

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
der Universität Hamburg
Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion

**Regulation und subzelluläre Verteilung der Isoform B
von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase aus
Rattus norvegicus (BERKENHOUT, 1769)**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie
an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Isabell Schreiber
aus Witzenhausen

Hamburg 2002

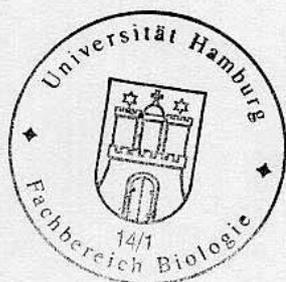
1. Gutachter: Prof. Dr. G.W. Mayr
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Wienand

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. G. W. MAYR

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND

Tag der Disputation: 20. Dezember 2002

Hamburg, den 05. Dezember 2002



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Udo Wienand', written in a cursive style.

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

1	Einleitung	1
1.1	Phosphoinositide und Inositolphosphate als intrazelluläre Signalmoleküle und essentielle Bestandteile eukaryontischer Zellen	1
1.1.1	Rolle der Phosphoinositide in Signaltransduktionswegen.....	2
1.1.1.1	Phosphoinositide als „second messenger“ in Signaltransduktionswegen	2
	<ul style="list-style-type: none"> • Funktionen der Phosphoinositide <i>PtdIns-3-P/PtdIns-4-P/PtdIns-5-P</i> • Funktionen der Phosphoinositide <i>PtdIns-3,4-P₂/PtdIns-3,5-P₂</i> • Funktion des Phosphoinositids <i>PtdIns-4,5-P₂</i> • Funktion des Phosphoinositids <i>PtdIns-3,4,5-P₃</i> 	
1.1.2	Rolle der Inositolphosphate in Signaltransduktionswegen	9
1.1.2.1	Generierung der „second messenger“ Inositol 1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol über die Aktivität der Phospholipase C (PLC).....	10
	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivierung der PLCγ Isoenzyme über Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosin Kinase Aktivität • Aktivierung der PLCβ Isoenzyme über G-Proteine gekoppelte Rezeptoren 	
1.1.2.2	Multiple Funktionen der Inositolphosphate in zellulären Systemen	12
	<ul style="list-style-type: none"> • Funktion des Inositolphosphats <i>Ins-1,3,4,5-P₄</i> • Funktion des Inositolphosphats <i>Ins-3,4,5,6-P₄</i> • Funktion des Inositolphosphats <i>Ins-1,4,5,6-P₄</i> • Funktion des Inositolphosphats <i>Ins-1,3,4,5,6-P₅</i> • Funktion des Inositolphosphats <i>Ins-1,2,3,4,5,6-P₆</i> • Funktionen der Inositolpyrophosphate <i>InsP₇/InsP₈</i> 	
1.2	Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase als ein zentrales Schaltelement des Inositolphosphatmetabolismus	16
1.2.1	Einordnung der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase in die Proteinfamilie der Inositolphosphat Kinasen	16
1.2.2	Schlüsselfunktion der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase im Inositolphosphatmetabolismus	16
1.2.3	Isoformen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase in Vertebraten.....	17
1.2.4	Differentielle Regulation von Isoformen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase in Vertebraten.....	18
1.3	Mechanismen der Zielsteuerung und Regulation von Schlüsselenzymen des Phosphoinositids/Inositolphosphats Metabolismus	19
1.3.1	Topologie von Schlüsselenzymen des Phosphoinositid/Inositolphosphat Metabolismus.....	20
1.3.1.1	Die Phosphatidylinositol Phosphat Kinasen der Klasse I & II (PIPK I & II).....	20
1.3.1.2	Die Phosphatidylinositol Phosphat Phosphatasen (PIPP).....	21
1.3.1.3	Die Phosphatidylinositol 3-Kinasen Klasse IA & IB (PI3K I)	22

1.3.1.4	Die Protein Kinase C (PKC)	23
1.3.1.5	Die Phospholipase C (PLC).....	23
1.3.1.6	Die Protein Kinase B (PKB/Akt).....	24
1.3.1.7	Die Inositoltrisphosphat 3-Kinase (IP3K).....	24
1.3.1.8	Die Inositolphosphat 5-Phosphatase (IP5P).....	24
1.3.1.9	Die Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK).....	25
1.4	Rolle des Proteins Aktin in Eukaryonten	26
1.4.1	Polymerisation von Aktin	27
1.4.2	Das Aktin-Zytoskelett.....	28
1.4.3	Aktin-bindende Proteine	29
1.4.3.1	Messmethoden zum Nachweis von Aktin-bindenden Proteinen.....	30
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	31
2	Material und Methoden	32
2.1	Material	32
2.1.1	Bakterienstämme.....	32
2.1.2	Medien & Lösungen für die Bakterienkultur.....	32
2.1.3	Zelllinien (<i>Rattus norvegicus</i>).....	33
2.1.4	Medien & Lösungen für die Zellkultur	33
2.1.5	Oligonukleotide	33
2.1.6	Enzyme.....	35
2.1.7	Kits.....	35
2.1.8	Plasmide.....	35
2.1.9	Antikörper	36
2.1.10	Molekulargewichtsstandards	36
2.1.11	Puffer & Lösungen.....	36
2.1.12	Chemikalien.....	40
2.2	Methoden.....	40
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1.1	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	40
2.2.1.2	<i>Nested</i> Polymerasekettenreaktion (<i>Nested</i> PCR)	41
2.2.1.3	Fusions-Polymerasekettenreaktion (Fusions-PCR).....	42
2.2.1.4	Analytische und präparative Polymerasekettenreaktion (PCR).....	43
2.2.1.5	QuikChange™ Mutagenese.....	44
2.2.1.6	Analytische und präparative Auftrennung von DNA in Agarosegelen	46
2.2.1.7	DNA Elution aus Agarosegelen	46
2.2.1.8	Fällung von DNA	47

2.2.1.9	A-Tailing von PCR-Produkten.....	47
2.2.1.10	Ligation von DNA.....	47
2.2.1.11	Klonierung von RT-PCR Produkten.....	48
2.2.1.12	Plasmid DNA Minipäparation.....	48
2.2.1.13	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	49
2.2.1.14	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	49
2.2.1.15	Sequenzierung von DNA	49
2.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	50
2.2.2.1	Transformation von Bakterien	50
2.2.2.2	Kultur und Aufbewahrung von Bakterien	51
2.2.2.3	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	51
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	51
2.2.3.1	Kontinuierliche Kultivierung von PC12- und NRK52E-Zellen	51
2.2.3.2	Transiente Transfektion von PC12- und NRK 52E-Zellen	52
2.2.3.3	Fixierung & Permeabilisierung eukaryontischer Zellen.....	53
2.2.3.4	Nachweis von Mikrofilamenten & Mikrotubuli.....	53
2.2.3.5	Fluoreszenzmikroskopische Auswertungen.....	54
2.2.4	Biochemische Methoden.....	54
2.2.4.1	Bakterielle Expression eines Glutathion-S-Transferase Fusionsproteins	54
2.2.4.2	Lyse der Bakterien nach heterologer Expression eines Glutathion-S- Transferase Fusionsproteins	55
2.2.4.3	Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase Fusionsproteins.....	55
2.2.4.4	Proteinbestimmung nach Bradford.....	55
2.2.4.5	Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
2.2.4.5	Western-Blot („semi dry“).....	57
2.2.4.6	Präparation von Aktin.....	58
2.2.4.7	Präparation von NBD-Aktin	58
2.2.5	Fluoreszenzspektroskopische Methoden.....	58
2.2.5.1	Präparation von polymeren NBD-Aktin	59
2.2.5.2	<i>In vitro</i> Aktin-(GST-IP3K)-Bindungsassay	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Klonierung der cDNA der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (IP3K B) aus <i>Rattus norvegicus</i>	60
3.1.1	Strategie zur Klonierung der IP3K B-cDNA.....	60
3.1.2	Amplifikation der IP3K B-cDNA Fragmente 1, 2 und 3 mittels RT-PCR.....	63
3.1.3	Amplifikation der IP3K B-cDNA Fragmente 2a und 3a mittels <i>nested</i> -PCR.....	63
3.1.4	Amplifikation des IP3K B-cDNA Fragmentes 4 mittels Fusions-PCR	64

