelluläre Lokalisation überexprimierter EGFP-Fusionsproteine der $\text{IP}_5\text{-2K}$ in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien untersucht. Die Wahl der Zelllinien wurde in **Kapitel 2.1.8.** erläutert. Für die meisten der bereits beschriebenen InsP -Kinasen wurde eine Translokation vom Zytosol in den Zellkern gefunden, und ein unabhängiger InsP -Metabolismus im Kern wird in letzter Zeit immer eingehender diskutiert (Martelli et al. 2004). Insbesondere die Beteiligung von nukleärem InsP_4 , InsP_5 und InsP_6 an der Chromatinremodellierung (Rando et al. 2003, Shen et al. 2003, Steger et al. 2003) sowie die Wichtigkeit von InsP_6 im NHEJ (Byrum et al. 2004) und in RNA editierenden Enzymen (Macbeth et al. 2005) ließen vermuten, dass die $\text{IP}_5\text{-2K}$ auch im Kern lokalisiert sein könnte. Diese Annahme konnte vor Beginn der vorliegenden Arbeit bereits durch Untersuchung der intrazellulären Lokalisation überexprimierter EGFP-Fusionsproteine der $\text{IP}_5\text{-2K}$ in NRK-Zellen bestätigt werden (persönliche Mitteilung von Dr. Marcus Nalaskowski).

Die $\text{IP}_5\text{-2K}$ wurde sowohl als N- als auch als C-terminales EGFP-Fusionsprotein in NRK-Zellen (**Abbildung 23A-C**) und COS7-Zellen (**Abbildung 23D-F**) überexprimiert. Beide Fusionsproteine verhielten sich bezüglich ihrer Lokalisation gleich. Lediglich die Transfektionsrate war für die N-terminal fusionierte $\text{IP}_5\text{-2K}$ etwas höher als für die C-terminal fusionierte, deshalb wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem $\text{IP}_5\text{-2K/EGFP}$ -Fusionsprotein durchgeführt.

In den transient transfizierten Zellen wurde sowohl zytosolische als auch nukleäre Lokalisation der IP₅-2K beobachtet. In einer großen Anzahl von Zellen trat das Enzym nach mehr als 20 h Expressionszeit auch in die Nukleoli ein. Interessanterweise war das Enzym nicht gleichmäßig im Kern verteilt, wie nahezu alle anderen bisher beschriebenen InsP-Kinasen (Brehm et al. 2004, Nalaskowski et al. 2003, Saiardi et al. 2001a). Nur für die IPMK aus *Drosophila melanogaster* wurde eine spezifische Zielsteuerung an Euchromatin in Polytänschromosomen beschrieben (Seeds et al. 2004). Wie in **Abbildung 23 (A,D)** veranschaulicht, zeigte die IP₅-2K eine stark strukturierte Anlagerung an spezifische nukleäre Strukturen, die nur schwach von DAPI angefärbt wurden (**Abbildung 23B,E**). Genregionen, mit denen DAPI stark wechselwirkte, zeigten hingegen kaum grüne Fluoreszenz, beruhend auf der Anlagerung von IP₅-2K. DAPI ist eine mit DNA interkallierende Substanz, die Heterochromatin signifikant stärker anfärbt als Euchromatin (Cowan et al. 2002). Die Überlagerungsbilder (**Abbildung 23C,F**) visualisieren diese Art der spezifischen Lokalisation von IP₅-2K, die auf eine bevorzugte Zielsteuerung des Enzyms an die Euchromatinfraction von nukleären Substrukturen hinweist.

Im Rahmen der von der Autorin praktisch betreuten Diplomarbeit von Dipl.-Biol. Tobias Schenk sollte ein putatives DNA-Bindungsmotiv der IP₅-2K untersucht werden (Schenk 2004), welches von einem phylogenetisch konservierten putativen Zinkfingermotiv gebildet wird. Es wurden hierzu mittels Quik-Change-Mutagenese Punktmutationen in dem N-Terminus der IP₅-2K im Bereich dieses putativen Zinkfingermotives (AS 150-170) erzeugt. Die Mutanten enthielten Alanine anstelle basischer Aminosäuren in diesem Segment. Tatsächlich konnte die Colokalisation der IP₅-2K mit Euchromatin durch die Mutagenese von Lysin 168 zu Alanin im IP₅-2K-Vollängenprotein vollständig aufgehoben werden. Diese Punktmutante zeigte eine gleichmäßige Verteilung in Zytoplasma und Zellkern und wies keinerlei Anlagerung mehr an Euchromatin auf (**Abbildung 23G-I**). Wurden Serine anstelle der putativ Zink bindenden Cysteine oder Histidine eingefügt, so war die Kernlokalisation der Mutanten stark beeinflusst (siehe **Kapitel 3.2.2**).

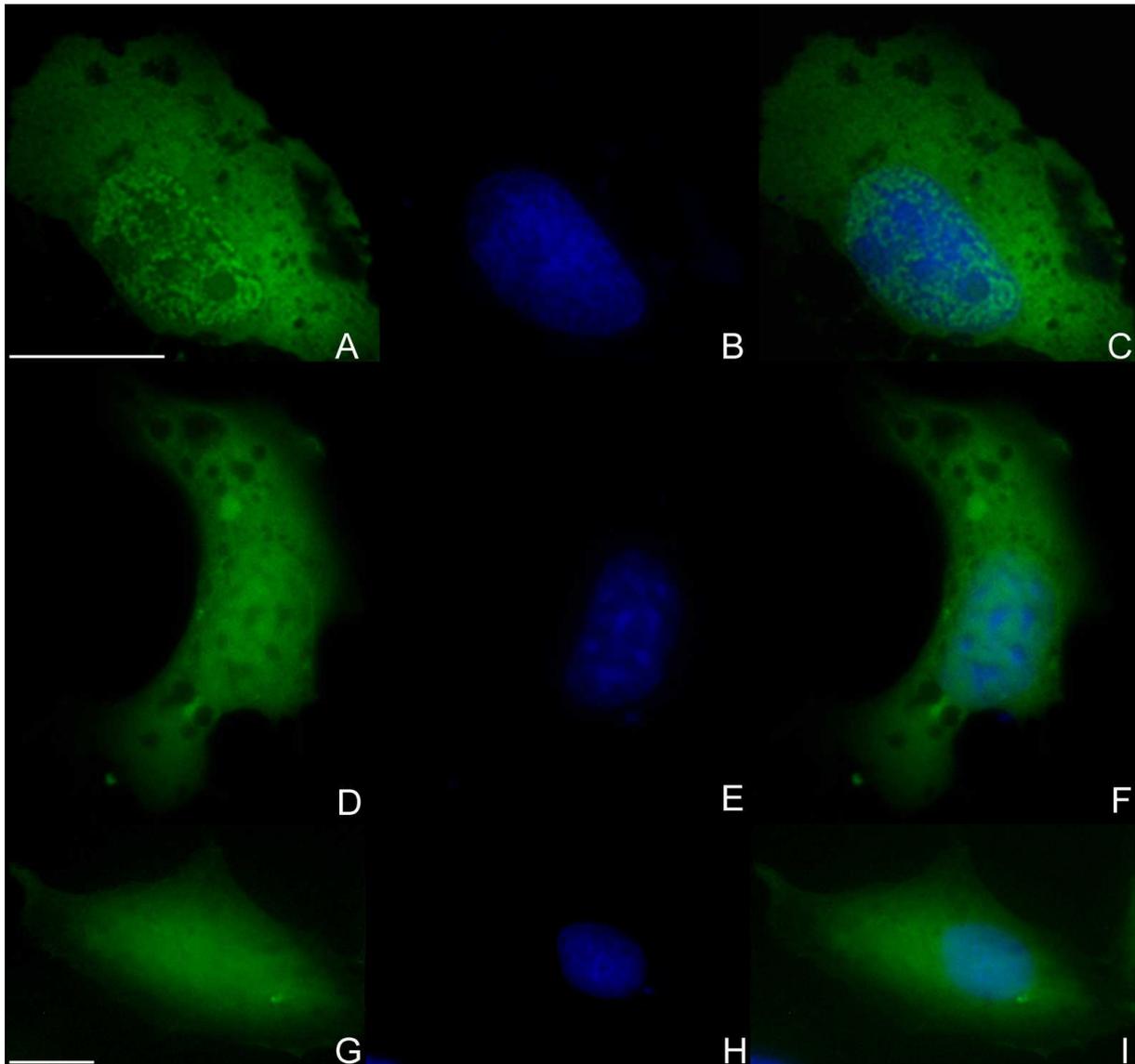


Abbildung 23: Intrazelluläre Lokalisation überexprimierter Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase.

IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein wurde transient in NRK- bzw. COS7-Zellen überexprimiert und die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (siehe Material und Methoden, n=100). (A-C) bzw. (D-F) zeigen Fluoreszenzbilder von NRK- und COS7-Zellen 24 h nach Transfektion. Die EGFP-Fluoreszenz (A,D) die blaue DAPI-Fluoreszenz (B,E) und die Überlagerungen beider Signale (C,F) veranschaulichen die Colokalisation von nukleärem EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein mit Regionen, die nur schwach von DAPI angefärbt werden, während stark DAPI bindende Regionen nur leichte EGFP-Fluoreszenz aufweisen.

Eine repräsentative NRK-Zelle, in der die Mutante L168→A überexprimiert wurde, wird in (G) dargestellt (n=100). Die EGFP-Fluoreszenz ist hier gleichmäßig zwischen Kern und Zytoplasma verteilt. Die Färbung des Kerns erfolgte mit DAPI (H). (I) stellt das Überlagerungsbild von (G) und (H) dar. Die Größenskalen entsprechen 10 µm.

Um diese Daten, die mit dem überexprimierten Enzym gewonnen wurden, zu bestätigen und Überexpressionsartefakte ausschließen zu können, wurde die intrazelluläre Lokalisation der endogenen IP₅-2K untersucht. Es wurde hierfür ein Kaninchen anti-IP₅-2K-Peptidantikörper (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, der gegen das Peptid RYLEEFPEERKTLQ (AS 346-360) der humanen Form der IP₅-2K gerichtet ist. In Kontroll Western Blots

detektierte dieser Antikörper spezifisch überexprimiertes IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein, wie durch einen anti-GFP-Antikörper bestätigt wurde. Die **Abbildung 24 (A-L)** zeigt die intrazelluläre Verteilung der endogenen IP₅-2K. Im Zytoplasma war die Kinase nur in sehr geringem Maße nachweisbar, der Zellkern hingegen wies eine starke Präsenz endogener IP₅-2K auf (**Abbildung 24A,D**). In Übereinstimmung mit den Daten, die mit dem IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein gewonnen wurden, ist eine gegensätzliche Färbung zu DAPI (**B,E**) deutlich erkennbar. In vielen der untersuchten Zellen waren punktförmige Ansammlungen von IP₅-2K vor allem im Zentrum der Nukleoli sichtbar (**D**). Sich teilende Zellen in der Anaphase oder der Telophase, in denen Kernmembranen abwesend sind, zeigten eine gleichmäßige Verteilung von IP₅-2K im Zytoplasma. Eine Colokalisation mit den hochkondensierten Chromatinstrukturen war in diesen Zellen erwartungsgemäß nicht nachweisbar (**Abbildung 24G-L**).

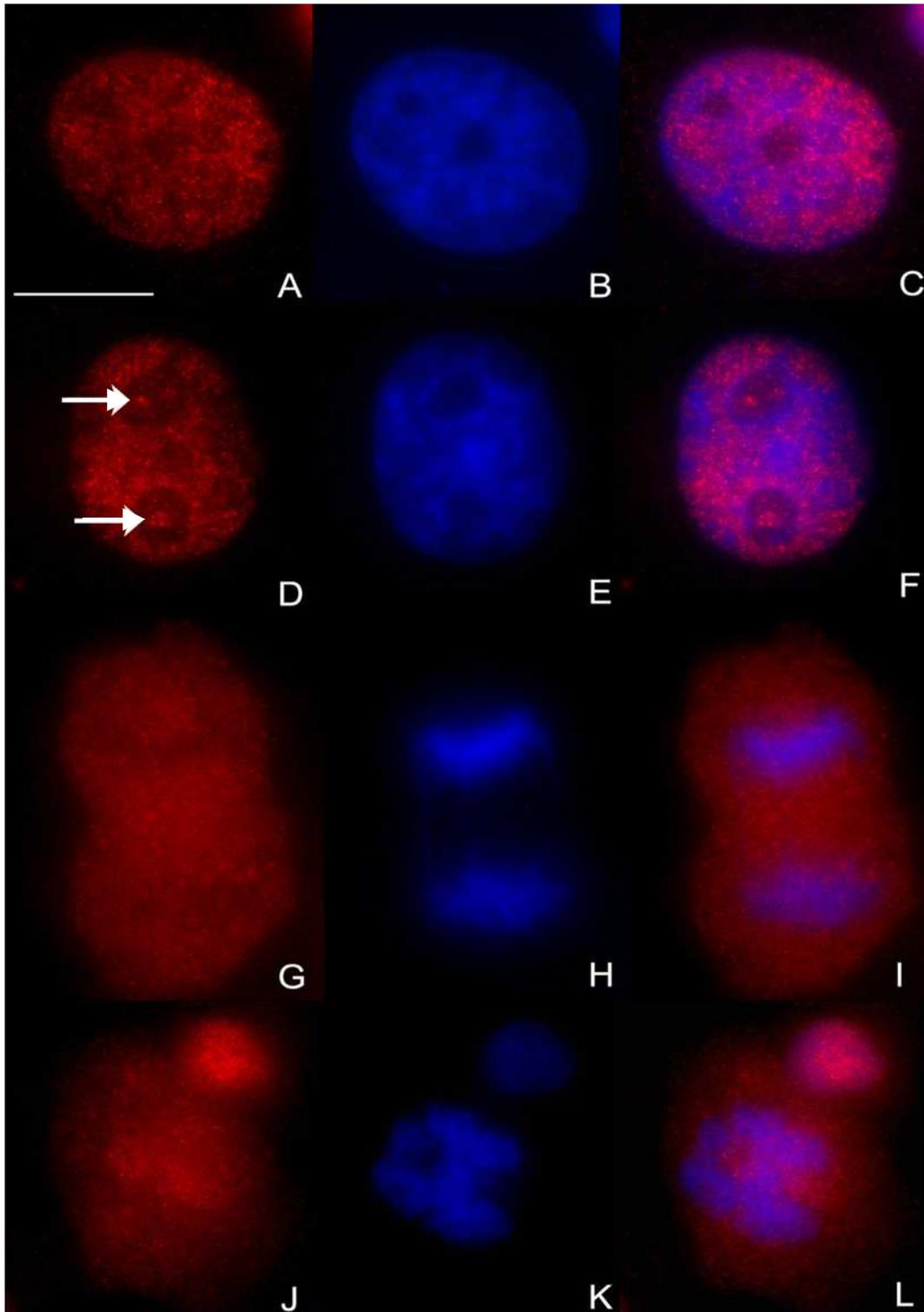


Abbildung 24: Intrazelluläre Lokalisation endogener Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase.

Endogene IP₅-2K wurde durch Immunfluoreszenz in H1299-Zellen detektiert (siehe Material und Methoden, n=100). Zwei repräsentative Zellen sind in (A-F) abgebildet. Rote IP₅-2K-Immunfluoreszenz (A,D) ist hauptsächlich im Kern in vielen kleinen Punkten lokalisiert, die sich in schwach DAPI gefärbten Kernregionen befinden (B,E). Die Überlagerungen (C,F) bestätigen diese Lokalisation. In einigen Zellen wurde auch IP₅-2K in den Nukleoli detektiert (weiße Pfeile in D). In sich teilenden H1299-Zellen (zwei Beispielzellen in (G-L)) war die rote Immunfluoreszenz der endogenen IP₅-2K (G,J) gleichmäßig über die Zellen verteilt und zeigte keine Colokalisation mit Heterochromatin, gefärbt mit DAPI (H,K), wie die Überlagerungen (I,L) bestätigen. Die Größenskala entspricht 10 µm.

3.2.2 Die Zielsteuerung der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase reguliert ein zeitabhängiges zytoplasmatisches Pendeln der Kinase

Nachdem eine nukleäre Lokalisation der IP₅-2K identifiziert wurde, sollten Zeitreihenexperimente klären, ob die Kinase im Kern verbleibt oder ob ein Reexport der IP₅-2K vom Zellkern ins Zytoplasma erfolgt. Ein solches nukleozytoplasmatisches Pendeln könnte ein erster Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der IP₅-2K am mRNA-Export sein.

Zur Klärung dieser Frage wurden IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein exprimierende NRK-Zellen 6, 10, 14, bzw. 20 Stunden nach Transfektion fixiert und die intrazelluläre Lokalisation des Proteins fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Anhand ihrer Fluoreszenzintensität wurden für jeden Zeitpunkt jeweils 40 Zellen ausgewählt und fotografiert, die mittelstark das Fusionsprotein exprimierten und die Prozentanteile der Zellen berechnet, in denen die IP₅-2K unterschiedlich lokalisiert war. Drei verschiedene intrazelluläre Verteilungen der IP₅-2K wurden definiert: Erstens eine ausschließlich zytosolische Lokalisation (**Abbildung 25, rote Säulen**). Zweitens eine schwächere Fluoreszenzintensität im Kern als im Zytoplasma (**schwarze Säulen**) und drittens, gleich starke oder stärkere Fluoreszenzintensität im Kern als im Zytoplasma (**grüne Säulen**).

Sechs Stunden nach Expression war noch in keiner der Zellen Fluoreszenz sichtbar. Erst nach frühestens zehn Stunden konnte grüne Fluoreszenz des exprimierten Fusionsproteins beobachtet werden. Nach dieser Zeit war die IP₅-2K in 35% der untersuchten Zellen exklusiv im Zytoplasma lokalisiert. In 37,5% der Zellen konnte IP₅-2K im Kern detektiert werden. Diese Zellen wiesen weniger Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma auf, aber es lag bereits z.T. eine strukturierte Anlagerung der IP₅-2K an Euchromatin vor. 27,5% der untersuchten Zellen zeigten eine gleichmäßig starke Fluoreszenz in Kern und Zytoplasma. In der Hälfte dieser Zellen (13,75%) lag die IP₅-2K sowohl strukturiert als auch diffus im Kern vor. In den restlichen Zellen (13,75%) zeigte die nukleäre IP₅-2K eine nahezu ausschließliche Lokalisation an Euchromatinstrukturen. Eine Lokalisation der IP₅-2K in den Nukleoli wurde nach 10-stündiger Expression in keiner Zelle beobachtet. 14 Stunden nach Transfektion zeigte ein weit größerer Prozentsatz an Zellen strukturierte Anlagerung der Kinase im Kern (77,5% mindestens gleich starke Fluoreszenzintensität in Kern und Zytoplasma, 12,5% schwächere Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma). Die Nukleoli waren immer noch von der Fluoreszenz ausgespart. Nur in 10% der Zellen war noch immer keine signifikante Menge an fluoreszierendem Protein im Zellkern sichtbar. 20 Stunden nach Transfektion wiesen 100% der Zellen starke nukleäre Fluoreszenz auf, in 80% konnte keine diffus verteilte IP₅-2K mehr, sondern nur noch spezifisch am Euchromatin lokalisierte Fluoreszenz beobachtet werden. Zu

diesem Zeitpunkt nach Transfektion war die IP₅-2K auch in die Nukleoli aufgenommen worden. Die zeitliche Abfolge der Lokalisationsstufen der IP₅-2K wird in dem graphischen Schema in **Abbildung 25 (1A-C)** illustriert. Darunter ist jeweils eine Beispielzelle für die jeweilige Expressionszeit dargestellt (**2A-C**). Insbesondere nach der längsten Expressionszeit wird eine Besonderheit der IP₅-2K-Lokalisation sichtbar. Es konnten große Fusionsproteinakkumulationen im Zytoplasma einiger transfizierter Zellen beobachtet werden. Teilweise standen diese konzentrisch um den Kern angeordneten Granula noch in Kontakt mit Kernporen. Derartige Proteinakkumulationen wurden niemals bei der Überexpression anderer EGFP-fusionierter InsP-Kinasen beobachtet.

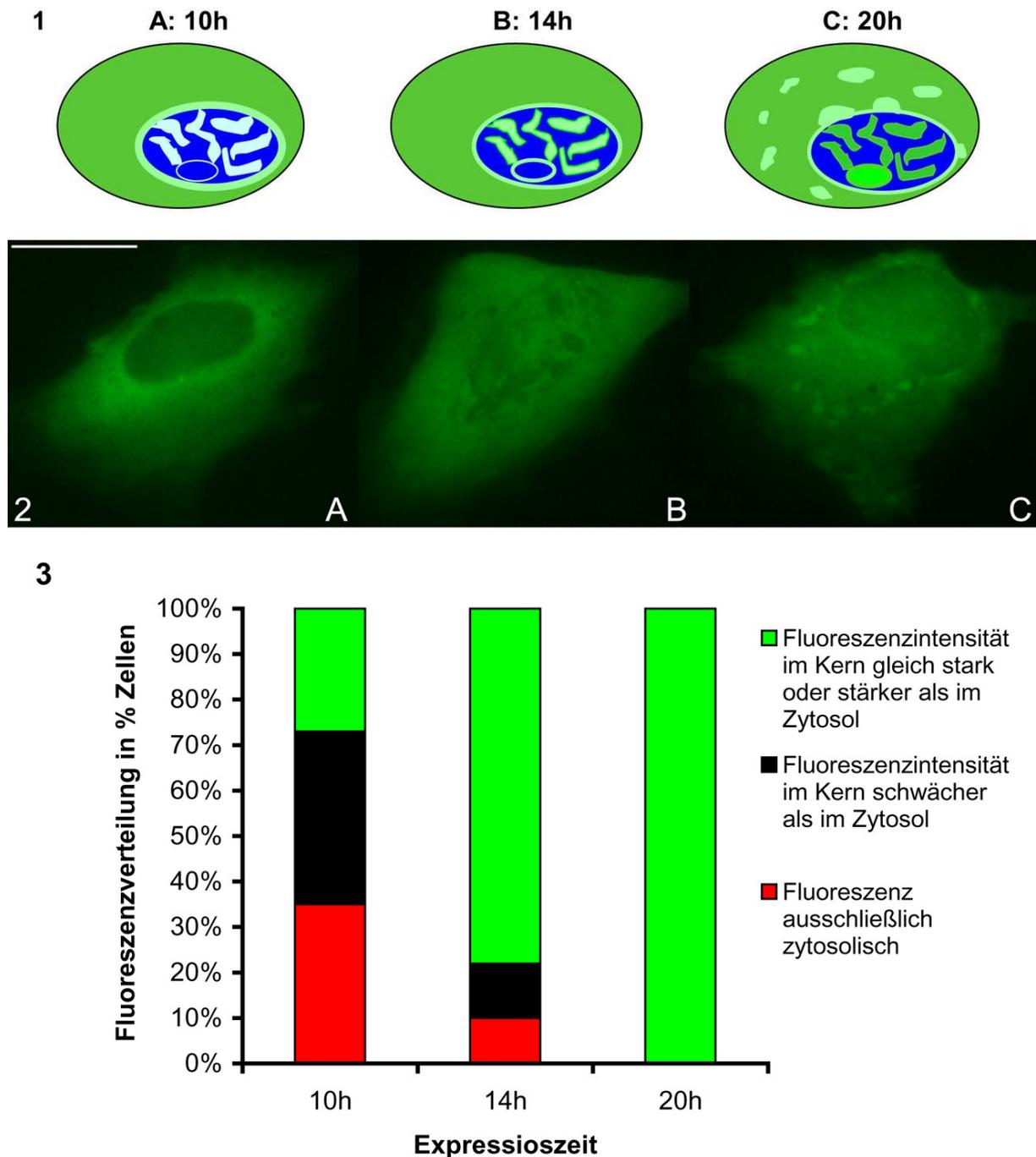


Abbildung 25: Expressionszeit abhängige Translokation der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase.

IP₅-2K/EGFP überexprimierende NRK-Zellen wurden 10, 14 bzw. 20 h nach Transfektion fixiert. Für jede Zeit wurde die intrazelluläre Lokalisation von EGFP und DAPI in 40 Zellen untersucht. Die Fluoreszenzverteilung nach jeder Expressionszeit wird in **1A-C** schematisch dargestellt (schwache DAPI-Färbung: hellblau, starke DAPI-Färbung: dunkelblau, IP₅-2K/EGFP: grün). Repräsentative Einzelzellbilder werden in **2A-C** gezeigt. Die Größenskala entspricht 10 µm.

Das Säulendiagramm (**3**) gibt an, in wieviel Prozent der untersuchten Zellen die Fluoreszenzintensität im Kern schwächer war als im Zytoplasma (**schwarze Säulen**), die Fluoreszenzintensität im Kern gleich stark oder stärker war als im Zytoplasma (**grüne Säulen**) und in wieviel Prozent der untersuchten Zellen ausschließlich zytoplasmatische Fluoreszenz sichtbar war (**rote Säulen**). 100% entsprechen jeweils 40 Zellen.

3.2.2.1 Identifizierung der Zielsteuerungsdomänen der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

Das nukleozytoplasmatische Pendeln der IP₅-2K und ihre Colokalisation mit Euchromatin bedingen die Aktivität verschiedener Zielsteuerungsdomänen. Um nach ihrer Synthese im Zytoplasma in den Kern gelangen zu können, ist ein Kernlokalisierungssignal (NLS) nötig. Enzyme, deren Molekulargewicht 40 kD überschreitet, können nämlich nicht passiv in den Kern diffundieren. Stattdessen müssen sie, wie in **Kapitel 1.3.3.1.1** beschrieben, über mindestens ein Kernlokalisierungssignal verfügen, das von Importin α erkannt wird. Nach der Bindung des NLS fungiert das Importin dann als Transporter, der das NLS-tragende Protein in den Kern geleitet.

Nach der Aufnahme der IP₅-2K wird eine Zielsteuerungsdomäne für die Lokalisation am Euchromatin benötigt. Die notwendige Aminosäure wurde, wie in **Kapitel 3.2.1** beschrieben, bereits im Bereich einer putativ Zink bindenden Domäne als Lysin 168 identifiziert.

Um den Kern wieder verlassen zu können, muss außerdem ein Kernexportsignal (NES) vorhanden sein.

3.2.2.1.1 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase besitzt ein nicht-kanonisches Kernlokalisierungssignal in ihrer N-terminalen Domäne

Um den Kernimport der IP₅-2K zu charakterisieren, erfolgte in Datenbankrecherchen die Suche nach klassischen NLS-Sequenzen. Tatsächlich wurde ein solches monopartites NLS der Sequenz PPNRKKT zwischen den Aminosäuren 38-44 prädictiert.

Die Notwendigkeit dieses Fragmentes für den Kernimport der IP₅-2K wurde anschließend in der von der Autorin mitbetreuten Diplomarbeit von Dipl.-Biol. Tobias Schenk untersucht (Schenk 2004). Die Inaktivierung putativer NLS, durch den Austausch der für die NLS-Aktivität essentiellen basischen Aminosäuren, ist ein adäquates Mittel zur Identifizierung von Kernlokalisierungssignalen. Die Eliminierung der für den Kernimport notwendigen und hinreichenden Aminosäuren würde dabei zu einer rein zytosolisch lokalisierten Mutante führen. Es erfolgte deshalb die Mutation aller drei basischen Aminosäuren in diesem Segment zu Alaninen (Mutante TS1: R41/K42/K43→A). Bei der hierfür verwendeten Methode, der Quik-Change-Mutagenese, werden die gewünschten Mutationen in die cDNA des Proteins eingefügt, die sich, fusioniert mit der cDNA von EGFP, in einem eukaryotischen Expressionsvektor befindet. Nach Transfektion eukaryotischer Zellen mit diesem Vektor wird die Mutante als EGFP-Fusionsprotein in den Zellen überexprimiert und kann anschließend

fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Die Mutante TS1 zeigte allerdings in maximal 13% der transfizierten Zellen eine rein zytosolische Lokalisation (**Abbildung 26**, TS1). Die nicht modifizierte Form der IP₅-2K zeigt dagegen in 100% transfizierter NRK-Zellen und ca. 82% transfizierter H1299-Zellen eine starke nukleäre Lokalisation (**Abbildung 26**, erste bzw. letzte Säule). Das prädiizierte NLS ist somit nicht entscheidend an der Translokation der IP₅-2K in den Kern beteiligt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde davon ausgegangen, dass für den Kernimport der IP₅-2K weitere basische Aminosäuren notwendig sind, die ein nicht-kanonisches NLS bilden. Deshalb erfolgte die Herstellung weiterer Mutanten, in denen zusätzliche Lysine und Arginine im N-Terminus der IP₅-2K zu Alaninen konvertiert wurden. Die Mutante TS2, in der neben dem Motiv R41/K42/K43 auch R28, K33 und K36 gegen Alanine ausgetauscht wurden, war bereits in 32% der untersuchten Zellen rein zytosolisch lokalisiert (**Abbildung 26**, TS2). Der größte Effekt wurde interessanterweise aber erzielt, wenn ein putatives Zinkfingermotiv (AS 150-170) mutagenisiert wurde. Die Konversion der putativ Zink bindenden Histidine (H152, H156) und Cysteine (C159, C162) zu Serinen führte dazu, dass das mutierte Protein (Mutante TS3: H152/H156/C159/C162→S) in 45% der untersuchten Zellen nicht mehr in den Kern transportiert wurde (**Abbildung 26**, TS3). Die Beteiligung eines Zink bindenden C₂H₂-Motives an einem NLS wurde bisher nicht beschrieben, trotzdem scheint es am Kernimport der IP₅-2K beteiligt zu sein. Untersuchungen von Prof. Dr. Mayr ergaben, dass dieser Typ von Zink bindendem C₂H₂-Motiv in der IP₅-2K von vielen Tierspezies hochkonserviert ist. Es könnte somit eine sehr wichtige Rolle in der Zielsteuerung der IP₅-2K spielen. In der ebenfalls von der Autorin praktisch betreuten Diplomarbeit von Dipl.-Ing. Xuefei Zhou wurden die basischen Reste in der Umgebung dieses putativen Zinkfingermotives auf ihre Beteiligung am Kernimport der IP₅-2K untersucht, um die Charakterisierung des NLS von IP₅-2K fortzuführen (Zhou 2005). Es wurden hierzu Mutanten generiert, in denen in verschiedenen Kombinationen die Lysine 155, 157, 173, 175 und 179 zu Alaninen mutiert wurden. Zwei dieser Mutanten zeigten in ca. 80% der transfizierten H1299-Zellen eine rein zytosolische Lokalisation. Es handelt sich dabei um die Mutante XZ1, die die Mutationen K155/157→A trägt, und die Mutante XZ2, in der die Lysine 173, 175 und 179 zu Alaninen mutiert wurden. Die Mutante XZ3, welche die Mutationen aller drei Mutanten XZ1, XZ2 und TS2 enthielt (XZ3: R28/R33/K36/R41/K42/K43/K155/K157/K173/K175/K179→A), war ebenfalls in 80% der transfizierten Zellen ausschließlich zytosolisch lokalisiert. Es konnte somit durch die Kombination der Mutationen kein additiver Effekt erzeugt werden, der in mehr als 80% der

transfizierten Zellen eine vollständige Inhibierung des Kernimportes von IP₅-2K-Mutanten erzeugte (**Abbildung 26, XZ1-3**).

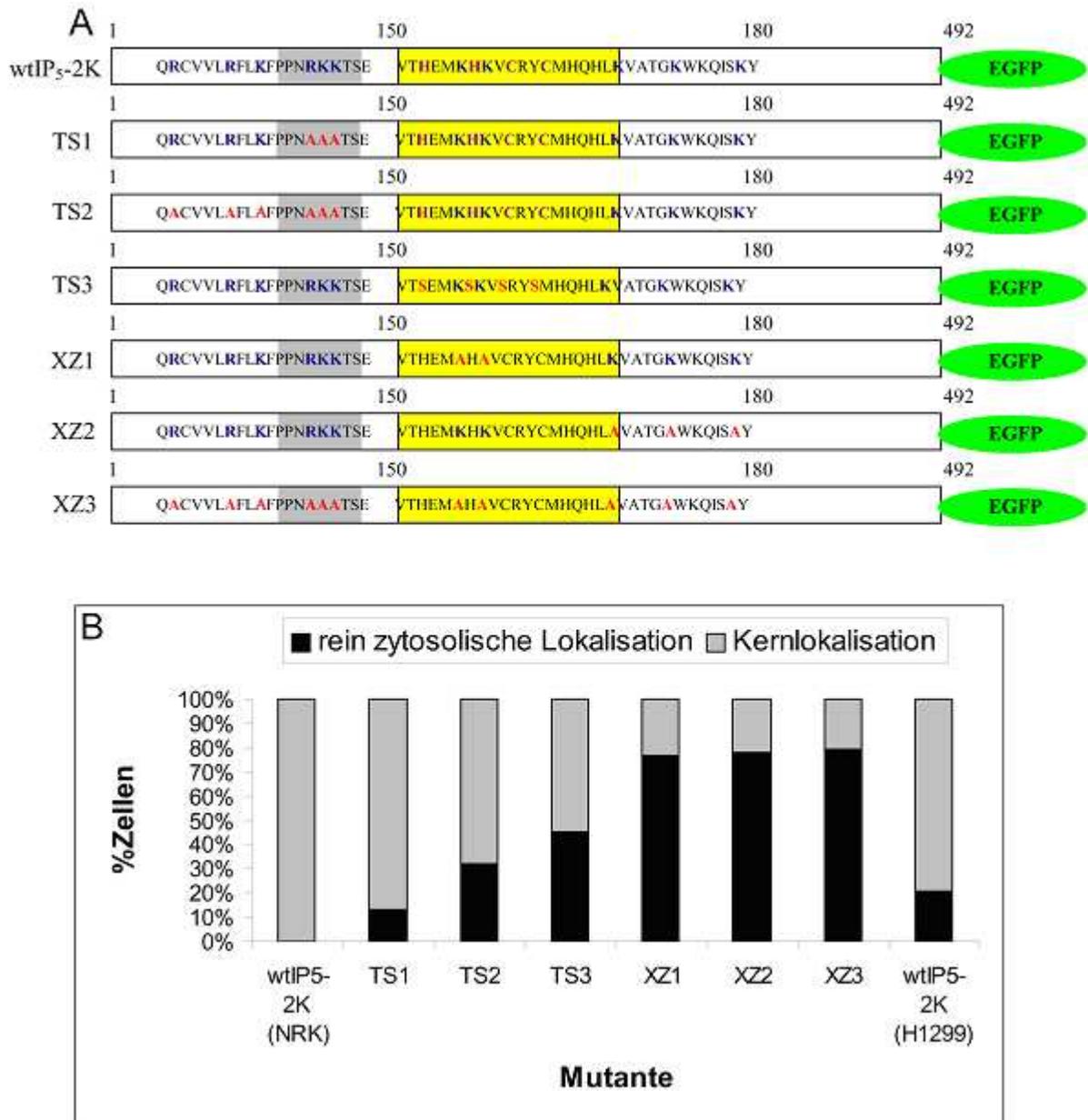


Abbildung 26: Die intrazelluläre Lokalisation von IP₅-2K/NLS-Mutanten

(A): Schematische Darstellung der IP₅-2K und der Mutanten TS1-3 und XZ1-3 als EGFP- (grünes Oval) Fusionsproteine. Das prädiizierte putative monopartite NLS ist grau unterlegt, das putative Zinkfingermotiv wird durch einen gelben Kasten hervorgehoben. Basische Aminosäuren sind in blauen, putativ Zink bindende Aminosäuren in violetten und durch Mutagenese eingeführte Alanine (A) sind in roten Lettern dargestellt.

(B): Die IP₅-2K/NLS-Mutanten TS1-3 wurden in NRK-Zellen überexprimiert, die Mutanten XZ1-3 in H1299-Zellen. Nach 24 h wurde die intrazelluläre Lokalisation der Mutanten in ≥ 200 Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Das Diagramm gibt den Prozentsatz transfizierter Zellen an, in denen die Mutanten rein zytosolisch lokalisiert vorlagen (schwarze Säulen), bzw. Kernlokalisierung aufwiesen (graue Säulen). In den Mutanten waren die folgenden Aminosäuren mutiert worden: TS1: R41/K42/K43→A; TS2: R28/R33/K36/R41/K42/K43→A; TS3: H152/H156/C159/C162→S; XZ1: K155/K157→A; XZ2: K173/K175/K179→A; XZ3: R28/R33/K36/R41/K42/K43/K155/K157/K173/K175/K179→A.

3.2.2.1.2 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase besitzt ein Exportin unabhängiges Kernexportsignal

Der nukleäre Export eines Enzyms kann über unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Eine Möglichkeit ist, wie in **Kapitel 1.3.3.1.1** beschrieben, die Aktivität einer Pendeldomäne, die sowohl den nukleären Import als auch den Export vermittelt (Kendirgi et al. 2003). Eine zweite NES-Variante stellen die Leucin reichen Kernexportsignale dar, welche die Interaktion mit Exportinen erfordern, um den Transport ins Zytoplasma medieren zu können (Gorlich and Kutay 1999). NTF2 homologe Domänen hingegen funktionieren Exportin unabhängig. Stattdessen bindet dieses Kernexportsignal an NTX, welches seinerseits direkt mit dem Kernporenkomplex interagiert und so den Kernexport des Heterodimers aus Frachtprotein und NTX ermöglicht (Coburn et al. 2001).

Um zu bestimmen, ob der Mechanismus des Kernexportes eines Proteins über ein Exportin abhängiges NES verläuft, gibt es zwei mögliche Ansätze: Erstens die Identifizierung der NES bildenden Aminosäuren und die Inaktivierung ihrer NES-Aktivität durch Mutagenesestudien oder zweitens die Inhibierung des Exportin abhängigen Kernexportes durch Leptomycin B (LMB, (Gorlich and Kutay 1999)).