3.1.5	Amplifikation des IP3K B-cDNA Fragmentes 5 mittels Fusions-PCR	64
3.2	Analyse der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (<i>Rattus norvegicus</i>) auf Ebene der cDNA Sequenz.....	65
3.3	Analyse der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (<i>Rattus norvegicus</i>) auf Ebene der Aminosäuresequenz.....	68
3.3.1	Vergleich mit der humanen Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B Aminosäuresequenz.....	68
3.3.2	Analyse der putativen Sekundärstruktur der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B	71
3.4	Generierung von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B-EGFP Fusionskonstrukten	73
3.5	Lokalisation von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B- EGFP Fusionsproteinen in eukaryontischen Zellen.....	75
3.5.1	<i>In vivo</i> Lokalisation der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B- EGFP Fusionsproteine 1, 2 und 3 in PC12 Zellen.....	75
3.5.2	<i>In vivo</i> Lokalisation des Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B- EGFP Fusionsproteins 1 in NRK52E Zellen.....	77
3.6	Kolokalisation des Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B- EGFP Fusionsproteins 1 mit F-Aktin <i>in vivo</i>	79
3.7	Homologien zwischen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B und Proteinen mit einem Aktin-Bindungsmotiv	82
3.8	Kolokalisation des Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B-EGFP Fusionsproteins 4 mit F-Aktin <i>in vivo</i>.....	83
3.9	Bakterielle Expression und Reinigung des GST-Inositol 1,4,5-trisphos- phat 3-Kinase Isoform B Fusionsproteins 1	85
3.10	Direkte Bindung des GST-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B Fusionsproteins 1 an F-Aktin <i>in vitro</i>	88
3.11	Intrazelluläre Lokalisation von punkt-mutierten Inositol 1,4,5-trisphos- phat 3-Kinase Isoform B-EGFP Fusionsproteinen	92
3.11.1	Generierung von punkt-mutierten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (As 108-170)-EGFP Fusionskonstrukten mittels QuikChange™ Mutagenese.....	92
3.11.2	Intrazelluläre Lokalisation von „single-site“ Mutanten des Inositol 1,4,5-trisphos- phat 3-Kinase Isoform B (As 108-170)-EGFP Fusionsproteins	93
3.12	Intrazelluläre Lokalisation von verkürzten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B Fragment 1-EGFP Fusionsproteinen	98
3.12.1	Generierung von verkürzten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B EGFP-Fusionskonstrukten.....	98
3.12.2	Intrazelluläre Lokalisation von verkürzten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B Fragment 1-EGFP-Fusionsproteinen	99

4	Diskussion	101
4.1	Aktin-Bindungsgebiete in eukaryontischen Proteinen.....	101
4.2	Vergleich zwischen dem I/LWEQ Modul und einem zum I/LWEQ Modul homologen Abschnitt aus der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B auf Ebene der Primär- und putativen Sekundärstruktur	102
4.3	Vergleich zwischen den <i>in vivo</i> Aktin-Bindungseigenschaften von Proteinen aus der I/LWEQ-Proteinfamilie und der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B.....	103
4.4	<i>In vitro</i> Aktin-Bindungseigenschaften der putativen Aktin-Bindungsdomäne aus der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B.....	110
4.5	Eine putative, neuartige Aktin-Bindungsdomäne in der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B.....	111
4.6	Lokalisation der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen in Säugern.....	113
4.6.1	Vergleich zwischen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B im Bereich der putativen Aktin-Bindungsdomäne mit den Isoformen A und C.....	113
4.6.2	Lokalisation der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B in Säugern	114
4.7	Spezifische Funktion der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B in Säugern	116
5	Zusammenfassung	122
6	Literatur.....	124
7	Anhang	135
7.1	Abkürzungsverzeichnis	135
7.2	Abbildungsverzeichnis	138

1 Einleitung

1.1 Phosphoinositide und Inositolphosphate als intrazelluläre Signalmoleküle und essentielle Bestandteile eukaryontischer Zellen

Die amphiphilen Phosphoinositide sind nicht nur essentielle Bestandteile von Membranen und spielen eine kritische Rolle bei der Generierung intrazellulärer Botenstoffe, wie Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP_3) und Diacylglycerol (DAG), sie stellen auch selbst wichtige Signalmoleküle dar. In dieser Funktion modulieren sie eine Vielfalt von zellulären Funktionen. Die Konzentration der Phosphoinositide wird dabei durch die Aktivität spezifischer Phosphoinositidkinasen und -phosphatasen in einem bestimmten Bereich der Zelle reguliert. Diese Regulation führt zu einer Induktion von Veränderungen ihrer Verfügbarkeit und damit zu lokalen Konzentrationsänderungen. Zum Beispiel führen lokale Änderungen des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat- (PtdIns-4,5-P_2) Spiegels, bedingt durch extrazelluläre Stimuli, zu einer Reorganisation von Mikrofilamenten gefolgt von Änderungen der Zellform. Des Weiteren ist PtdIns-4,5-P_2 in die Regulation des vesikulären Transports der Zelle involviert. Derart spielen die Phosphoinositide eine Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen wie dem Zellwachstum, der Polarität, der Bewegung und der Sekretion [Takenawa et al., 2001; Toker, 2002]. Auf die Funktion der Phosphoinositide als „second messenger“ (siehe Abschnitt 1.1.2.1, Seite 10) sowie die Steuerung zentraler Enzyme des Phosphoinositidmetabolismus (siehe Abschnitt 1.3, Seite 19) wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit eingegangen.

Der Metabolismus der Phosphoinositide ist eng mit dem der Inositolphosphate verknüpft, so hydrolysiert die Rezeptor gekoppelte Phospholipase C (PLC) als Antwort auf extrazelluläre Stimuli das membranständige PtdIns-4,5-P_2 zu den zwei „second messengern“ InsP_3 und DAG. DAG verbleibt in der Membran und aktiviert zusammen mit weiteren Faktoren die Proteinkinase C (PKC). Diese Aktivierung hat eine Vielfalt von zellulären Antworten zur Folge. InsP_3 ist frei im Zytosol diffusibel und mobilisiert Ca^{2+} aus Calciumspeichern des Endoplasmatischen Retikulums (ER) über seine Bindung an den InsP_3 -Rezeptor, der gleichzeitig einen Calciumkanal darstellt. Des Weiteren bildet InsP_3 das Ausgangssubstrat für die Bildung einer Vielfalt von Inositolphosphaten, die als Signalmoleküle wichtige zelluläre Prozesse steuern [Irvine et al., 2001]. Eine Übersicht der multiplen Funktionen von Inositolphosphaten (siehe Abschnitt 1.1.2.2, Seite 12) und eine Charakterisierung von Schlüsselenzymen dieses Stoffwechsels erfolgt einleitend (siehe Abschnitt 1.3, Seite 19).