Um den Einfluss einer Inhibierung des Kernexportes durch LMB auf die intrazelluläre Lokalisation der IP₅-2K zu erforschen, wurden zunächst IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein überexprimierende NRK-Zellen mit LMB inkubiert (Schenk 2004). Dieser SH-reaktive Exportinhibitor bindet an Exportin und verhindert auf diese Weise den nukleären Export von Proteinen mit Exportin abhängigen Leucin reichen NES, wodurch sie im Zellkern verbleiben (Wolff et al. 1997). Wie **Abbildung 27A-C** zeigt, konnte aber nach einer sechsstündigen Behandlung, von Zellen, welche die IP₅-2K 24 h lang überexprimierten, keine Veränderung der intrazellulären Lokalisation der IP₅-2K, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**D-F**), beobachtet werden.

Zur Absicherung dieses Befundes wurde in der Primärstruktur der IP₅-2K nach Leucin reichen NES gesucht. Dabei konnten von Prof. Dr. Mayr vier solcher putativen Sequenzen identifiziert werden.

NES1 mit der Sequenz **LEFVKQLCL**, in einer amphipatischen vorhergesagten Helix, wird von den AS 82-90 gebildet und besitzt drei Leucine, die ein spezifisches Merkmal von klassischen NES-Sequenzen darstellen. Im Rahmen ihrer von der Autorin mitbetreuten Diplomarbeit hat Dipl.-Ing. Xuefei Zhou drei NES1-Mutanten hergestellt, in denen eine putative NES-Aktivität inaktiviert worden wäre (Zhou 2005). Aus einer Deletionsmutante wurde das gesamte Peptidsegment 80-93 entfernt. Die beiden Punktmutanten trugen folgende

Aminosäureaustausche: L82V/V85A/L88V/L90V bzw. L82A/V85A/L88V/L90A. Es konnte bei diesen Mutanten aber keine verstärkte Kernlokalisierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss der drei putativen NES (NES2: 327-335; NES3: 369-376 und NES4: 433-442) auf den Kernexport der IP₅-2K, wird nun im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Stud. med. Mario Kobras untersucht.

Weitere Sequenzanalysen sollten Hinweise auf mögliche Exportin unabhängige NES der IP₅-2K liefern. Hierzu erfolgte der Vergleich von zehn Vertebraten-IP₅-2K- und 18 Pilz-Ipk1-Aminosäuresequenzen (siehe Alignierung im Anhang, Seite II, erstellt von Prof. Dr. Mayr), wobei zwei inserierte Peptidsegmente identifiziert wurden, die nur in den IP₅-2Ks aus Vertebraten vorkommen. Sie bestehen aus den Aminosäuren 202-297 bzw. 335-389. Um Anhaltspunkte über ihre Funktion zu erhalten, wurden die codierenden Basenpaare dieser Insertionen durch Quik-Change-Mutagenese aus der cDNA der IP₅-2K deletiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation dieser Deletionsmutanten, überexprimiert als EGFP-Fusionsproteine in H1299-Zellen. Die Deletionsmutante ohne Insertion 1 (**G-I**) war in 95% der transfizierten Zellen ausschließlich im Kern lokalisiert. Die Insertion 1 scheint damit ein sehr starkes Exportin unabhängiges Kernexportsignal der IP₅-2K zu sein. Im Zusammenhang mit einer DAPI-Färbung des Kerns war bei der Deletion von Insertion 2 keine Veränderung der IP₅-2K-Lokalisation sichtbar (Daten nicht gezeigt).

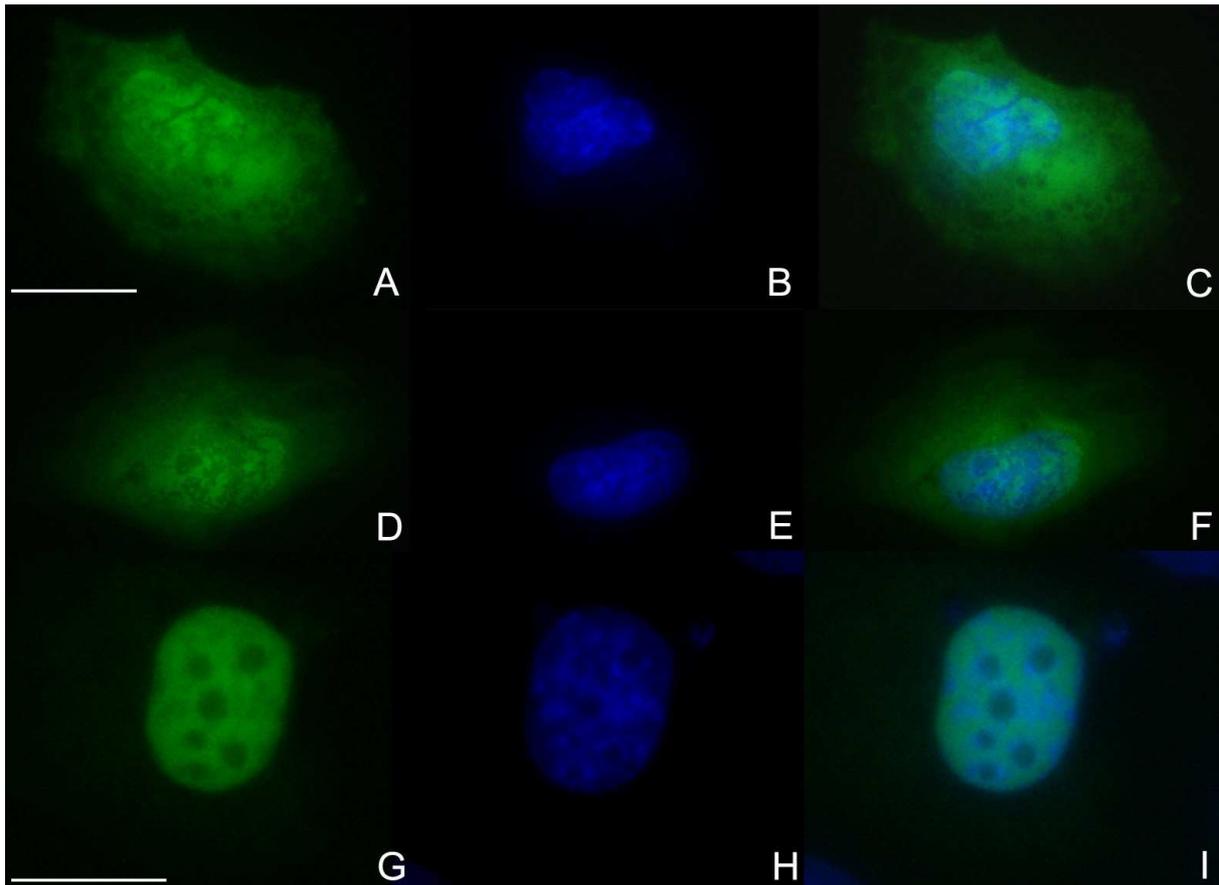


Abbildung 27: Intrazelluläre Lokalisation von IP₅-2K/EGFP nach LMB-Behandlung transfizierter NRK-Zellen, bzw. einer Deletionsmutante der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase.

IP₅-2K/EGFP überexprimierende NRK-Zellen wurden für 6 h mit dem Exportinhibitor LMB inkubiert. (A) zeigt die intrazelluläre Lokalisation der *wt*IP₅-2K als EGFP-Fusionsprotein nach LMB-Behandlung. Eine exemplarische unbehandelte Kontrollzelle, die ebenfalls IP₅-2K/EGFP überexprimierte, ist in (D) abgebildet. (G) zeigt eine exemplarische H1299-Zelle, welche die IP₅-2K-Deletionsmutante ohne Vertebrateninsertion 1 (siehe Text) als EGFP-Fusionsprotein für 24 h überexprimierte. Die Kerne dieser Zellen wurden mit DAPI gefärbt (B,E,H). Die Überlagerungsbilder (C,F,I) verdeutlichen die Verteilung der EGFP-Fusionsproteine zwischen Kern und Zytoplasma. Die Größenskalen entsprechen 10 µm.

3.2.3 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase colokalisiert mit nukleärer poly(A)-RNA

Das nukleozytoplasmatische Pendeln der IP₅-2K deutete auf eine mögliche Aufgabe der Kinase in Kernimport oder -exportprozessen hin. Eine solche Funktion wurde indirekt für das Hefehomolog der IP₅-2K, die *Ipk1*, beschrieben, die als ein kritischer Faktor im Gle1-medierten mRNA-Export der Hefe identifiziert wurde (Miller et al. 2004). Der Entstehungsort von mRNA ist Euchromatin, welches aus aktiven Genregionen besteht, in denen eine hohe Transkriptionsaktivität vorliegt. Die gefundene Colokalisation der IP₅-2K mit Euchromatin und ihr nukleozytoplasmatisches Pendeln bestärkten die Annahme, dass auch die humane IP₅-2K am mRNA-Export beteiligt sein könnte. Eine Colokalisation der

Kinase mit mRNA wäre ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen IP₅-2K, mRNA und mRNA-Export. In IP₅-2K/EGFP überexprimierenden Zellen wurde deshalb poly(A)-RNA durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit einer Alexa Fluor 555[®] markierten poly(dT)₅₀-Sonde detektiert. Wie **Abbildung 28** zeigt, konnte tatsächlich eine deutliche Colokalisation des IP₅-2K/EGFP-Fusionsproteins (**Abbildung 28A**) mit nukleärer mRNA (**Abbildung 28B**) nachgewiesen werden.

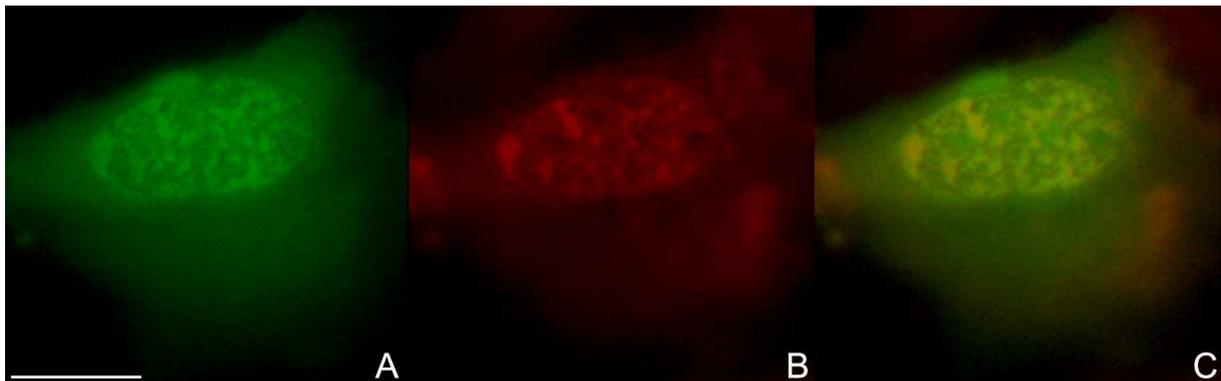


Abbildung 28: Untersuchung der Colokalisation von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase mit nukleärer poly(A)-RNA.

IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein wurde in NRK-Zellen überexprimiert. Die Detektion von poly(A)-RNA erfolgte mittels FISH unter Verwendung eines rot fluoreszierenden poly(dT)₅₀-Oligonukleotids (siehe Material und Methoden, n=100). Colokalisation von IP₅-2K/EGFP (A) mit nukleärer poly(A)-RNA (B) erscheint gelb in der Überlagerung (C). Die Größenskala entspricht 10 µm.

3.2.4 Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ist Bestandteil von zytosolischen mRNA-Akkumulationen, die durch Proteinüberexpression hervorgerufen werden

Bei der Färbung von poly(A)-RNA wurden in einer Vielzahl der transfizierten Zellen auch zytosolische Akkumulationen detektiert, die einen hohen Anteil an mRNA aufwiesen. Interessanterweise colokalisierten diese mRNA-Ansammlungen mit den zytosolischen IP₅-2K-Akkumulationen, die bereits in den Zeitreihenexperimenten auffielen (**Abbildung 25C**). Aus **Abbildung 29** wird ersichtlich, dass die Colokalisation von IP₅-2K (A) und mRNA (B) in diesen Akkumulationen einer Dynamik unterworfen zu sein scheint. In den Überlagerungsbildern (C-F) fällt auf, dass die Akkumulationen umso weniger IP₅-2K enthalten, je weiter sie sich vom Kern entfernen. Bei ihrer Bildung im Kern und beim Verlassen dieses Zellkompartiments durch einige bestimmte Kernporen sind die Akkumulationen im Überlagerungsbild noch gleichmäßig gelb, das heißt, sie enthalten am selben Ort gleichbleibende Mengen an IP₅-2K und mRNA. Bei größerer Entfernung zum

Kern werden die Akkumulationen auf der vom Zellkern abgewandten Seite zunehmend roter, was auf einen Verlust an grün fluoreszierender IP₅-2K schließen lässt.

Wie **Abbildung 29 (H,K)** zeigt, treten die zytosolischen mRNA enthaltenden Granula auch bei der Überexpression anderer EGFP-Fusionsproteine wie z.B. IP3K-B, der ABD von IP3K-B (**Abbildung 29G-I**) oder EGFP allein (**Abbildung 29J-L**) auf, jedoch zeigt keines dieser Proteine eine Colokalisation mit den mRNA-Granula. Die Überexpression könnte somit zur Bildung dieser Granula führen, und die IP₅-2K scheint eine Komponente dieser Strukturen zu sein.

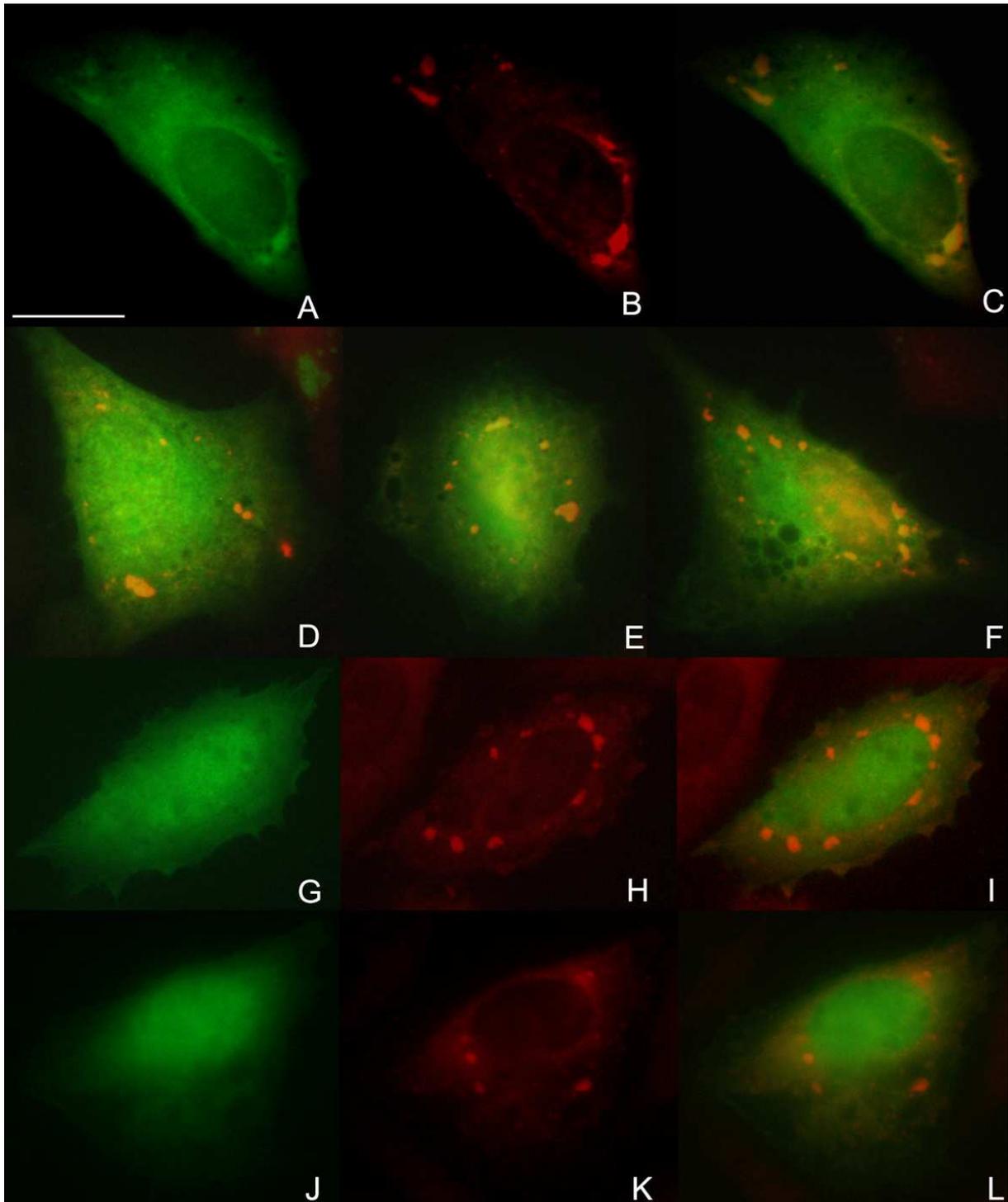


Abbildung 29: Untersuchung der Colokalisation von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase mit zytosolischen mRNA-Akkumulationen.

IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein wurde in NRK-Zellen überexprimiert. Die Detektion von poly(A)-RNA erfolgte mittels FISH unter Verwendung eines rot fluoreszierenden poly(dT)₅₀-Oligonukleotids (siehe Material und Methoden, n=100). IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein (A) colokalisiert mit zytosolischen mRNA-Akkumulationen (B). In der Überlagerung (C) erscheint diese Colokalisation gelb. (D-F) stellen die Überlagerungsbilder derselben Färbungen in drei weiteren Zellen dar. In Kontrollversuchen wurde in IP3K-B-ABD bzw. EGFP überexprimierenden NRK-Zellen ebenfalls eine FISH durchgeführt. Weder die IP3K-B-ABD (G) noch EGFP (J) akkumulieren im Zytosol. Expressionsbedingte mRNA-Akkumulationen konnten durch FISH nachgewiesen werden (H,K). Die Überlagerungen der beiden Fluoreszenzen (I,L) zeigen keine Colokalisation der überexprimierten Proteine mit mRNA-Akkumulationen. Die Größenskala entspricht 10 µm.

3.2.5 Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase colokalisiert mit mRNA-Bindeproteinen in Stressgranula

Die Colokalisation eines überexprimierten Proteins mit zytosolischen mRNA-Akkumulationen wurde bereits für das RNA-Bindeprotein TIA-1 beschrieben (Gilks et al. 2004). Die Transfektion und anschließende Überexpression von TIA-1 führte in den Zellen zu Stress, der dann die Bildung von sogenannten Stressgranula (SG) induzierte. SG sind Ribonukleoproteinkomplexe, die vor allem mRNA und RNA-Bindeproteine enthalten. Einige solcher Proteine, für die die Colokalisation mit SG beschrieben wurde, sind das poly(A) bindende Protein (PABP), das TIA-1 verwandte Protein (TIAR) und das humane Protein R (HuR) (Gilks et al. 2004). Die Ausbildung von SG geschieht als Antwort auf Stress, der durch elektrophile Oxidationsreagenzien, UV-Strahlung, Hitzeschock, chemische Substanzen oder eben Proteinüberexpression verursacht werden kann. Der Wirkmechanismus dieser Komplexe, die der Zelle helfen sich von oxidativem Stress zu regenerieren, wurde bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben (**Kapitel 1.3.4.5**). Der Nachweis einer Colokalisation eines zu untersuchenden Proteins mit den mRNA-Bindeproteinen PABP oder TIAR ist eine in der Literatur etablierte Methode, um die Assoziation dieses Proteins an Komponenten von SG zu beweisen (Thomas et al. 2005). Dieses Vorgehen wurde deshalb auch genutzt, um zu untersuchen, ob es sich bei den zytosolischen IP₅-2K/mRNA-Akkumulationen um SG handelte. Hierzu wurden PABP und TIAR in IP₅-2K überexprimierenden Zellen mittels Immunfluoreszenz detektiert. Es konnte dadurch eine eindeutige Colokalisation von IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein (**Abbildung 30A,D**) sowohl mit PABP (**B**) als auch mit TIAR (**E**) gezeigt werden, die in den Überlagerungsbildern gelb erscheint (**C, F**).

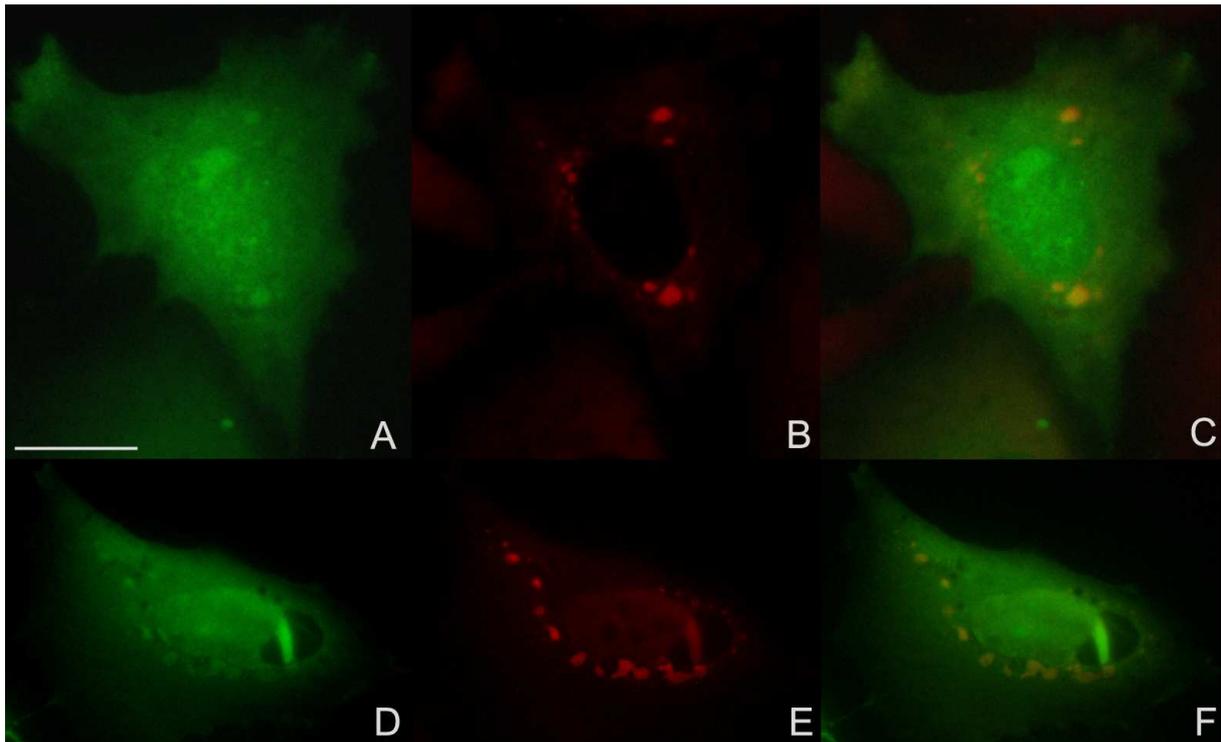


Abbildung 30: Untersuchung der Colokalisation von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase und PABP bzw. TIAR.

In IP_5 -2K/EGFP-Fusionsprotein überexprimierenden NRK-Zellen wurden PABP bzw. TIAR mittels Immunfluoreszenz detektiert (Methoden, jeweils $n=100$). (A) und (D) zeigen die intrazelluläre Verteilung der IP_5 -2K/EGFP-Fluoreszenz. Die Verteilung von PABP wird in (B), die von TIAR in (E) abgebildet. Die Colokalisation von IP_5 -2K mit den mRNA-Bindeproteinen in zytosolischen Akkumulationen erscheint gelb in den Überlagerungsbildern (C, F). Die Größenskala entspricht 10 μ m.

3.2.6 Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ist eine Komponente von Puromycin induzierten Stressgranula

Um zu beweisen, dass IP_5 -2K nicht nur zufällig mit SG kolokalisiert, die durch Transfektion und Proteinüberexpression induziert wurden, erfolgte die Untersuchung einer möglichen Colokalisation von IP_5 -2K mit Puromycin induzierten SG. Puromycin ist ein Antibiotikum, das zum Zerfall von Ribosomen in deren Untereinheiten und damit zum vorzeitigen Abbruch der Translation führt. Diese Störung der Proteinbiosynthese induziert die Bildung von SG (Crawford et al. 1997).

IP_5 -2K überexprimierende NRK-Zellen (Abbildung 31A,D) wurden einer einstündigen Inkubation mit Puromycin unterzogen. Die dadurch hervorgerufenen SG wurden anschließend mittels FISH (B) oder durch den immunhistochemischen Nachweis von TIAR (E) detektiert. Die Überlagerungen (C,F) zeigen auch hier eine deutliche Colokalisation von SG mit der überexprimierten IP_5 -2K.

Um diesen Befund für die endogene Kinase zu bestätigen, wurden untransfizierte humane H1299-Zellen ebenfalls einer Inkubation mit Puromycin unterzogen. Der Nachweis der auf diese Weise induzierten SG erfolgte durch die Detektion der endogenen Proteine TIAR und IP₅-2K mittels Immunfluoreszenz. Wie **Abbildung 31 (G-I)** zeigt, konnten so erfolgreich IP₅-2K enthaltende SG nachgewiesen werden.

Aufgrund der relativ schwachen Detektion der Kinase in SG durch den anti-IP₅-2K-Antikörper, wurden in repräsentativen Fluoreszenzzellbildern des selben Versuchs Fluoreszenzintensitätsmessungen jeweils entlang einer geraden Linie von ca. 3 µm Länge mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Die Messung der relativen Fluoreszenzintensität erfolgte jeweils in der Fotografie der grünen IP₅-2K-Fluoreszenz, dort, wo in der roten TIAR-Färbung der selben Zelle SG nachgewiesen wurden. Weitere entsprechende Messungen wurden im Zytoplasma (ohne SG) und im Kern durchgeführt. Die **Abbildung 32** gibt jeweils 40 Messungen von SG (**A**), Zytoplasma (**B**) und Kern (**C**) wieder. Die Lokalisation von endogener IP₅-2K mit Puromycin induzierten SG kann auf diese Weise besser visualisiert werden: Im Bereich der SG (**A**) ist, verglichen mit dem Zytoplasma (**B**), ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität sichtbar. In den Kernen (**C**) liegt die relative Intensität der Fluoreszenz weit über der in SG und Zytoplasma. Die drei gemittelten Kurven dieser Einzelmessungen (**D**) zeigen, dass in SG (rote Kurve) 56% mehr IP₅-2K durch den anti-IP₅-2K-Antikörper detektiert wird als im Zytoplasma (schwarze Kurve, Intensität gleich 100% gesetzt). Im Kern, in dem sich der größte Anteil der IP₅-2K befindet, wird 169% mehr Enzym detektiert als im Zytoplasma.

Um zu untersuchen, ob der anti-IP₅-2K-Antikörper sein Epitop schlechter erkennen kann, wenn sich die IP₅-2K in SG befindet, wurde in NRK-Zellen überexprimiertes IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein durch anti-IP₅-2K-Antikörper detektiert. Anschließend wurden 20 SG sowohl in der grünen IP₅-2K/EGFP-Fluoreszenz als auch in der roten anti-IP₅-2K-Fluoreszenz einer Fluoreszenzmessung unterzogen. Die Mittelwerte dieser mit ImageJ erstellten Fluoreszenzkurven werden in **Abbildung 32E** angegeben. Der anti-IP₅-2K-Antikörper detektiert 47% mehr EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein in SG (rot-gestrichelte Linie) als im Zytoplasma (grün-gestrichelte Linie). Im Kern (schwarz-gestrichelte Linie) wird 67% mehr Kinase nachgewiesen als im Zytoplasma. Bei direkter Messung der EGFP-Fluoreszenz, wird ersichtlich, dass im Kern (schwarze durchgezogene Linie) 107% und in SG (rote durchgezogene Linie) 80% mehr EGFP-Fusionsprotein vorliegt als im Zytoplasma (grüne durchgezogene Linie). Offensichtlich kann der Antikörper nur 63% der nukleären EGFP/IP₅-2K nachweisen. In SG dagegen liegt die Detektionsrate nur noch bei 53%. Die niedrigste

Nachweisrate scheint der Antikörper aber in Nukleoli aufzuweisen. **Abbildung 32F** veranschaulicht, dass die großen Mengen an EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein in den Nukleoli (Pfeile im linken Bild) durch den anti-IP₅-2K-Antikörper praktisch nicht erkannt werden (Pfeile im rechten Bild).

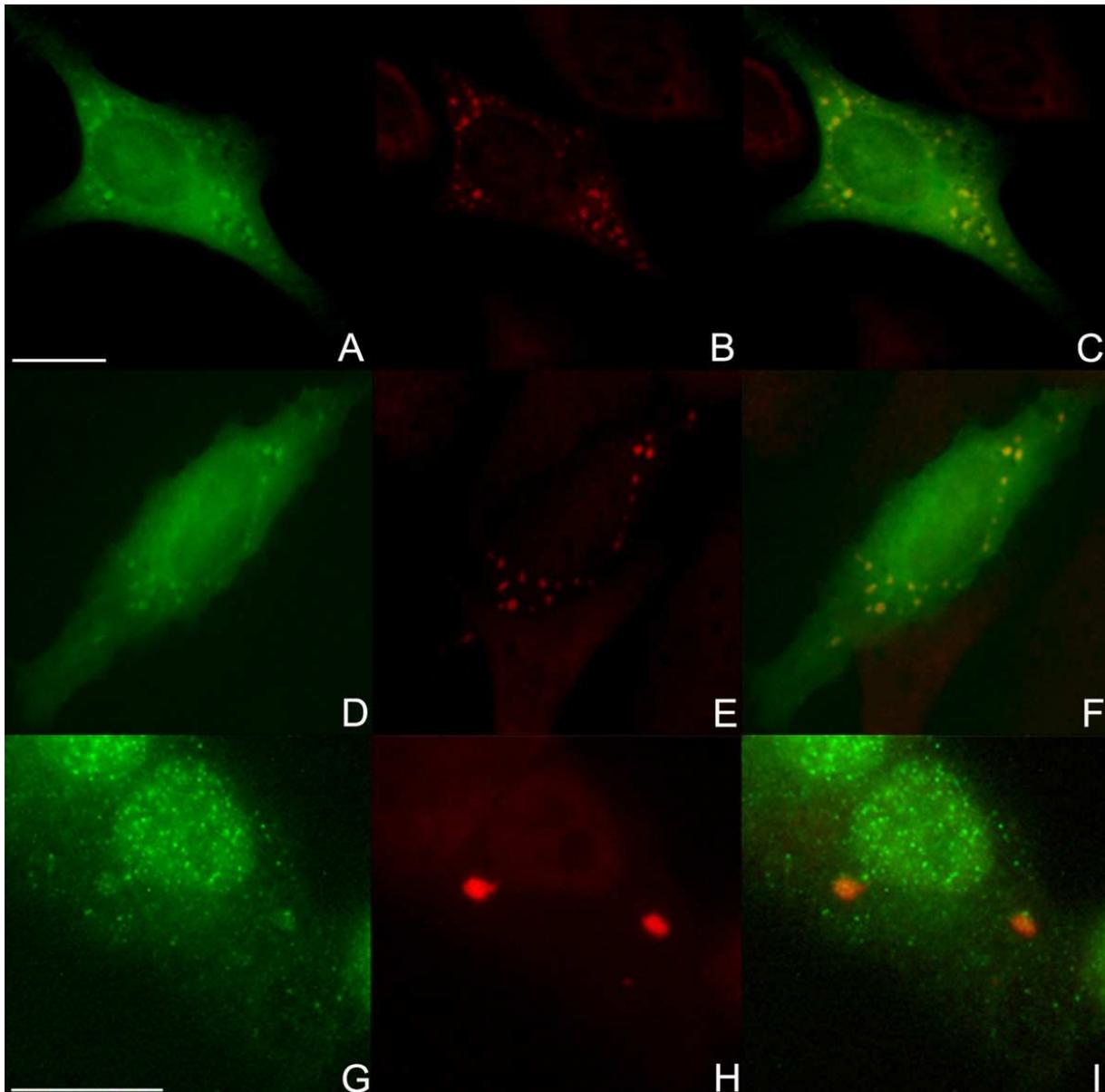


Abbildung 31: Untersuchung der Colokalisation von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase und Stressgranula nach Puromycininkubation.

In IP₅-2K/EGFP-Fusionsprotein überexprimierenden NRK-Zellen wurden SG durch Inkubation mit Puromycin induziert und anschließend durch FISH (**B**) bzw. durch immunhistochemischen Nachweis von TIAR (**E**) detektiert (jeweils n=100). (**A**) und (**D**) zeigen zwei repräsentative Zellen, visualisiert durch EGFP-Fluoreszenz, in denen mRNA durch FISH (**B**) bzw. TIAR mittels Immunfluoreszenz (**E**) nachgewiesen wurden. Die Colokalisation von IP₅-2K mit SG erscheint gelb in den Überlagerungen (**C**) und (**F**).

In untransfizierten H1299-Zellen wurden SG durch Inkubation mit Puromycin induziert. Anschließend erfolgte der Antikörpernachweis endogener IP₅-2K und Detektion der SG durch Immunfärbung von TIAR (n=100). (**G**) zeigt die grüne IP₅-2K-Fluoreszenz einer exemplarischen Zelle, immunhistochemisch nachgewiesenes TIAR erscheint rot in (**H**). (**I**) stellt die Überlagerung von (**G**) und (**H**) dar. Die Größenskalen entsprechen 10 µm.

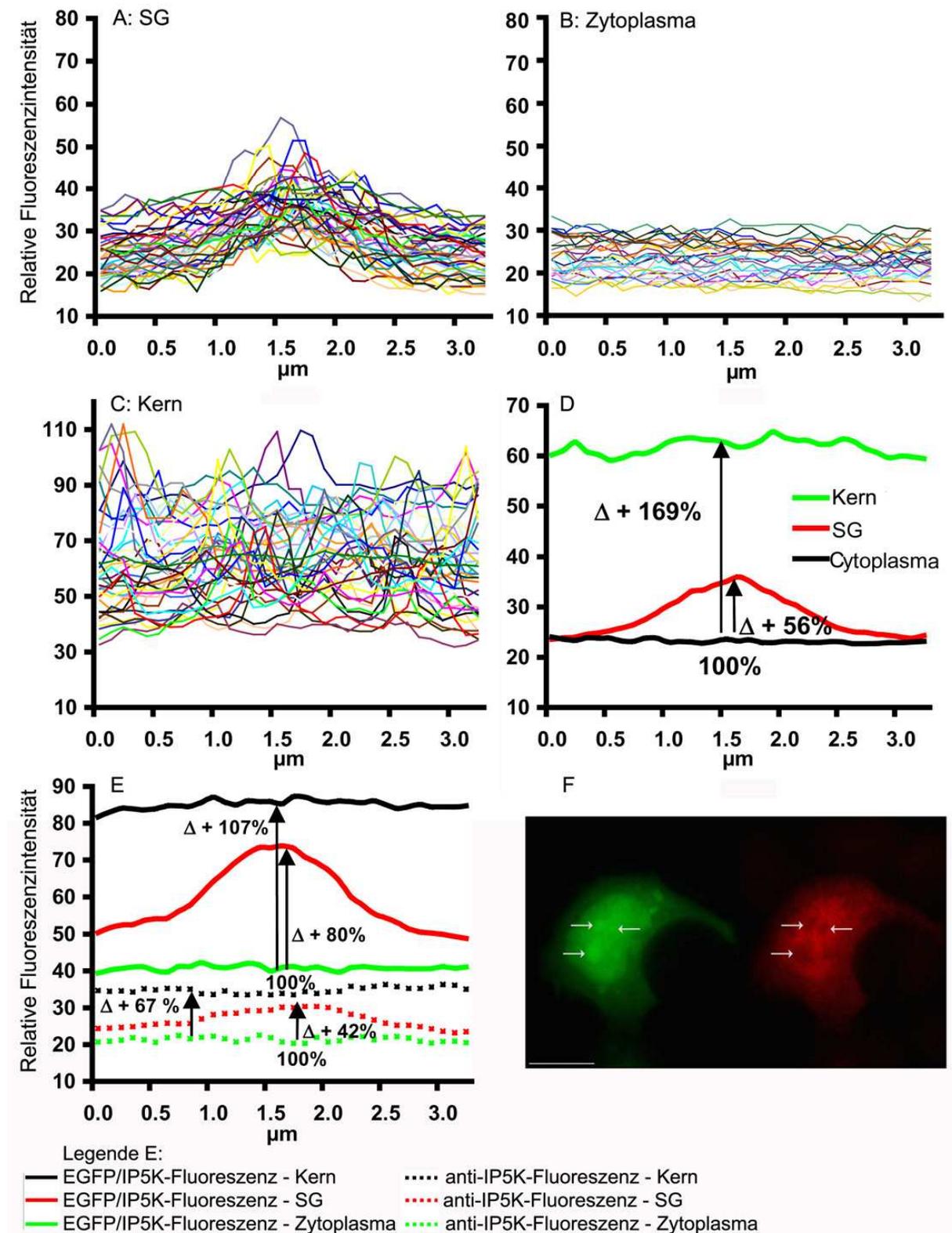


Abbildung 32: Fluoreszenzintensitätsmessungen von immunhistochemisch nachgewiesener endogener und überexprimierter Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase in H1299-Zellen.

H1299-Zellen wurden für 1 h mit Puromycin inkubiert. Anschließend wurde endogene IP₅-2K mit anti-IP₅-2K-Antikörper nachgewiesen. Der Kinase/Antikörper-Komplex wurde mittels eines grün fluoreszierenden sekundären anti-Kaninchen-Antikörpers aus der Ziege sichtbar gemacht (n=100). Die relative Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe des Programms ImageJ 40 mal in SG (A), im Zytoplasma (B) und im Kern (C) gemessen. Die Mittelwerte dieser Messungen werden in (D) abgebildet (Details siehe Text). (E): In H1299-

Zellen wurde überexprimiertes EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein mit anti-IP₅-2K-Antikörper nachgewiesen. Der Kinase/Antikörper-Komplex wurde mittels eines grün fluoreszierenden sekundären anti-Kaninchen-Antikörpers aus der Ziege sichtbar gemacht (n=60). Die relative Fluoreszenzintensität des EGFP-Fusionsproteins (**durchgezogene Linien**) und des anti-IP₅-2K-Antikörpers (**gestrichelte Linien**) wurde mit Hilfe des Programms ImageJ 20 mal in SG (**rot**), im Zytosol (**grün**) und im Kern (**schwarz**) gemessen. Eine Beispielzelle wird in (F) gezeigt (Details siehe Text). Nukleoli weisen große Mengen an EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein auf (**Pfeile im linken Bild**), das kaum durch anti-IP₅-2K-Antikörper detektiert wird (**Pfeile im rechten Bild**).

3.2.7 Katalytisch inaktive Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase colokalisiert nicht mit Stressgranula

Um zu untersuchen, ob die Colokalisation der IP₅-2K mit SG von der katalytischen Aktivität des Enzyms abhängt, wurde eine katalytisch inaktive Variante der IP₅-2K hergestellt. Die Arbeitsgruppe von Majerus hatte eine solche „Totmutante“ für die Ipk1 durch den Austausch von Cystein 139 zu Tyrosin erhalten (Zhu et al. 2000). Um die humane Form dieser Mutante herzustellen, wurde das korrespondierende Cystein 162 zu Tyrosin mutagenisiert. Überexprimiert in COS7-Zellen und durch Immunadsorption an GFP-Antikörper/Protein-G-Agarosekügelchen angereichert, zeigte diese Mutante gegenüber InsP₅ keine Phosphorylierungsaktivität mehr (Daten nicht gezeigt).

Die Überexpression der Totmutante als EGFP-Fusionsprotein führte in NRK-Zellen zur Bildung von SG, die mit einem anti-PABP-Antikörper (**Abbildung 33C**) oder mittels FISH (**A**) fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden konnten. In diesen SG fand sich jedoch keine Colokalisation der überexprimierten mutierten IP₅-2K mit mRNA bzw. PABP mehr (**B, D**). Wie die weißen Pfeile in den Bildern (**B**) und (**D**) andeuten, wurde ganz im Gegenteil die mutierte IP₅-2K nun weitgehend von den SG ausgeschlossen.

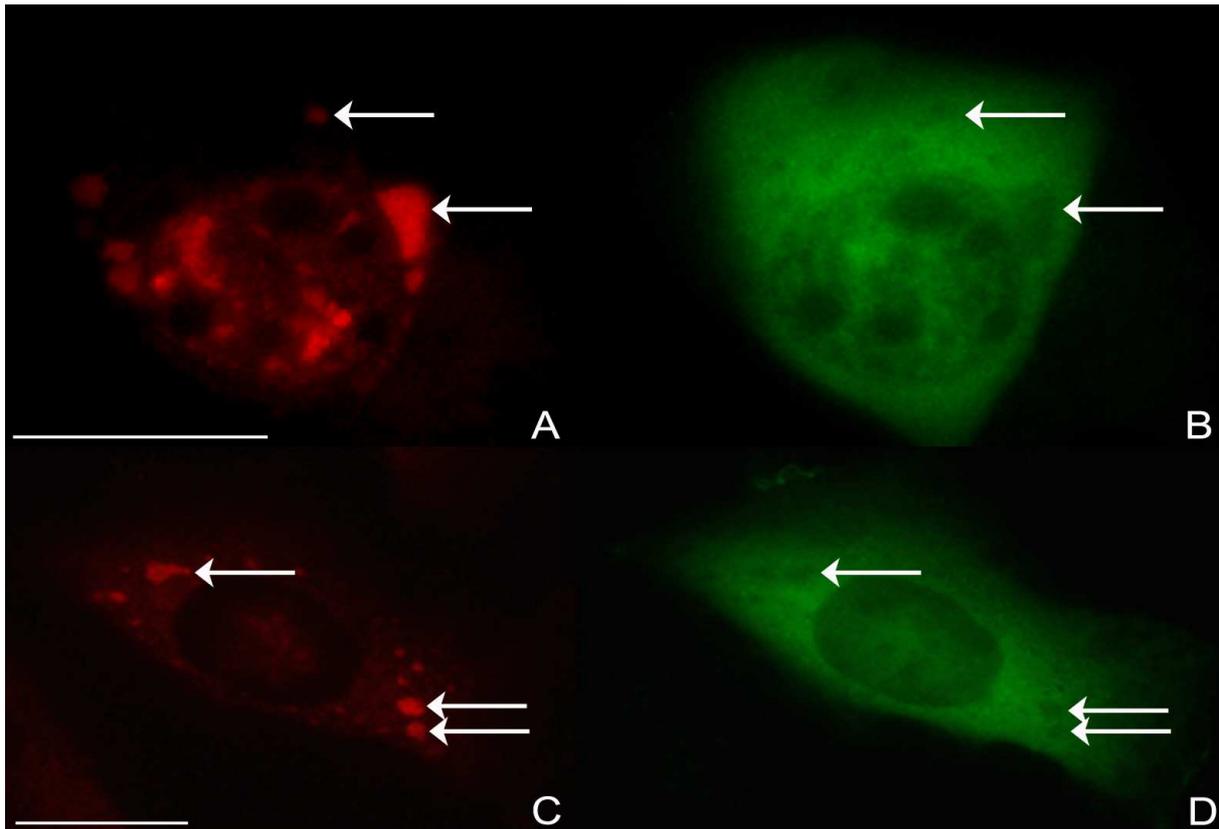


Abbildung 33: Intrazelluläre Lokalisation der IP₅-2K-Totmutante.

In NRK-Zellen, die die IP₅-2K-Totmutante überexprimierten, wurden SG mittels FISH bzw. durch den immunhistochemischen Nachweis von PABP detektiert (jeweils n=100). (A) zeigt SG nach Detektion von mRNA durch FISH. In (C) werden SG durch Immunfluoreszenz von PABP visualisiert. Die SG (weiße Pfeile in (A) und (C)) werden durch die Totmutante (grüne EGFP-Fluoreszenz in (B) und (D)) ausgespart. Die Größenskalen entsprechen 10 µm.

3.2.8 Eliminierung von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase durch siRNA verändert die Kernmorphologie und beeinflusst den Kernimport von TIAR

Um zusätzliche Hinweise auf die Funktionen humaner IP₅-2K zu erhalten, sollte die Proteinexpression der endogenen Kinase durch RNAi herunterreguliert werden. Es wird hierbei die mRNA des interessierenden Proteins mehr oder weniger stark eliminiert, wodurch es zu einer bis zu 98%igen Verringerung der Proteinkonzentration kommt. So können Effekte beobachtet werden, die durch das Nichtvorhandensein des Proteins verursacht werden, um Hinweise auf seine physiologische Relevanz zu erhalten.

Die IP₅-2K-siRNA wurde mit Hilfe des pSilencer Vektors in H1299-Zellen eingebracht. Nach zweitägiger Expression der siRNA wurden die Zellen fixiert und mit anti-IP₅-2K-Antikörper inkubiert. In einigen Zellen war kaum mehr IP₅-2K nachweisbar (markiert durch weiße Pfeile in **Abbildung 34A**). Die Konzentration der Kinase war hier so stark reduziert, dass kein

Unterschied mehr zu einem Kontrollansatz sichtbar war, in den nur der fluoreszierende Sekundärantikörper zu transfizierten Zellen gegeben wurde. In der DAPI-Färbung dieser Zellen fiel eine veränderte Kernmorphologie auf. Die Zellkerne (markiert durch weiße Pfeile in **Abbildung 34B**) lagen nicht mehr in einer Ebene mit den Kernen der umliegenden untransfizierten Zellen, waren pyknotisch und die DNA wirkte unstrukturierter als in den nicht transfizierten Zellen.

Eine weitere Auffälligkeit in den Zellen mit stark verminderter IP₅-2K-Konzentration wurde durch den Nachweis von TIAR mittels Immunfluoreszenz sichtbar. Die stark reduzierte Expression der IP₅-2K (**Abbildung 34C**) schien dazu zu führen, dass TIAR nicht mehr vom Zytosol in den Zellkern transportiert werden konnte. Wie in **Abbildung 34D** deutlich wird, lag TIAR nun rein zytosolisch vor; im Kern war das Protein praktisch nicht mehr detektierbar. In unbehandelten Zellen bzw. Kontrollzellen, die mit „scrambled“ siRNA transfiziert wurden, konnten keine Zellen ohne IP₅-2K detektiert werden. Diese Zellen zeigten keine Auffälligkeiten in der Kernmorphologie und TIAR war in allen Zellen auch nukleär lokalisiert.

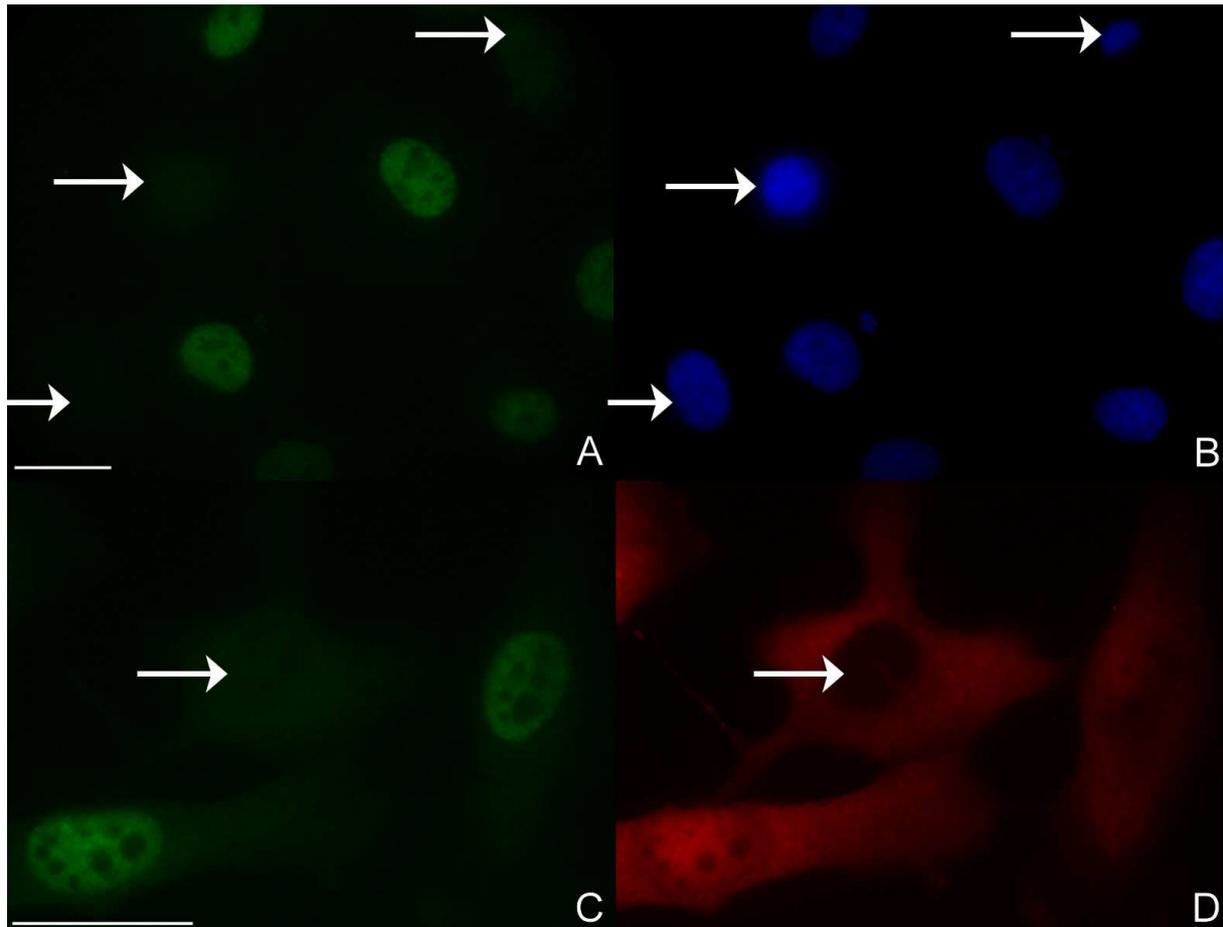


Abbildung 34: Herunterregulierung der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase durch siRNA in H1299-Zellen.

In H1299-Zellen wurde die Expression von IP₅-2K durch Transfektion mit einem IP₅-2K/siRNA-Vektor transient herunterreguliert. Nach 48-stündiger Expression der siRNA erfolgte der immunhistochemische Nachweis von endogener IP₅-2K (n=50). Expression der siRNA führte zu einer starken Verminderung der IP₅-2K-Proteinkonzentration, d.h. es war kaum IP₅-2K-Immunfluoreszenz in den durch weiße Pfeile markierten transfizierten Zellen in (A) und (C) nachweisbar. Die Färbung der DNA erfolgte mittels DAPI (B). (D) zeigt die Lokalisation von endogenem TIAR. In der durch einen weißen Pfeil markierten Zelle, die eine stark verminderte IP₅-2K-Konzentration aufwies, befand sich kaum TIAR im Kern. Die Größenskalen entsprechen 10 µm.

3.2.8.1 TIAR ist ein Bindungspartner der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

Nachdem die siRNA-Experimente Hinweise auf eine Interaktion von TIAR mit IP₅-2K lieferten, sollte untersucht werden, ob die beiden Proteine zusammen immunpräzipitiert werden können. Hierzu wurde das EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein 24 Stunden in H1299-Zellen überexprimiert und aus dem Zelllysate mit Hilfe eines anti-GFP-Antikörpers, der an Protein-G-Agarosekügelchen gebunden vorlag, immunadsorbiert (siehe Methoden). Das angereicherte Protein wurde gewaschen und durch Denaturierung von den Kügelchen getrennt. Nach der Trennung der präzipitierten Proteine durch SDS-PAGE und ihrer Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese mit einem anti-TIAR-Antikörper inkubiert. Tatsächlich konnte in diesem Western Blot eine Bande bei 42 kD nachgewiesen werden, die der Größe einer von zwei TIAR-Isoformen in Vertebraten entspricht. Eine weitere Bande bei ca. 80 kD könnte TIAR-Dimere darstellen (**Abbildung 35**, Bahn C). Beide Banden wurden nicht im Kontrollimmunpräzipitat detektiert, das aus EGFP überexprimierenden H1299-Zellen stammte. Hier war nur eine anscheinend unspezifische Bande bei ca. 44 kD nachweisbar (**Abbildung 35**, Bahn B), die auch über der 42-kD-Bande in Bahn C detektiert wurde. Die Spezifität des Antikörpers wurde mit Hilfe eines Zelllysates aus untransfizierten H1299-Zellen bestätigt. Wie in Bahn A erkennbar, weist der Antikörper die beiden TIAR-Isoformen der Größen 40 und 42 kD nach. Auch die Bande bei 80 kD wird vom Antikörper erkannt, was dafür spricht, dass es sich bei der 80-kD-Bande in Bahn C tatsächlich um TIAR-Dimere handelt.

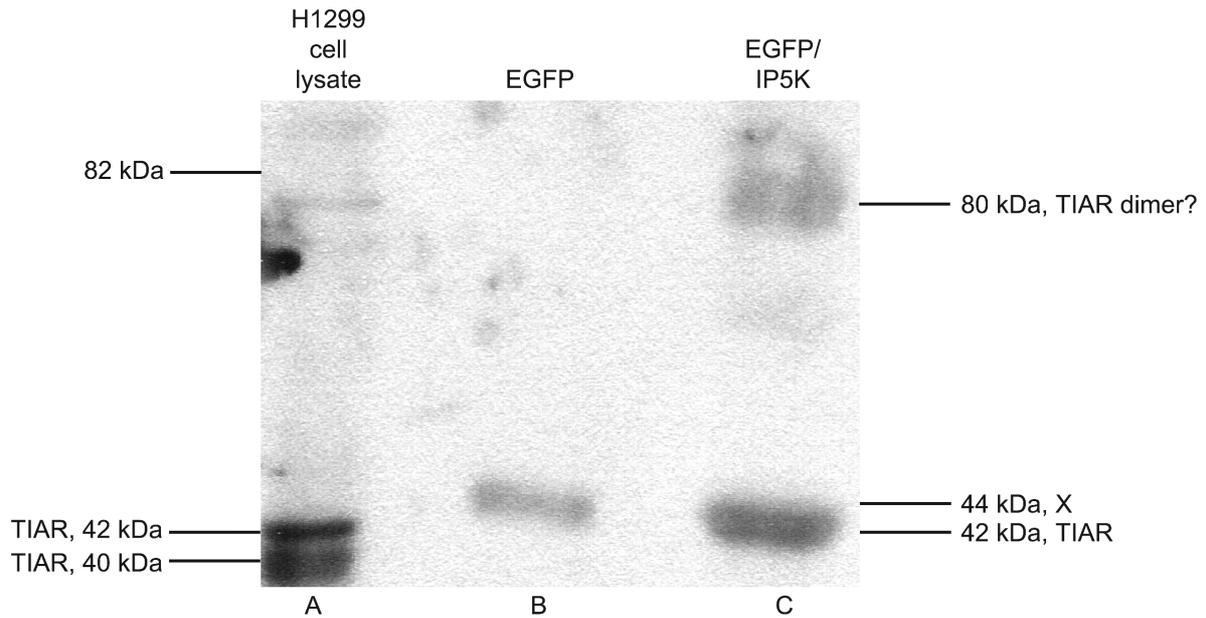


Abbildung 35: Western Blot zum Nachweis von TIAR in EGFP/IP₅-2K-Immunpräzipitaten.

EGFP bzw. EGFP/IP₅-2K überexprimierende H1299-Zellen wurden lysiert und die EGFP-Fusionsproteine mit Hilfe eines anti-GFP-Antikörpers immunpräzipitiert (Methoden). Die gefällten, gewaschenen Proteine wurden über eine SDS-PAGE getrennt und durch Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die anschließend mit einem anti-TIAR-Antikörper inkubiert wurde. Kontrolllysate aus untransfizierten Zellen: Bahn A; Immunpräzipitat aus EGFP überexprimierenden H1299-Zellen: Bahn B; Immunpräzipitat aus EGFP/IP₅-2K überexprimierenden H1299-Zellen: Bahn C.

3.2.9 In COS7-Zellen überexprimierte Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ist ein hochaktives oligomeres Enzym

Abschließend sollte die IP₅-2K umfassenden Untersuchungen zu ihrer InsP-Kinaseaktivität und Substratspezifität unterzogen werden. Dazu musste sie in ausreichender Menge, das heißt mindestens im Mikrogrammmaßstab gereinigt vorliegen. Die Gruppe von P.W. Majerus hatte bereits beschrieben, dass eine prokaryotische Expression dieser Kinase extrem schwierig ist (Verbsky et al. 2002), trotzdem wurde, im Rahmen der Diplomarbeit von Dipl.-Biol. Tobias Schenk, die cDNA der IP₅-2K in die bakteriellen Expressionsvektoren pSKA und IBA5 kloniert und der Versuch einer Überexpression in verschiedenen *E. coli* BL21-Stämmen unternommen. In den meisten Fällen konnte im Comassiegel kein rekombinantes Enzym nachgewiesen werden. Lediglich durch die Expression der IP₅-2K als GST-Fusionsprotein aus dem Vektor IBA5 im Expressionsstamm BL21 (DE3, pLys, pRep) konnte eine geringe Menge löslichen Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 51 kD erhalten werden, welches sich aber nicht über den GST-Anhang reinigen ließ (Schenk 2004). Aufgrund dieser Befunde wurde von der rekombinanten Expression in Bakterien abgesehen. Stattdessen erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines eukaryotischen Expressionssystems zur Anreicherung der IP₅-2K. Hierzu wurde die Kinase in COS7-Zellen als EGFP-Fusionsprotein überexprimiert und ein Antikörper basiertes Reinigungssystem genutzt, wie es ähnlich bereits in (Horn et al. 2004) beschrieben wurde.

Nach 24-stündiger Überexpression des EGFP/IP₅-2K-Fusionsproteins in COS7-Zellen wurde ein Zelllysat hergestellt, welches mit einem anti-GFP-Antikörper inkubiert wurde, der an Protein-G-Agarose gekoppelt vorlag. Nach mehreren Waschschritten konnte auf diese Weise das N-terminal mit EGFP fusionierte Enzym in angereicherter Form gewonnen werden. Das Fusionsprotein aus IP₅-2K mit C-terminalem EGFP-Anhang konnte mit Hilfe dieser Methode nicht angereichert werden. Vermutlich führte die Expression von EGFP am C-Terminus der IP₅-2K zu einer Tertiärstruktur, die das Antikörperepitop verdeckte, so dass der Antikörper aufgrund sterischer Hinderung nicht mehr an EGFP binden konnte. Das EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein konnte so aber im Mikrogrammmaßstab gewonnen werden. Im Anschluss an die Reinigung wurde die spezifische Aktivität der IP₅-2K für die Umsetzung von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat zu InsP₆ von Werner Fanick und Dr. Hongying Lin bestimmt. **Abbildung 36A** zeigt die MDD-HPLC-Analyse des Umsatzes von Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu InsP₆ durch die IP₅-2K innerhalb von zwei Stunden. Wie am InsP₆-Ausgang bei einer Retentionszeit von 17,48 min zu sehen ist, ist eine große Menge an InsP₆ produziert worden. Das zusätzlich detektierte Ins(1,2,4,5,6)P₅ stellt eine Verunreinigung des Substrates dar.

Ein sehr wichtiges Ergebnis dieser Analyse war, dass die spezifische Aktivität des Enzyms signifikant höher war als die des von Verbsky et al. in Schneider-Zellen exprimierten Enzyms (500 nmol/min/mg im Vergleich zu 31 nmol/min/mg) (Verbsky et al. 2002). Außerdem zeigte die Aktivität der IP₅-2K eine sigmoidale Substratabhängigkeit, wie in **Abbildung 36B** gezeigt. Es konnte ein $K_{0.5,app}$ für halbmaximale Aktivität von 8 μ M und ein Hill Koeffizient von 1,8 ermittelt werden (Abbildung und Daten von Prof. Dr. Mayr). Diese positive Kooperativität könnte auf eine Dimerisierung oder eine höhere Oligomerbildung zurückzuführen sein (Segel 1975).

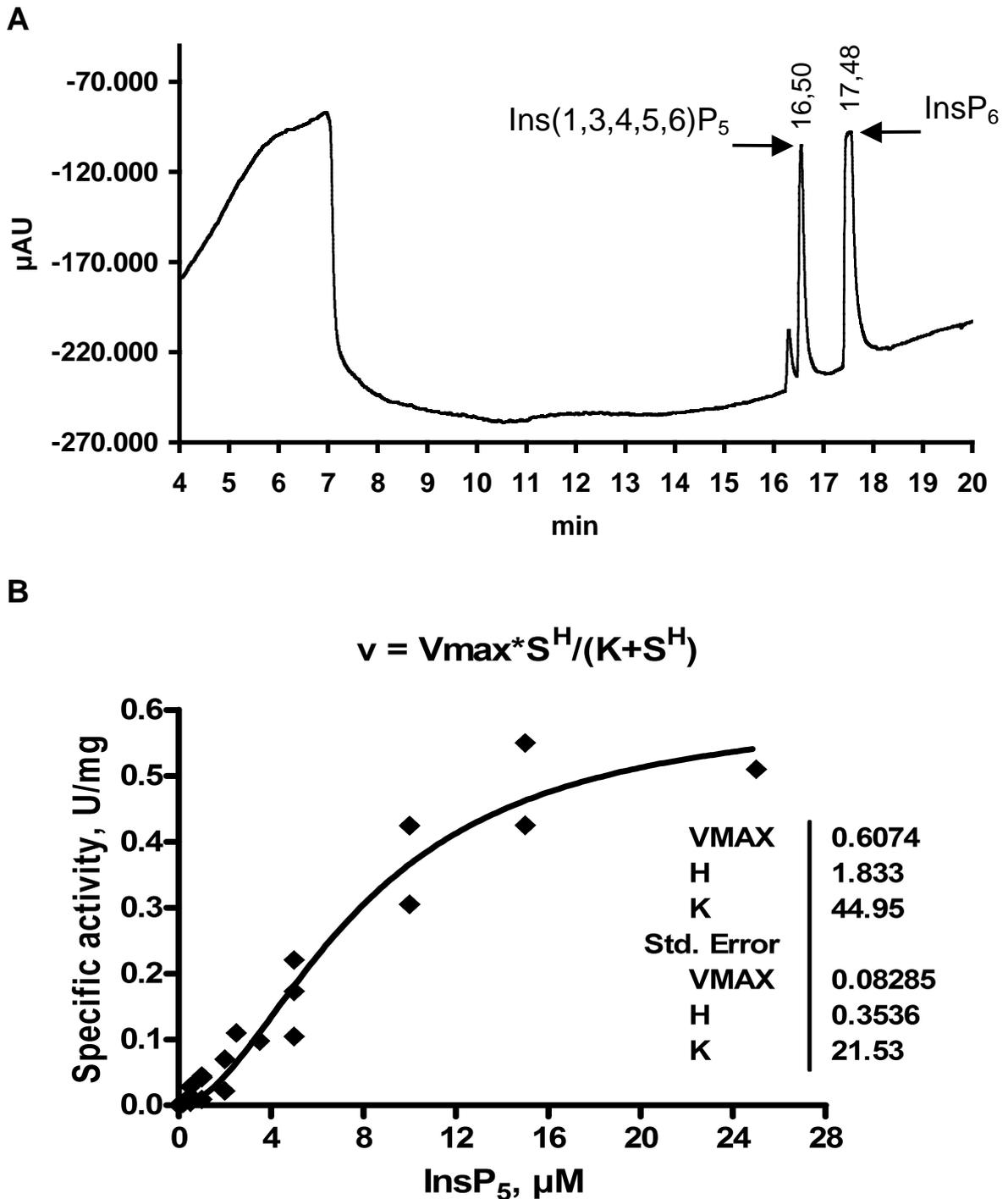


Abbildung 36: Substratspezifität von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase für Ins(1,3,4,5,6)P₅.

EGFP/IP₅-2K wurde in COS7-Zellen 24 h überexprimiert und nach Lyse der Zellen durch Immunadsorption an anti-GFP-Antikörper/Protein-G-Agarosekügelchen angereichert. Das erhaltene Protein wurde direkt in Kinetikmessungen eingesetzt, um Enzymparameter für das Substrat Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu erhalten. Substrate und Produkte wurden durch MDD-HPLC quantifiziert (Methoden). Das Fusionsprotein wurde in SDS-Gelen durch Vergleich mit Standardproteinbanden nach Coomassie-Blau-Färbung quantifiziert.

(A): HPLC-Chromatogramm von Ins(1,3,4,5,6)P₅ nach Umsetzung durch IP₅-2K. Das Substrat Ins(1,3,4,5,6)P₅ und das entstandene Produkt InsP₆ werden durch schwarze Pfeile markiert.

Die aus den Messungen bestimmten Enzymparameter für ein kooperatives Enzym und die Standardabweichungen werden in (B) angegeben. Der $K_{0.5,app}$ für halbmaximale Aktivität liegt bei 8 µM (Berechnung der Enzymparameter und Erstellung der Graphik, Prof. G. W. Mayr).

Die IP₅-2K wurde außerdem auf ihre Fähigkeit hin untersucht andere Substrate als Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu phosphorylieren. Wie **Abbildung 37A** zeigt, konnte Ins(1,4,5)P₃ innerhalb von zwei Stunden nicht umgesetzt werden. Ins(1,3,4,6)P₄ hingegen wurde an Position 2' mit geringer Aktivität von 0,02 µmol/min/mg zu Ins(1,2,3,4,6)P₅ phosphoryliert (**B**).

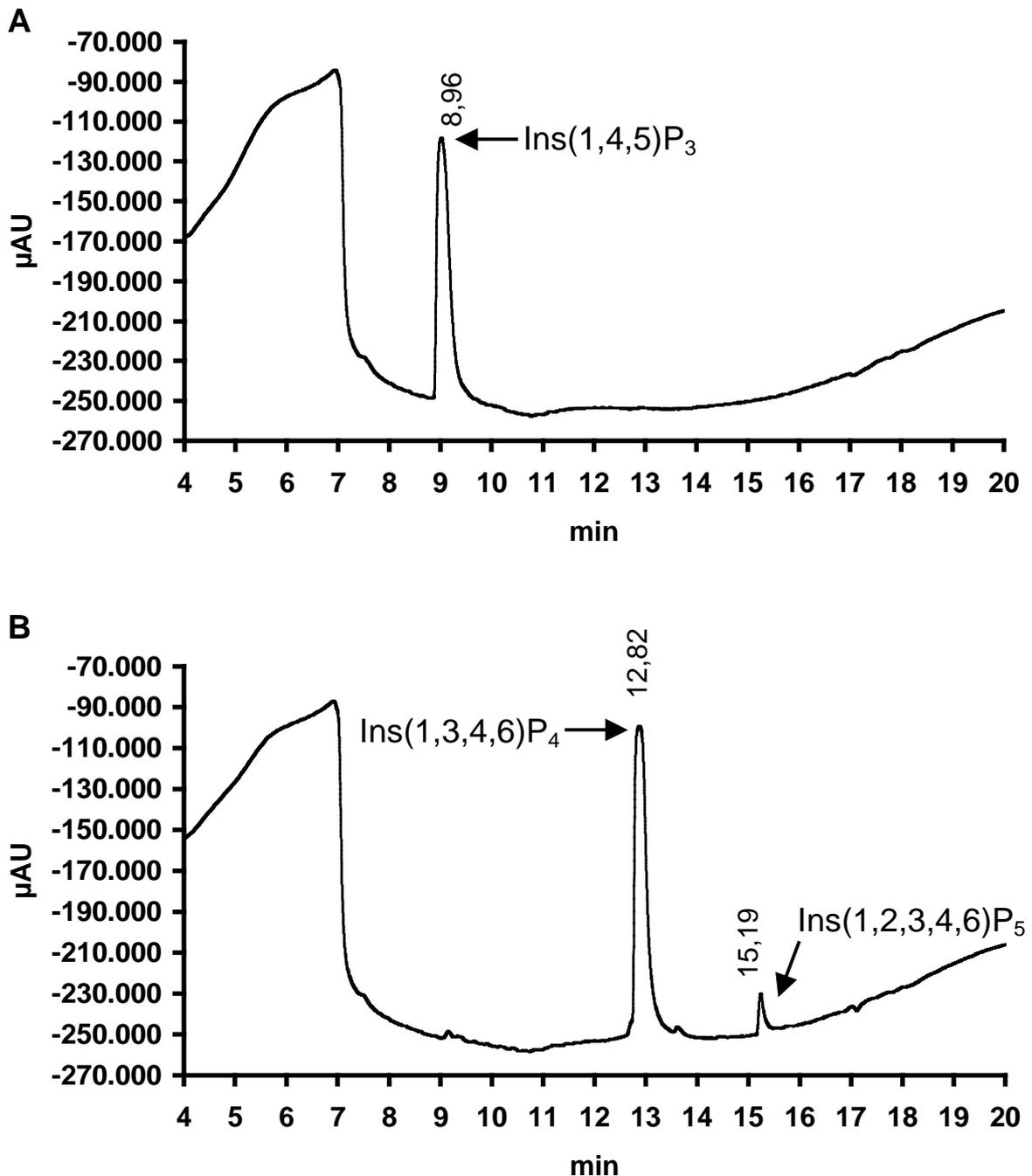


Abbildung 37: Substrattests für Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase.

EGFP/IP₅-2K wurde in COS7-Zellen 24 h überexprimiert und nach Lyse der Zellen durch Immunadsorption an anti-GFP-Antikörper/Protein-G-Agarosekügelchen angereichert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Proteins mit verschiedenen InsP-Isomeren (siehe Material und Methoden).

(A): HPLC-Chromatogramm von Ins(1,4,5)P₃ nach Inkubation mit immunadsorbierter IP₅-2K. Es ist kein Produkt nachweisbar. (B): HPLC-Chromatogramm von Ins(1,3,4,6)P₄ nach Inkubation mit immunadsorbierter IP₅-2K. Hier war das Produkt Ins(1,2,3,4,6)P₅ detektierbar.

Nach der Bestimmung der *in vitro* Umsetzung von Inositolphosphaten durch die IP₅-2K wurde der Einfluss einer IP₅-2K-Überexpression auf die Konzentrationen verschiedener InsP-Isomere *in vivo* untersucht. Hierzu erfolgte eine 24-stündige Überexpression des Volllängenproteins in COS7-Zellen. Kontrollzellen wurden entweder mit einem Leervektor transfiziert oder sie überexprimierten Fragment 189 (= EGFP/IP₅-2K₁₋₁₈₉) bzw. nur EGFP. Nach der InsP_x-Extraktion (siehe Methoden) konnten die Konzentrationen der InsP-Isomere von Dr. Hongying Lin mittels MDD-HPLC bestimmt werden. Erwartungsgemäß stieg die InsP₆-Konzentration in den IP₅-2K überexprimierenden Zellen (**Abbildung 38**, schwarze Säulen) im Vergleich zu den Kontrollen (**Abbildung 38**, Fragment 189: weiße Säulen; EGFP: schraffierte blau-weiße Säulen; Kontrollvektor: quergestreifte grün-weiße Säulen) stark an, während die des Substrates Ins(1,3,4,5,6)P₅ stark abnahm. Interessanterweise sank aber auch die Menge an detektierbarem Ins(1,4,5,6)P₄ und die Konzentration von Ins(1,2,3,4,5)P₅ war gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Für Ins(1,3,4,5)P₄, das als Substrat zur Herstellung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ dient, wurde erwartungsgemäß ebenfalls eine Abnahme detektiert, allerdings war diese nicht signifikant.

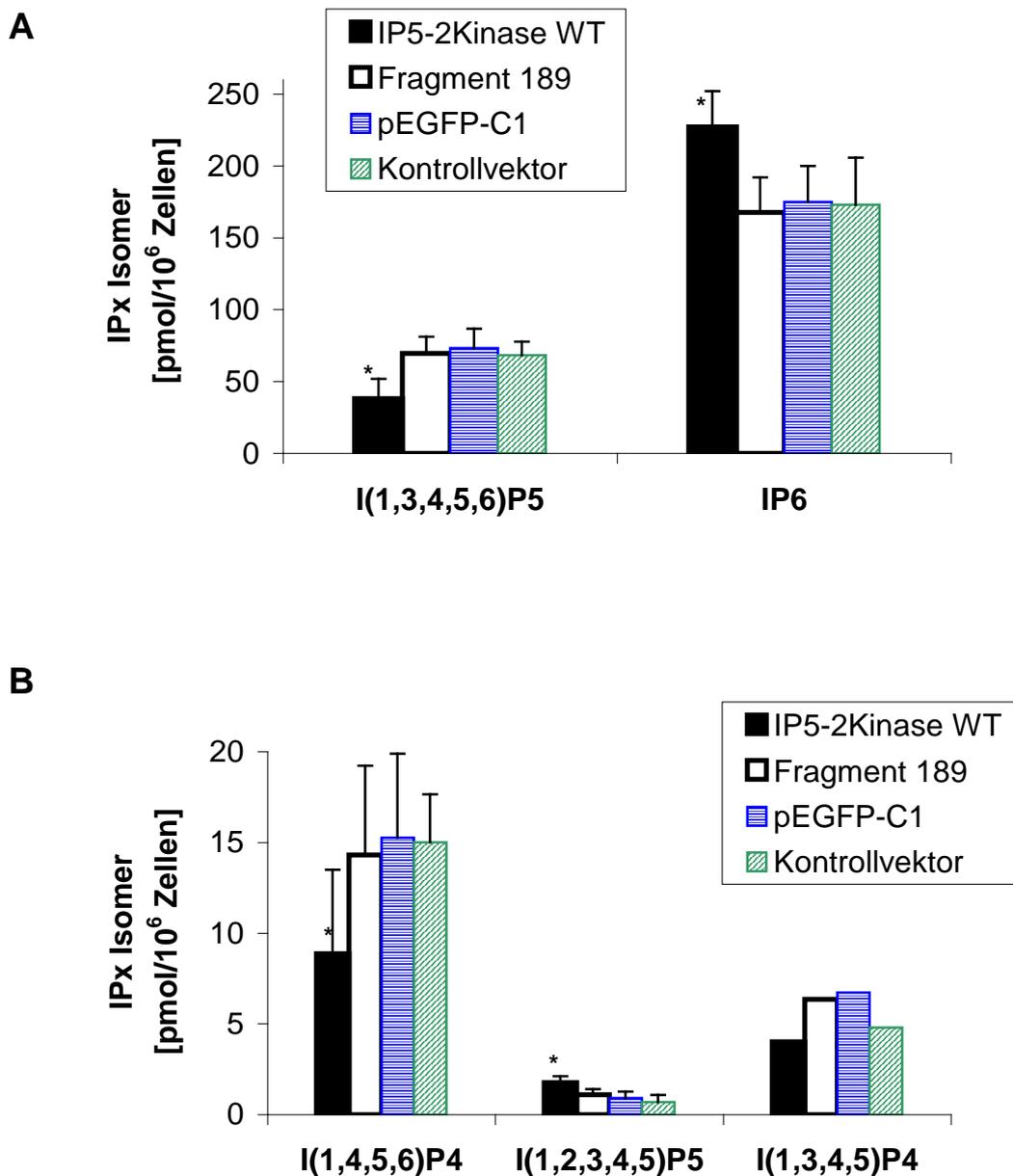


Abbildung 38: Beeinflussung der InsP_x -Konzentrationen durch Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase -Überexpression.

In COS7-Zellen wurden 24 h IP_5 -2K, IP_5 -2K₁₋₁₈₉ oder EGFP überexprimiert. Außerdem fand eine Kontrollvektortransfektion statt. Anschließend erfolgte die Reinigung der InsP s und ihre Trennung und Quantifizierung mittels MDD-HPLC. Signifikant veränderte InsP -Konzentrationen in IP_5 -2K überexprimierenden Zellen (schwarze Säulen) gegenüber den Kontrollen (Fragment IP_5 -2K₁₋₁₈₉: weiße Säulen, EGFP: quergestreifte blau-weiße Säulen, Kontrollvektor: schraffierte grün-weiße Säulen) werden in (A) für $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ und InsP_6 und in (B) für $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ angegeben ($n \geq 6$, $p < 0,1$). Eine Abnahme der $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Konzentration war ebenfalls messbar, aber nicht signifikant.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Zielsteuerungen von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B

4.1.1 Die Aktinbindungsdomänen von Inositoltrisphosphatkinasen gehören einer neuen ABD-Familie an

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die umfassende Charakterisierung der Aktinbindungsdomäne von IP3K-B. Es konnte dadurch bestätigt werden, dass die von Dr. Isabell Schreiber als Fragment untersuchte Aktinbindungsdomäne der Ratten-IP3K-B (Schreiber 2002), bestehend aus den Aminosäuren 108-170 (Aminosäuren 103-165 in der humanen Form), die einzige funktionale ABD im Volllängenpolypeptid der IP3K-B repräsentiert.