1.1.1 Rolle der Phosphoinositide in Signaltransduktionswegen

Da die membranständigen Phosphoinositide nur einen geringen Anteil der zellulären Membranen konstituieren, kann ihre maßgebliche Rolle nicht ausschließlich in der Ausbildung dieser Zellstrukturen liegen. Ihre zentrale Rolle scheint in der spezifischen Regulation von zellulären Prozessen wie der Agonist-stimulierten Signaltransduktion zu liegen. Die Initiierung von Signalwegen über Phosphoinositide erfolgt über ihre Interaktion mit einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine. Diese spezifischen und hoch affinen Interaktionen haben abhängig von der Natur der interagierenden Proteine unterschiedliche Wirkungen. Zum einen kann über diese Wechselwirkung eine Translokation des interagierenden Proteins von einem Bereich der Zelle zu einem anderen erfolgen, typischerweise von dem Zytosol zum inneren Blatt der Plasmamembran. Zum anderen kann diese Lipid-Protein Interaktion eine Konformationsänderung des interagierenden Proteins zur Folge haben und damit die Aktivität dieses Proteins modulieren. Die Lipid-Protein Interaktion kann sich auch in Form einer Phosphorylierung oder Dephosphorylierung sowie einem Schutz vor Hydrolyse durch Phospholipasen auf das Lipid selbst auswirken. Das Ergebnis dieser Kombination von unterschiedlichen Effekten der Lipid-Protein Interaktion ist die Initiierung von anknüpfenden Signalkaskaden. Diese führen zum Zellwachstum und zur Proliferation, zur Apoptose, zur Umbildung des Aktin-Zytoskeletts, zur Sekretion und zum vesikulären Transport sowie zu spezifischen Veränderungen des intrazellulären Metabolismus.

1.1.1.1 Phosphoinositide als „second messenger“ in Signaltransduktionswegen

Das Ausgangssubstrat zur Bildung aller Phosphoinositide ist das Lipid Phosphatidylinositol (PtdIns). Durch Phosphorylierung von einer oder mehreren Hydroxyl-Gruppen der Inositolkopfguppe des PtdIns durch spezifische Phosphoinositidkinasen können sieben weitere Phosphoinositide gebildet werden. Einen Überblick des Phosphoinositidmetabolismus gesteuert durch die Aktivität spezifischer Kinasen und Phosphatasen zeigt das folgende Schema.

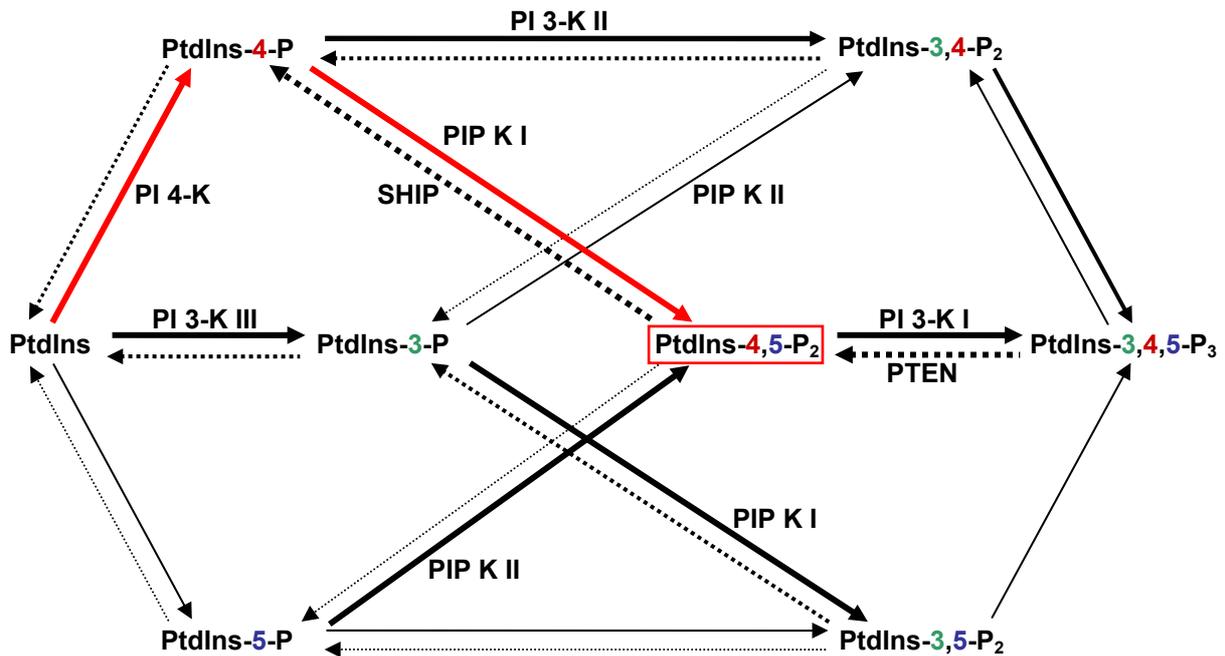


Abbildung 1.1.1.1 Schematische Darstellung des Phosphoinositidmetabolismus

Durch die Aktivität spezifischer Phosphoinositidkinasen und -phosphatasen werden multiple Phosphoinositide generiert, die entweder nur an den Positionen 3, 4 und 5 oder in Kombination phosphoryliert vorliegen. Die durchgängigen Pfeile zeigen *in vitro* nachgewiesene Synthesewege über die Aktivität von Kinasen, die unterbrochenen Pfeile zeigen Synthesewege über die Aktivität von Phosphatasen. Die Synthesewege, die unter physiologischen Bedingungen eine relevante Rolle spielen, sind durch stärkere Pfeile hervorgehoben. Der Hauptsyntheseweg für die Generierung des wichtigen Lipid-Botenzstoffs Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns-4,5-P₂) führt über die Phosphorylierung des Phosphatidylinositol (PtdIns) an Position 4 zu Phosphatidylinositol-4-Phosphat und weiter zu PtdIns-4,5-P₂ über die Aktivität von Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinasen. Dieser Syntheseweg ist durch rote Pfeile markiert [verändert nach Toker, 2002].