Ihre Primärstruktur weist keinerlei Homologien zu den bekannten ABDs auf, wie z.B. der CH-, der WH2- oder der ADF-H-Domäne (Dominguez 2004, Lappalainen et al. 1998, Paunola et al. 2002). Lediglich eine geringe Sequenzähnlichkeit zu dem ersten Block von vier Sequenzblöcken eines I/LWEQ-Moduls (McCann and Craig 1999) konnte gefunden werden. Jedoch befinden sich alle bisher bekannten I/LWEQ-Module im C-Terminus des entsprechenden Aktin bindenden Proteins, und eine F-Aktinbindung erfolgt nur, wenn alle vier Blöcke eines solchen Moduls vorhanden sind und diese in einem bestimmten ununterbrochenen Aminosäurekontext vorliegen. Im N-Terminus der IP3K-B gibt es zwar Bereiche, die geringe Ähnlichkeit mit den Blöcken III und IV eines I/LWEQ-Moduls aufweisen, allerdings ist der Aminosäureabschnitt zwischen diesen beiden Blöcken zu lang und der Block II fehlt vollständig. In der IP3K-B ist aber das distinkte Fragment 108-170 allein hinreichend, um die F-Aktinbindung *in vivo* zu vermitteln. Aufgrund dieser Tatsachen kann davon ausgegangen werden, dass die Ähnlichkeit der ABD von IP3K-B zu Block I eines I/LWEQ-Moduls eher zufällig ist (Schreiber 2002).

Prof. Dr. Mayr modellierte ein putatives Tertiärstrukturmodell für den N-terminalen Bereich der HsIP3K-B. Das verwendete Alignment (PdP file 1EE8: Kette A, Aminosäuren 53-266, „MutM DNA binding protein“ *Thermus thermophilus*) ist im Anhang (Seite IV) aufgeführt. Ein gemittelttes Modell aus vier der so erstellten Modelle wurde durch "Sculpting" im Bereich der Lücken in der Alignierung optimiert und nach erneuter "Relaxierung" mittels Modeller verwendet. Dieses Modell unterscheidet sich in seinem Aufbau von bereits beschriebenen ABD-Strukturen (vergleiche mit **Abbildung 5**, Einleitung). Bekannte Aktinbindungsdomänen

bestehen meist aus einer Ebene mehrerer β -Stränge, die zwischen α -Helices liegen (Lappalainen et al. 1998). In der modellierten IP3K-B-Aktinbindungsdomäne sind vermutlich zwei α -Helices von großer Wichtigkeit für die F-Aktinbindung, die sich aber nicht ober- und unterhalb eines β -Faltblattes befinden, sondern senkrecht zu einem putativen Faltblatt aus zwei β -Strängen stehen (**Abbildung 39A**, rote und blaue α -Helices). Das saure Aktinmolekül wird vermutlich durch die basische α -Helix I (Aminosäuren 125-141, blau markiert in **Abbildung 39A-D**) gebunden. Der basische Charakter dieses Sekundärstrukturelements wird durch eine Häufung von Seitenketten mit Aminofunktionen (blaue Stäbchenmodelle in **B**) auf der Oberfläche dieser α -Helix bedingt. Unterstützt wird die Bindung wahrscheinlich durch die amphipatische α -Helix II (Aminosäuren 149-161, rot markiert in **Abbildung 39A,B**). Die hydrophilen Aminosäurereste (blaue Stäbchenmodelle in **Abbildung 39C,D**) liegen bei dieser α -Helix eher von der durch die orthogonalen α -Helices gebildeten Oberfläche abgewandt, während die hydrophoben Aminosäuren (weiße Stäbchenmodelle in **Abbildung 39C,D**) in der gebildeten Ebene liegen. Diese vermutlich an der Aktinbindung beteiligten, gekreuzt zueinander stehenden Ballungen von basischen und neutralen Ladungen werden besonders in der Oberflächendarstellung der ABD sichtbar (**E**). Wie **Abbildung 39F** zeigt, sind die Ladungen auf der Rückseite dieser Domäne eher zufällig verteilt, was dafür spricht, dass dieser Bereich im 3D-Modell wahrscheinlich nicht direkt an der Aktinbindung beteiligt ist. Es ist zu betonen, dass das Modell nur versucht, eine von vielen möglichen Strukturen der hier charakterisierten ABD zu visualisieren, und dass es dabei vor allem um das Verständnis der Rolle der beteiligten α -Helices sowie der Prolin reichen Regionen geht.

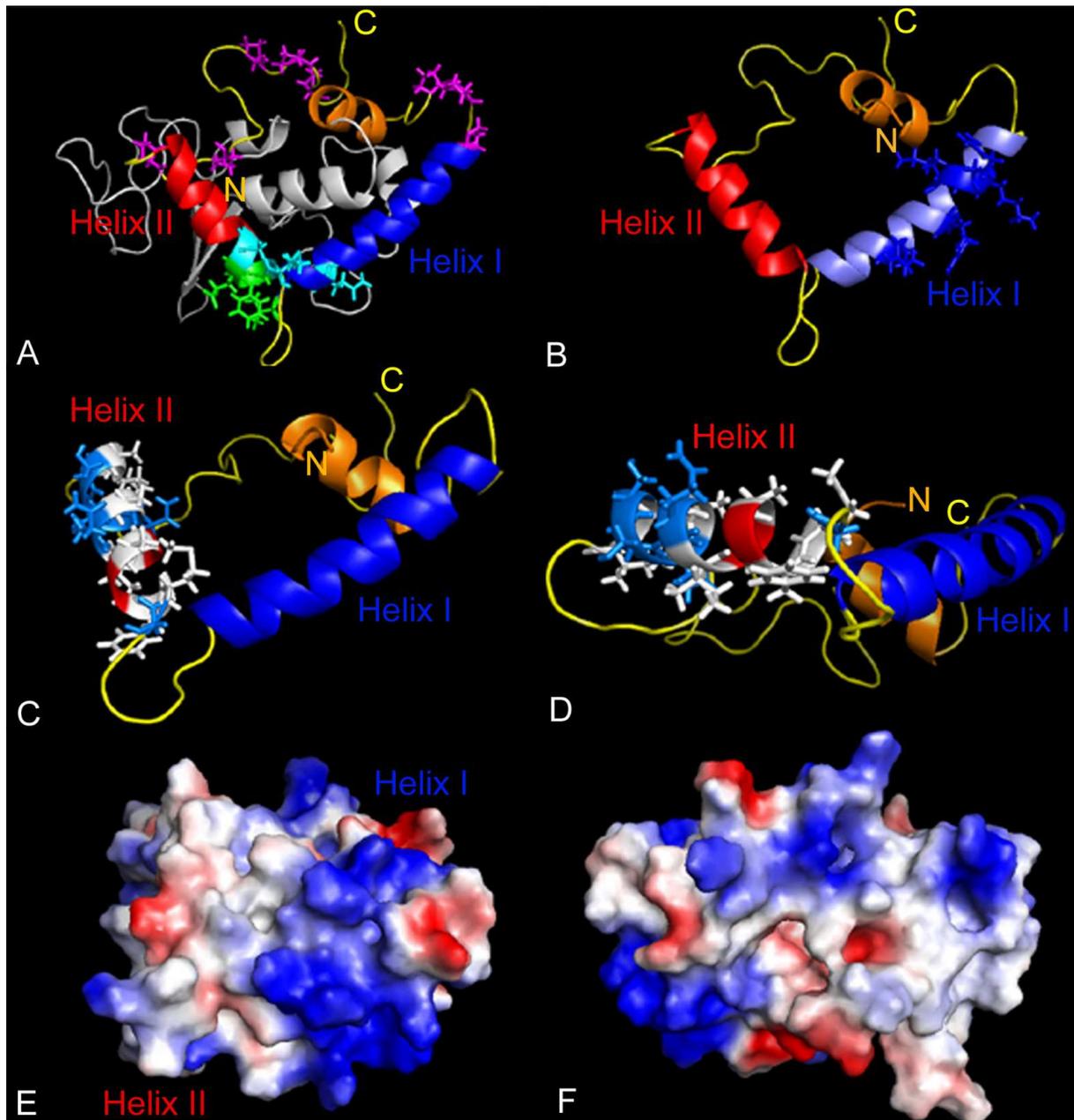


Abbildung 39: Putatives 3D-Modell der Aktinbindungsdomäne von Inositol-1,4,5-trisphosphatkinase 3-Kinase Isoform B.

Modellierung eines putativen 3D-Modells der ABD von IP3K-B mit dem Programm Modeller (Marti-Renom et al. 2000) unterschiedlich visualisiert mit dem Programm Pymol, erstellt von Prof. Dr. Mayr. (A): Modellerte 3D-Struktur des N-Terminus der IP3K-B. Bunt markiert ist die Aktinbindungsdomäne (103-193). Proline sind Magenta farben explizit dargestellt. Zwischen den Isoformen A und B identische Aminosäuren sind grün, stark konservierte Aminosäuren sind türkis markiert. (B): Putatives 3D-Modell der ABD in der die basischen Aminosäuren von α -Helix I (blau) als Stäbchenmodell dargestellt werden. (C) und (D) verdeutlichen den amphipatischen Charakter der α -Helix II, hydrophobe Aminosäuren sind als weiße, hydrophile Aminosäuren sind als blaue Stäbchenmodelle dargestellt. Die hydrophoben Aminosäuren liegen von der in (E) gezeigten Oberfläche orthogonal abgewandt (C), während die hydrophoben Aminosäuren zur Oberfläche hingewandt liegen (D). (E) zeigt die vermutete Vorderseite, (F) die wahrscheinliche Rückseite der IP3K-B-Aktinbindungsdomäne unter Darstellung der Oberflächenladung. Basische Reste sind blau, saure Reste sind rot eingefärbt. Die entsprechende Aminosäuresequenz wird in **Abbildung 40** abgebildet.

Wie die Alignierung in **Abbildung 40** zeigt, besitzen die Aktinbindungsdomänen von IP3K-Bs verschiedener Spezies interessanterweise große Ähnlichkeiten zu denen von IP3K-As. Die Anhäufung ähnlicher Aminosäuren an einer bestimmten Position innerhalb dieser ABDs wird durch den „Identitätsscore“ in der untersten Reihe der Alignierung verdeutlicht (je höher die Säule, desto häufiger kommt eine bestimmte Aminosäure an dieser Position vor). Die Aktinbindungsdomäne der humanen IP3K-B weist sogar ca. 20% Identität zur ABD der HsIP3K-A auf, welche von Schell und Mitarbeitern beschrieben wurde (Schell et al. 2001). Das charakteristische Segment der Aktinbindungsdomäne von IP3K-A ist eine Prolin reiche Region, die sechs Proline (gelb unterlegt in **Abbildung 40**) beinhaltet und von einer α -Helix gefolgt wird. Die ABD von IP3K-B enthält drei Proline (Pro121, 122, 124), an die sich die zwei prädizierten α -Helices I und II anschließen. Ein Motiv im α -helikalen C-terminalen Bereich, welches von den Aminosäuren LFEAR in IP3K-A und MFEAH in IP3K-B gebildet wird, ist hochkonserviert (**Abbildung 40**, ab Position 194). Gefolgt wird dieses Motiv wieder von einer Prolin reichen Region mit sechs dieser Reste (Pro164, 167, 175, 177, 186, 187) innerhalb von 23 Aminosäuren. Aus der Alignierung wird deutlich, dass es sich bei dem Prolin reichen Segment um einen in Vertebraten hochkonservierten Aminosäurebereich handelt, der im Kontext des Vollängenproteins höchstwahrscheinlich essentiell für die F-Aktinbindung ist. Durch ihre strukturbrechenden Eigenschaften gewährleisten diese Proline möglicherweise Flexibilität zwischen den beiden α -Helices und den angrenzenden Sekundärstrukturbereichen, wodurch eine Konformationsänderung der ABD zwischen Aktin ungebundenem und gebundenem Zustand stattfinden könnte.

Die Tatsache, dass die ABDs der Isoformen A und B der IP3K große Ähnlichkeiten aufweisen, aber keine Homologie zu anderen bekannten ABDs zeigen, lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei um eine neue Familie von Aktinbindungsdomänen handelt.

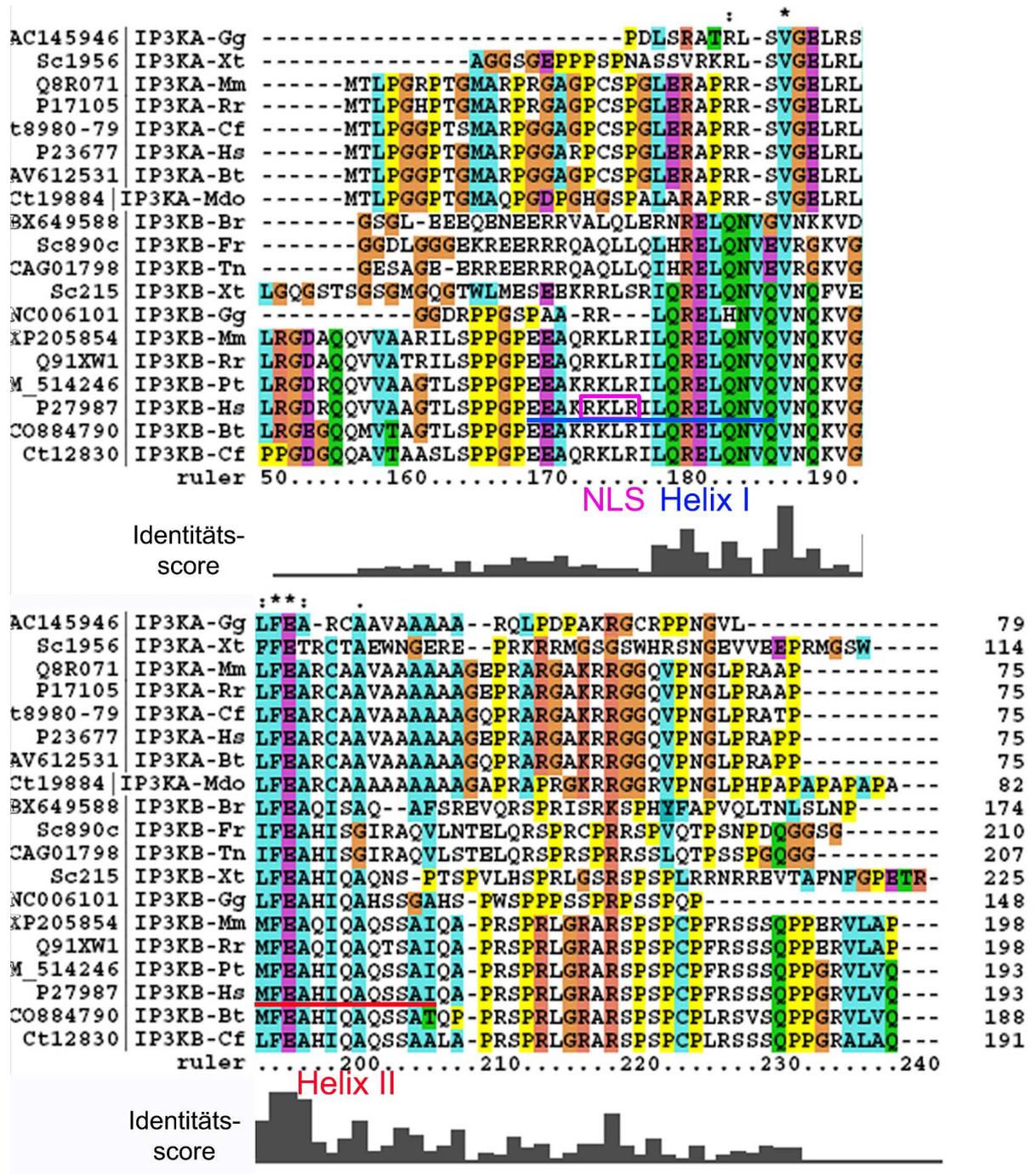


Abbildung 40: Aminosäuresequenzalignierung der Aktinbindungsdomänen der A- und B-Isoformen von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen verschiedener Spezies, entsprechend den Aminosäuren 106 bis 193 der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B mit Hilfe von ClustalX.

Proline sind gelb unterlegt. Identische bzw. ähnliche Aminosäuren sind farblich markiert und in der obersten Reihe durch ein „:“, „*“ bzw. „:“ sowie 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. 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); Mdo: *Monodelphis domestica* (Opossum); Br: *Danio rerio* (*Brachydanium rerium*, Fisch); Tn: *Tetraodon nigroviridis* (Fisch); Pt: *Pan troglodytes* (Schimpanse).

4.1.2 F-Aktinbindungseigenschaften und Charakteristika der Aktinbindungsdomäne von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B

Um die F-Aktinbindungseigenschaften der IP3K-B-ABD näher charakterisieren zu können, wurde die Domäne auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die endogene IP3K-B vom F-Aktin zu verdrängen. Nach der Überexpression der isolierten ABD als EGFP-Fusionsprotein zeigte diese eine deutliche Colokalisation mit F-Aktin. Wurde in den selben Zellen, nach 24-stündiger Produktion der ABD, die endogene Kinase durch Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen IP3K-B nachgewiesen, so konnte das endogene IP3K-B-Enzym nicht mehr am F-Aktin detektiert werden. Dass heißt, der durch die Überexpression bedingte Überschuss an isolierter ABD führte zu einer nahezu vollständigen Verdrängung des endogenen Enzyms vom F-Aktin. Dieser Befund belegt, dass die isolierte ABD und die IP3K-B um die selben Bindungsstellen am F-Aktin konkurrieren, d.h. die isolierte ABD liegt wahrscheinlich in der selben Sekundärstruktur vor wie im Kontext des Volllängenenzym.

Im Vergleich mit anderen F-Aktin bindenden Proteinen ist die in den *in vitro* Bindungstests bestimmte Affinität der Aktinbindungsdomäne von IP3K-B zu F-Aktin, mit einem K_d von 10 μM , für die isolierte Domäne relativ niedrig. Im Vergleich dazu binden Plectrin mit einem apparenten K_d von 0,3 μM , Abp1p mit einem $K_d < 0,1 \mu\text{M}$ (Goode et al. 2001), der Arp2/3 Komplex mit einem K_d von 2 μM (Fontao et al. 2001), und WASp mit einem $K_d \approx 1 \mu\text{M}$ (Higgs et al. 1999) an F-Aktin. Möglicherweise verursacht der GST-Anhang der ABD durch sterische Behinderung diese recht schwache Bindung an F-Aktin. Es wäre aber auch denkbar, dass flankierende Aminosäurebereiche des Volllängenproteins zur Stabilisierung der Bindung und damit zur Affinitätserhöhung nötig sind. Eine niedrige Affinität der IP3K-B zu F-Aktin könnte aber auch den Vorteil bieten, dass das Enzym flexibel zwischen F-Aktin, Kern und ER pendeln könnte, um so im schnellen Wechsel dort zu wirken, wo es benötigt wird.

Dass die F-Aktinbindung der isolierten Aktinbindungsdomäne von IP3K-B auf einem charakteristischen Merkmal von ABDs, nämlich dem Vorhandensein von α -Helices beruht, konnte durch die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von sogenannten Helixbrechermutanten der isolierten ABD nachgewiesen werden. Durch die Einführung von Prolinen in die putativen α -Helices der ABD (L139→P, L143→P und I159→P, T163→P) wurden solche Mutanten mit einer gestörten Sekundärstruktur hergestellt. Die Position dieser mutierten Aminosäuren in dem putativen 3D-Strukturmodell der IP3K-B wird in **Abbildung 41** verdeutlicht. Da nur eine putative 3D-Struktur für die humane Kinase modelliert wurde, die Mutationen aber in der Ratten-IP3K-B-ABD vorgenommen wurden, sind die zur

Rattensequenz äquivalenten Aminosäuren markiert (Leu134, Leu138, Ile154 und Ser158). Überexprimiert als EGFP-Fusionsproteine 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 Aktinbindungsdomäne der IP3K-B auf dem Vorhandensein von korrekt gefalteten α -Helices, welche die Bindung an F-Aktin vermitteln.

Dieser Befund konnte *in vitro* bestätigt werden, denn die als GST-Fusionsproteine rekombinant hergestellten Helixbrechermutanten zeigten auch in F-Aktin-Bindungsstudien mit polymerisiertem F-Aktin in der Küvette keinerlei Affinität zu F-Aktin. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass eine intakte Sekundärstruktur unabdingbar für die Bindung der IP3K-B an F-Aktin ist. Die *wt*ABD zeigte unter den selben Bedingungen eine direkte Bindung an F-Aktin, wodurch die Notwendigkeit weiterer Proteine für die Bindung der IP3K-B an F-Aktin ausgeschlossen werden konnte.

Erneux und seine Kollegen schlugen das Fragment IP3K-B₂₃₁₋₃₀₉ als putative ABD vor, da es helikale Strukturen aufweist und reich an Prolinen ist (Dewaste et al. 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ausgeschlossen werden, dass dieser als ABD postulierte Bereich in die F-Aktinbindung der IP3K-B involviert ist, denn die Helixbrechermutationen, eingeführt in den verlängerten N-Terminus des Enzyms (Aminosäuren 108-583), hatten den selben Effekt wie in der isolierten ABD. Das heißt, die Aminosäuren 171-583 sind nicht essentiell für die Funktion der ABD und es befinden sich keine weiteren funktionalen ABDs in diesem Aminosäureabschnitt.

Um untersuchen zu können, ob weitere ABDs in anderen Bereichen des Enzyms existieren (Aminosäuren 1-107 oder im C-Terminus), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit, erstmals in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayr, eine Vollängen-cDNA der humanen IP3K-B erfolgreich kloniert, die der veröffentlichten Sequenz entspricht (GenBank[®] accession no. NM002221 und AJ242780; GenBank[®] gene info identifier (gi): 38569399 und 14329671).

Durch die Deletion der ABD-codierenden Basenpaare und Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der überexprimierten Deletionsmutante durch Fluoreszenzmikroskopie konnte die Existenz weiterer ABDs eindeutig verneint werden. Denn die Deletionsmutante wies keine F-Aktinbindung mehr auf, während die ER-Lokalisation erhalten blieb. Die ER-Zielsteuerungdomäne der IP3K-B befindet sich demnach außerhalb der ABD, da die Aminosäuren 103-165 nicht für die ER-Lokalisation essentiell sind. Dieser Befund wurde kürzlich von Yu et al. (2005) bestätigt, die die ER-Bindungsdomäne auf den Bereich der Aminosäuren 262-399 eingrenzen konnten.

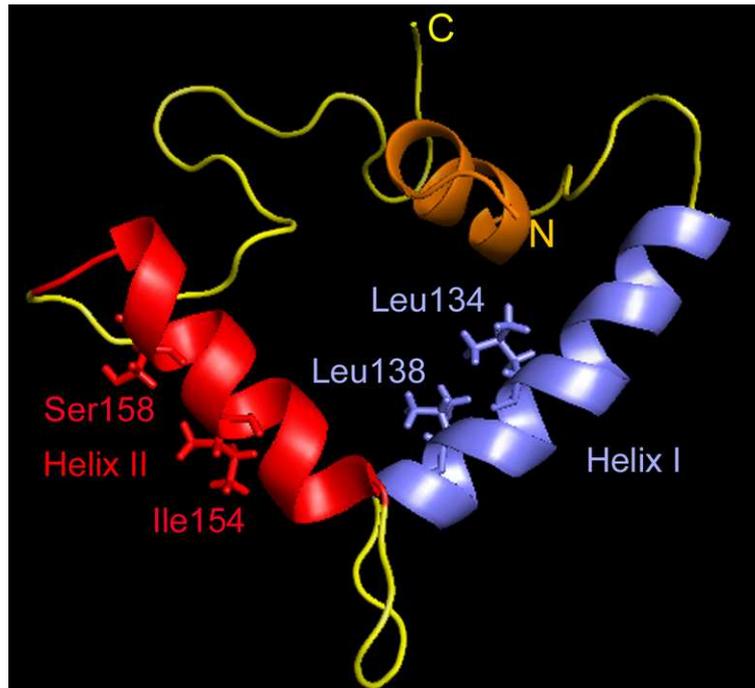


Abbildung 41: Position mutierter Aminosäuren innerhalb des putativen 3D-Strukturmodells der Aktinbindungsdomäne von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B

Die als Stäbchenmodell gezeigten Aminosäuren Leu134 und Leu138 in α -Helix I (blau) und die Aminosäuren Ile154 und Ser158 in α -Helix II (rot) wurden durch Proline ersetzt, um die helikalen Strukturen der ABD aufzubrechen.

4.1.3 Die Aktinbindungsdomäne der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B enthält ein kanonisches monopartites Kernlokalisierungssignal, welches einen Kernimport des Enzyms vermitteln kann

Bei der Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der ABD-Deletionsmutante fiel neben der fehlenden F-Aktinbindungsaktivität auf, dass diese Mutante im Gegensatz zur Wildtypform rein zytosolisch lokalisiert war. Ein Transport in den Zellkern konnte nicht mehr beobachtet werden. Das überexprimierte Vollängenprotein dagegen zeigte eine starke Kernlokalisierung und auch das endogene Enzym war durch Immunfluoreszenz im Kern nachweisbar. Tatsächlich konnte ein kanonisches monopartites NLS der Sequenz RKLRL, beginnend an Aminosäureposition 128, innerhalb der ABD identifiziert werden (Magenta farbene Markierung in **Abbildung 40**). Vermutlich wurde durch die Deletion ein aktiver, Importin abhängiger Kernimport unmöglich, da die Mutation zur Eliminierung beider Zielsteuerungsdomänen führte.

In dem putativen 3D-Modell der ABD ist dieses NLS Teil der basischen α -Helix I. Bis auf das Lysin (roter Pfeil in **Abbildung 42**) liegen seine Seitenketten erwartungsgemäß auf der Oberfläche dieser bifunktionalen Zielsteuerungsdomäne (**Abbildung 42A**: NLS, gezeigt als

Aminosäurereste in der basischen Helix I; **(B)**: rosa Punkte markieren die Atome der NLS bildenden Aminosäuren an der Oberfläche der ABD). Dass das Lysin im Modell nicht auf der Außenseite der α -Helix I positioniert ist, hat möglicherweise eine der folgenden Ursachen: Erstens könnte eine Seitenkettenrotation nötig sein, um das Lysin an die Oberfläche zu bringen, zweitens ist es eventuell gar nicht direkt an der Bindung des Importins beteiligt, welches den Kernimport der IP3K-B vermittelt, und drittens besteht die Möglichkeit einer Ungenauigkeit des putativen 3D-Modells an dieser Stelle. Läge die angrenzende weiße α -Helix (weißer Pfeil in **Abbildung 42**) nicht ganz so nah an der basischen, so wäre auch das Lysin für eine Bindung verfügbar.

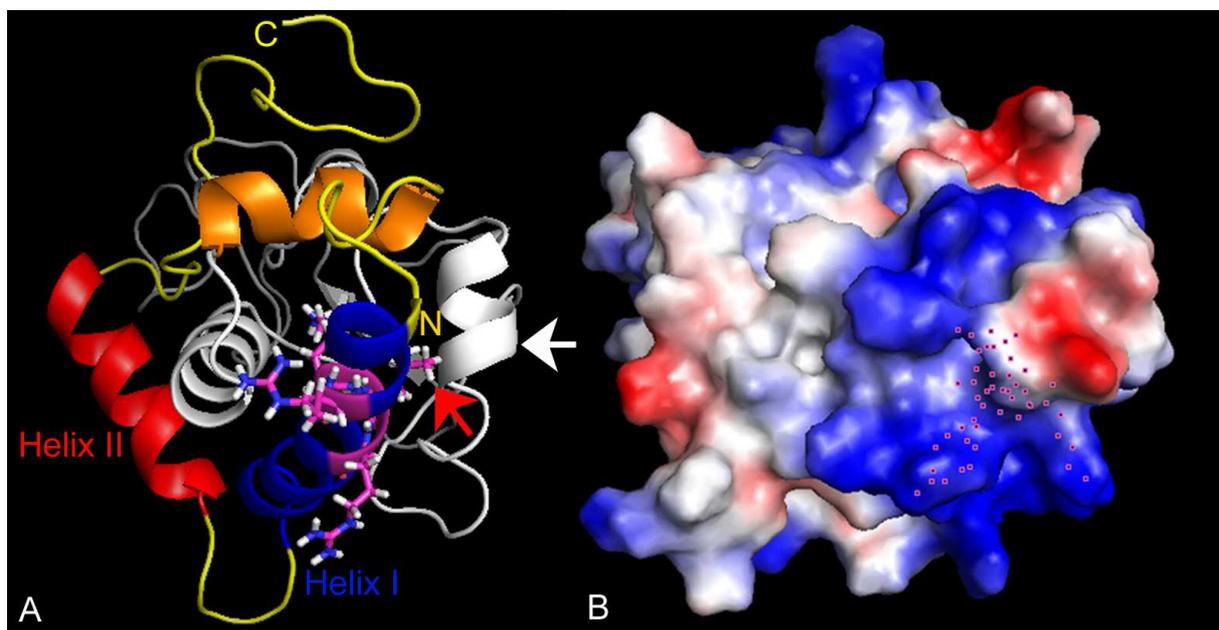


Abbildung 42: Lage des Kernlokalisationsignals in der modellierten 3D-Struktur der Aktinbindungsdomäne von Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B.

(A) zeigt im putativen 3D-Modell der IP3K-B-ABD die am NLS beteiligten Aminosäuren (RKLR) als Stäbchenmodelle. Ein nicht oberflächenpräsentiertes Leucin ist durch einen roten Pfeil markiert. Die nahe an diesem Leucin liegende weiße Helix wird durch einen weißen Pfeil angegeben. In (B) markieren Rosa farbige Punkte die Position der NLS bildenden Atome an der Oberfläche der ABD.

Die vollständige Inhibierung des Kernimportes durch die ABD-Deletion lässt außerdem den Schluss zu, dass zwei weitere putative NLS-Sequenzen (RKIK (Aminosäuren 649-652) und KKK (Aminosäuren 665-667)), die sich in der N-terminalen bzw. C-terminalen Hälfte der CaM-BD befinden, im Kontext der gefalteten Form der HsIP3K-B nicht aktiv sind. Wie aus der Alignierung in **Abbildung 43** deutlich wird, sind diese NLS (Magenta farbene Kästen) in IP3K-Bs verschiedener Spezies hochkonserviert. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass es sich hierbei tatsächlich um funktionale NLS-Sequenzen handelt, die aber durch gebundenes CaM verdeckt und damit inhibiert werden. Eine Aktivierung könnte durch Modifikationen am

Enzym erfolgen, die eine CaM-Bindung verhindern und so die NLS freilegen. Fände z.B. eine Spaltung der IP3K-B durch Calpaine in der PEST-Sequenz (Pattni et al. 2003) statt, die den N-Terminus von CaM-BD und katalytischer Domäne trennt, so könnten die NLS unter Umständen zu einem Kernimport dieses isolierten C-terminalen Bereiches beitragen.

Weitere posttranslationale Modifikationen wie Sumoylierung oder Glykosylierung könnten ebenfalls eine Aktivierung dieser NLS bewirken. Da sich in der unmittelbaren Umgebung der putativen C-terminalen NLS vier mögliche Phosphorylierungsstellen (grüne Pfeile in **Abbildung 43**) befinden, wäre auch eine Regulation der NLS-Aktivität über Phosphorylierung denkbar. Dass an den beiden mit einem Stern gekennzeichneten Phosphorylierungsstellen tatsächlich eine Phosphorylierung durch PKC stattfindet, konnte bereits durch Arbeiten im Arbeitskreis Mayr gezeigt werden.

Die Isoform A der IP3K enthält keine hoch konservierten NLS-Sequenzen. Von dem C-terminalen NLS im Bereich der CaM-BD sind lediglich die Aminosäuren KIR vorhanden (**Abbildung 43**), und ein zum N-terminalen NLS der IP3K-B äquivalentes basisches Aminosäuremotiv ist in der Isoform A nicht konserviert. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass die IP3K-A nicht in den Kern transportiert, sondern ausschließlich an F-Aktin zielgesteuert wird.

4.1.4 Mögliche funktionale Bedeutung alternativer Zielsteuerungsdomänen in der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B

Die Zielsteuerung endogener IP3K-B an das ER und an F-Aktin, in Form von Stressfasern und kortikalem Aktin, deuten auf die Beeinflussung der InsP_3 -Konzentrationen an diesen zellulären Substrukturen hin. Kürzlich erschien eine Arbeit der Gruppen um Irvine und Schell, die sich mit der physiologischen Relevanz dieser verschiedenen Lokalisationen der IP3K-B beschäftigt (Yu et al. 2005). Die Autoren untersuchten zunächst die Lokalisation verschiedener IP3K-B-Fragmente in Rattenastrozyten und COS7-Zellen. Erwartungsgemäß war die IP3K-B₁₋₉₃₄ sowohl an 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 Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass sich die ER-Lokalisationsdomäne im zentralen Bereich des Enzyms befindet. Die Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Fragmente ergab einen abnehmenden Umsatz von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ in der Reihenfolge IP3K-B₁₋₉₃₄ = IP3K-B₆₃₃₋₉₃₄ > IP3K-B₃₉₉₋₉₃₄ > IP3K-B₂₆₂₋₉₃₄. Erwartungsgemäß waren nur die Fragmente, die die katalytische Domäne enthielten, in der Lage InsP_3 zu phosphorylieren.

Außerdem wurde der Einfluss einer Überexpression der verschiedenen IP3K-B-Konstrukte auf die Ca^{2+} -Mobilisierung untersucht. Der Agonist Histidin erzeugt in HeLa-Zellen die Produktion von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, welches die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER bewirkt (Bootman 1996, Bootman and Berridge 1996). Um messen zu können, wie effektiv die IP3K-B-Aktivität diese Ca^{2+} -Antwort reduziert, wurden HeLa-Zellen mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura RedTM inkubiert und anschließend mit 100 μM Histidin stimuliert. In Zellen, die lediglich einen Kontrollvektor überexprimierten, rief diese Behandlung eine ca. 30%ige Abnahme der normalisierten Fura RedTM-Fluoreszenz hervor, was einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nachweist. Diese Zellantwort wurde durch die Überexpression von IP3K-B₁₋₉₃₄ vollständig aufgehoben. Entsprechend früherer Berichte ist die Kinase damit in der Lage die Histamin induzierte Ca^{2+} -Antwort abzuschwächen (Millard et al. 2000). Die Überexpression von IP3K-B₁₋₂₆₂ hatte erwartungsgemäß keinen Effekt, da dem Fragment die katalytische Domäne fehlt. Das C-terminale Fragment IP3K-B₂₆₂₋₉₃₄, welches primär am ER lokalisiert, zeigte 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.

Für die IP3K-B₁₋₉₃₄ wurde außerdem der Effekt auf die Ca²⁺-Mobilisierung verringert, wenn sie durch Auflösen des Zytoskeletts mit Cytocalasin D nicht mehr an F-Aktin vorlag. Diese Befunde belegen die Vermutung, dass die Lokalisation und nicht die enzymatische Aktivität für die Effektivität des InsP₃-Abbaus durch die IP3K-B verantwortlich ist (Yu et al. 2005).

Zusätzlich konnte für die 2003 beschriebene Abspaltung des N-Terminus der IP3K-B in der PEST-Sequenz vor der katalytischen Domäne durch Ca²⁺-abhängige Calpaine (Pattni et al. 2003) eine physiologische Relevanz aufgeklärt werden. Ein doppelt markiertes IP3K-B₁₋₉₃₄-Konstrukt, das N-terminal einen Flag-Anhang und C-terminal einen mRFP1-Anhang besitzt, wird nach Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺ gespalten, so dass durch immunhistochemischen Nachweis der N-Terminus hauptsächlich an F-Aktin und der C-Terminus vorwiegend am ER detektiert werden (Yu et al. 2005).

Anscheinend erfolgt bei hoher Ca²⁺-Konzentration *in vivo* tatsächlich eine Abspaltung der katalytischen Domäne der IP3K-B vom N-Terminus und ihr Transport an das ER. Damit es nicht zusätzlich zu einer Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem ER kommt, könnte die Metabolisierung von InsP₃ beeinflusst werden, indem freies InsP₃ vor seiner Bindung an den ER-Rezeptor abgefangen und der Phosphorylierung zu höherphosphorylierten InsPs bis hin zum InsP₆ zugeführt wird. Da die Aktivität der IP3K-B sehr stark durch Ca²⁺-Calmodulin reguliert wird, ist es sinnvoll, dass die Kinase an den Orten der höchsten Ca²⁺-Konzentrationen lokalisiert. Nämlich an der Plasmamembran, durch die Ca²⁺-Ionen in die Zelle einströmen, und am ER, wo sie aus intrazellulären Speichern entlassen werden. Auf diese Weise käme es zu einer Translokation des C-terminalen Segments der IP3K-B an das ER und zu dessen CaM-Aktivierung, wenn viele Ca²⁺-Ionen in der Zelle vorhanden sind, und zu einer Kanalisierung der InsP₃-Umsetzung hin zur Phosphorylierung anstelle der Dephosphorylierung. Die dadurch vermehrt produzierten höherphosphorylierten InsPs können dann ihrerseits in die Regulation von Ca²⁺-Signalen eingreifen.

Für pankreatische β -Zellen wurde beschrieben, dass die Ca²⁺-Konzentration von entscheidender Wichtigkeit für die Exozytose bzw. die Insulinsekretion ist. Auf eine Stimulation dieser Zellen mit Glucose erfolgt ein Anstieg der intrazellulären InsP₆-Konzentration, der mit einem erhöhten Einstrom von Ca²⁺-Ionen über spannungsabhängige Kalziumkanäle korreliert ist. Es findet dabei eine indirekte Regulation des Kalziumeinstroms durch InsP₆ statt, indem einerseits eine Serin/Threonin-Phosphatase inhibiert wird, die spannungsabhängige Kalziumkanäle dephosphoryliert und so die Kanäle desensibilisiert oder inhibiert. Gleichzeitig stimuliert InsP₆ die PKC ϵ , was zu einer Phosphorylierung und damit zu einer Aktivitätssteigerung des Kanals führt (Barker and Berggren 1999, Hoy et al. 2003).

Der wesentlich niedrigere K_m von IP3K-B für InsP_3 verglichen mit dem der InsP_3 5-Phosphatase (Irvine and Schell 2001, Shears 1998), garantiert ebenfalls die bevorzugte Produktion höherphosphorylierter InsPs .

Eine gesteigerte Produktion von InsP_4 in der Nähe der Plasmamembran durch 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, das vermutlich 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. Anscheinend bewirkt die Interaktion von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ mit dem InsP_4 -Rezeptorprotein $\text{GAP1}^{\text{IP}_4}$ eine Senkung der $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration, welche dann die Ca^{2+} -Freisetzung induziert. Nach einer Vorinkubation von permeabilisierten L1210-Zellen mit GTP beladenem R-Ras verursacht die Gabe von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, im Vergleich zu Zellen, die nicht mit R-Ras/GTP beladen wurden, eine um 106% gesteigerte Ca^{2+} -Freisetzung bei submaximaler Konzentration von $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ (Cullen 1998, Fukuda and Mikoshiba 1996, Loomis-Husselbee et al. 1998). Eine Beeinflussung von PtdInsP_3 -Rezeptorproteinen, für die *in vitro* InsP_4 -Bindung beschrieben wurde, wäre ebenfalls möglich. Das humane Homolog des Ratten-Centaurin- α , p42^{IP_4} , ist ein solches Protein. Seine Assoziation an $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ wird durch die Bindung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ inhibiert, woraufhin eine Translokation des Proteins aus der Plasmamembran in das Zytosol stattfindet. Die Funktion dieses Vorganges wurde noch nicht aufgeklärt. Eine Vermutung ist, dass durch Bindung von InsP_4 an Centaurin und seine Mobilisierung das $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ der Plasmamembran für eine Dephosphorylierung zu $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ durch SHIP freigegeben wird. Dieses Produkt kann Akt aktivieren, welches in differenzierenden neuronalen Zellen die Apoptose verhindert. Andererseits wurde InsP_4 als ein Mediator des neuronalen Zelltods in Zellen des Hippocampus beschrieben (Bottomley et al. 1998, Hanck et al. 1999).

Für Dephosphorylierungsprodukte von InsP_3 ist bisher keine Funktion in der Regulation von Kalziumsignalen bekannt.

Die sehr geringen nukleären Konzentrationen der IP3K-B deuten auf eine Nebenfunktion der Kinase im Kern hin, die vermutlich nur unter bestimmten zellulären Bedingungen oder in gewissen Gewebetypen von Bedeutung ist. So könnte die IP3K-B in einigen Geweben, die keine kernlokalisierte IP3K-C exprimieren, eine nukleäre Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ gewährleisten.

Die Colokalisation der ABD und des NLS im N-Terminus der IP3K-B könnte außerdem die folgenden Aufgaben erfüllen: Da die Existenz von nukleärem Aktin in den letzten Jahren

immer intensiver diskutiert wird (Pederson and Aebi 2005), wäre es möglich, dass durch die sich überlagernden NLS- und ABD-Sequenzen eventuell ein Transport der IP3K-B zu Aktinstrukturen im Kern stattfinden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das NLS in der ABD der IP3K-B zu einer Aufnahme der Kinase in den Zellkern führt, wenn es zu einer erhöhten Depolymerisierung von F-Aktin kommt. Durch posttranslationale Modifikationen könnte die Verwendung dieser beiden sich überlappenden Zielsteuerungsdomänen reguliert werden. Zur Zeit erfolgen Untersuchungen in der AG von Prof. Dr. Mayr, die Aufschluss über eine mögliche Zielsteuerungsregulation durch Phosphorylierungen in der Nähe der ABD bringen sollen.

4.2 Die umfangreiche Charakterisierung von Lokalisation und Funktion der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

4.2.1 Die Kernlokalisation der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ergänzt das Bild eines unabhängigen InsP-Metabolismus' im Zellkern

Die Wichtigkeit der Kernlokalisation von InsPs und den InsP formenden Inositolphosphatkinasen wird in letzter Zeit immer eingehender diskutiert (Martelli et al. 2004). Für eine Reihe von Inositolphosphatkinasen wurde bereits eine nukleäre Lokalisation gezeigt. Hierzu gehören die Isoformen B und C der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (Brehm et al. 2004, Nalaskowski et al. 2003) und die Inositolphosphatmultikinase (Nalaskowski et al. 2002). Die drei Isoformen der Inositolhexakisphosphatkinase sind ebenfalls in unterschiedlichem Grade nukleär lokalisiert. Isoform 1 zeigt eine ebenso starke zytosolische wie nukleäre Lokalisation, während sich Isoform 2 praktisch ausschließlich im Kern befindet. Die Isoform 3 hingegen verbleibt größtenteils im Zytosol und kann nur zu einem geringen Prozentsatz im Kern detektiert werden (Saiardi et al. 2001b). Unveröffentlichte Untersuchungen von Dr. Marcus Nalaskowski in der Arbeitsgruppe Mayr zeigen, dass auch die Inositolpolyphosphat 5/6/1-Kinase nukleär lokalisiert ist.

In dieser Arbeit konnte nun durch die Detektion sowohl überexprimierter als auch endogener Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphatkinase 2-Kinase im Zellkern bewiesen werden, dass eine autarke Produktion von InsP_6 und InsP_7 in diesem Zellkompartiment möglich ist. In **Abbildung 44**, die diese Daten zusammenfasst, wird deutlich, dass alle IPKs, die für die Phosphorylierungsschritte ausgehend von InsP_3 zu InsP_6 und PPIInsP_5 benötigt werden, im Zellkern vorliegen können. Für entsprechende Phosphatasen (grau dargestellt) wurden bisher noch keine Lokalisationsstudien durchgeführt. Eine Mutation, die zum Ausfall einer der Kinasen führt, würde wahrscheinlich nicht den vollständigen Verlust von InsP_6 bedeuten, denn alle diese Enzyme besitzen Nebenaktivitäten, welche die Aufrechterhaltung der InsP_6 -Produktion über alternative Synthesewege garantieren könnten.

Neben dem Hauptsyntheseweg für InsP_6 , der von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, über $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ (**Abbildung 44**) führt, gibt es für eukaryotische Zellen noch viele weitere Möglichkeiten, über Nebenwege zu InsP_6 zu gelangen. So kann allein die IPMK aus den drei InsP_4 -Isomeren $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ herstellen, welches von der IP_5 -2K bzw. der IPMK zu InsP_6 phosphoryliert werden kann (Chang and

Majerus 2006, Nalaskowski et al. 2002, Nalaskowski and Mayr 2004). Das durch die hier identifizierte *in vitro* Nebenaktivität der IP₅-2K aus Ins(1,3,4,6)P₄ produzierte Ins(1,2,3,4,6)P₅ kann ebenfalls von der IPMK zu InsP₆ umgesetzt werden. Ins(1,2,3,4,5)P₅, welches bei Überexpression von EGFP/IP₅-2K in COS7-Zellen vermutlich aus Ins(1,3,4,5)P₄ vermehrt gebildet wird, ist ebenfalls ein Substrat zur InsP₆-Bildung für die IPMK. Dass diese neue Nebenaktivität der IP₅-2K *in vitro* nicht nachweisbar war, könnte auf ein bisher unbekanntes Hilfsprotein hinweisen, das für diese Spezifität der Katalyse notwendig ist. Die starke Abnahme der Ins(1,3,4,5,6)P₅-Konzentration durch die hohe Phosphorylierungsaktivität der überexprimierten IP₅-2K führte außerdem folgerichtig zur Abnahme der Ins(1,4,5,6)P₄-Konzentration, einem Abbauprodukt von InsP₅. (Die Daten über unveröffentlichte Nebenaktivitäten der IPMK stammen aus Untersuchungen von Prof. Georg W. Mayr, Werner Fanick und Dr. Hongying Lin).

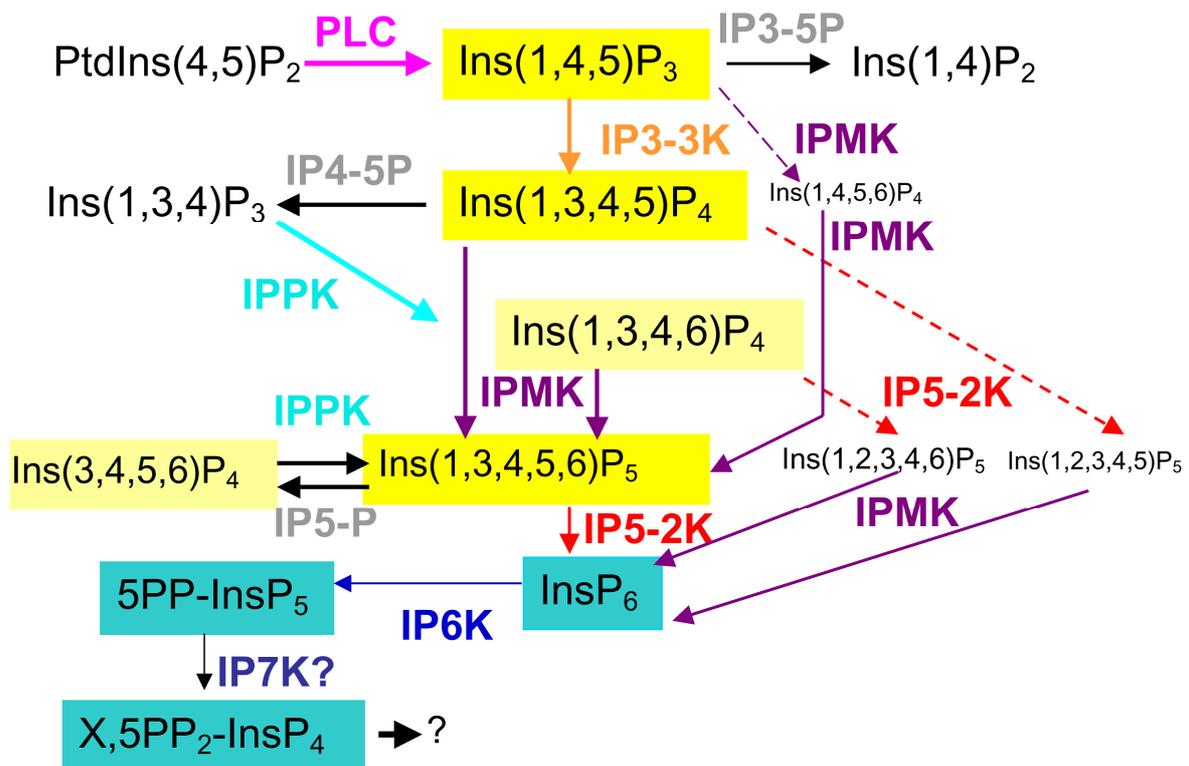


Abbildung 44: Der nukleäre Inositolphosphatmetabolismus in Tieren.

Überblick über Substrate und Produkte von IPKs mit nukleärer Lokalisation. Nebensubstrate und -produkte sind gegenüber den Hauptsubstraten und -produkten durch kleinere Schriftgrößen abgehoben. Enzyme, für die eine mögliche Lokalisation im Kern noch nicht untersucht wurde, sind grau dargestellt.

PLC: Phospholipase C; IP3-3K: Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase (Isoformen B, C); IPMK: Inositolphosphatmultikinase; IP6K: InsP₆-Kinase (Isoformen 1, 2); IPPK: InsP_{3/4} 5/6/1-Kinase = Inositolpolyphosphat 5/6/1-Kinase; IP5-2K: Ins(1,3,4,5,6)P₅ 2-Kinase; IP7K: 5PP-InsP₅ Kinase; IP3-5P: Ins(1,4,5)P₃ 5-phosphatase; IP4-5P: Ins(1,3,4,5)P₄ 5-phosphatase; IP5-P: Ins(1,3,4,5,6)P₅ 1-Phosphatase. Abbildung modifiziert nach Prof. Dr. Mayr.

4.2.2 Ist die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ein TAP-Homologes?

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten nicht nur die bereits bekannten Inositolphosphat umsetzenden Eigenschaften der IP₅-2K bestätigt sowie Nebenaktivitäten charakterisiert werden, sondern es konnten auch neue bisher unbekannte Lokalisationen des Enzyms nachgewiesen und Hinweise auf neue Funktionen der Kinase gewonnen werden. Nachfolgend sollen die Ergebnisse dieser Arbeit ausgehend von der 3D-Struktur des mRNA-Exportproteins TAP in einen kausalen Zusammenhang gebracht werden. Warum TAP? Weil es zum einen eine leichte primärstrukturelle Homologie zur IP₅-2K mit 11% identischen Aminosäuren zeigt. Zum anderen besitzen die IP₅-2K und TAP 21% stark konservierte und 16% schwach konservierte Aminosäuren (**Abbildung 45**). Bemerkenswert ist dabei, dass bei der homologen Alignierung der beiden Aminosäureprimärstrukturen keine Lücken in die Sequenzen eingefügt werden mussten. Dies spricht für eine schwache aber echte Homologie zwischen IP₅-2K und TAP. In der vorliegenden Arbeit wurden für die IP₅-2K typische Eigenschaften von mRNA-Exportproteinen nachgewiesen, auf die nachfolgend im Detail eingegangen wird. Hierzu zählen 1) nukleozytoplasmatisches Pendeln, 2) Coexport zusammen mit mRNA unter offensichtlicher Interaktion mit dem Kernporenkomplex und 3) Colokalisation mit nukleärer mRNA. Prof. Dr. Mayr hat deshalb putative 3D-Strukturmodelle für die IP₅-2K mittels des Programms Modeller (Marti-Renom et al. 2000) erstellt, indem bekannte 3D-Strukturen von schwach Sequenz homologen mRNA-Transportern zugrundegelegt wurden. Wie **Abbildung 46** zeigt, konnte auf diese Weise eine den kristallographisch bzw. durch NMR aufgeklärten Domänen des TAP (**Abbildung 46** oben), sehr ähnliche 3D-Struktur für die IP₅-2K als bestes Homologiemodell erstellt werden (**Abbildung 46** unten, Sequenz von TAP NP_006353 und TAP-Strukturen aus (Grant et al. 2002, Ho et al. 2002)). TAP bindet mRNA über die RNA-Bindedomäne. Diese besteht aus der N-terminalen SR-reichen Domäne (Aminosäuren 36-55, Magenta farben), einer RNP-Domäne (grün) und Leucin reichen Wiederholungen (leucine rich repeats = LRR-Domäne, grün, Aminosäuren 96-372), zwischen denen sich die gelb markierten Verbindungssequenzen (Aminosäuren 105-118 und 198-203, keine 3D-Struktur vorliegend) befinden (Ho et al. 2002). Nach der Bindung an TAP wird mRNA durch den Kernporenkomplex in das Zytoplasma exportiert. Für diesen Transport besitzt TAP eine NTF2 (nuclear transport factor 2) homologe Domäne (Aminosäuren 371-551, orange), mit deren Hilfe es ein Heterodimer mit dem Pendelprotein p15/NXT1 ausbildet, welches mit Nukleoporinen interagiert (Coburn et al. 2001) und so den Export mediiert. Zusätzlich kann TAP direkt mit FG-Motiven von Nukleoporinen über eine FG-Bindedomäne (**Abbildung 46**

oben, rote Domäne) interagieren, die das nukleozytoplasmatische Pendeln von TAP unterstützt (Grant et al. 2002). Aus dem Zytosol wird TAP mit Hilfe eines N-terminalen NLS (blau markierte Domäne, **Abbildung 46**) wieder in den Kern reimportiert (Truant et al. 1999). Obwohl die IP₅-2K und TAP auf Primärstrukturebene nur relativ wenige Identitäten aufweisen (siehe Alignierung, **Abbildung 45**), scheinen sie sehr ähnliche Tertiärstrukturen zu besitzen, denn alle für TAP charakteristischen Domänen konnten auch mittels der Sequenz der IP₅-2K sehr gut 3D-modelliert werden (RNP und LRR: grün; NTF2: orange; FG: rot, **Abbildung 46**) was nur gelingt, wenn kompatible Primärstrukturen vorhanden sind. Die IP₅-2K könnte damit tatsächlich die Funktionen eines TAP ähnlichen mRNA-Transporters erfüllen, denn alle dafür notwendigen Domänen, bis auf ein N-terminales SR reiches putatives RNA-Bindungsmotiv, konnten für die putative Tertiärstruktur der IP₅-2K vorhergesagt werden. Vor allem aber liefert diese Arbeit praktische Befunde, die auf einen nukleären mRNA-Export zu Stressgranula unter Beteiligung der IP₅-2K schließen lassen.

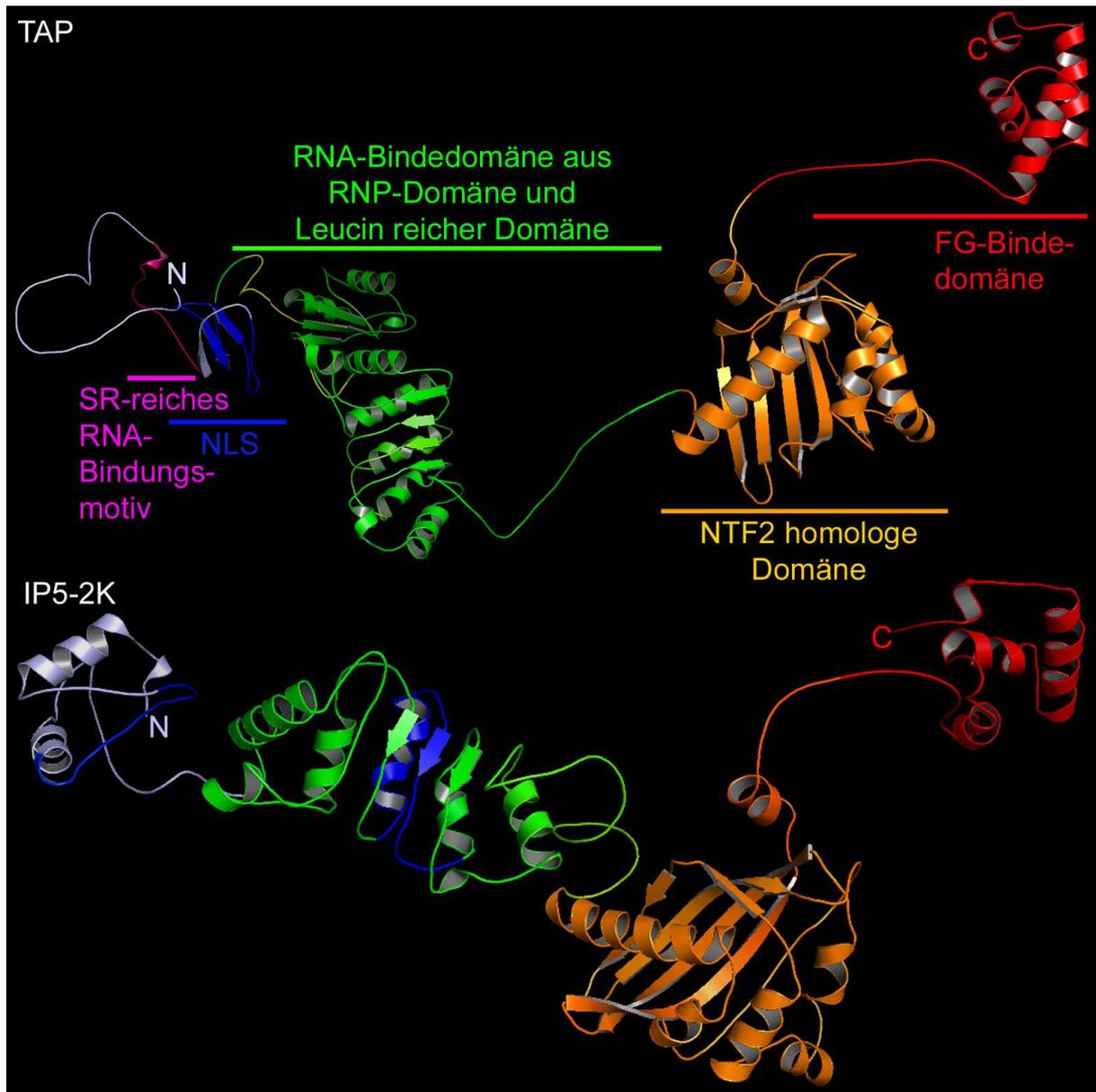


Abbildung 46: 3D-Strukturmodelle von humanem TAP und humaner Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase.

Mit Hilfe des Programms Modeller (Marti-Renom et al. 2000) wurden zunächst Modellierungen der 3D-Struktur von humanem TAP aus dessen Aminosäuresequenz und bereits publizierten Teilen der 3D-Struktur (Grant et al. 2002, Ho et al. 2002) vorgenommen (oben). Unten: Ein putatives 3D-Strukturmodell von humaner IP₅-2K, erstellt am vollständigen Modell der Struktur von TAP (Prof. Dr. Mayr). Die für TAP charakteristischen Domänen sind farblich markiert: Das SR reiche N-terminale putative RNA-Bindungs-motiv Magenta farben, das NLS dunkelblau, die RNA-Bindedomäne aus der RNP-Bindedomäne und der LRR-Domäne (Leucin reiche Domäne, leucine rich repeats) grün, Verbindungssequenzen gelb, die NTF2 homologe Domäne orange und die FG-Bindedomäne rot.

4.2.2.1 Das nukleozytoplasmatische Pendeln der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

Die erste typische Eigenschaft eines mRNA-Transportproteins, welche hier für die IP₅-2K identifiziert werden konnte, ist das nukleozytoplasmatische Pendeln:

Durch Zeitreihenexperimente konnte eine spezifische Abfolge intrazellulärer Translokationen der IP₅-2K zwischen verschiedenen zellulären Substrukturen beobachtet werden, die eine logische und funktionsbedingte Reihenfolge zu haben schienen. Nach zehnstündiger Expression war die IP₅-2K in fast allen Zellen rein zytosolisch lokalisiert. Dies lässt sich aus dem Zeitablauf der Proteinbiosynthese nach transienter Transfektion erklären. Durch die Transfektion mit einem eukaryotischen Expressionsvektor wurde die cDNA der IP₅-2K mit einem starken Promotor versehen in die Zellen eingebracht, was zu einer massiven Produktion von IP₅-2K-mRNA führte und die Synthese großer Mengen IP₅-2K im Zytosol der transfizierten Zellen bedingte. Offenbar benötigen die Zellen einen bestimmten Zeitraum zwischen Proteinbiosynthese und Kernimport des produzierten Enzyms, denn erst nach 14 Stunden waren große Mengen des IP₅-2K/EGFP-Fusionsproteins im Kern sichtbar, die zum größten Teil unstrukturiert lokalisiert vorlagen. Eine kleine Fraktion des Proteins zeigte aber schon eine sehr auffällige strukturierte Anlagerung an spezifische Kernstrukturen. 20 Stunden nach Transfektion war dann ein deutlicher Richtungswechsel der Translokationen aus dem Zellkern heraus erkennbar. Im Kern verringerte sich die Konzentration an IP₅-2K wieder und das dort verbleibende Enzym lag vollständig spezifisch an nukleäre Substrukturen angelagert oder in Nukleoli lokalisiert vor. Es war erkennbar, dass ein Teil der IP₅-2K den Kern durch distinkte Kernporen verließ und sich im Zytoplasma zu granulösen Agglomeraten formierte. Diese Akkumulationen sind offenbar ebenfalls einer Dynamik unterworfen, denn ihr Gehalt an IP₅-2K sinkt mit steigender Entfernung zum Kern. Die Kinase wird anscheinend in einem bestimmten Abstand zum Kern, oder auf ein spezifisches Signal hin, aus den Akkumulationen entlassen, woraufhin sie für einen Reimport in den Kern und damit für einen weiteren Transportzyklus zur Verfügung stehen könnte. Dieser Import/Exportzyklus der IP₅-2K ist ein deutlicher Hinweis auf eine Transportfunktion der Kinase, denn sie verbleibt offenbar nicht im Kern, sondern verlässt ihn unter Kontakt mit wenigen Kernporen wieder.

4.2.2.1.1 Putative Zielsteuerungsdomänen der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

4.2.2.1.1.1 Das putative Kernlokalisierungssignal der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

Für das beschriebene nukleozytoplasmatische Pendeln der IP₅-2K benötigt die Kinase sowohl Zielsteuerungsdomänen, die den Kernexport ermöglichen, als auch solche, die den Kernimport vermitteln. Es sollten deshalb die für den nukleären Import der IP₅-2K notwendigen und hinreichenden Aminosäuren im Rahmen zweier Diplomarbeiten (Schenk 2004, Zhou 2005) identifiziert werden, welche von der Autorin mitbetreut wurden. Hierzu wurde die Bedeutung basischer Aminosäuregruppierungen als NLS-Motive und eines putativen C₂H₂ Zink bindenden Aminosäuremotives, dem zwei weitere Histidine vorausgehen, untersucht. Das putative Zinkfingermotiv wird aus den Aminosäuren 150-170 gebildet und befindet sich in einem in vielen Tierspezies phylogenetisch konservierten Sequenzbereich der IP₅-2K. Die Alignierung in **Abbildung 47** zeigt, dass vier Histidine und zwei Cysteine (in der humanen Form His152, His156, His 164, His 166, Cys159 und Cys162) sowie die umgebenden Aminosäuren nur in höheren Vertebraten hoch konserviert sind. In Pilzen sind jedoch immer auch die beiden Cysteine vorhanden. In Pflanzen dagegen sind nur ein bis zwei Histidine präsent, die beiden Cysteine sind nicht konserviert.

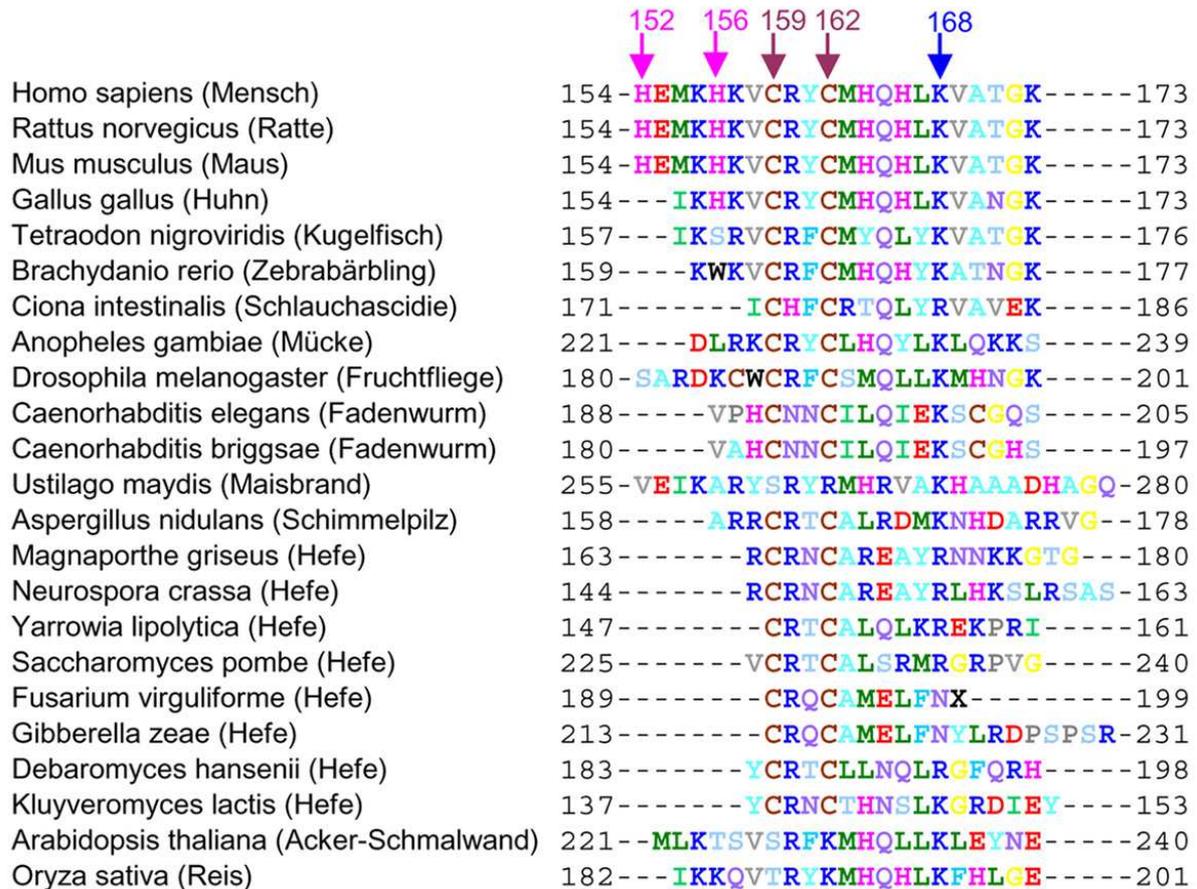


Abbildung 47. Ausschnitt eines Aminosäuresequenzvergleiches von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinasen verschiedener Spezies.

Es wurden bekannte IP₅-2K- und Ipk1-Sequenzen sowie putative IP₅-2K-Fragmente aligniert. Abgebildet ist der Ausschnitt der Sequenzen, die sich im Bereich des putativen Zinkfingermotives bei den Vertebraten befinden. Die Cysteine sind braun, Histidine rosa markiert. Im Rahmen von Mutagenesestudien veränderte Aminosäuren werden mit Position angegeben und durch einen Pfeil markiert.

Durch Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass das putative Zinkfingermotiv sowohl an der katalytischen Aktivität als auch an der Zielsteuerung der IP₅-2K essentiell beteiligt ist.

Der Austausch von Cystein 162 (violett markiert in **Abbildung 47**) zu Tyrosin führt zu einem vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität der IP₅-2K. Wurde die Mutante als EGFP-Fusionsprotein durch Immunadsorption an anti-GFP-Antikörper tragenden Protein-G-Agarosekügelchen gereinigt, so war im Aktivitätstest keine Umsetzung von InsP₅ zu InsP₆ mehr messbar. Anscheinend kommt es durch die Inaktivierung des putativen Zinkfingermotives zu einer so gravierenden Störung der Struktur von IP₅-2K, dass ihre Kinaseaktivität eliminiert wird. Möglicherweise erfolgt eine Konformationsänderung des Enzyms, wodurch entweder das InsP₅ oder das ATP nicht mehr gebunden werden können. Denkbar wäre auch, dass die Bindungsstellen der beiden Substrate durch die Mutation

räumlich so weit voneinander entfernt liegen, dass eine Phosphorylierungsreaktion nicht mehr zu bewerkstelligen ist.

Die Lokalisation der IP₅-2K wurde durch die folgenden Mutationen verändert: Der Austausch von L168→A (blau markiert in **Abbildung 47**) eliminierte die Euchromatinlokalisation, jedoch unter Erhalt des Kernimportes. Die Translokation der IP₅-2K vom Zytosol in den Zellkern wurde hingegen erst durch den Austausch mehrerer putativ Zink bindender Cysteine und Histidine signifikant beeinflusst. Die Deletion des gesamten Zinkfingermotives bzw. die Mutation der Aminosäuren His152 und 156 sowie Cys159 und 162 zu Serinen führte zu einer stark verringerten Aufnahme der Mutanten in den Zellkern. Die Veränderung einer basischen Aminosäuregruppierung im Bereich Arg32-Lys42, die einem monopartiten NLS ähnlich ist, hatte nur einen geringen Einfluss auf den Kernimport der IP₅-2K (Schenk 2004). Dipl.-Ing. Xuefei Zhou untersuchte deshalb den Einfluss der basischen Reste im Bereich der Aminosäuren 140-180 auf den Kernimport der IP₅-2K. Durch die Mutation der basischen Aminosäuren Lys155, 157, bzw. Lys173, 175 und 179 konnte in 80% transfizierter Zellen eine rein zytosolische Lokalisation der Mutanten erzielt werden (Kontrolle: In 20% EGFP/IP₅-2K überexprimierender Zellen rein zytosolische IP₅-2K. Mutierte Aminosäuren werden in **Abbildung 48** als Stäbchenmodelle dargestellt). Der Kernimport der IP₅-2K wird somit anscheinend von einem neuartigen Kernlokalisierungssignal vermittelt, das vermutlich aus basischen Aminosäuren besteht, die durch die Komplexbildung von Zink durch die Histidine und Cysteine des Zinkfingermotives so in einen räumlichen Kontext zueinander gebracht werden, dass der nukleäre Import aktiviert wird. Dass tatsächlich eine Zinkbindung durch diese Aminosäuren stattfindet, ist durchaus denkbar, denn sie liegen in dem putativen 3D-Modell so nahe beieinander, dass sie eine räumliche und funktionelle Einheit zur Zinkbindung ausbilden könnten (rosa markiert in **Abbildung 48**). Damit wäre die IP₅-2K das erste Enzym, dessen Kernimport von einem nicht-kanonischen NLS mediiert wird, welches durch Zinkkomplexbildung aktiviert wird. Möglicherweise ist dieses NLS wie ein kanonisches NLS in der Lage an Importin zu binden und so den Kernimport zu vermitteln. Vielleicht interagiert es aber auch direkt mit dem Kernporenkomplex oder mit einem bisher unbekanntem Importprotein, mit dem die IP₅-2K cotransportiert wird. Eine Bindung an Transportin, wie die des nicht kanonischen NLS von TAP ist eher unwahrscheinlich, da das NLS der IP₅-2K keinerlei Homologie zu dem TAP-NLS zeigt, das dem NLS M9 des RNA-Bindeproteins A1 sehr ähnlich ist (Truant et al. 1999). Der extreme N-Terminus von TAP (Aminosäuren 1-122), in dem sich sein NLS (Aminosäuren 61-102) befindet, fehlt der IP₅-2K sogar vollständig (**Abbildung 45**).

Das putative Zinkfingermotiv der IP₅-2K scheint damit ein zentrales strukturgebendes und funktionsbeeinflussendes Element in der Tertiärstruktur der IP₅-2K zu sein, das den Kernimport, die Colokalisation mit Euchromatin und die katalytische Aktivität der Kinase beeinflusst.

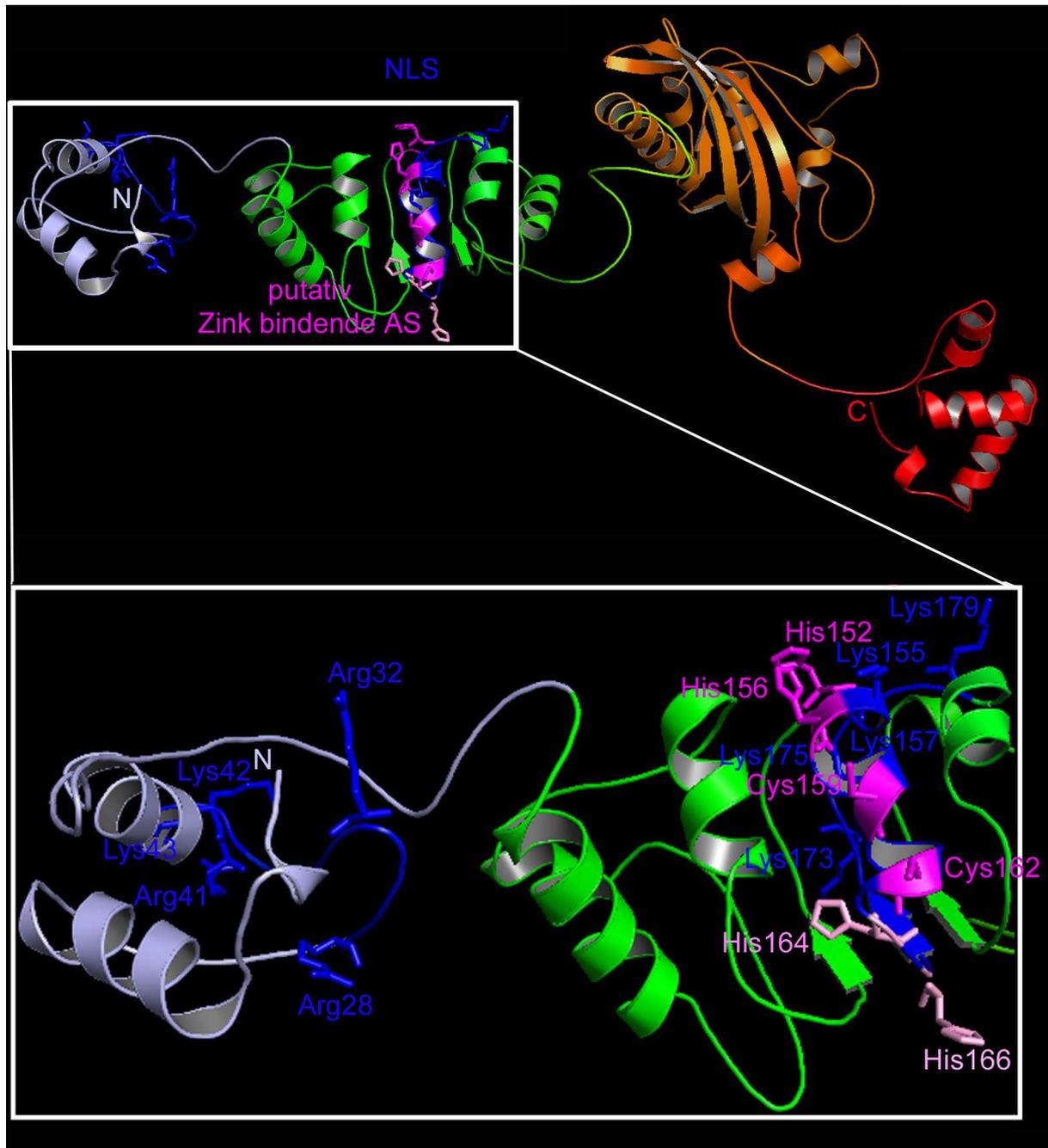


Abbildung 48: Lage des putativen Zinkfingermotives und des Kernlokalisierungssignals in der modellierten 3D-Struktur der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase.