Funktionen der Phosphoinositide PtdIns-3-P/PtdIns-4-P/PtdIns-5-P

Das Lipid Phosphatidylinositol (PtdIns) bildet das Ausgangssubstrat für die Synthese höher phosphorylierter Phosphoinositide und wird zunächst hauptsächlich durch die Aktivität der Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI4K) zu PtdIns-4-P umgesetzt. Es kann jedoch auch an Position 3 oder 5 zu den monophosphorylierten Lipiden PtdIns-3-P oder PtdIns-5-P umgesetzt werden. Die Phosphorylierung zu PtdIns-3-P erfolgt über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) der Klasse III. Bisher konnten drei Familien von PI3Ks identifiziert und charakterisiert werden, die sich nicht nur durch ihre unterschiedliche Substratspezifität gut voneinander unterscheiden lassen. Die monophosphorylierten Lipide sind konstitutiv vorhanden, dabei ist ihr Spiegel in den bisher untersuchten Zelltypen konstant. Hinweise für eine Regulation der Synthese sowie potentielle Bindungspartner des erst im letzten Jahr entdeckten PtdIns-5-P gibt es bisher keine. Für das PtdIns-3-P konnte eine spezifische Bindung an eine 70-Aminosäuren umfassende Proteinsequenz, als FYVE-finger-Domäne bezeichnet, nachgewiesen werden. Proteine wie z.B. das „early endosome antigen-1“ (EEA1) und

andere die eine FYVE-finger-Domäne besitzen interagieren spezifisch mit PtdIns-3-P [Gaullier et al., 1998]. Ein weiteres mit PtdIns-3-P interagierendes Protein ist das Adapter Protein-2 (AP2), das eine Rolle bei der Assemblierung von Clathrin Umhüllungen (Clathrin coats) an der Membran spielt [Rapoport et al., 1997]. Aufgrund dieser Beobachtungen kann dem monophosphorylierte Lipid PtdIns-3-P eine Aufgabe im vesikulären Transport zugeordnet werden (siehe Abbildung 1.1.1.3, Seite 9).

Hinweise auf spezifisch an PtdIns-4-P bindende Proteine gibt es bislang wenige, möglicherweise dient es nur als Ausgangssubstrat für die Synthese des höher phosphorylierten PtdIns-4,5-P₂. Festzuhalten bleibt, dass Proteine, die mit diesem höher phosphorylierten Lipid spezifisch interagieren, auch das Potential haben, PtdIns-4-P zu binden.

Funktionen der Phosphoinositide PtdIns-3,4-P₂/PtdIns-3,5-P₂

Das PtdIns-3,4-P₂ kann durch die Aktivität der Klasse II der PI3-K aus dem monophosphorylierten PtdIns-4-P generiert werden oder entsteht als ein Abbauprodukt aus der Hydrolyse des PtdIns-3,4,5-P₃. Dieses Lipid kann direkt mit Proteinen interagieren und mit seiner Bindung deren Aktivität und/oder Lokalisation beeinflussen. Einen gut charakterisierten Effektor stellt die Protein Kinase B (PKB) auch als Akt bezeichnet dar, die sowohl PtdIns-3,4-P₂ als auch PtdIns-3,4,5-P₃ bindet. Diese Proteinkinase bindet mittels ihrer „Pleckstrin homology“ Domäne (PH Domäne) Phosphoinositide mit hoher Affinität und Spezifität mit folgender Präferenz: PtdIns-3,4-P₂ > PtdIns-3,4,5-P₃ >> PtdIns-4,5-P₂ [Franke et al., 1997]. Die Bindung von PtdIns-3,4-P₂ an PKB/Akt induziert eine geringe (3-5fache) Aktivitätssteigerung des Enzyms. Eine vollständige und effiziente Aktivierung des Enzyms kann jedoch nur mittels einer Phosphorylierung an dem funktionellen Rest Thr308 durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK-1) bewirkt werden (siehe auch Abschnitt 1.3.1.6, Seite 24) [Scheid et al., 2002]. Obwohl die PDK-1 hoch spezifisch an PtdIns-3,4,5-P₃ bindet, zeigt sie *in vitro* auch eine hohe Affinität zu PtdIns-3,4-P₂ [Currie et al., 1999]. Welches der beiden Lipide PtdIns-3,4-P₂ und/oder PtdIns-3,4,5-P₃ nun *in vivo* bei der Aktivierung der PKB/Akt eine entscheidende Rolle spielt ist bisher nicht bekannt. Auch konnte für bestimmte Isoformen der Protein Kinase C (PKC), PKC δ , PKC ϵ und PKC ζ *in vitro* eine direkte Bindung an PtdIns-3,4-P₂ nachgewiesen werden. Doch wie bereits für die Akt/PKB beschrieben, sind für die vollständige Aktivierung der PKC beide Lipide sowie die PDK-1 erforderlich. Im Gegensatz zu der PKB/Akt besitzen die Isoformen der PKC keine PH Domäne, die Bindung erfolgt über einen bestimmten Bereich in der regulatorischen Domäne des Enzyms, der bisher noch nicht identifiziert werden konnte [Palmer et al., 1995]. Festzuhalten bleibt, dass PtdIns-3,4-P₂ einen wichtigen „second messenger“ darstellt, dessen Funktion noch weiterer Aufklärung bedarf.

Durch eine Phosphorylierung des PtdIns-5-P an Position 3 entsteht das PtdIns-3,5-P₂, für das bisher keine Interaktionspartner oder eine spezifische Funktion in Zellen entdeckt werden konnten. Hinweise auf eine „second messenger“ Funktion liefert die Beobachtung, dass die Spiegel dieses Lipids in bestimmten Zellsystemen drastischen Schwankungen unterliegen [Dove et al., 1997]. Eingehende Studien sind erforderlich, um die Rolle dieses Lipids im Phosphoinositidmetabolismus und der Phosphoinositid vermittelten Signaltransduktion weiter aufzuklären. Putative Bindungspartner könnten dabei Proteine mit einer Phosphoinositid bindenden PH Domäne darstellen.

Funktion des Phosphoinositids PtdIns-4,5-P₂

Das Lipid PtdIns-4,5-P₂ wird hauptsächlich durch die Aktivität der Phosphatidylinositol Phosphat Kinase (PIPK) der Klasse I gebildet oder entsteht aus der Dephosphorylierung des hoch phosphorylierten PtdIns-3,4,5-P₃ durch die Aktivität der Phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog). Dieses Lipid nimmt als ein wichtiger „second messenger“ eine zentrale Rolle in der Phosphoinositid-vermittelten Signaltransduktion ein. Eine große Anzahl von PtdIns-4,5-P₂ Effektoren regulieren die Umbildung des Aktin-Zytoskeletts, die Lokalisation an Membranen und die Prozesse des vesikulären Transports.

Viele Proteine, die an der Ausbildung und Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind, interagieren mit PtdIns-4,5-P₂. Zum Beispiel führt eine Interaktion von PtdIns-4,5-P₂ mit den Aktin-bindenden Proteinen Gelsolin und CapZ zu einer spontanen Aktin Polymerisation [Barkalow et al., 1996]. Gelsolin und CapZ werden auch als „Aktin cappende Proteine“ bezeichnet, d.h. sie besetzen das stumpfe Ende („barbed end“) von filamentösem/polymerem Aktin (F-Aktin) und verhindern damit eine fortschreitende Polymerisation (siehe auch Abschnitt 1.4.1, Seite 27). Da die Polymerisation und die damit einhergehende Bildung von Mikrofilamenten (F-Aktin) hauptsächlich an dem besetzten stumpfen Ende erfolgt, wird die Filamentbildung durch „Aktin cappende“ Proteine stark gehemmt. Eine Bindung von PtdIns-4,5-P₂ an „cappende“ Proteine bewirkt ein Abdissoziieren des Proteins von den Mikrofilament-Enden und die spontane Aktin Polymerisation ist nicht mehr gehemmt. Auch das Protein Profilin besetzt Aktin und verhindert damit die Polymerisation [Lu et al., 1996]. Eine Bindung von PtdIns-4,5-P₂ an Profilin induziert die Freisetzung des monomeren Aktins von dem Profilin-Aktin-Komplex und es kann eine Aktin-Polymerisation erfolgen [Lassing et al., 1985]. Die GTPase Rac interagiert synergistisch mit PtdIns-4,5-P₂ und reguliert Proteine, die zu der Familie der ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteine gehören sowie die WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) Proteine, welche über eine PH Domäne verfügen [Miki et al., 1996; Takenawa et al., 2001]. Proteine der ERM Familie interagieren mit der Oberfläche von Glykoproteinen und Aktin-Filamenten. Die Assoziation zwischen Glykoprotein, Aktin und dem entsprechenden Protein wird durch die Bindung von PtdIns-4,5-P₂ erhöht. Die Substrate der

Protein Kinase C (PKC), Pleckstrin und MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) interagieren ebenfalls mit diesem Lipid, wodurch die Assoziation dieser Proteine mit dem Zytoskelett vermittelt wird [Glaser et al., 1996]. Zusätzlich reguliert PtdIns-4,5-P₂ die Interaktion zwischen Zytoskelett und „focal adhesions“, indem es an die Aktin-Regulatorproteine Vinculin, α -Actinin und Talin bindet. Diese regulatorischen Proteine vermitteln über Integrine im Bereich der „focal adhesions plaques“ die Verbindung zwischen Aktin-Stressfilamenten („stress fibers“) und dem extrazellulären Raum. Die Bindung von PtdIns-4,5-P₂ an α -Actinin erhöht die Vernetzung und die Aktin-Polymerisation, während eine Bindung des Lipids an Vinculin die Verbindung von Aktin-Filamenten und Talin verstärkt [Huttelmaier et al., 1998; Fukami et al., 1992; Tempel et al., 1995].

Die hoch affine Bindung von PtdIns-4,5-P₂ an eine große Anzahl von Proteinen führt zu einer Translokation dieser Proteine an die Membran. Diese Translokation wird oft über die PtdIns-4,5-P₂ bindenden Interaktionsdomänen z.B. ENTH Domänen (Epsin NH₂-terminal homology domain), FYVE finger Domänen (F**a**b1p, **Y**OTB, **V**ac1p, **E**EA1 finger domain) und über die PH Domänen (Pleckstrin homology domain) der Proteine vermittelt. So wird die Bindung der PLC β ebenso wie die der GTPase Austauschfaktoren SOS und Vav, an PtdIns-4,5-P₂ über ihre PH Domänen vermittelt [Chen et al., 1997].

Abschließend ist PtdIns-4,5-P₂ ein kritischer regulatorischer Bestandteil des intrazellulären vesikulären Transportes. Beispielsweise ist dieses Lipid ein essentieller Kofaktor der Phospholipase D (PLD), die den intrazellulären vesikulären Transport reguliert [Liscovitch et al., 1994]. An der Aktivierung der PLD ist zusätzlich das Protein Arf-1 beteiligt, das ebenfalls durch eine Bindung von PtdIns-4,5-P₂ reguliert wird. Auch der Austauschfaktor für Arf-1, als ARNO bezeichnet, interagiert mit diesem Lipid [Paris et al., 1997]. Damit ist die Regulation der PLD eng mit dem PtdIns-4,5-P₂ Spiegel verknüpft.

Zusätzlich reguliert PtdIns-4,5-P₂ verschiedene endozytotische Prozesse, indem es Proteine im Bereich ihrer ENTH Domäne bindet, die eine Rolle bei der Endozytose spielen. ENTH-Domänen sind spezifische PtdIns-4,5-P₂-Bindungseinheiten, die mit einer geringeren Affinität zusätzlich auch PtdIns-4,5-P₂ binden können [Itho et al., 2001]. Eine Übersicht der unterschiedlichen Funktionen des PtdIns-4,5-P₂ als „second messenger“ in Signaltransduktionsprozessen zeigt die folgende Abbildung.

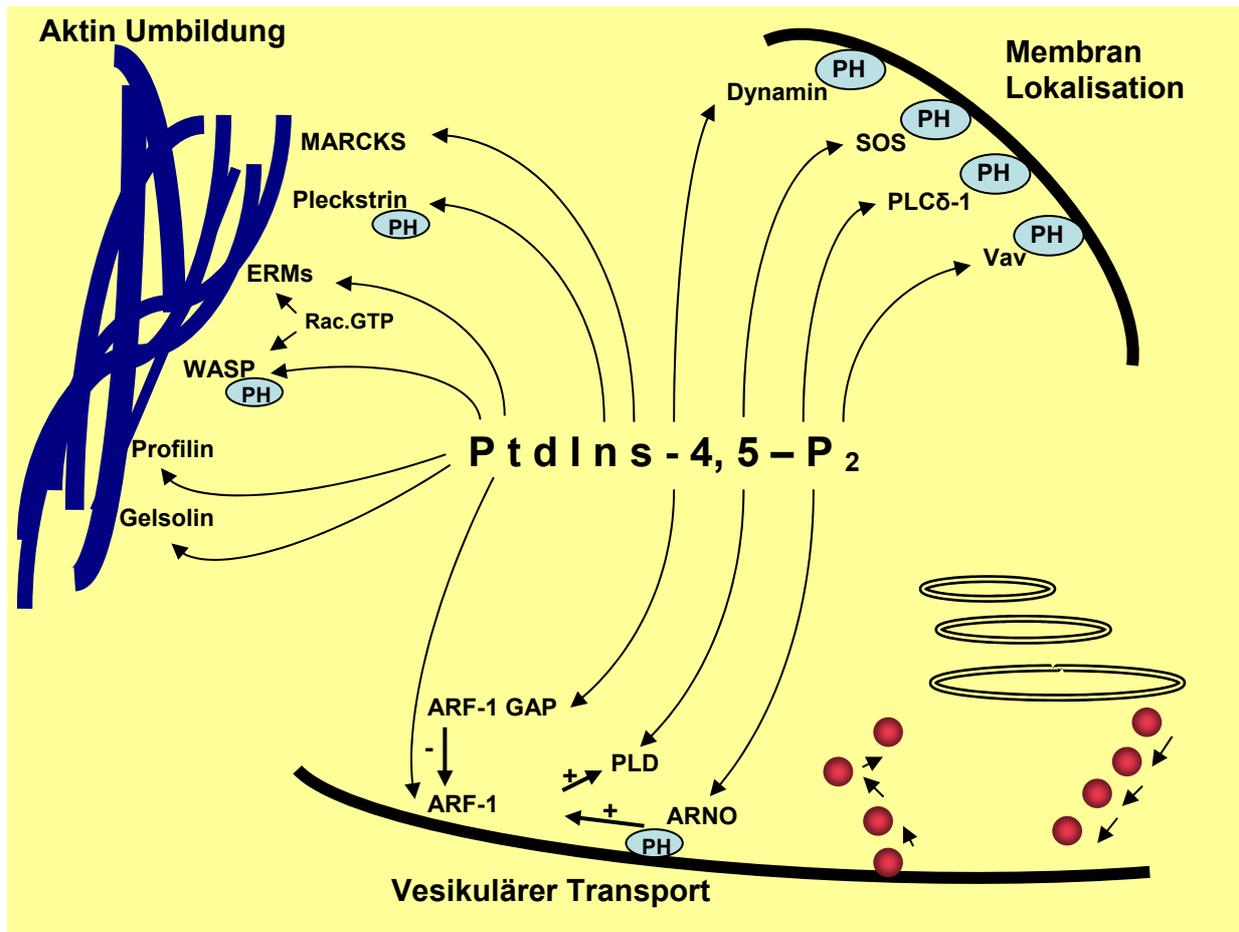


Abbildung 1.1.1.2 Rolle des PtdIns-4,5-P₂ in Signaltransduktionswegen

Eine große Anzahl von Effektoren des PtdIns-4,5-P₂ reguliert die Umbildung des Aktin-Zytoskeletts, die Lokalisation an Membranen und den vesikulären Transport. Eine Auswahl von Proteinen, die mit diesem Lipid interagieren ist in dieser Abbildung dargestellt. Viele Proteine binden über ihre PH-Domänen (blau dargestellt) an Phosphoinositide. Eine detaillierte Charakterisierung der einzelnen hier aufgeführten Proteine findet sich im vorangegangenen Textabschnitt.