Lage des NLS und der putativ Zink bindenden Aminosäuren im 3D-Strukturmodell der IP₅-2K, die unten vergrößert dargestellt werden. Die basischen Aminosäuren, deren Beteiligung am Kernimport der IP₅-2K nachgewiesen wurde, sind als blaue Aminosäurereste hervorgehoben. Mutagenisierte putativ Zink bindende Aminosäuren sind Magenta farben markiert, zwei nicht untersuchte Histidine des C₂H₂-Motives werden Rosa farben dargestellt.

4.2.2.1.1.2 Das putative Kernexportsignal der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

Der nukleäre Export der IP₅-2K konnte ebenfalls durch das 3D-Modell von TAP und Primärstrukturvergleiche von IP₅-2K- und Ipk1-Sequenzen aufgeklärt werden: TAP wird mit Hilfe von NXT1/p15 aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert. Dazu bildet TAP unter Verwendung seiner NTF2 homologen Domäne ein Heterodimer mit NXT1/p15, welches seinerseits mit dem Kernporenkomplex interagieren kann, wodurch es den Kernexport von TAP ermöglicht (Bachi et al. 2000, Katahira et al. 1999).

Im putativen 3D-Strukturmodell der IP₅-2K konnte ebenfalls eine der NTF2 homologen Domäne aus TAP sehr ähnliche Domäne modelliert werden (orange in **Abbildung 46** und **Abbildung 49**). Der N-terminale Bereich dieser Domäne befindet sich in einem von zwei Peptideinschüben, die durch den Vergleich von zehn Vertebraten-IP₅-2K- und 18 Pilz-Ipk1-Aminosäuresequenzen identifiziert wurden (siehe Alignierung im Anhang, Seite II, erstellt von Prof. Dr. Mayr). Sie bestehen aus den Aminosäuren 202-297 (Insertion 1 pink markiert in **Abbildung 49**) bzw. 335-389 (Insertion 2 gelb markiert in **Abbildung 49**). Die Deletion von Insertion 1 aus dem IP₅-2K-Volllängenprotein führt zu einer Mutante, die, überexprimiert als EGFP-Fusionsprotein, eine rein nukleäre Lokalisation aufweist, d.h. das mutierte Protein besitzt offensichtlich keine Kernexportaktivität mehr. Da die Insertion 1 den N-terminalen Bereich der putativen NTF2 homologen Domäne der IP₅-2K bildet, könnte sie an der Bindung von NXT1 beteiligt sein, welches nach Bildung des Heterodimers mit IP₅-2K unter Interaktion mit dem NPC den Transport des Komplexes in das Zytoplasma vermitteln könnte. Auf diese Weise werden vermutlich die IP₅-2K-Akkumulationen in der Nähe von Kernporen gebildet. Der Mechanismus des NXT vermittelten Kernexportes würde auch erklären, warum eine Inkubation mit LMB keine Veränderung der *wt*IP₅-2K-Lokalisation hervorrief. LMB blockiert nämlich nur den Exportin abhängigen Kernexport, welcher über Leucin reiche NES Segmente der Frachtproteine mediiert wird. Da NXT nicht zu den Exportinen gehört, kann der nukleäre Export mit Hilfe dieses Transportfaktors auch in Gegenwart von LMB stattfinden. Hiermit konnte erstmals für eine Inositolphosphatkinase ein Exportin unabhängiges Kernexportsignal identifiziert werden.

Die späte evolutionäre Entwicklung der Peptidinsertionen bei IP₅-2Ks höherer Eukaryoten könnte darauf hinweisen, dass sie für eine Interaktion verantwortlich sind, die eine gegenüber den Pilzen neu gewonnene Funktion der IP₅-2K in Vertebraten vermittelt. Ein Beispiel ist die oben geschilderte Kernexportaktivität der IP₅-2K, die durch die Insertion 1 vermittelt wird.

Die Insertion 2, die sich C-terminal von Insertion 1 in der putativen NTF2 homologen Domäne befindet, könnte theoretisch als eine Bindedomäne dienen, über welche die IP₅-2K mit Bestandteilen von SG interagiert. Dass der Großteil der RNA-Bindungsmotive auch in Pilz-Ipk1s zu finden ist, könnte dafür sprechen, dass auch sie eine aktive Rolle im mRNA-Export spielen und lediglich die Beteiligung an der SG-Bildung eine Eigenschaft der IP₅-2K ist, die im Laufe der Evolution hinzugewonnen wurde. Die Klärung dieser Theorien bedarf aber weiterer Untersuchungen.

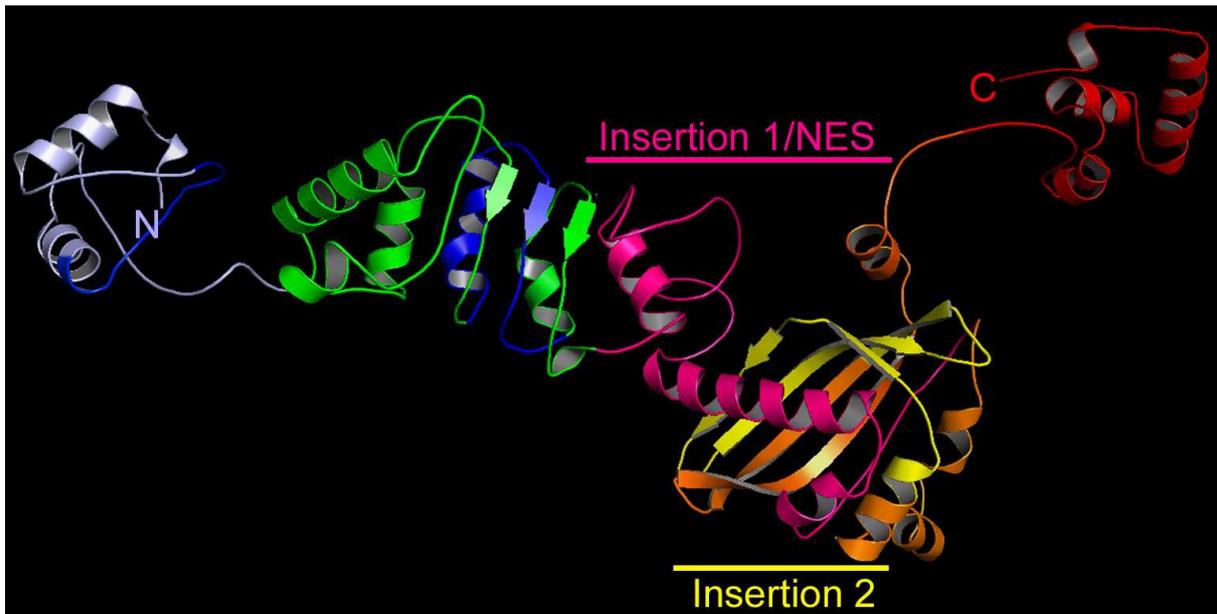


Abbildung 49: Position von Vertebrateninsertionen in der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase sowie ihres Kernexportsignals im putativen 3D-Strukturmodell.

In der putativen 3D-Struktur der humanen IP₅-2K wurden die beiden Aminosäureinsertionen, die nur in Vertebraten-IP₅-2Ks und nicht in Pilz-Ipk1s vorhanden sind, farblich hervorgehoben. Insertion 1 (Aminosäuren 202-297), die das NES bildet, ist pink und Insertion 2 (Aminosäuren 335-389) ist gelb markiert.

4.2.2.1.1.3 Die putative FG-Bindedomäne der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

In der putativen 3D-Struktur der IP₅-2K konnte außerdem eine FG-Bindedomäne prädictiert werden (**Abbildung** 46, rote Domäne). FG-Motive sind Phenylalanin und Glycin reiche Domänen von Nukleoporinen. Diese Proteine sind Bestandteile des Kernporenkomplexes, die über ihre FG-Motive mit mRNA-Transportproteinen physikalisch interagieren und so deren Passage durch den Kernporenkomplex vermitteln. Die Nukleoporine Nup116p und Nup100p beispielsweise interagieren über GLFG-Regionen mit der FG-Bindungsdomäne von Mex67p, dem Hefehomolog von TAP (Strawn et al. 2001), während humanes TAP an Can/Nup214 bindet (Katahira et al. 1999).

Die FG-Bindungsdomäne von TAP besteht aus vier α -Helices, die gegeneinander gepackt sind (**Abbildung 50A**). Der Vergleich zwischen der von Grant et al. durch NMR gelösten Struktur (**Abbildung 50A**) mit der von Prof. Dr. Mayr modellierten (**Abbildung 50B**) zeigt eine gute Übereinstimmung der beiden 3D-Strukturen. Für die IP₅-2K konnte von Prof. Dr. Mayr eine FG-Bindungsdomäne modelliert werden, die der von TAP sehr ähnlich ist (vergleiche **Abbildung 50A** und **B** (TAP) mit **C** (IP₅-2K)). In TAP bilden die Aminosäuren Glu566, Phe574, Leu563 und Gln590 einen hydrophoben Kern, für dessen Stabilität das Trp594 von großer Wichtigkeit ist (**Abbildung 50D**). Obwohl diese Aminosäuren in der IP₅-2K nicht konserviert sind (**Abbildung 45**), gibt es in der putativen 3D-Struktur von IP₅-2K ebenfalls eine ähnliche hydrophobe Gruppierung, die von den Aminosäuren Ile458, Tyr460, Tyr461, Ala471, Met474 und Phe478 geformt wird (blau markiert in **Abbildung 50E**). Ein Pendant für eine zweite hydrophobe Aminosäuregruppierung von TAP, die für seine Interaktion mit dem Kernporenkomplex verantwortlich ist, konnte für die IP₅-2K jedoch bisher nicht identifiziert werden. Ob die putative FG-Domäne tatsächlich als solche aktiv und damit am nukleozytoplasmatischen Pendeln der IP₅-2K beteiligt ist, gilt es in Zukunft zu klären.

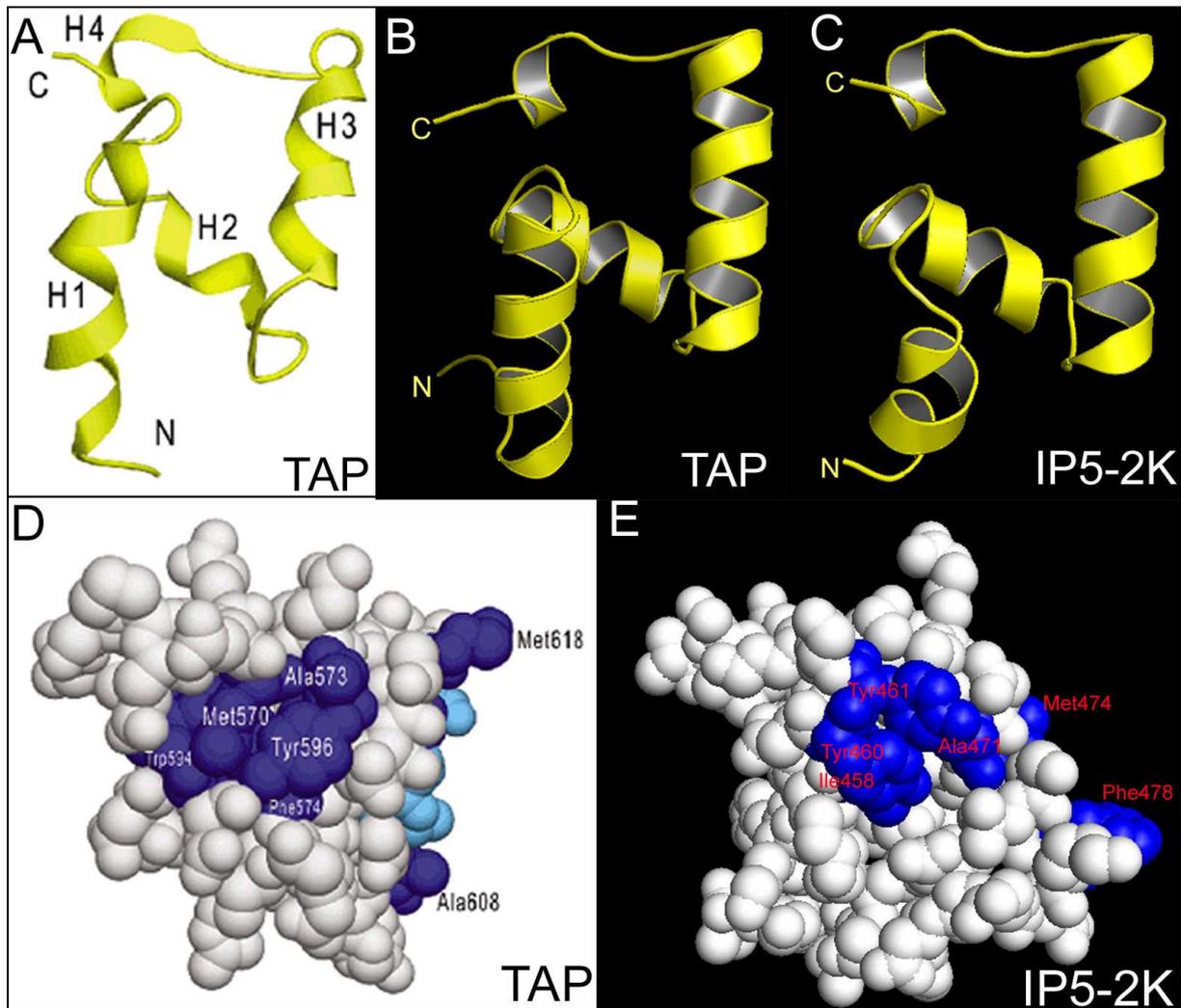


Abbildung 50: Verschiedene Ansichten der 3D-Strukturmodelle der C-terminalen Domänen von TAP und IP₅-2K.

(A): 3D-Struktur der C-terminalen Domäne von TAP (Grant et al. 2002). (B): 3D-Strukturmodell der C-terminalen Domäne von TAP, modelliert von Prof. Dr. Mayr. (C): Putative 3D-Struktur der C-terminalen Domäne von IP₅-2K, modelliert von Prof. Dr. Mayr. (D): In der 3D-Struktur der C-terminalen Domäne von TAP wurden die strukturgebenden hydrophoben Aminosäuren blau markiert (Grant et al. 2002). (E): Blaue Markierung einer ähnlichen hydrophoben Gruppierung im 3D-Strukturmodell der C-terminalen Domäne von IP₅-2K.

4.2.2.2 Die strukturierte Anlagerung von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase an Euchromatin und ihre Colokalisation mit mRNA

Die zweite typische Eigenschaft eines mRNA-Transportproteins, die hier für die IP₅-2K charakterisiert werden konnte, ist die Colokalisation mit mRNA:

Für alle IPKs, die eine nukleäre Lokalisation aufweisen, wurde eine gleichmäßige Verteilung im Kern beschrieben (Brehm et al. 2004, Nalaskowski et al. 2003, Nalaskowski et al. 2002,

Saiardi et al. 2001b). Erst 2004 wurden Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der *DmIPMK* in Speichelzellen der Fruchtfliege veröffentlicht, welche eine spezifische Anlagerung dieser Kinase an die Euchromatinfraction von Polytäanchrosomen wahrscheinlich machten (Seeds et al. 2004). In den oben beschriebenen Zeitreihenexperimenten und bei der Untersuchung der intrazellulären Lokalisation sowohl endogener als auch überexprimierter IP₅-2K konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine Zielsteuerung zu spezifischen nukleären Strukturen charakterisiert werden. Sie ist damit, überexprimiert in NRK-Zellen aus der Ratte, sowie in COS7-Zellen der Grünen Meerkatze und humanen H1299-Zellen, nicht, wie in (Fujii and York 2005) beschrieben, gleichmäßig über die Zelle verteilt lokalisiert.

Durch multiple Versuchsansätze konnten diese Substrukturen des Zellkerns als transkriptionell aktive Genbereiche identifiziert werden. 1) Die nukleären Substrukturen, mit denen die IP₅-2K colokalisiert, werden nur schwach von DAPI angefärbt, welches dafür bekannt ist, dass seine Interaktion mit Heterochromatin wesentlich stärker ist als die mit Euchromatin, das die zur Transkription partiell entwundenen Chromatinstrukturen enthält. 2) Die Detektion endogener IP₅-2K im Zentrum von Nukleoli weist auf eine Colokalisation mit Nukleolusorganisatorregionen von Chromosomen hin, d.h. auch der Ort der rRNA-Synthese (Stryer 1999) bindet IP₅-2K. 3) Bei der Detektion endogener IP₅-2K in mitotischen Zellen mittels Immunfluoreszenz wurden die hochkondensierten Chromatinstrukturen von der IP₅-2K hingegen völlig ausgespart. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Zellen in der Ana- oder Telophase praktisch kein Euchromatin besitzen. Durch den Zusammenbruch der Kernmembran während der Zellteilung entsteht ein Kontinuum zwischen Kern und Zytoplasma (Stryer 1999), weswegen die IP₅-2K gleichmäßig über die Zelle, um das Chromatin herum verteilt, detektiert werden konnte. 4) Für eine Euchromatinlokalisation der IP₅-2K spricht weiterhin, dass im Rahmen der Dissertation von Dr. Claudia Luther (Luther 1995) auch für das Produkt der IP₅-2K, das InsP₆, eine Colokalisation mit aktiven Genregionen bestimmt wurde. Ihre Arbeit beschäftigte sich mit dem Nachweis von radioaktiv markiertem InsP₆ an Polytäanchrosomen aus Speichelzellen von *Chironomus thummi*. Diese Präparate wurden nach der Inkubation mit Tritium markiertem InsP₆ mit Fotoemulsion überschichtet. Nach Belichtung der Emulsion durch das Tritium und Entwicklung der Silberkörner wurde ein charakteristisches Bandenmuster aktiver Genregionen in den Polytäanchrosomen der Zellen erkennbar (Luther 1995).

5) Bei einer Lokalisation der IP₅-2K an Euchromatin sollte zumindest eine partielle Colokalisation der Kinase mit mRNA, die bei der Transkription entsteht, sichtbar sein.

Tatsächlich konnte durch den Nachweis von poly(A)-RNA mittels FISH hier erstmalig die Colokalisation einer Inositolphosphatkinase mit mRNA nachgewiesen werden. Auch für die Interaktion mit mRNA bietet die putative 3D-Struktur der IP₅-2K einen Erklärungsansatz. Denn eine einer RNP-Bindedomäne von TAP (Ho et al. 2002) sehr ähnliche Interaktionsdomäne konnte auch für die IP₅-2K aus der Sequenz vorhergesagt und 3D-modelliert werden (siehe **Abbildung 46**, grüne Domänen). Diese RNP-Domäne von TAP wird bei der Bindung von mRNA durch einen Bereich von Leucin reichen Wiederholungen funktionell unterstützt (Ho et al. 2002), für die ebenfalls ein Pendant in der IP₅-2K prädiiziert werden konnte (**Abbildung 46**).

Alle diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass IP₅-2K eine bisher unbekannte Funktion inne hat, die sich anscheinend nicht auf die Produktion von InsP₆ beschränkt, wie es für das Hefehomolog der IP₅-2K, die Ipk1, beschrieben wurde. Die Ipk1 soll über ihre Phosphorylierungsaktivität von Ins(1,3,4,5,6)P₅, also über die Produktion von InsP₆, den Gle1 mediierten mRNA-Export beeinflussen (Miller et al. 2004). Die Autoren stellten eine Ipk1-Mutante her, die an eine Zielsteuerungssequenz für die Plasmamembran gekoppelt war. Auf diese Weise wurde eine plasmamembranständige Ipk1-Mutante erzeugt, die keinen Einfluss auf den mRNA-Export der Hefe durch Protein/mRNA-Wechselwirkung haben konnte. Diese Bedingungen riefen keine negative Beeinflussung des mRNA-Exportes hervor, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die Ipk1 nicht aktiv am Export beteiligt ist, sondern lediglich als InsP₆-Produzent wirkt. Somit wurde InsP₆ als der wichtige oder gar essentielle Faktor postuliert (Miller et al. 2004). Die InsP₆-Herstellung könnte auch durch Plasmamembran verankerte IP₅-2K erfüllt werden, von wo aus das InsP₆ durch Diffusion an seinen Wirkort im Kern bzw. an den Kernporen gelangen kann. Es ist allerdings fragwürdig, ob die Markierung der Ipk1 mit einer PM-Zielsteuerungssequenz tatsächlich zu einer 100%igen Lokalisation an der Plasmamembran führt. So könnte eine starke Überexpression von Membranproteinen dazu führen, dass ein Teil der Proteine statt in die Plasmamembran in die Kernmembran eingelagert wird. Es wäre auch möglich, dass alle Bindungsstellen in der Plasmamembran durch die hohe Konzentration des Proteins belegt werden und deshalb noch ein Teil der Mutante frei im Zytosol vorliegt. Auf diese Weise könnten noch ausreichend viele Moleküle des mutierten Proteins für den mRNA-Export als direkte Interaktionspartner bereitstehen.

Das nukleozytoplasmatische Pendeln der IP₅-2K, ihre Colokalisation mit Euchromatin und nukleärer mRNA sowie die Akkumulationen der Kinase an bestimmten Kernporen und im Zytosol lassen eher darauf schließen, dass die IP₅-2K eine wesentlich direktere und

vielfältigere Rolle im mRNA-Export, wenigstens einer Fraktion der mRNA von Vertebraten, spielt, als nur durch Produktion von InsP₆ erklärbar.

Warum unterschiedliche Funktionen von IP₅-2K in Hefen (Odom et al. 2000, York et al. 1999) und Vertebraten? In Hefezellen, die einem rapiden Wachstum und schneller Proliferation unterliegen, ist es wahrscheinlich nötig, schnell InsP₆ produzieren zu können. Da Hefezellen aber recht klein sind, muss das InsP₆ vermutlich nicht unbedingt direkt an seinem Wirkort produziert werden, da es durch Diffusion schnell genug zu seinen Bindungspartnern gelangen kann.

Die meisten mRNAs in Hefen sind intronlos und ihr nukleärer Export unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht vom Export der meist gespleißten mRNAs in Vertebraten (Goffeau et al. 1996, Stutz and Izaurralde 2003). Diese Tatsache, die Größe und die Komplexität von Vertebratenzellen und -kernen könnten eine feinregulierte Zielsteuerung von InsP₆ und seinem Produzenten erfordern. InsP₆ ist ein polyanionisches Molekül, das höchstwahrscheinlich in löslichen poly-Magnesiumhydratkomplexen (Torres et al. 2005) vorliegt, die dazu neigen, über Mg²⁺-Brücken mit negativ geladenen Membranen und Polynukleotidstrukturen zu assoziieren (Stuart et al. 1994). Die dadurch eingeschränkte Diffusion von InsP₆ könnte ein raffiniertes System nukleärer und zytosolischer Lokalisationsereignisse der IP₅-2K erfordern, um InsP₆ an definierten zellulären Substrukturen in genügend hoher Konzentration bereitzuhalten. So würde sichergestellt, dass das InsP₆ direkt an seinem Wirkort produziert wird, der tatsächlich in der Nähe des Euchromatins liegen könnte, wie der schon erwähnte Nachweis von InsP₆ an der Euchromatinfraction von Polytäanchrosomen aus *Chironomus thummi* (Luther 1995) zeigt. Außerdem wurde InsP₆ kürzlich als ein essentieller Faktor für Proteinfaltung und Aktivität der RNA editierenden Adenosindesaminasen ADAR2 und ADAT1 beschrieben (Macbeth et al. 2005). Diese Funktion von InsP₆ könnte ebenfalls eine nukleäre Produktion des „niedermolekularen Faltungsmediators“ InsP₆ erfordern. Darüber hinaus spielt InsP₆ im DNA/PK-Komplex offenbar ebenfalls eine wichtige Rolle zur Stabilisierung der Proteinfaltung und -oligomerisierung (Byrum et al. 2004, Hanakahi and West 2002, Ma and Lieber 2002). Bei der Assoziation mit Chromatin und RNPs sowie bei der hier beschriebenen Oligomerisierung der IP₅-2K könnte eine ähnliche Funktion für InsP₆ postuliert werden.

4.2.3 Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphatkinase 2-Kinase, mRNA-Export und Stressgranula

Nachdem in der vorliegenden Arbeit mehrere Eigenschaften der IP₅-2K charakterisiert werden konnten, welche starke Hinweise darauf lieferten, dass es sich bei dieser Kinase auch um ein mRNA-Transportprotein handelt, stellte sich die Frage nach der physiologischen Relevanz der Ausbildung von zytosolischen IP₅-2K-Akkumulationen. Deshalb wurden diese IP₅-2K-Granula, die in den Zeitreihenexperimenten aufgefallen waren, näher untersucht. Interessanterweise werden sie ebenfalls bei poly(A)-RNA-Detektion durch FISH angefärbt, d.h. sie enthalten mRNA. Auf diese Weise konnte bewiesen werden, dass die IP₅-2K tatsächlich mRNA aus dem Kern begleitet und somit aktiv am mRNA-Export beteiligt ist. Unter normalen zellulären Bedingungen ist es aber untypisch, dass exportierte mRNA in zytosolischen Granula akkumuliert. Proteinhaltige Ansammlungen von mRNA im Zytoplasma können jedoch durch zellulären Stress induziert werden, weshalb sie Stressgranula genannt werden (Kedersha et al. 1999). Eine Art von Stress, die zur Ausbildung von SG führen kann, ist die transiente Proteinüberexpression (Kedersha et al. 2000). Anscheinend hat also die Überexpression des EGFP/IP₅-2K-Fusionsproteins in den untersuchten Zellen zur Bildung von SG geführt. Es wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit die in der Literatur anerkannten Verfahren genutzt, um eine Beteiligung der IP₅-2K an dem Phänomen der Ausbildung von SG zu beweisen. Hierzu zählt der Nachweis einer Colokalisation mit spezifischen Bestandteilen von SG, wie z.B. den mRNA-Bindeproteinen TIAR und PABP (Thomas et al. 2005). Für das überexprimierte EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein konnte durch den immunhistochemischen Nachweis sowohl für TIAR als auch für PABP eine Colokalisation mit der Kinase in SG identifiziert werden. Eine weitere Methode ist die Untersuchung der Colokalisation des interessierenden Proteins mit künstlich, durch Inkubation mit Puromycin, induzierten SG (Kedersha and Anderson 2002). Dieses Polysomen destabilisierende Reagenz führte zu SG, die eine deutliche Colokalisation mit überexprimierter IP₅-2K zeigten, wenn sie mittels FISH oder durch Immunfärbung von TIAR nachgewiesen wurden. Dabei fiel auf, dass die Puromycin induzierten SG zahlreicher und kleiner waren als die durch Proteinüberexpression induzierten SG. Dies könnte auf die unterschiedlichen Erholungszeiten zurückzuführen sein, die die Zellen hatten, um sich unter Auflösung der SG zu regenerieren. Es wurde bereits beschrieben, dass nach Stressinduktion zunächst viele kleine SG entstehen, die sich mit der Zeit zu wenigen großen SG vereinen (Kedersha and Anderson 2002). Die EGFP/IP₅-2K überexprimierenden Zellen waren zum Zeitpunkt der Fixierung bereits 24 Stunden dem Stress der Proteinüberexpression ausgesetzt.

Sie hatten somit mehrere Stunden Zeit sich den veränderten Bedingungen anzupassen und enthielten vermutlich deshalb nur wenige große SG. Die Puromycin behandelten Zellen wurden eine Stunde dem SG induzierenden Reagenz ausgesetzt und anschließend sofort fixiert, ohne die Möglichkeit zu haben sich zu regenerieren. Aus diesem Grunde waren vermutlich viele kleine SG nachweisbar.

Die endogene Kinase konnte in der Tat ebenfalls in den Puromycin induzierten SG durch eine immunhistochemische Doppelfärbung von IP₅-2K und TIAR detektiert werden. Da die Visualisierung der endogenen IP₅-2K in SG nicht so eindeutig war wie bei dem überexprimierten EGFP-Fusionsprotein, wurden die Fluoreszenzintensitäten des anti-IP₅-2K-Antikörpers, detektiert mit einem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper, in SG, Kern und Zytoplasma verglichen. Wie in **Kapitel 3.2.6** gezeigt, war im Bereich der SG ein deutlicher Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität von durchschnittlich +56% gegenüber dem Fluoreszenzsignal im Zytoplasma (=100%) messbar. Im Kern dagegen lag eine um 169% höhere Fluoreszenzintensität vor als im Zytoplasma. Durch äquivalente Messungen der lokalisierten EGFP/IP₅-2K-Fluoreszenz und der Fluoreszenz, bestimmt über gebundenen anti-IP₅-2K-Antikörper, mit dem das Fusionsprotein detektiert wurde, konnte gezeigt werden, dass durch den anti-IP₅-2K-Antikörper nur ca. 47% des in SG vorhandenen EGFP-Fusionsproteins detektiert wurden. Diese verminderte Detektion in SG ist vermutlich auf eine sterische Behinderung der Antikörperbindung an das Epitop der IP₅-2K zurückzuführen. Anscheinend wird durch die Bindung der IP₅-2K an Komponenten von SG der Aminosäurebereich verdeckt, in dem die Bindungsstelle für den Antikörper liegt. Das gleiche Phänomen könnte erklären, warum die endogene IP₅-2K im Kern ebenfalls um ca. 37% schwächer erkannt wird und die großen Mengen an EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein, die in den Nukleoli sichtbar sind, praktisch gar nicht von dem Antikörper detektiert werden. Das Antikörperepitop, das von den Aminosäuren 346-360 gebildet wird (**Abbildung 51**, Cyan farbene Aminosäuren), liegt in der Vertebrateninsertion 2 der IP₅-2K, und damit anscheinend in einem wichtigen Protein/Proteininteraktionsbereich des Enzyms. Wie schon erwähnt, könnte es sich bei der Insertion 2 um eine SG-Bindungsdomäne handeln, da sie nur in Vertebraten-IP₅-2Ks vorkommt und deshalb wahrscheinlich an einer Funktion beteiligt ist, die der Ipk1 fehlt. Fände die SG-Interaktion der IP₅-2K über die Insertion 2 statt, so ließe sich auch erklären, warum die IP₅-2K gerade in SG nur schlecht durch den Antikörper detektiert wird.

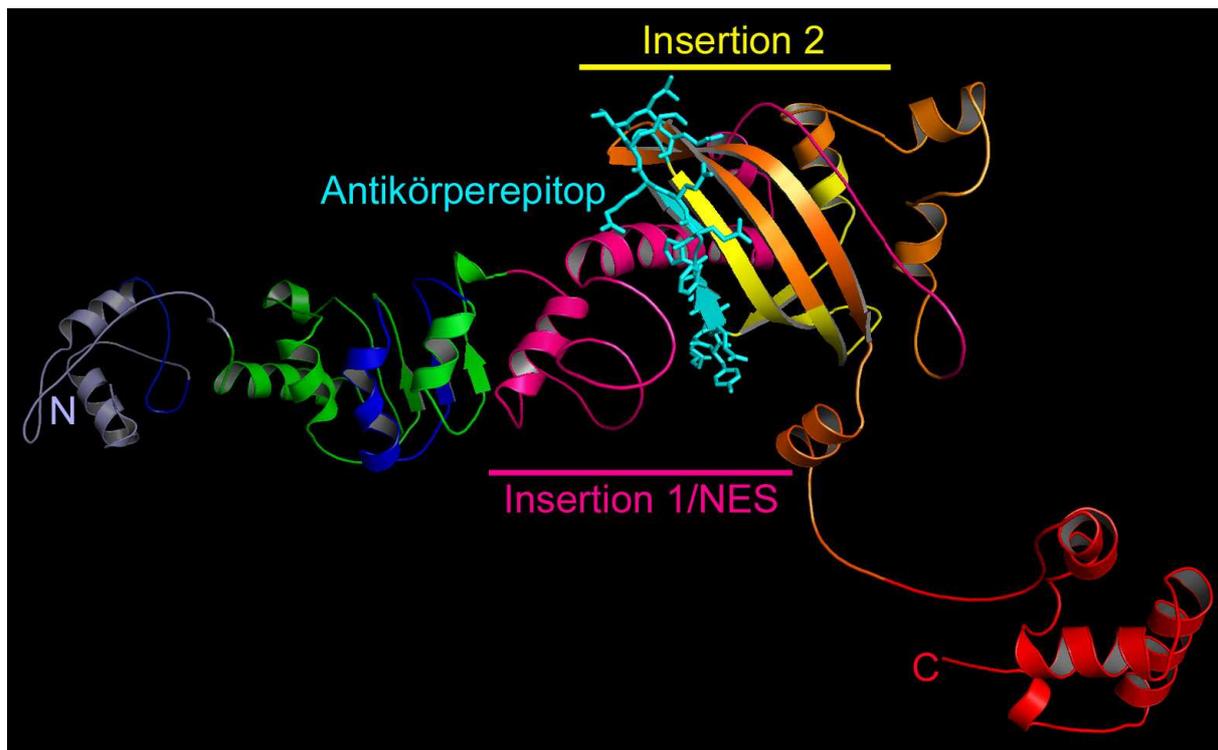


Abbildung 51. Position des Antikörperepitops innerhalb der putativen 3D-Struktur der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase.

In der putativen 3D-Struktur der humanen IP₅-2K wurden die beiden Aminosäureinsertionen, die nur in Vertebraten-IP₅-2Ks und nicht in Pilz-Ipk1s vorhanden sind, farblich hervorgehoben. Insertion 1 (NES, Aminosäuren 202-297) ist pink und Insertion 2 (Aminosäuren 335-389) ist gelb markiert. Die Aminosäuren des Antikörperepitops (346-360) für den anti-IP₅-2K-Antikörper sind als Cyan farbene Stäbchenmodelle visualisiert.

4.2.4 Die intrazellulären Lokalisationen der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase im Überblick

Die oben diskutierten Lokalisationen der IP₅-2K, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert wurden, lassen sich folgendermaßen in einen kinetischen und funktionellen Zusammenhang bringen. **Abbildung 52** stellt zusammenfassend die intrazellulären Translokationen der IP₅-2K dar: Nach der Translation der IP₅-2K-mRNA wird das synthetisierte Protein mit Hilfe seines NLS aus dem Zytoplasma in den Kern transportiert, wo es zunächst an den transkriptionell aktiven Regionen des Chromatins, dem Euchromatin, lokalisiert (1). Zu einem späteren Zeitpunkt tritt die IP₅-2K auch in Nukleoli ein, dem Ort der rRNA-Synthese (2). Die im Euchromatin und im Nukleolus produzierten RNAs werden dann von der IP₅-2K aus dem Kern (4) in das Zytoplasma begleitet. Vermutlich bindet das NES der IP₅-2K an NXT, das den Export unter Interaktion mit dem Kernporenkomplex mediiert (5). Steht die Zelle unter Stress, ist die IP₅-2K offenbar an der Bildung von SG beteiligt, wo sie

mit mRNA (6), TIAR (7) und PABP (8) colokalisiert. Durch die [³H]InsP₆ *in situ* Bindungsstudien von Dr. Claudia Luther (Luther 1995) konnte eine Bindung von InsP₆ an aktive Genregionen, Kernmembranen und Nucleoli gezeigt werden (3).

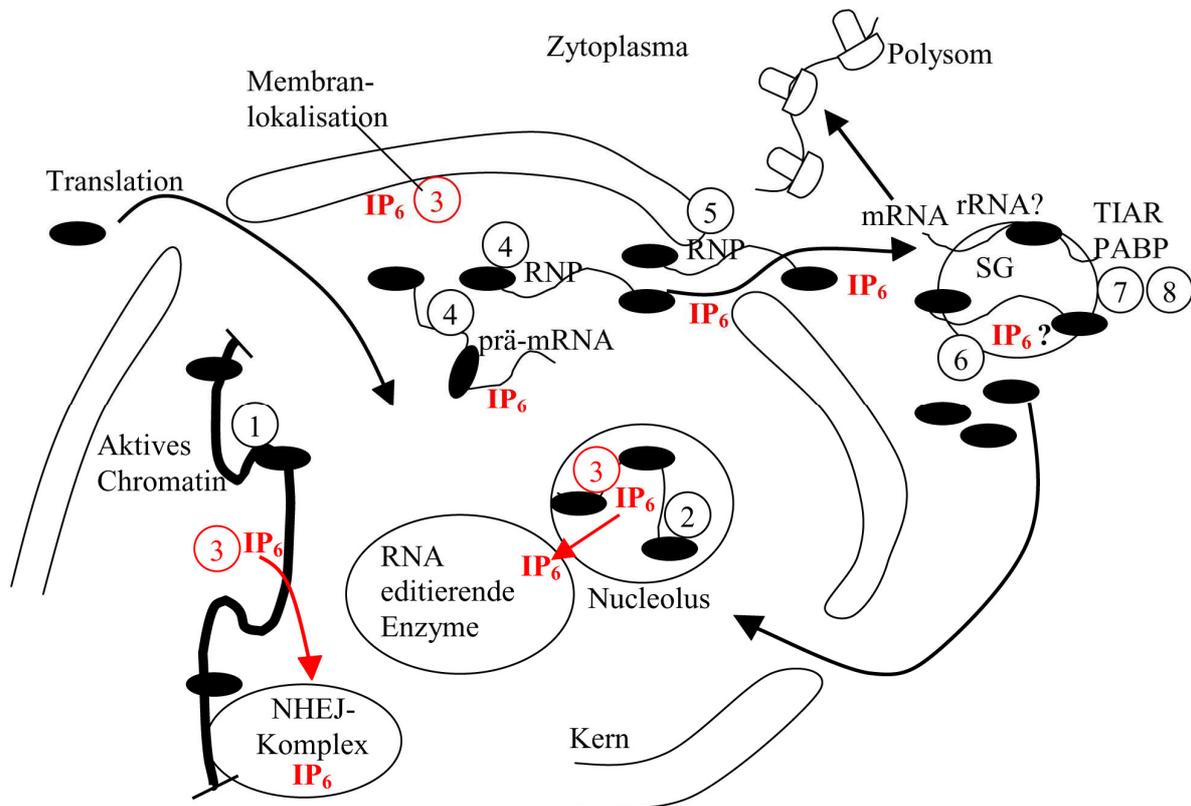


Abbildung 52: Überblick über die Lokalisationen von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase und InsP₆.