Funktion des Phosphoinositids PtdIns-3,4,5-P₃

In Zellen, die unter der Verwendung von Serum-freiem Medium kultiviert werden und sich in einem unstimulierten Zustand befinden, ist das hochphosphorylierte Lipid PtdIns-3,4,5-P₃ nicht nachweisbar. Eine Stimulation der Zellen mit extrazellulären Liganden wie Wachstumsfaktoren oder Hormonen führt zu einem raschen Anstieg des PtdIns-3,4,5-P₃ Spiegels. Dieser Anstieg wird ausgelöst durch die stimulierbare Aktivität der PI3K der Klasse Ia. Abgebaut bzw. dephosphoryliert wird das PtdIns-3,4,5-P₃ durch die Aktivität der Phosphatase PTEN, die damit den Antagonisten des PI3K-Signalweges darstellt [Maehama et al., 2001]. Eine Vielfalt von Proteinen interagiert mit PtdIns-3,4,5-P₃ und transduziert das von der PI3K ausgehende Signal in die Zelle. Die Interaktion mit dem Lipid führt bei den interagierenden Proteinen zu einer Veränderung ihrer Aktivität und zellulären Lokalisation.

Das Überleben der Zelle als Antwort auf pro-apoptotische Signale wird gesteuert über den PtdIns-3,4,5-P₃-PDK-1-Akt/PKB Signaltransduktionsweg. Die mitogene Proteinkinase Akt/PKB bindet über ihre PH Domäne, wie bereits beschrieben, nicht nur PtdIns-3,4,-P₂ sondern auch PtdIns-3,4,5-P₃. Als Folge dieser Bindung findet eine Konformationsänderung der Kinase statt, die einen Bereich zugänglich macht, der für eine vollständige Aktivität an dem funktionellen Rest Thr308 phosphoryliert werden muss [Scheid et al., 2002]. Diese direkte Phosphorylierung erfolgt wiederum über die Kinase PDK-1, die über ihre PH Domäne an PtdIns-3,4,5-P₃ bindet. Diese Bindung hat keinen Einfluss auf die Aktivität der PDK-1, stattdessen bewirkt sie eine Relokalisation des Enzyms vom Zytosol an die Plasmamembran [Alessi et al., 1997; Anderson et al., 1998]. Auch viele Mitglieder, die zur Familie der Protein Kinase C (PKC) gehören, konnten *in vitro* durch PtdIns-3,4-P₂ und PtdIns-3,4,5-P₃ direkt aktiviert werden. Zusätzlich werden einige dieser PKC's (PKC δ , PKC ζ) nach dem gleichen Mechanismus, wie bereits für die Akt/PKB beschrieben, durch die Kinase PDK-1 phosphoryliert, um ihre maximale Aktivität zu erlangen [Le Good et al., 1998]. Auch die Kinasen PKA (Protein Kinase A), PAK-1 (p21-activated kinase) und p70S6 bilden Substrate der PDK-1 und werden folglich durch den PtdIns-3,4,5-P₃ Spiegel reguliert [Cheng et al., 1998; Tang et al., 1999]. Zusätzlich wird die PH Domäne-beinhaltende Tyrosinkinase „Bruton's tyrosine“ Kinase (Btk) synergistisch über die Bindung von PtdIns-3,4,5-P₃ und über Phosphorylierung durch die Src Tyrosin Kinase reguliert [Li et al., 1997]. Diese Kinase ist in die Entwicklung von B-Lymphocyten involviert.

Die Umbildung des Aktin-Zytoskeletts wird ebenfalls mediiert durch die Bindung von PtdIns-3,4,5-P₃ und Aktivierung des GTP Austauschfaktors für Rac, dem Protein Vav. Da einige Mitglieder der PKC Familie das Zytoskelett beeinflussen und PtdIns-3,4,5-P₃, wie bereits beschrieben, an Isoformen der PKC bindet, erfolgt auch über diesen Weg eine Regulation der Zytoskelett-Organisation.

Ferner interagiert PtdIns-3,4,5-P₃ mit einer Anzahl von GTP Austauschfaktoren, die eine Rolle im vesikulären Transport der Zelle spielen. Ein Protein aus dieser Familie wird repräsentiert durch das Protein Grp1 (general receptor for phosphoinositides oder auch cytohesin), das über seine PH Domäne selektiv an PtdIns-3,4,5-P₃ bindet und mit seiner Sec7 Domäne als Austauschfaktor für die G-Proteine ARF1 sowie ARF5 fungiert [Klarlund et al., 1997;1998].

Abschließend konnte für PtdIns-3,4,5-P₃ auch eine Interaktion mit Phospholipasen, speziell der PLC γ nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 1.3.1.5, Seite 23). Die Bindung des Lipids erfolgt im Bereich der SH2 Domäne des Enzyms und erhöht *in vitro* seine Phospholipase Aktivität. Zusätzlich verfügt die PLC γ auch über eine PH Domäne, die ebenfalls PtdIns-3,4,5-P₃ bindet. Da sowohl die PLC als auch die PKC eine Rolle im Zell-Zyklus sowie der Mitose

spielen und durch eine Bindung an PtdIns-3,4,5-P_3 reguliert werden, sind folglich auch diese beiden Prozesse mit über den PtdIns-3,4,5-P_3 -Spiegel regulierbar.

Bisher konnten bestimmt noch nicht alle Proteine identifiziert werden, die mit PtdIns-3,4,5-P_3 interagieren. Festzuhalten bleibt, dass dieses Lipid einen essentiellen „second messenger“ darstellt, der über seine Interaktion mit vielfältigen Bindungspartnern regulativ in wichtige Zell-Prozesse eingreift. Zusammenfassend sind die Interaktionen in der folgenden Abbildung graphisch dargestellt.