Siehe Text für Details. Die IP₅-2K wird durch ●, InsP₆ durch IP₆ markiert.

4.2.5 Möglicherweise ist die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase das bisher unbekannte Glied zwischen Stressabbau und gleichzeitigem Schutz vor Apoptose

Weitere Hinweise auf die Funktionen der IP₅-2K hat die Herunterregulierung ihrer Expression durch siRNA geliefert. Es wurde in den Zellen mit stark reduzierter IP₅-2K-Konzentration sowohl eine abgewandelte Kernmorphologie als auch eine veränderte intrazelluläre Lokalisation von TIAR beobachtet. Funktionen und Lokalisation von IP₅-2K und TIAR scheinen somit eng miteinander verwoben zu sein. Erstens colokalisiert die IP₅-2K mit TIAR in SG. Zweitens ist die IP₅-2K anscheinend am Kernimport von TIAR beteiligt und drittens

ist TIAR ein direkter Bindungspartner, da es bei Immunpräzipitation von EGFP/IP₅-2K-Fusionsprotein mitgefällt wird.

Ob die Ursache für die veränderte Kernmorphologie in Zellen mit herunterregulierter IP₅-2K-Expression tatsächlich im Fehlen der Kinase begründet ist, kann deshalb nicht eindeutig geklärt werden. Einerseits spricht die Euchromatinlokalisation der IP₅-2K für eine Beteiligung der Kinase an der Organisation des Chromatins, und ihr Produkt InsP₆ ist in die Chromatinremodellierung involviert (Rando et al. 2003, Shen et al. 2003, Steger et al. 2003). Andererseits kann in Abwesenheit der IP₅-2K TIAR nicht mehr in den Kern transportiert werden, weshalb die veränderte Kernmorphologie auch mit dem Fehlen der Aktivitäten von TIAR im Kern zusammenhängen könnte.

Für TIAR wurde kürzlich, neben den schon bekannten mRNA-Bindungseigenschaften, die Fähigkeit beschrieben an DNA-Strukturen zu binden. Zwei relevante Bindungsziele konnten für TIAR und TIA-1 identifiziert werden: die 3'-UTRs bestimmter mRNAs, zu denen die von Interleukin (IL)-8, der humanen Matrix Metalloproteinase (MMP)-13, Cyclooxygenase-2 und die des Tumornekrosefaktor (TNF)- α gehören, sowie die U-reiche Sequenz in der Nähe der 5'-Spleißstelle einiger prä-mRNAs, wie Fibroblasten Wachstumsrezeptor 2 (FGFR2), humanes Calcitonin/CGRP, Fas und TIAR selbst.

Einige dieser Proteine besitzen Funktionen, die direkt oder indirekt mit Apoptose zusammenhängen. IL-8 ist ein Chemokin der CXC Familie, welches unter anderem durch Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert wird. Ein wichtiger Angriffspunkt des Chemokins sind neutrophile Granulozyten. Die wesentlichen biologischen Wirkungen von IL-8 auf Granulozyten beinhalten die Förderung der Chemotaxis, die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Granula (WIKIPEDIA 2005).

Die Cyclooxygenase (COX) ist ein intrazelluläres Enzym der Prostaglandinsynthese und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsreaktion. Es findet sich in Leukozyten, Thrombozyten, Endothelzellen, Nierenzellen, Gehirn- und Rückenmarkszellen. Das Isoenzym COX-2 ist induzierbar und nur bei Entzündungen aktiv (WIKIPEDIA 2005).

Metalloproteinasen sind Schlüsselenzyme bei der Degradierung von Proteinen der Extrazellulären Matrix. Sie werden nach ihren Substraten in fünf Gruppen unterteilt: Stromelysine, Elastasen, „Membrane-type Matrix Metalloproteinases“ und Collagenasen, zu denen auch die MMP-13 gehört (Phillips et al. 2003). MMP-2, das zur fünften Gruppe, den Gelatinasen, gehört, spaltet außerdem die extrazelluläre Domäne des Fibroblasten-

Wachstumsfaktorrezeptors (FGFR) und reguliert so die Aktivität von Wachstumsfaktoren (Steinberg et al. 2005).

Fas, Tumornekrosefaktoren (TNF) und andere Zytokine, die beispielsweise von T-Lymphozyten sezerniert werden, leiten den extrinsischen Weg bei der Initiationsphase der Apoptose ein. Die Ligandenbindung erfolgt an einem Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie (z.B. CD95). Daraufhin rekrutiert der Rezeptor mit Hilfe von FADD (Fas-associated death domain protein) im Zytoplasma vorliegende Procaspase 8. Diese aktiviert sich durch die entstandene hohe lokale Konzentration autokatalytisch. Aktive Caspase 8 ihrerseits löst die sogenannte Caspasekaskade aus (WIKIPEDIA 2005).

TIAR bindet DNA ebenfalls über seine RNA-Erkennungsmotive (RNA recognition motif, RRM) 2 und 3. Deshalb wurde postuliert, dass mRNA und DNA um die selben Bindungsstellen in TIAR konkurrieren. Außerdem soll TIAR ein weiteres DNA-Bindungsmotiv besitzen, weil ein gewisser Anteil an gebundener DNA nicht durch Zugabe von RNA verdrängt werden kann. Aufgrund dieser dualen Bindungseigenschaften könnte TIAR ein Brückenprotein zwischen DNA und mRNA darstellen, das in die Prozessierung und den Transport von mRNA involviert ist (Suswam et al. 2005).

Dies ist interessant im Hinblick auf neue Erkenntnisse über die Wirkung von InsP_6 , das in HEK293-Zellen Schutz vor $\text{TNF}\alpha$ und Fas induzierter Apoptose bieten soll (Verbsky and Majerus 2005). Die Überexpression der IP_5 -2K führte in diesen Zellen zu einer Akkumulation von InsP_6 , während InsP_5 verschwand; gleichzeitig sank die Anfälligkeit gegenüber $\text{TNF}\alpha$ und Fas induzierter Apoptose. Pyrophosphorylierte Inositolphosphate, wie InsP_7 , für die eine pro-apoptotische Wirkung postuliert wird (Morrison et al. 2001), lagen erwartungsgemäß nicht in höheren Konzentrationen vor.

Die bekannten anti-apoptotischen Signaltransduktionswege wurden durch Überexpression der IP_5 -2K nicht aktiviert, weshalb die Autoren folgerten, dass die Apoptose inhibierende Wirkung der IP_5 -2K auf einer neuen Funktion dieser Kinase beruhen muss. Denn der Effekt konnte nicht auf die anti-apoptotische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ durch Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ zurückgeführt werden. Außerdem beeinflussen veränderte InsP_6 -Pegel weder die Expression von $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren noch die Aktivität von Caspase 8 *in vitro* (Verbsky and Majerus 2005).

Diese Befunde berücksichtigend, lässt sich die folgende Theorie über einen möglichen Zusammenhang von IP_5 -2K-Überexpression und Schutz vor Apoptose aufstellen (**Abbildung 53**): In gestressten Zellen können mehrere Stressreaktionswege eingeschlagen werden, zu

denen die Bildung von SG zur Bewältigung des Stresses gehört und die Einleitung der Apoptose, falls sich der Stress nicht abbauen lässt. Werden SG als Zwischenspeicher für beim Stressabbau nicht benötigte Transkripte gebildet, so sollte die Induktion der Apoptose zunächst unterdrückt werden. Hierzu könnte die IP₅-2K folgendermaßen beitragen: TIAR liegt gebunden an die 3'UTR von TNF α und Fas vor und kontrolliert möglicherweise die Transkription der entsprechenden mRNAs bzw. deren Prozessierung. Die Abhängigkeit des Kernimportes von TIAR von der IP₅-2K und ihre Euchromatinlokalisation lassen den Schluss zu, dass die IP₅-2K TIAR aus dem Zytoplasma zu seiner DNA-Bindungsregion im Euchromatin transportiert hat und sich nun dort mit ihm zusammen befindet. Ungeklärt ist noch, ob die IP₅-2K dabei an TIAR, an DNA oder an mRNA gebunden vorliegt.

Unter Stress ist es sinnvoll, die Transkripte herzustellen, die Apoptose induzierende Proteine codieren, damit sie rasch translatiert werden können, falls der Stress nicht zu bewältigen ist. Zunächst sollten sie aber unter Translationsarrest gelagert werden für den Fall, dass der Stress erfolgreich abgebaut werden kann. TIAR und die IP₅-2K könnten dazu im Komplex mit anderen Proteinen z.B. die TNF α - und Fas-mRNAs aus dem Kern zu SG begleiten, wo die Translationsinhibierung stattfindet. Die Gruppe von Dr. Sabine Windhorst konnte in gestressten Zellen in der Tat sowohl eine verstärkte IP₅-2K-Expression als auch erhöhte InsP₆-Pegel nachweisen (unveröffentlichte Daten). Der Mechanismus, nach dem InsP₆ Apoptose inhibierend wirkt, konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

Für die IP₅-2K lässt sich aber postulieren, dass sie ein Enzym ist, das durch mehrere seiner Funktionen, nämlich Produktion von InsP₆ und, zusammen mit anderen Proteinen, Transport und Translationsinhibierung von mRNAs Apoptose induzierender Proteine, gewisse Apoptosewege inhibiert. Der Zelle wird damit die Möglichkeit gegeben spezifische Arten oxidativen Stresses zu bewältigen, während die Option auf Apoptose erhalten bleibt.

Durch diese Theorie lässt sich auch erklären, warum in der Abwesenheit von IP₅-2K die Anfälligkeit gegenüber Apoptose erhöht ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der IP₅-2K durch siRNA herunterreguliert. Nach zwei Tagen transientser Expression der siRNA waren noch einige Zellen mit stark verminderter IP₅-2K-Konzentration zu detektieren, die in der TIAR-Färbung aber niemals SG aufwiesen. Bereits nach drei Tagen Expressionszeit konnten keine Zellen ohne IP₅-2K mehr nachgewiesen werden, d.h. dass der Verlust der IP₅-2K zum Zelltod führte. Wahrscheinlich können ohne IP₅-2K keine SG gebildet werden. Dies führt dazu, dass der Stressabbau erheblich erschwert wird, wodurch die Zellen vermutlich verstärkter und schnellerer Apoptoseinduktion erliegen. Dass die IP₅-2K lebensnotwendige

Funktionen erfüllt, wird zudem beim knock-out dieser Kinase deutlich, denn die IP₅-2K-K.O.-Mäuse sind am Tag 8,5 embryonal letal (Verbsky et al. 2005a).

Die Lokalisation der IP₅-2K an weiten Bereichen des Euchromatins spricht dafür, dass die Kinase noch weitere Aufgaben an vielen Genen und Transkripten erfüllt als die eben beschriebenen, denn bei einer alleinigen Interaktion mit den Genen von Fas und TNF α müsste eine konzentriertere Anlagerung der Kinase an distinkte Genbereiche zu beobachten sein, anstelle einer nahezu vollständigen granulösen Färbung von Euchromatin. TIAR bindet ebenfalls nicht nur an wenige bestimmte Gene, wie die von TNF α und Fas, sondern allgemein an U-reiche Sequenzen. In nicht gestressten Zellen könnte die IP₅-2K deshalb möglicherweise die SG-unabhängigen Aktivitäten von TIAR begleiten und z.B. die mRNAs exportieren, an deren Prozessierung TIAR beteiligt ist.

Für solche mit mRNA assoziierten Funktionen der IP₅-2K sprechen alle hier dargelegten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit: Das nukleozytoplasmatische Pendeln der IP₅-2K, ihre Colokalisation mit mRNA im Kern, an Kernporen und im Zytoplasma, die gezeigte Interaktion der IP₅-2K mit dem mRNA-Bindeprotein TIAR, die Beteiligung an Stressgranulabildung unter Colokalisation mit PABP, zytosolischer mRNA und TIAR sowie die gute Modellierbarkeit ihrer Tertiärstruktur anhand der Struktur des mRNA-Exportproteins TAP.

Die Klärung der molekularen Zusammenhänge all dieser Befunde und die detaillierte Charakterisierung ihrer physiologischen Relevanz wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

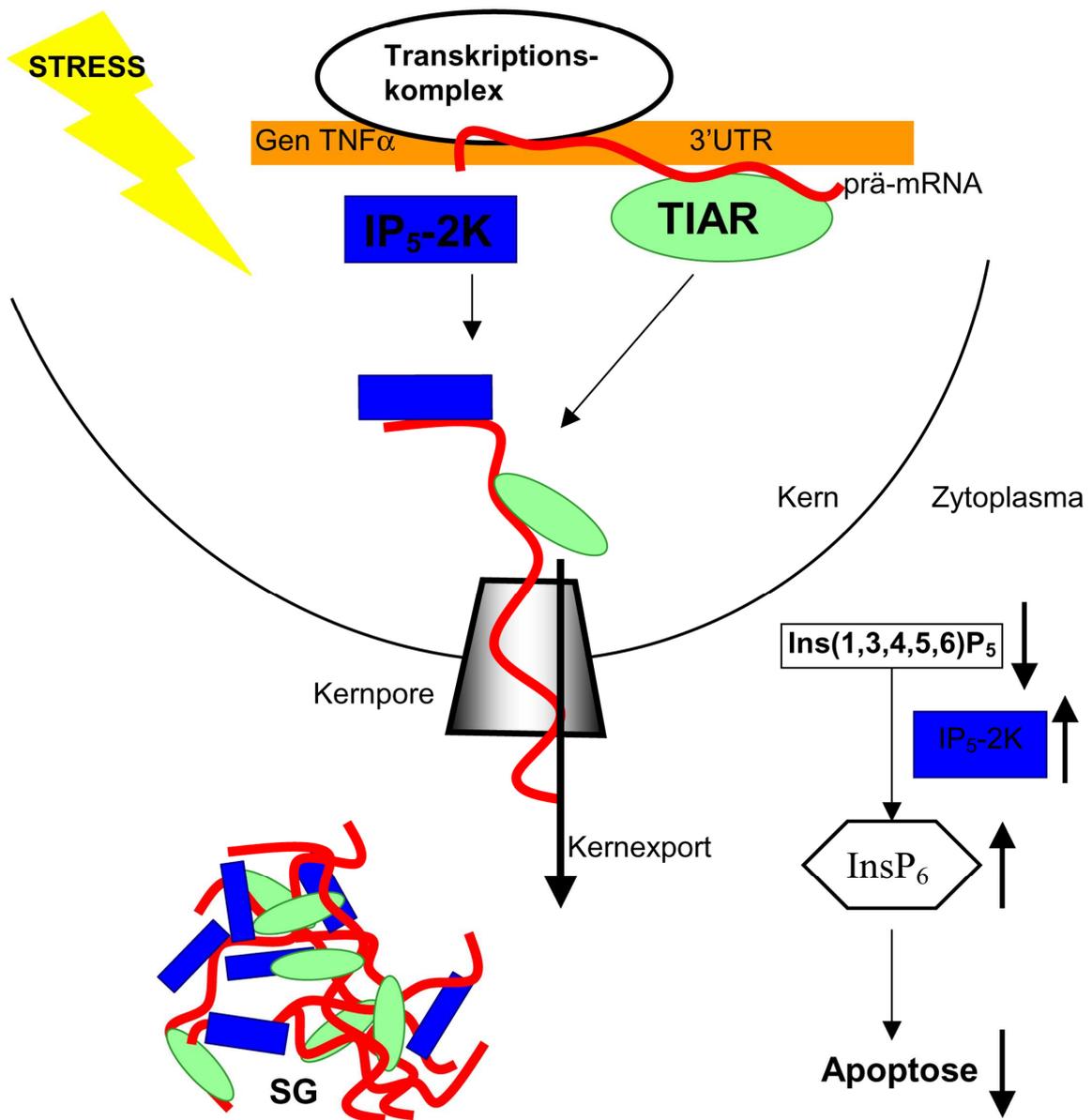


Abbildung 53: Theorie zur Funktion der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase in Stressbewältigung und Apoptoseinhibierung.

In gestressten Zellen könnte die IP₅-2K zusammen mit TIAR an der Transkription und Prozessierung der TNF α - und Fas-mRNA beteiligt sein. Unklar bleibt, ob die IP₅-2K dabei an TIAR, DNA oder mRNA gebunden vorliegt. Anschließend könnten die mRNAs zusammen mit TIAR unter Beteiligung der IP₅-2K, und wahrscheinlich weiterer Proteine aus dem Kern exportiert werden. Im Zytoplasma findet dann der Translationsarrest in Stressgranula statt. Gleichzeitig wird die Expression der IP₅-2K erhöht, wodurch es zu einer Verringerung der InsP₅-Konzentration unter Anstieg des InsP₆-Pegels kommt. Dadurch wird die Apoptose inhibiert und der Zelle wird die Möglichkeit gegeben sich vom Stress zu erholen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von Zielsteuerungen und damit zusammenhängender Funktionen zweier wichtiger Enzyme im Inositolphosphatmetabolismus. Die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B ist ein Schlüsselenzym in der Regulation von Kalziumsignalen, indem es den sekundären Botenstoff $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ einer Metabolisierung zu höherphosphorylierten InsPs zuführt. Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase ist ebenfalls ein Inositolphosphat umsetzendes Enzym, über dessen Funktionen, neben der Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ zu InsP_6 , zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt war.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Aktinbindungsdomäne der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B vollständig zu charakterisieren. Es konnte belegt werden, dass die von Dr. Isabell Schreiber 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. Die Aktinbindungsdomäne ist die einzige funktionale F-Aktinzielsteuerungsdomäne in der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B, ihre Bindung an F-Aktin ist reversibel, benötigt keine weiteren unterstützenden Proteine und ist abhängig von der korrekten Sekundärstruktur zweier prädizierter α -Helices. Innerhalb der Aktinbindungsdomäne konnte außerdem ein aktives kanonisches monopartites Kernlokalisierungssignal identifiziert werden, das an Aminosäureposition 128 beginnt. Diese duale Zielsteuerungsdomäne besitzt damit die interessante Eigenschaft einer alternativen Zielsteuerung zwischen F-Aktin und Kern.

Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase konnte erstmals als ein hochaktives eukaryotisch exprimiertes Enzym angereichert und auf seine Substratspezifität hin untersucht werden. Als Hauptaktivität bestätigte sich die bereits bekannte Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ zu InsP_6 mit einer spezifischen Aktivität von $0,5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Zusätzlich wurde die Umsetzung von $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ zu $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ mit niedrigerer Aktivität von ca. $0,02 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ nachgewiesen. Eine Überexpression der Kinase in COS7-Zellen rief neben dem erwarteten Anstieg der InsP_6 - und einem Abfall der $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -Konzentration eine Erniedrigung des $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ - sowie eine Erhöhung des $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ -Pegels hervor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem die intrazelluläre Lokalisation der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase umfassend charakterisiert. Die Kinase weist sowohl zytosolische als auch nukleäre Lokalisation unter Colokalisation mit Euchromatin und

nukleärer neusynthetisierter mRNA auf. Für einen dynamischen Wechsel zwischen diesen Lokalisationen sind Zielsteuerungsdomänen notwendig, die das hier beschriebene nukleozytoplasmatische Pendeln der Kinase vermitteln. Sowohl das basische nicht-kanonische Kernlokalisierungssignal, dessen Aktivität von der Funktionalität eines putativen Zink bindenden Motivs abhängt, als auch ein Exportin unabhängiges Kernexportsignal konnten beschrieben werden. Außerdem wurde durch die Colokalisation mit zytosolischen mRNA-Akkumulationen und den mRNA-Bindeproteinen PABP und TIAR erstmals die Beteiligung der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase an Stressgranula nachgewiesen. Anscheinend ist die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase zusammen mit dem mRNA-Bindeprotein TIAR an der Produktion, der Prozessierung, dem Kernexport und dem Translationsarrest von bestimmten mRNAs in Stressgranula beteiligt. Außerdem konnte TIAR als ein Bindungspartner der IP₅-2K identifiziert werden, dessen Kernimport nach Herunterregulation der Kinase blockiert ist.

Die physiologische Relevanz dieser neu identifizierten Funktionen der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase liegt möglicherweise im Schutz vor Apoptose. In gestressten Zellen könnte die Kinase an der Lagerung bestimmter mRNAs in Stressgranula beteiligt sein, deren Translation zur Einleitung von Apoptose führen würde. Gleichzeitig erfolgt vermutlich die Apoptoseinhibierung durch Erhöhung der InsP₆-Konzentration durch die Kinaseaktivität der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase. Auf diese Weise könnte den Zellen die Gelegenheit gegeben werden den Stress unter Erhalt der Option auf Apoptose zu bewältigen.

6 Summary

In this work localization and the functions of two essential human enzymes of the inositol phosphate metabolism were characterized. Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoform B is a key player in regulation of Ca^{2+} -signalling starting phosphorylation of the second messenger $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ to higher phosphorylated inositol phosphates. Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase is also an inositol phosphate metabolising enzyme. This work describes novel functions of this enzyme in addition to its phosphorylation of $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ to InsP_6 .

Actin Binding Domain of Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoform B was characterized. It is shown that the ABD from rat (aa 108-170), first described by Dr. Isabell Schreiber, is also in the human enzyme (aa 103-165) and is essential for binding of the kinase to F-actin. The ABD investigated here is the only Actin Binding Domain in the full-length enzyme. Its binding to F-actin is reversible and no other proteins are needed. Binding requires the correct folding of the two predicted α -helices in the ABD. Interestingly, the ABD contains an active classical monopartite Nuclear Localization Signal beginning at aa 128.

The Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase was for the first time expressed in a mammalian expression system and then enriched as a highly active protein and its substrate specificity was investigated. The phosphorylation of $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ to InsP_6 was confirmed as the main activity of the kinase. The enzyme showed a high specific activity of 0.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Additionally the conversion of $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ to $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ with lower specific activity of 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ was identified. Furthermore, overexpression of Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase in COS7 cells led to the expected loss of $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ and an increase in InsP_6 concentration. Unexpectedly the amount of $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ was also increased, whereas $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ concentration was decreased.

The intracellular localization of Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase was fully described for the first time in this work, and a novel function of IPKs was identified. IP_5 -2K was found to co-localize with mRNA. Furthermore, Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase was identified as a component of stress granules by its co-localization with cytosolic mRNA accumulations and the mRNA binding proteins PAPB and TIAR.

The RNA associated functions of Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase necessitate targeting domains mediating nuclear import as well as nuclear export of the protein. Here the nuclear localization sequence as well as the nuclear export signal of Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase were identified.

Knock-down of Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase by siRNA led to a modified nuclear morphology and nuclear import of TIAR was inhibited. Together with TIAR, Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase seems to be involved in production, processing, nuclear export and translational arrest of mRNA.

To explain the physiological relevance of these novel functions the following thesis is suggested: In cells exposed to stress Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase, together with other proteins, might regulate the delay of apoptosis by the storage of special mRNAs (e.g. TNF α and Fas) in stress granules where translation is inhibited. At the same time, the kinase activity of Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase increases InsP₆ levels, thus inhibiting apoptosis. This provides the stressed cell time to either recover from stress or induce cell-death by apoptosis.

7 Literaturverzeichnis

- Abdullah, M., P. J. Hughes, A. Craxton, R. Gigg, T. Desai, J. F. Marecek, G. D. Prestwich, and S. B. Shears. 1992. Purification and characterization of inositol-1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase from rat liver using an inositol hexakisphosphate affinity column. *J Biol Chem* 267: 22340-5.
- Agranoff, B. W. 1978. Cyclitol confusion. *Trends Biochem Sci* 3: N283-N285.
- Allen, T. D., J. M. Cronshaw, S. Bagley, E. Kiseleva, and M. W. Goldberg. 2000. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 113 (Pt 10): 1651-9.
- Arrigo, A. P. 1983. Acetylation and methylation patterns of core histones are modified after heat or arsenite treatment of Drosophila tissue culture cells. *Nucleic Acids Res* 11: 1389-404.
- Arrigo, A.P.. 2005. [Heat shock proteins as molecular chaperones]. *Med Sci (Paris)* 21: 619-25.
- Bachi, A., I. C. Braun, J. P. Rodrigues, N. Pante, K. Ribbeck, C. von Kobbe, U. Kutay, M. Wilm, D. Gorlich, M. Carmo-Fonseca, and E. Izaurralde. 2000. The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *Rna* 6: 136-58.
- Balla, T., S. S. Sim, A. J. Baukal, S. G. Rhee, and K. J. Catt. 1994. Inositol polyphosphates are not increased by overexpression of Ins(1,4,5)P3 3-kinase but show cell-cycle dependent changes in growth factor-stimulated fibroblasts. *Mol Biol Cell* 5: 17-27.
- Barker, C. J., and P. O. Berggren. 1999. Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus-secretion coupling. *Anticancer Res* 19: 3737-41.
- Barker, C. J., J. Wright, P. J. Hughes, C. J. Kirk, and R. H. Michell. 2004. Complex changes in cellular inositol phosphate complement accompany transit through the cell cycle. *Biochem J* 380: 465-73.
- Bashirullah, A., R. L. Cooperstock, and H. D. Lipshitz. 1998. RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 67: 335-94.
- Bayliss, R., T. Littlewood, L. A. Strawn, S. R. Wentz, and M. Stewart. 2002. GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta. *J Biol Chem* 277: 50597-606.
- Bercy, J., E. Dubois, and F. Messenguy. 1987. Regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of the three ARGR regulatory genes and cellular localization of their products. *Gene* 55: 277-85.
- 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., and J. W. Putney, Jr. 1996. Effect of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate on inositol trisphosphate-activated Ca²⁺ signaling in mouse lacrimal acinar cells. *J Biol Chem* 271: 6766-70.
- Bogerd, H. P., R. A. Fridell, R. E. Benson, J. Hua, and B. R. Cullen. 1996. Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear

- export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* 16: 4207-14.
- Bootman, M. D. 1996. Hormone-evoked subcellular Ca²⁺ signals in HeLa cells. *Cell Calcium* 20: 97-104.
- Bootman, M. D., and M. J. Berridge. 1996. Subcellular Ca²⁺ signals underlying waves and graded responses in HeLa cells. *Curr Biol* 6: 855-65.
- Bottomley, M. J., K. Salim, and G. Panayotou. 1998. Phospholipid-binding protein domains. *Biochim Biophys Acta* 1436: 165-83.
- Braun, I. C., A. Herold, M. Rode, and E. Izaurralde. 2002. Nuclear export of mRNA by TAP/NXF1 requires two nucleoporin-binding sites but not p15. *Mol Cell Biol* 22: 5405-18.
- Breeuwer, M., and D. S. Goldfarb. 1990. Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell* 60: 999-1008.
- 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 (IP3K-B). *Biochem J* 382: 353-62.
- Bullock, W. O., Fernandez, J.M., Short, J.M. 1987. XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-379.
- Byrum, J., S. Jordan, S. T. Safrany, and W. Rodgers. 2004. Visualization of inositol phosphate-dependent mobility of Ku: depletion of the DNA-PK cofactor InsP₆ inhibits Ku mobility. *Nucleic Acids Res* 32: 2776-84.
- Caras, I. W., G. N. Weddell, and S. R. Williams. 1989. Analysis of the signal for attachment of a glycopospholipid membrane anchor. *J Cell Biol* 108: 1387-96.
- Chang, S. C., and P. W. Majerus. 2006. Inositol polyphosphate multikinase regulates inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 209-16.
- 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.
- Christophe, D., C. Christophe-Hobertus, and B. Pichon. 2000. Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell Signal* 12: 337-41.
- 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.
- Coburn, G. A., H. L. Wiegand, Y. Kang, D. N. Ho, M. M. Georgiadis, and B. R. Cullen. 2001. Using viral species specificity to define a critical protein/RNA interaction surface. *Genes Dev* 15: 1194-205.
- Conti, E., and J. Kuriyan. 2000. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure Fold Des* 8: 329-38.
- Conti, E., M. Uy, L. Leighton, G. Blobel, and J. Kuriyan. 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94: 193-204.
- Cowan, C. R., P. M. Carlton, and W. Z. Cande. 2002. Reorganization and polarization of the meiotic bouquet-stage cell can be uncoupled from telomere clustering. *J Cell Sci* 115: 3757-3766.
- Crawford, E. K., J. E. Ensor, I. Kalvakolanu, and J. D. Hasday. 1997. The role of 3' poly(A) tail metabolism in tumor necrosis factor-alpha regulation. *J Biol Chem* 272: 21120-7.
- Cullen, B. R. 2003. Nuclear RNA export. *J Cell Sci* 116: 587-97.
- Cullen, P. J. 1998. Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling. *Biochim Biophys Acta* 1436: 35-47.

- 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. *376*: 527-530.
- 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. Universität Hamburg.
- Detmers, P., A. Weber, M. Elzinga, and R. E. Stephens. 1981. 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole actin as a probe for actin polymerization. *J Biol Chem* 256: 99-105.
- 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., 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.
- Dominguez, R. 2004. Actin-binding proteins--a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci* 29: 572-8.
- 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.
- Dubois, E., and F. Messenguy. 1994. Pleiotropic function of ArgRII_p (Arg82_p), one of the regulators of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Role in expression of cell-type-specific genes. *Mol Gen Genet* 243: 315-24.
- Eggleton, P. 1999. Effect of IP₆ on human neutrophil cytokine production and cell morphology. *Anticancer Res* 19: 3711-5.
- Englmeier, L., J. C. Olivo, and I. W. Mattaj. 1999. Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol* 9: 30-41.
- Fan, X. C., and J. A. Steitz. 1998. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15293-8.
- Ferry, S., M. Matsuda, H. Yoshida, and M. Hirata. 2002. Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFkappaB-mediated cell survival pathway. *Carcinogenesis* 23: 2031-41.
- FIZ. 2004. Fachinformationszentrum Chemie Berlin, <http://www.vs-c.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/dna.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/nukleinsauren/dna-strukturen/chromatin/chromatin.vscml.html>.
- Fontao, L., D. Geerts, I. Kuikman, J. Koster, D. Kramer, and A. Sonnenberg. 2001. The interaction of plectin with actin: evidence for cross-linking of actin filaments by dimerization of the actin-binding domain of plectin. *J Cell Sci* 114: 2065-76.
- Fontes, M. R., T. Teh, D. Jans, R. I. Brinkworth, and B. Kobe. 2003. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. *J Biol Chem* 278: 27981-7.
- Fontes, M. R., T. Teh, and B. Kobe. 2000. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol* 297: 1183-94.
- Fujii, M., and J. D. York. 2005. A Role for Rat Inositol Polyphosphate Kinases rIPK2 and rIPK1 in Inositol Pentakisphosphate and Inositol Hexakisphosphate Production in Rat-1 Cells. *J. Biol. Chem.* 280: 1156-1164.
- Fukuda, M., and K. Mikoshiba. 1996. Structure-function relationships of the mouse Gap1m. Determination of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding domain. *J Biol Chem* 271: 18838-42.

- Gilks, N., N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin, L. M. Dember, and P. Anderson. 2004. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* 15: 5383-98.
- Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23: 175-82.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-7.
- Goode, B. L., A. A. Rodal, G. Barnes, and D. G. Drubin. 2001. Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J Cell Biol* 153: 627-34.
- Gorlich, D., M. Dabrowski, F. R. Bischoff, U. Kutay, P. Bork, E. Hartmann, S. Prehn, and E. Izaurralde. 1997. A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol* 138: 65-80.
- Gorlich, D., and U. Kutay. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 607-60.
- Grant, R. P., E. Hurt, D. Neuhaus, and M. Stewart. 2002. Structure of the C-terminal FG-nucleoporin binding domain of Tap/NXF1. 9: 247-251.
- Guse, A. H., A. Goldwisch, K. Weber, and G. W. Mayr. 1995. Non-radioactive, isomer-specific inositol phosphate mass determinations: high-performance liquid chromatography-micro-metal-dye detection strongly improves speed and sensitivity of analyses from cells and micro-enzyme assays. *J Chromatogr B Biomed Appl* 672: 189-98.
- Hanakahi, L. A., and S. C. West. 2002. Specific interaction of IP6 with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK
10.1093/emboj/21.8.2038. *EMBO J*. 21: 2038-2044.
- Hanck, T., R. Stricker, U. M. Krishna, J. R. Falck, Y. T. Chang, S. K. Chung, and G. Reiser. 1999. Recombinant p42IP4, a brain-specific 42-kDa high-affinity Ins(1,3,4,5)P4 receptor protein, specifically interacts with lipid membranes containing Ptd-Ins(3,4,5)P3. *Eur J Biochem* 261: 577-84.
- Higgs, H. N., L. Blanchoin, and T. D. Pollard. 1999. Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* 38: 15212-22.
- Ho, D. N., G. A. Coburn, Y. Kang, B. R. Cullen, and M. M. Georgiadis. 2002. The crystal structure and mutational analysis of a novel RNA-binding domain found in the human Tap nuclear mRNA export factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1888-93.
- Hodge, C. A., H. V. Colot, P. Stafford, and C. N. Cole. 1999. Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *Embo J* 18: 5778-88.
- Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. 347: 44-49.
- Horn, S., E. Endl, B. Fehse, M. M. Weck, G. W. Mayr, and M. Jucker. 2004. Restoration of SHIP activity in a human leukemia cell line downregulates constitutively activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3beta signaling and leads to an increased transit time through the G1 phase of the cell cycle. *Leukemia* 18: 1839-49.
- Hoy, M., P.-O. Berggren, and J. Gromada. 2003. Involvement of Protein Kinase C- ϵ in Inositol Hexakisphosphate-induced Exocytosis in Mouse Pancreatic β -Cells. *J. Biol. Chem.* 278: 35168-35171.
- 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.
- Izaurralde, E., and S. Adam. 1998. Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Rna* 4: 351-64.

- Jakel, S., and D. Gorlich. 1998. Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *Embo J* 17: 4491-502.
- Jarmolowski, A., W. C. Boelens, E. Izaurralde, and I. W. Mattaj. 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J Cell Biol* 124: 627-35.
- Jin, L., B. W. Guzik, Y. C. Bor, D. Rekosh, and M. L. Hammarskjold. 2003. Tap and NXT promote translation of unspliced mRNA. *Genes Dev* 17: 3075-86.
- 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.
- Kang, Y., and B. R. Cullen. 1999. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev* 13: 1126-39.
- Katahira, J., K. Straesser, T. Saiwaki, Y. Yoneda, and E. Hurt. 2002. Complex formation between Tap and p15 affects binding to FG-repeat nucleoporins and nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem* 277: 9242-6.
- Katahira, J., K. Strasser, A. Podtelejnikov, M. Mann, J. U. Jung, and E. Hurt. 1999. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *Embo J* 18: 2593-609.
- Kedersha, N., and P. Anderson. 2002. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30: 963-9.
- Kedersha, N., M. R. Cho, W. Li, P. W. Yacono, S. Chen, N. Gilks, D. E. Golan, and P. Anderson. 2000. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* 151: 1257-68.
- Kedersha, N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 147: 1431-42.
- Kendirgi, F., D. M. Barry, E. R. Griffis, M. A. Powers, and S. R. Wentz. 2003. An essential role for hGle1 nucleocytoplasmic shuttling in mRNA export. *J Cell Biol* 160: 1029-40.
- Kitten, G. T., and E. A. Nigg. 1991. The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol* 113: 13-23.
- Kobe, B. 1999. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol* 6: 388-97.
- 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.
- la Cour, T., L. Kiemer, A. Molgaard, R. Gupta, K. Skriver, and S. Brunak. 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17: 527-36.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lai, M. C., and W. Y. Tarn. 2004. Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J Biol Chem* 279: 31745-9.
- Lappalainen, P., M. M. Kessels, M. J. Cope, and D. G. Drubin. 1998. The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell* 9: 1951-9.
- Larsson, O., C. J. Barker, A. Sjöholm, H. Carlqvist, R. H. Mitchell, A. Bertorello, T. Nilsson, R. E. Honkanen, G. W. Mayr, J. Zwiller, and P. O. Berggren. 1997. Inhibition of phosphatases and increased Ca²⁺ channel activity by inositol hexakisphosphate. *Science* 278: 471-4.

- Leslie, D. M., W. Zhang, B. L. Timney, B. T. Chait, M. P. Rout, R. W. Wozniak, and J. D. Aitchison. 2004. Characterization of karyopherin cargoes reveals unique mechanisms of Kap121p-mediated nuclear import. *Mol Cell Biol* 24: 8487-503.
- 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.
- Lu, Y. J., Y. He, and S. F. Sui. 2002. Inositol hexakisphosphate (InsP₆) can weaken the Ca(2+)-dependent membrane binding of C2AB domain of synaptotagmin I. *FEBS Lett* 527: 22-6.
- Luther, C. 1995. Einfluß von Inositolhexakisphosphat auf Kernsubstrukturen. *Fakultät für Biologie*. Ruhr-Universität Bochum, Bochum.
- Ma, Y., and M. R. Lieber. 2002. Binding of Inositol Hexakisphosphate (IP₆) to Ku but Not to DNA-PKcs
10.1074/jbc.C200030200. *J. Biol. Chem.* 277: 10756-10759.
- Macbeth, M. R., H. L. Schubert, A. P. Vandemark, A. T. Lingam, C. P. Hill, and B. L. Bass. 2005. Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science* 309: 1534-9.
- Majerus, P. W., M. V. Kisseleva, and F. A. Norris. 1999. The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J Biol Chem* 274: 10669-72.
- Makkerh, J. P., C. Dingwall, and R. A. Laskey. 1996. Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol* 6: 1025-7.
- Maniatis, T., and R. Reed. 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416: 499-506.
- Marcus, F. 1985. Preferential cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in dilute acid. *Int J Pept Protein Res* 25: 542-6.
- Martelli, A. M., F. Fala, I. Faenza, A. M. Billi, A. Cappellini, L. Manzoli, and L. Cocco. 2004. Metabolism and signaling activities of nuclear lipids. *Cell Mol Life Sci* 61: 1143-56.
- Marti-Renom, M. A., A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo, and A. Sali. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 291-325.
- Mayr, G. W. 1988. A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens. *Biochem J* 254: 585-91.
- Mayr, G. W.. 1990. Mass determination of inositol phosphates by high-performance-liquid-chromatography with postcolumn complexometry (metal-dye-detection). *Methods in Inositide Research*: 83-108.
- McCann, R. O., and S. W. Craig. 1999. Functional genomic analysis reveals the utility of the I/LWEQ module as a predictor of protein:actin interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 135-40.
- McKendrick, L., E. Thompson, J. Ferreira, S. J. Morley, and J. D. Lewis. 2001. Interaction of eukaryotic translation initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m(7) guanosine cap. *Mol Cell Biol* 21: 3632-41.
- Michael, W. M., M. Choi, and G. Dreyfuss. 1995. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83: 415-22.

- Michael, W. M., P. S. Eder, and G. Dreyfuss. 1997. The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *Embo J* 16: 3587-98.
- 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. L., M. Suntharalingam, S. L. Johnson, A. Audhya, S. D. Emr, and S. R. Wenthe. 2004. Cytoplasmic Inositol Hexakisphosphate Production Is Sufficient for Mediating the Gle1-mRNA Export Pathway. *J. Biol. Chem.* 279: 51022-51032.
- Mizutani, A., M. Fukuda, M. Niinobe, and K. Mikoshiba. 1997. Regulation of AP-2-synaptotagmin interaction by inositol high polyphosphates. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 128-31.
- Mo, Y. Y., C. Wang, and W. T. Beck. 2000. A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 275: 41107-13.
- Mohr, E., and D. Richter. 2004. Subcellular vasopressin mRNA trafficking and local translation in dendrites. *J Neuroendocrinol* 16: 333-9.
- Morimoto, R. I. 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409-10.
- Morrison, B. H., J. A. Bauer, J. Hu, R. W. Grane, A. M. Ozdemir, M. Chawla-Sarkar, B. Gong, A. Almasan, D. V. Kalvakolanu, and D. J. Lindner. 2002. Inositol hexakisphosphate kinase 2 sensitizes ovarian carcinoma cells to multiple cancer therapeutics. *Oncogene* 21: 1882-9.
- Morrison, B. H., J. A. Bauer, D. V. Kalvakolanu, and D. J. Lindner. 2001. Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon-beta in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 276: 24965-70.
- Mosammaparast, N., C. S. Ewart, and L. F. Pemberton. 2002. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *Embo J* 21: 6527-38.
- Mosammaparast, N., K. R. Jackson, Y. Guo, C. J. Brame, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and L. F. Pemberton. 2001. Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J Cell Biol* 153: 251-62.
- Muhlhauser, P., E. C. Muller, A. Otto, and U. Kutay. 2001. Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep* 2: 690-6.
- Nagata, E., H. R. Luo, A. Saiardi, B. I. Bae, N. Suzuki, and S. H. Snyder. 2005. Inositol hexakisphosphate kinase-2, a physiologic mediator of cell death. *J Biol Chem* 280: 1634-40.
- Nakielny, S., and G. Dreyfuss. 1996. The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *J. Cell Biol.* 134: 1365-1373.
- Nakielny, S., and G. Dreyfuss . 1999. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99: 677-90.
- 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.
- 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.
- Nathans, D. 1964. Puromycin Inhibition of Protein Synthesis: Incorporation of Puromycin into Peptide Chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 585-92.

- Norris, F. A., E. Ungewickell, and P. W. Majerus. 1995. Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro. *J Biol Chem* 270: 214-7.
- Nover, L., K. D. Scharf, and D. Neumann. 1983. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol Cell Biol* 3: 1648-55.
- Nover, L., K. D. Scharf, and D. Neumann . 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol* 9: 1298-308.
- Odom, A. R., A. Stahlberg, S. R. Wenthe, and J. D. York. 2000. A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* 287: 2026-9.
- Ohno, M., M. Fornerod, and I. W. Mattaj. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* 92: 327-36.
- Ohno, M., A. Segref, A. Bachi, M. Wilm, and I. W. Mattaj. 2000. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101: 187-98.
- Ongusaha, P. P., P. J. Hughes, J. Davey, and R. H. Michell. 1998. Inositol hexakisphosphate in *Schizosaccharomyces pombe*: synthesis from Ins(1,4,5)P₃ and osmotic regulation. *Biochem J* 335 (Pt 3): 671-9.
- Ongusaha, P. P., P. J. Hughes, M. Hirata, J. Davey, and R. H. Michell. 1997. The inositol 1,4,5-trisphosphate 6-kinase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans* 25: 105S.
- Ornstein, L. 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 121: 321-49.
- 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.
- Paunola, E., P. K. Mattila, and P. Lappalainen. 2002. WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett* 513: 92-7.
- Pederson, T., and U. Aebi. 2005. Nuclear Actin Extends, with No Contraction in Sight. *Mol. Biol. Cell* 16: 5055-5060.
- Pemberton, L. F., and B. M. Paschal. 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6: 187-98.
- Phillips, P. A., J. A. McCarroll, S. Park, M.-J. Wu, R. Pirola, M. Korsten, J. S. Wilson, and M. V. Apte. 2003. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover 10.1136/gut.52.2.275. *Gut* 52: 275-282.
- Pollard, V. W., W. M. Michael, S. Nakielny, M. C. Siomi, F. Wang, and G. Dreyfuss. 1996. A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* 86: 985-94.
- Pouillon, V., R. Hascakova-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.
- Preker, P. J., K. S. Kim, and C. Guthrie. 2002. Expression of the essential mRNA export factor Yra1p is autoregulated by a splicing-dependent mechanism. *Rna* 8: 969-80.
- Rando, O. J., T. H. Chi, and G. R. Crabtree. 2003. Second messenger control of chromatin remodeling. *Nat Struct Biol* 10: 81-3.
- Rebane, A., A. Aab, and J. A. Steitz. 2004. Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *Rna* 10: 590-9.
- Rechsteiner, M., and S. W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-71.

- Rees, M. K., and M. Young. 1967. Studies on the isolation and molecular properties of homogeneous globular actin. Evidence for a single polypeptide chain structure. *J Biol Chem* 242: 4449-58.
- Richmond, T. J. 2006. <http://www.mol.biol.ethz.ch/groups/richmond>. *Eidgenössische Technische Hochschule Zürich*.
- Rout, M. P., J. D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B. T. Chait. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 148: 635-51.
- Rout, M. P., G. Blobel, and J. D. Aitchison. 1997. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 89: 715-25.
- Ryan, K. J., and S. R. Wentz. 2000. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 12: 361-71.
- SAFER. WORLD 2005. <http://www.safer-world.org/d/themen/emf/protein.htm>.
- 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., J. J. Caffrey, S. H. Snyder, and S. B. Shears. 2000. The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J Biol Chem* 275: 24686-92.
- Saiardi, A., H. Erdjument-Bromage, A. M. Snowman, P. Tempst, and S. H. Snyder. 1999. Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases. *Curr Biol* 9: 1323-6.
- Saiardi, A., E. Nagata, H. R. Luo, A. Sawa, X. Luo, A. M. Snowman, and S. H. Snyder. 2001a. Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2306-11.
- Saiardi, A., E. Nagata, H. R. Luo, A. M. Snowman, and S. H. Snyder. 2001b. Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase. *J Biol Chem* 276: 39179-85.
- 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 U S A* 102: 1911-4.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
- Sarmah, B., A. J. Latimer, B. Appel, and S. R. Wentz. 2005. Inositol polyphosphates regulate zebrafish left-right asymmetry. *Dev Cell* 9: 133-45.
- 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.
- Schenk, T. 2004. Charakterisierung der nukleären Lokalisation von humaner Inositol-(1,3,4,5,6)-pentakisphosphat 2-Kinase (HsInsP5-2K). Universität Hamburg.
- Schreiber, I. 2002. Regulation und subzelluläre Verteilung der Isoform B von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase aus *Rattus norvegicus* (BERKENHOUT, 1769). *Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion*. Universität Hamburg, Hamburg.
- Seeds, A. M., J. C. Sandquist, E. P. Spana, and J. D. York. 2004. A molecular basis for inositol polyphosphate synthesis in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 279: 47222-32.
- Segel, I. H. 1975. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems. *Enzyme Kinetics*: 18-99.

- Senger, B., G. Simos, F. R. Bischoff, A. Podtelejnikov, M. Mann, and E. Hurt. 1998. Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *Embo J* 17: 2196-207.
- Shears, S. B. 1989. The pathway of myo-inositol 1,3,4-trisphosphate phosphorylation in liver. Identification of myo-inositol 1,3,4-trisphosphate 6-kinase, myo-inositol 1,3,4-trisphosphate 5-kinase, and myo-inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate 5-kinase. *J Biol Chem* 264: 19879-86.
- Shears, S. B. 1998. The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochim Biophys Acta* 1436: 49-67.
- Shears, S. B. 2004. How versatile are inositol phosphate kinases? *Biochem J* 377: 265-80.
- Shears, S. B. 2005. Telomere maintenance by intracellular signals: new kid on the block? *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1811-2.
- Shen, X., H. Xiao, R. Ranallo, W. H. Wu, and C. Wu. 2003. Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science* 299: 112-4.
- Singh, R. P., C. Agarwal, and R. Agarwal. 2003. Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces G1 arrest and apoptotic death of prostate carcinoma DU145 cells: modulation of CDKI-CDK-cyclin and pRb-related protein-E2F complexes. *Carcinogenesis* 24: 555-63.
- 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.
- Steger, D. J., E. S. Haswell, A. L. Miller, S. R. Wentz, and E. K. O'Shea. 2003. Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science* 299: 114-6.
- Steinberg, Z., C. Myers, V. M. Heim, C. A. Lathrop, I. T. Rebutini, J. S. Stewart, M. Larsen, and M. P. Hoffman. 2005. FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis 10.1242/dev.01690. *Development* 132: 1223-1234.
- Strawn, L. A., T. Shen, and S. R. Wentz. 2001. The GLFG regions of Nup116p and Nup100p serve as binding sites for both Kap95p and Mex67p at the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 276: 6445-52.
- Stryer, L. 1999. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Stuart, J. A., K. L. Anderson, P. J. French, C. J. Kirk, and R. H. Michell. 1994. The intracellular distribution of inositol polyphosphates in HL60 promyeloid cells. *Biochem J* 303 (Pt 2): 517-25.
- Stutz, F., and E. Izaurralde. 2003. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol* 13: 319-27.
- Suswam, E. A., Y. Y. Li, H. Mahtani, and P. H. King. 2005. Novel DNA-binding properties of the RNA-binding protein TIAR. *Nucleic Acids Res* 33: 4507-18.
- 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.
- Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, M. Loschi, J. M. Pasquini, J. Correale, S. Kindler, and G. L. Boccaccio. 2005. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* 16: 405-20.

- Thomas, S., B. Brake, J. P. Luzio, K. Stanley, and G. Banting. 1994. Isolation and sequence of a full length cDNA encoding a novel rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochim Biophys Acta* 1220: 219-22.
- Torres, J., S. Dominguez, M. F. Cerda, G. Obal, A. Mederos, R. F. Irvine, A. Diaz, and C. Kremer. 2005. Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions. *J Inorg Biochem* 99: 828-40.
- Truant, R., Y. Kang, and B. R. Cullen. 1999. The human tap nuclear RNA export factor contains a novel transportin-dependent nuclear localization signal that lacks nuclear export signal function. *J Biol Chem* 274: 32167-71.
- 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.
- Vanweyenbergh, 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.
- Verbsky, J., K. Lavine, and P. W. Majerus. 2005a. Disruption of the mouse inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene, associated lethality, and tissue distribution of 2-kinase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8448-53.
- Verbsky, J. W., S.-C. Chang, M. P. Wilson, Y. Mochizuki, and P. W. Majerus. 2005b. The Pathway for the Production of Inositol Hexakisphosphate in Human Cells. *J. Biol. Chem.* 280: 1911-1920.
- Verbsky, J. W., and P. W. Majerus. 2005. Increased levels of inositol hexakisphosphate (InsP₆) protect HEK293 cells from TNF α and Fas induced apoptosis. *J Biol Chem.*
- Verbsky, J. W., M. P. Wilson, M. V. Kisseleva, P. W. Majerus, and S. R. Wentz. 2002. The synthesis of inositol hexakisphosphate. Characterization of human inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase. *J Biol Chem* 277: 31857-62.
- Voglmaier, S. M., J. H. Keen, J. E. Murphy, C. D. Ferris, G. D. Prestwich, S. H. Snyder, and A. B. Theibert. 1992. Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 158-63.
- Wang, C., R. H. Gomer, and E. Lazarides. 1981. Heat shock proteins are methylated in avian and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 3531-5.
- 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.
- Waterborg, J. H. 1999. UMKC.
- Watkins, J. L., R. Murphy, J. L. Emtage, and S. R. Wentz. 1998. The human homologue of Saccharomyces cerevisiae Gle1p is required for poly(A)⁺ RNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6779-84.
- Wegner, A. 1976. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* 108: 139-50.
- WIKIPEDIA. 2005. <http://de.wikipedia.org>.
- 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.
- Yang, J., H. P. Bogerd, P. J. Wang, D. C. Page, and B. R. Cullen. 2001. Two closely related human nuclear export factors utilize entirely distinct export pathways. *Mol Cell* 8: 397-406.
- Ye, W., N. Ali, M. E. Bembenek, S. B. Shears, and E. M. Lafer. 1995. Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3. *J Biol Chem* 270: 1564-8.

- York, J. D., A. R. Odom, R. Murphy, E. B. Ives, and S. R. Wenthe. 1999. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 285: 96-100.
- York, S. J., B. N. Armbruster, P. Greenwell, T. D. Petes, and J. D. York. 2005. Inositol diphosphate signaling regulates telomere length. *J Biol Chem* 280: 4264-9.
- 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.
- Zasloff, M. 1983. tRNA transport from the nucleus in a eukaryotic cell: carrier-mediated translocation process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 6436-40.
- Zhao, J., S. B. Jin, B. Bjorkroth, L. Wieslander, and B. Daneholt. 2002. The mRNA export factor Dbp5 is associated with Balbiani ring mRNP from gene to cytoplasm. *Embo J* 21: 1177-87.
- Zhou, X. 2005. Expressions- und Reinigungsstrategien sowie funktionelle Charakterisierung der menschlichen Inositol(1,3,4,5,6)-pentakisphosphat 2-Kinase (IP5-2K). *Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Zentrum für Experimentelle Medizin Institut für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion*. Technische Universität Hamburg -Harburg, Hamburg.
- 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.
- Zi, X., R. P. Singh, and R. Agarwal. 2000. Impairment of erbB1 receptor and fluid-phase endocytosis and associated mitogenic signaling by inositol hexaphosphate in human prostate carcinoma DU145 cells. *Carcinogenesis* 21: 2225-35.
- Zolotukhin, A. S., W. Tan, J. Bear, S. Smulevitch, and B. K. Felber. 2002. U2AF participates in the binding of TAP (NXF1) to mRNA. *J Biol Chem* 277: 3935-42.

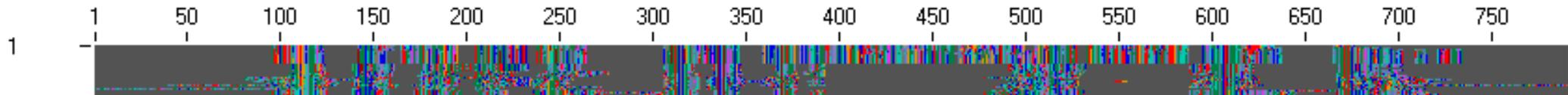
8 Anhang

8.1 Gefahrstoffe

Substanz	Kennzeichnung Gefahrensymbole	Gefahrenhinweise R-Sätze	Sicherheitsratschläge S-Sätze
Acrylamid	T	45-46-E24/25- E48/23/24/25	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38- 42/43	22-24-26-37
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
Diethylether	Xn, F+	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Formaldehyd	T	23/24/25-34- 39/23/24/25-40-43	26-36/37/39-45-51
Kanamycin	T	32/61	22/45/53
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
2-Propanol	F, Xi	11-41-67	7-16-24-26-39
Tetracyclin	Xn	22-40-63	36/37
Triton X-100	Xn	22-41	24-26-39

8.2 Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V



1 CRFCMYQLYKVA-----TGKWKRSRYCPLDLFSG--NKQRMHFAIRQLI--EEPQNNLKIFKGGQCTYSRKDSDSDSL--DLNSLHLHLRPFYFLOANNRYSCHMTNKALLNDFIQVLMNALL--SSE--GREGGPVNDRAHERQSYCDASL--FNKERSRHG-----SQGLPGDSVL
2 CRFCMYQLYKVA-----TGKWKRSRYCPLDLFSG--NKQRMHFAIRQLI--EEPQNNLKIFKGGQCTYSRKDSDSDSL--DLNSLHLHLRPFYFLOANNRYSCHMTNKALLNDFIQVLMNALL--SSH--GGEGGVANDRQAERRNYCDASL--FNRRERSRHG-----SQGLPDSVCL
3 CRFCMHQHYKAT-----NGKWKRLSRYCPLDLFSG--SKQRMVVALKNLL--EEPQNNLKIFKGGELIFSKDDAKQPPDLNLLIQHLRPFYFHTNGLYNGHQPGKVIILNEFIQVICSALL--SGGSDNRSRSGEPRKMHLSEKPHCEASL--FPRDLIRNG-----HHGLPKDSVL
4 CRYCMHQHLKVA-----NGKWKRPSSKYCPVDLFSG--NKQRMHFALKSLL--QEAQNNLKIFKNGELIYGCKDDQECSSDWNELARHLKPPFFPSNGLVSGPHCTRTIVKELIHVITLTL--SSTDACRAGDMKTVPVSQGRSYCEASL--FNKELVRNGKHKLESGLPRGCLL
5 CRFCMHQHLKVA-----KGKWKRSKYCPLDLFSG--NKQRMHFALMNLL--QESQNNLKIFKNGELIYGCRRDQEHFLDINELAHHLKPPFFPASPGLISGPQCPKTVVKELIHILTTVLLNNSDSTARAANIMPFIPLSQGRNYCEASL--FCPDDLN--SKHVTEATGLPKGCIL
6 CRYCMHQHLKVA-----TGKWKRSKYCPLDLFSG--NKQRMHFALRSLL--QETQNNLRIFKNGELIYGCGRDARSPVADLKLALAHHLKPPFFPSNGLASGPHCTKAVIRELVHVI TRVLL--SSSEKARAGALR--LGLQGPVCEASL--FPRSRLHNQKNTSEHSGLPKGCIL
7 CRYCMHQHLKVA-----TGKWKRSKYCPLDLFSG--NKQRMHFALKSLL--QEAQNNLRIFKNGELIYGCGRDARSPVADLKLALAHHLKPPFFPSNGLASGPHCTRAVIRELVHVI TRVLL--SSTDKGRAGALR--LGLQGARVCEASL--FPRSRLHHQKNTPEHSGLPKGCIL
8 CRYCMHQHLKVA-----TGKWKRSKYCPLDLFSG--NKQRMHFALKSLL--QEAQNNLKIFKNGELIYGCGRDARSPVADWSELAHHLKPPFFPSNGLASGPHCTRAVIRELVHVI TRVLL--SGSDKGRAGTLRGLGPGQPRVCEASL--FPRSRLRQCQKNTPERSGLPKGCIL
9 CRYCMHQHLKVA-----TGKWKRSKYCPLDLFSG--NKQRMHFALKSLL--QEAQNNLKIFKNGELIYGCGRDARSPVADWSELAHHLKPPFFPSNGLASGPHCTRAVIRELVHVI TRVLL--SGSDKGRAGTLRGLGPGQPRVCEASL--FPRSRLRQCQKNTPERSGLPKGCIL
10 CRYCMHQHLKVA-----TGKWKRSKYCPLDLFSG--NKQRMHFALKSLL--QEAQNNLRIFKNGELIYGCGRDARSPVADWSELAHHLKPPFFPSNGLASGPHCTRAVIRELVHVI TRVLL--SSTDKGRAGALR--LGLQGARVCEASL--FPRSRLHHQKNTPEHSGLPKGCIL
11 CRNCTHNAFKGRK-----TKYCYNQLL--VN-----PSHLEVVFG-----DCNITYTENFKAAMHEYLHNDNINIF
12 CRNCTHNVFKGRE-----VRYCYNQLL--IN-----PSHLELFTF-----ECKVYPDKFKAAMLNLYLHDDNINVF
13 CRNCTHNAFKGR-----ETKYCYNQLL--MN-----SSHLETMLV-----DYERYPNEFKATILEYLRNANNVF
14 CRNCTHNAFKGRG-----TKYCYNQLL--MN-----PAHLELIFG-----ECNIFPVKFKDAMHEYLHNDNINIF
15 CRNCTHNNLKNRK-----IPYCYALMV--VDP--SHV--SDMLLHTG-----IAFPRKFLIKFVDYFVSKSDNVL
16 CRNCTLNLRLRQTS-----ISYCHAQLL--NPG--QAGPILKSLFAG-----LNVPPAFIEDMEAYIAQPCSVL
17 CRNCTHNSLGRD-----IEYCFHLDE-----LI IETL FAG-----RQVPEEFLDIDLQYLQSSDSIT
18 CRNCARAYRNK-----KGTGDS--ILCPLRF--M--DRAG-----EVSMARVKEFITKGLGISSGSPAATLEKWLRENTLL
19 CRTCALRAMKNHQR-----KQGEKARQ--GFCPLDLV--SDD-----FEHVLR-----AVKSIKGPQHRIRVTKFLHRNPTL
20 CRTCAREALRLHTKPETARKQKQKQSPKETSILCPLNLLAC-----TTSPTALTH-----TAQRARLATWLQNTLL
21 CRTCALRDMKNHDAR-----RVGASEV--SPCPLDLV--SDK-----FEHVLR-----ATKFPVKYKDHTRLAKVIYRNPTL
22 CRQCAMELFNXL RDP-----SPSRHTPEQ--KPCPLTL--NPS-----APPAISSPF-----RFAPKLASKCNDPMVRELLAKTADHQVI
23 CRTCALQLKR-----EKPRICPLKLF--NED-----EQTSLQALEDVFPGTQKQFPELAKFFSNSELF
24 CRTCALSRMRGR-----PVGFCPLQLL--FNN-----WPKFLCCLQGFVSPDIAMRLFQSGIL
25 CRTCSLNQLKRV-----PRHFCPLDLI--YTE-----TIEQGLND-----LFAPIPQDIYAKIEKLIPLKLLTTIYFNPNPNVF
26 CRTCLLNQLRGF-----QRHFCPLDLI--YE-----ETIDQGLD-----DILLIPQDLLIEISETNKIPVKQLFRIFLNNPNNVF
27 CRTCSLNQLKNV-----PRHFCPLDLI--YP-----ETIDQALI-----D--LFKPIPVDILDKIEKLIPLKLFKIYLNENNINVF
28 CRYCRTCSHNLQ-----RGFSR--HFCPLDLI--YD-----QTI DRGID-----DI--LNKVPTSVLKNVKNKCI PVRLLLRIFLSDPSNVF

1 SRILQTMQLDMRD-----IEELYPLYHRVEQHLQDFPKQARLHIEGPNKFELEMLQKCPAEDDGSVEYAA-----KIHQYLITKTAKDCSIMVALVPSDKEEDDEGAAHTAA-----SPGKQDVEVPR-----SLVSLDLDPKPPFSILYSSCAWTSRLSPT
2 SRILQTMQLDMRD-----IEDLYPLYHRVEQHLQDFPKQARLHIEGPNKFELEMLQKCPAEDDGSVEYAA-----KIHQYLITKTAKDCSIMVALVPSDKEEEDGWLKGSRAPFFT-----SLVSLDLDPKPPFSILYSSCAWTSRLSPT
3 AKILQVQMLDMLD-----IEGIYPLYKRVEQYLEEFPEERKIRLQIDGPDYDESFMDTVKSCLNEDDGSVEYAI-----KVHQYR--VAMTAKDCSIMVITFAPC--EEDDEHKLNL--E--KPRFT-----YSVSLDLDTKPYEGIPHQYKLDKIVNYY
4 YKTLQAQMLDMLD-----IEGLYPLYNRVEQYLEEFPEERSTLQIDGPDYDEAFYKLLDLSTEDDGTAFAL-----KVQYR--VAMTAKDCSIMIALSPCLQDCESEQRPVVLAASKTRFT-----FVSVLDDLKPYESIPHQYKLDGKIVNYY
5 YKTLQAQMLDMLD-----IEGLYPLYKRVEQYLEEFPEERGTLLDGPYDETFPEKLDLSEDDGSI SYAA-----KIQYR--VAMTAKDCSIMIALSPVTQEECLDPRSVIRSSKFSI-----HSVSLDDLKPYENIPHQYKLDKIVNYY
6 YKTLQVQMLDQLD-----IEGLYPLYKRVEQYLEEFPEERKTLQIDGPDYDEVFYQKLLDLSTEDDGTAFAL-----KVQYR--VAMTAKDCSIMIALSPCLQGTSSDQRVPVPSRSRLA-----FVSVLDDLKPYESIPHQYKLDKIVNYY
7 YKTLQVQMLDQLD-----IEGLYPLYNRVEQYLEEFPEERKTLQIDGPDYDEVFYQKLLDLSTEDDGTAFAL-----KVQYR--VAMTAKDCSIMIALSPCLRGASSDQRVPVPSRSRLA-----FVSVLDDLKPYESIPHQYKLDKIVSYY
8 YKTLQVQMLDLLD-----IEGLYPLYNRVERYLEEFPEERKTLQIDGPDYDEAFYQKLLDLSTEDDGTAFAL-----KVQYR--VAMTAKDCSIMIALSPCLQDASSDQRVPVPSRSRFA-----FVSVLDDLKPYESIPHQYKLDGKIVNYY
9 YKTLQVQMLDLLD-----IEGLYPLYNRVERYLEEFPEERKTLQIDGPDYDEAFYQKLLDLSTEDDGTAFAL-----KVQYR--VAMTAKDCSIMIALSPCLQDVRSDQRVPVPSRSRFA-----FVSVLDDLKPYESIPHQYKLDGKI INYY
10 YKTLQVQMLDLLD-----IEGLYPLYNRVERYLEEFPEERKTLQIDGPDYDEAFYQKLLDLSTEDDGTAFAL-----KVQYR--VAMTAKDCSIMIALSPCLQDASSDQRVPVPSRSRFA-----FVSVLDDLKPYESIPHQYKLDGKIVNYY
11 KILYDLQKKLTKNTISTK-----DIKSINDVND EYL--LMTLRDVTCFIEWN SAESALC-----VNIIDVDLKPKEKWHWTHTKYSQLTSSQ
12 KILYDLQKKLTKNTVISIK-----NIKSIDDKDEHL--LMTLRDVTCFIEWNSTKDALY-----VNIIDVDLKPKEKWHWTHTKYSQLTSSQ
13 KILYDLQKKLTKNTIPIK-----NLSIHDIKDDL--LMTLRDVTCFIEWNSTGNTLC-----VNIIDVDLKPKEKWHWTHTKYSQLTSSQ
14 KILYDLQKKLTKNTTPIIS-----DIKSINDVND EHL--LMTLRDVTCFIEWN SAENALH-----VNIIDVDLKPKEKWHWTHTKYSQLTSSQ
15 AKLHDIQKNLDSNVSMN-----DIKSIDVSDAFL--NMMLTKDVSCFIEWTREPDLSL-----VNIIDVDLKPKEKWHWTHTKYSQLTSSQ
16 QRLRVAQEQVDASLGPL-----DQPDTAASPERC--LSMTLKDVSCEFVSWHKDASPV-----AVVDLDMKPAKSAHWHTALQEQDLDRFP
17 QRLYAAQRFVKDDL S-----FLMTLRVDTCFIEWNRNTRSVK-----ATIIDVDQKPAKLRHWQSTESALASFP
18 PHLHDAQVSNDSSTG-----VLEPKDQFKLG--LAMTLRDCCTCYVRLSRQSSIEKVE-----ARLGDLDLKDQTTKLDYWRDMELELQEQ
19 LKLRDCCQRMN-----AVGLPG--LDADYRDRASMTLRDCTMFVKDKPV-----GRTIADLTAGIAPLVEILLKKKNNDMSI
20 LRLRAAQLAARDG-----EEEEGGG-----EDEGAGDPERLA--LAMTLRDCACFVRVP--AEAGRPE-----AKLADLDRKNWEA--KRGYWRERMERLVE
21 LKLLAHQRSMDV G-----LYGSPSLSRDKS--LAMTLRDCCTMYIKMPR--SEKGR--VE-----IRLGDLDLKTAGGGKAQYWLELHRLLS
22 RDLRWLQNLSDTKG-----PLHAEKNDMPFS--LAMTVRDCCTCFVOMNLGPDVPEQRLR-----VRLGDFLDKTDIKFKRWTSAEKLDIES
23 AEIRHMQHGD ELGIL-----GYANYVQPPQFV--TAMTMRDVSFLVHVQGD SVNG-----KIVDADLKSVEKRDYASLETDLIEG
24 RKLRLQEQYSRT-----DVA--LAMTLRDTVLYIGKDH-----ITLDDLDPKMDNTKMSKWERDERNLEIG
25 QKLKQYQKINNKNDLIK-----NLTSYSDVSQNL S--LVMTLRDVGLFPIKIEKPKNNHIHTSHNNIKNVYRINDNKSNGTKDQDQEI GTNDEEDNDEKFLITCN--IYDDLKSKMKYKHWLKVENDLQEIY
26 QKLKEYQRINNKNDLIK-----NITSYDVLQNL S--LVMTLRDVGLFPIKIEKPKNNHIHTSHNNIKNVYRINDNKSNGTKDQDQEI GTNDEEDNDEKFLITCN--IYDDLKSKMKYKHWLKVENDLQEIY
27 QQLRKYQKINNKNDLIE-----NLTSSDDVSSNLS--LIMTLRDVGLFPIKIEKPKNNHIHTSHNNIKNVYRINDNKSNGTKDQDQEI GTNDEEDNDEKFLITCN--IYDDLKSKMKYKHWLKVENDLQEIY
28 VKLKEYQRINNKNDLIA-----NLTLIHDVLQNL S--LVMTLRDVGLFPIKIEKPKNNHIHTSHNNIKNVYRINDNKSNGTKDQDQEI GTNDEEDNDEKFLITCN--IYDDLKSKMKYKHWLKVENDLQEIY

8.3 Aminosäuresequenzalignierung von zehn Vertebraten-IP₅-2K-Sequenzen und 18 Pilz-Ipk1p-Sequenzen.

In der oberen Reihe stellt ein Farbpunkt ein Aminosäure in einer Sequenzalignierung von 10 Vertebraten-IP₅-2K-Sequenzen (1-10) und 18 Pilz-Ipk1p-Sequenzen (11-28) dar. Die Farbcodierung entspricht der im Programm BioEdit beschriebenen. Die Alignierung wurde mit dem Programm CLUSTAL-X durchgeführt. Die Nummerierung bezieht sich auf die gesamte Alignierung mit eingefügten Lücken. Die untere Abbildung stellt eine Alignierung der Sequenzsegmente dar, die oben durch Cyan farbene und pinke Balken markiert werden. Das für die katalytische Aktivität wichtige C ist rot markiert. Kurze konservierte Bereiche, die in Vertebraten und Pilzen ähnlich sind, wurden orange unterlegt. Die zwei großen Peptidinsertionen, die nur in Vertebraten vorkommen, sind Cyan farben bzw. pink unterlegt.

Vertebraten-IP₅-2K-Sequenzen: **1:** ChrUn320|*Fugu rubripes**; **2:** CR633999|*Tetraodon nigroviridis**; **3:** BX465868|*Brachydanio rerio**, **4:** XM_414295|*Gallus gallus*; **5:** CX897701|*Xenopus tropicalis**; **6:** XP_283126|*Mus musculus*; **7:** XP_225201|*Rattus norvegicus*; **8:** Sc25506|*Macaca mulatta**; **9:** Ct541.52|*Pan troglodytes**, **10:** NP_073592|*Homo sapiens*.

Pilz-Ipk1p-Sequenzen: **11:** Ct_107|*Sacharomyces paradoxus**; **12:** Ct_376|*Saccharomyces mikatae**; **13:** Ct_439|*Saccharomyces bayanus**; **14:** gi|6320521|*Saccharomyces cerevisiae*; **15:** XP_447113|*Candida glabrata*; **16:** gi|45184787|*Eremothecium gossypii*, **17:** XM_454521|*Kluyveromyces lactis*; **18:** XM_359600|*Magnaporthe grisea*; **19:** Sc1-1.37|*Coccidioides immitis**; **20:** SCt1.2s|*Chaetomium globosum**; **21:** EAA65019|*Aspergillus nidulans*; **22:** Sc4.1.272|*Fusarium graminearum**, **23:** XM_503655|*Yarrowia lipolytica*; **24:** NP_588080|*Schizosaccharomyces pombe* (truncated), **25:** gi|46431478|*Candida albicans*; **26:** CR382139|*Debaromyces hansenii*; **27:** SCt1.1Ct|*Candida tropicalis**; **28:** SCt1.5Cg|*Candida guilliermondii**.

Sequenzen, die durch ein * markiert werden, stammen aus einer Vorhersage durch Aminosäuresequenzhomologie- und Stammbaumuntersuchungen. Die “neuronal network based” Vorhersagealgorithmen FGENESH und HMM-FGENESH wurden von der Firma Softberry Inc., USA (www.softberry.com) entwickelt. Sie wurden hier für *ab initio* oder Proteinsequenz basierte Genprädiktionen verwendet.

8.4 Zur Modellierung der N-terminalen Domäne von HsIP3K-B verwendete Sequenz:

```
>P1;1EE8 = Matrizensequenz und korrespondierende 3D-Struktur:
structureX: 1EE8: 53:A:266 :A: MutM DNA binding protein
Thermus thermophilus
FLLFALGEGVELVAH-----LGMTGGFRLEPTPHTRAALVLEGRTLYFHDPRRFG
RLFGVRRGDYREIPLLLRLGP-EPLSEA-FAFPGFFRGLKESARPLKALLLDQRLAAGVG
NIYADEALFRARLSPFRP----ARSLT---EEEARR----LYRALREV-----LAEA-
VELGGSTLSDQSYRQPDGLPGGFQTRHAVYGREGLPCPACGRPVERRVVAGRGTHFCPTC
QGEGP-----*
```

```
>P1;ip3kb-n8 = modellierte Sequenz (Prof. Dr. Mayr):
sequence: ip3kb-n8: 1: :184 : : N-terminale Domäne von IP3K-B
MAVYCYALNSLVIMNSANEMKSGGGPGPSGS--ETPPPPRRAVL-SPGSV---FSPGRGA
SFL-----FPPAESLSPEEPRSPGGWRSR--RRLNSSSGS-----GSGSS
GSSVSSPSWAGRLRGDRQQVVAAGTLPSPGPEEAKRKLRLILQRELQNVQVNQKVGMFEAH
IQAQSSAI--QAPRSP-----RL---GRARSPSP-----CP-
----FRSSS*
```

8.5 Zur Modellierung der putativen 3D-Struktur von HsIP₅-2K verwendete Sequenzen:

DEFINITION Nuclear RNA export factor 1 (Tip-associating protein)

(Tip-associated protein) (mRNA export factor TAP).

ACCESSION Q9UBU9

```
1 MADEGKSYSE HDDERVNFPQ RKKKGRGPFR WKYEGNRRS GRGSGIRSS RLEEDDGDVA
61 MSDAQDGRV RYNPYTTRPN RRGDTWHDRD RIHVTVRRDR APPERGGAGT SQDGTSKNWF
121 KITIPYGRKY DKAWLLSMIQ SKCSVPFTPI EFHYENTRAQ FFVEDASTAS ALKAVNYKIL
181 DRENRISII INSSAPPHTI LNELKPEQVE QLKLIMSKRY DGSQQALDLK GLRSDPDLVA
241 QNIDVVLNRR SCMAATLR II EENIPELLSL NLSNNRLYRL DDMSSIVQKA PNLKILNLSG
301 NELKSERELD KIKGLKLEEL WLDGNSLCDT FRDQSTYISA IRERFPKLLR LDGHELPPPI
361 AFDVEAPTTL PPCKGSYFGT ENLKSLVLFH LQYYAIYDS GDRQGLLDAY HDGACCSLSI
421 PFIPQNPARS SLAEYFKDSR NVKCLKDPTL RFRLKHLTRL NVVAFNLNLP KTQHDVNSFV
481 VDISAQTSTL LCFSVNGVFK EVDGKSRDSL RAFTRTFIAV PASNSGLCIV NDELFRNAS
541 SEEIQRAFAM PAPTSSSPV PTLSPQQEM LQAFSTQSGM NLEWSQKCLQ DNNWDYTRSA
601 QAFTHLKAKG EIPEVAFMK
```

DEFINITION nuclear RNA export factor 1 [Homo sapiens].

ACCESSION NP_006353

```
1 MADEGKSYSE HDDERVNFPQ RKKKGRGPFR WKYEGNRRS GRGSGIRSS RLEEDDGDVA
61 MSDAQDGRV RYNPYTTRPN RRGDTWHDRD RIHVTVRRDR APPERGGAGT SQDGTSKNWF
121 KITIPYGRKY DKAWLLSMIQ SKCSVPFTPI EFHYENTRAQ FFVEDASTAS ALKAVNYKIL
181 DRENRISII INSSAPPHTI LNELKPEQVE QLKLIMSKRY DGSQQALDLK GLRSDPDLVA
241 QNIDVVLNRR SCMAATLR II EENIPELLSL NLSNNRLYRL DDMSSIVQKA PNLKILNLSG
301 NELKSERELD KIKGLKLEEL WLDGNSLCDT FRDQSTYISA IRERFPKLLR LDGHELPPPI
361 AFDVEAPTTL PPCKGSYFGT ENLKSLVLFH LQYYAIYDS GDRQGLLDAY HDGACCSLSI
421 PFIPQNPARS SLAEYFKDSR NVKCLKDPTL RFRLKHLTRL NVVAFNLNLP KTQHDVNSFV
481 VDISAQTSTL LCFSVNGVFK EVDGKSRDSL RAFTRTFIAV PASNSGLCIV NDELFRNAS
541 SEEIQRAFAM PAPTSSSPV PTLSPQQEM LQAFSTQSGM NLEWSQKCLQ DNNWDYTRSA
601 QAFTHLKAKG EIPEVAFMK
```

8.6 Hinweis zur Rechtschreibung:

Die vorliegende Arbeit wurde nach der derzeit gültigen Deutschen Rechtschreibung formatiert, Stand 17.02.2006.