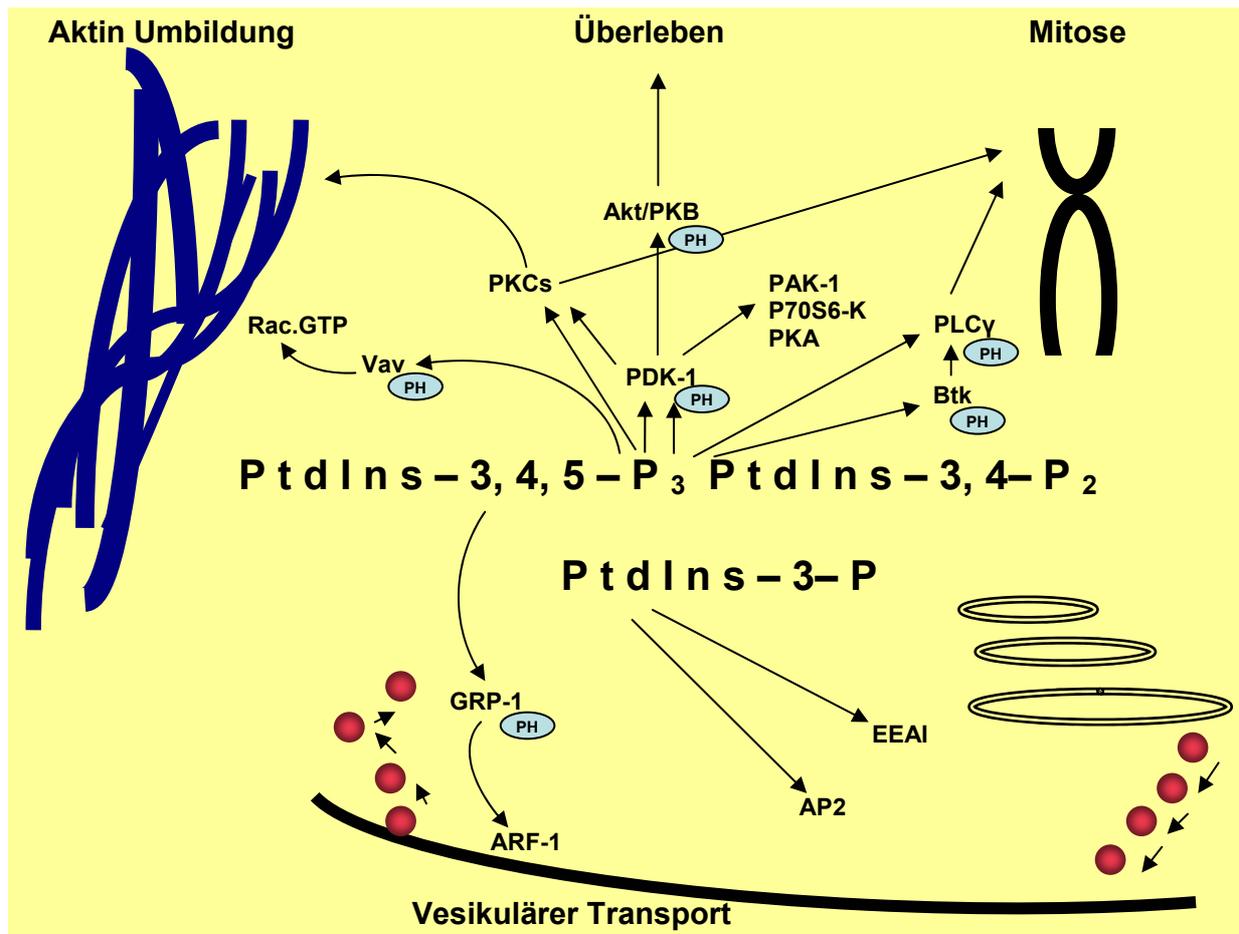


Abbildung 1.1.1.3 Rolle von $\text{PtdIns-3,4,5-P}_3/\text{PtdIns-3,4,-P}_2/\text{PtdIns-3-P}$ in Signaltransduktionswegen

Eine große Anzahl von Effektoren der drei Phosphoinositide $\text{PtdIns-3,4,5-P}_3/\text{PtdIns-3,4,-P}_2/\text{PtdIns-3-P}$ reguliert die Umbildung des Aktin-Zytoskeletts, das Überleben der Zellen, die Mitose und den vesikulären Transport. Eine Auswahl von Proteinen, die mit diesen Lipiden interagieren, ist in dieser Abbildung dargestellt. Viele Proteine, die mit PtdIns-3,4,5-P_3 interagieren, tun dies auch mit PtdIns-3,4-P_2 . Eine detaillierte Charakterisierung der einzelnen hier aufgeführten Proteine findet sich im vorangegangenen Textabschnitt.

1.1.2 Rolle der Inositolphosphate in Signaltransduktionswegen

Das Eingangssubstrat für die Generierung der hydrophilen, diffusiblen Inositolphosphate bildet das membranständige PtdIns-4,5-P_2 , das durch die Aktivität der Rezeptor gekoppelten Phospholipase C (PLC) zu Inositol 1,4,5-trisphosphat (InsP_3) und Diacylglycerol (DAG)

hydrolysiert wird. Auf diese Weise nimmt die Phospholipase C, von der in Säugetieren mittlerweile elf Isoformen identifiziert wurden, die zu vier Gruppen von Subfamilien (β , γ , δ und ϵ) zusammengefasst werden konnten, eine Schlüsselfunktion im Phosphoinositid-/Inositolphosphat Metabolismus ein [Rhee S.G., 2001]. Die Regulation der PLC Aktivität erfolgt im Zellsystem über zwei zentrale Signalwege.

1.1.2.1 Generierung der „second messenger“ Inositol 1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol über die Aktivität der Phospholipase C (PLC)

Aktivierung der PLC γ Isoenzyme über Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosin Kinase Aktivität

Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor) und viele weitere induzieren in vielen Zellsystemen die Umsetzung des Lipids PtdIns-4,5-P₂, indem sie die PLC γ aktivieren. Die Bindung eines Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor verursacht eine Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten. Sie stimuliert die intrinsische Tyrosin Kinase Aktivität des Rezeptors und ruft eine Autophosphorylierung des Rezeptors an spezifischen Tyrosinresten hervor. Diese phosphorylierten Reste initiieren zelluläre Signale, indem sie als hoch affine Bindungsstellen für SH2 Domänen von unterschiedlichen Effektorproteinen (u. a. die PLC γ) fungieren. Über eine direkte Phosphorylierung oder allosterische Effekte erfolgt die Aktivierung der PLC γ . Diese Aktivierung bewirkt die Hydrolyse des membranständigen Lipids PtdIns-4,5-P₂ zu den zwei „second messengers“ DAG und InsP₃.

Aktivierung der PLC β Isoenzyme über G-Proteine gekoppelte Rezeptoren

Sowohl verschiedene Neurotransmitter wie Adrenalin und Glutamat als auch Hormone wie Vasopressin und Serotonin führen über ihre Bindung an den extrazellulären Bereich von Rezeptoren (GPCR), die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind, zu einer Aktivierung von Isoenzymen der PLC β . Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer α , β und γ Untereinheit, die in ihrer inaktiven GDP-gebundenen Form stabil miteinander assoziiert sind. Die Interaktion eines Liganden mit dem GPCR führt zu einem Austausch von GDP durch GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins, was eine Abdissoziierung des β/γ -Dimers zur Folge hat. Nicht nur die GTP- α -Untereinheit, sondern auch der β/γ -Komplex spielen eine Rolle in der intrazellulären Signalweiterleitung. Sowohl die α -Untereinheit im Komplex mit GTP als auch der β/γ -Komplex können nun Phospholipase C-Isoenzyme (α -Untereinheit: PLC β_1 , β/γ -Komplex: PLC β_2) aktivieren und die hydrolytische Spaltung des Membranlipids PtdIns-4,5-P₂ katalysieren. Die α -Untereinheiten der G-Proteine können in vier Subfamilien unterteilt

werden: $G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G_q\alpha$ und $G_{12}\alpha$. Die Aktivierung der PLC erfolgt über die α -Untereinheiten von Mitgliedern der Gq (α_q , α_{11} , α_{14} und α_{16}) Subfamilie.

Reguliert wird die Signalübertragung über die intrinsische GTPase Aktivität der α -Untereinheit. Als Folge der Hydrolyse von GTP zu GDP an der α -Untereinheit erfolgt eine Reassoziierung dieser Untereinheit mit dem β/γ Komplex und es entstehen wieder aktivierbare G-Proteine.

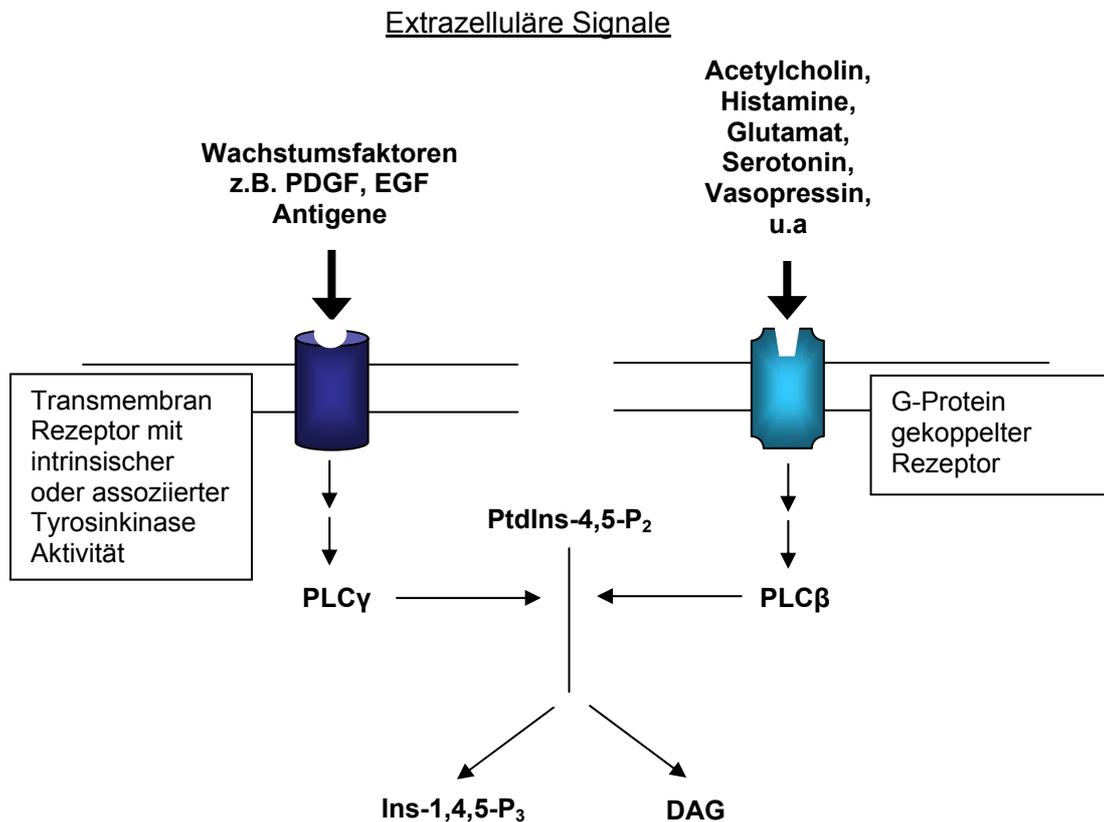


Abbildung 1.1.2.1 Aktivierung von Isoenzymen der Phospholipase C (PLC)

Die Aktivierung der PLC kann entweder über Transmembran-Rezeptoren erfolgen, die eine intrinsische oder assoziierte Tyrosinkinase Aktivität besitzen oder über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Eine Bindung von Liganden wie Wachstumsfaktoren oder Antigene an den Rezeptor vom ersten Typ bewirkt eine Aktivierung der PLC γ (links dargestellt). Die Aktivierung der PLC β wird hingegen über die Bindung von Neurotransmittern oder Hormonen an den G-Protein gekoppelten Rezeptor gesteuert (rechts dargestellt). Beide Aktivierungswege bewirken die hydrolytische Spaltung des membranständigen Lipids PtdIns-4,5-P $_2$ in die zwei wichtigen Botenstoffe DAG und Ins-1,4,5-P $_3$.

Unabhängig von der Aktivierungsweise der PLC bewirkt die Hydrolyse des Lipids PtdIns-4,5-P $_2$ die Generierung der „second messenger“ Inositol 1,4,5-trisphosphat (InsP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). Während DAG an der Plasmamembran verbleibt und dort teilweise zusammen mit Ca $^{2+}$ und Phospholipiden die Serin/Threonin spezifische Proteinkinase C aktiviert (siehe Abschnitt 1.3.1.4, Seite 23), bewirkt das frei im Zytosol diffusible InsP $_3$ die Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus Speicherorganen. Die Bindung von InsP $_3$ an InsP $_3$ -Rezeptoren, die sich in Membranen von ER abgeleiteten Speicherorganen befinden und neben ihren Rezeptorfunktionen als Calciumkanäle fungieren, bewirkt die Öffnung dieser Ionenkanäle gefolgt von einem Anstieg der zytosolischen Ca $^{2+}$ -Konzentration. Dabei erfolgt die Öffnung des

aus vier identischen Untereinheiten bestehenden Ionenkanals unter der Beteiligung weiterer Faktoren wie Ca^{2+} , Mg^{2+} und ATP. Ca^{2+} wiederum stellt ein zentrales Signalmolekül dar, dessen Anstieg im Zytosol eine Reihe von zellulären Reaktionen hervorruft. Zu diesen Ca^{2+} -abhängigen Reaktionen gehören z.B. Muskelkontraktion, Zellproliferation, Sehprozesse, Sekretion, Zellmobilität in Verbindung mit der Formation des Zytoskelettes, Genexpression und Reaktionen des intermediären Metabolismus [Clapham, 1995].

1.1.2.2 Multiple Funktionen der Inositolphosphate in zellulären Systemen

InsP_3 bildet das Ausgangssubstrat für die Bildung einer Vielfalt von Inositolphosphaten, die als Signalmoleküle wichtige zelluläre Prozesse steuern [Irvine et al., 2001]. Dabei erfolgt die Generierung der Inositolphosphate und Inositolpyrophosphate ausgehend von der Aktivität spezifischer Inositolphosphat-Kinasen und -Phosphatasen, deren Aktivität über unterschiedliche Mechanismen reguliert wird. Eine detaillierte Charakterisierung von Schlüsselenzymen des Inositolphosphatstoffwechsels erfolgt in den Abschnitten 1.2 und 1.3.

Einen Einblick in den Inositolphosphatmetabolismus mit den bisher für Eukaryonten beschriebenen Synthesewegen zeigt die folgende Abbildung. Anschließend erfolgt eine Diskussion bisher entdeckter Funktionen einzelner Inositolphosphate.

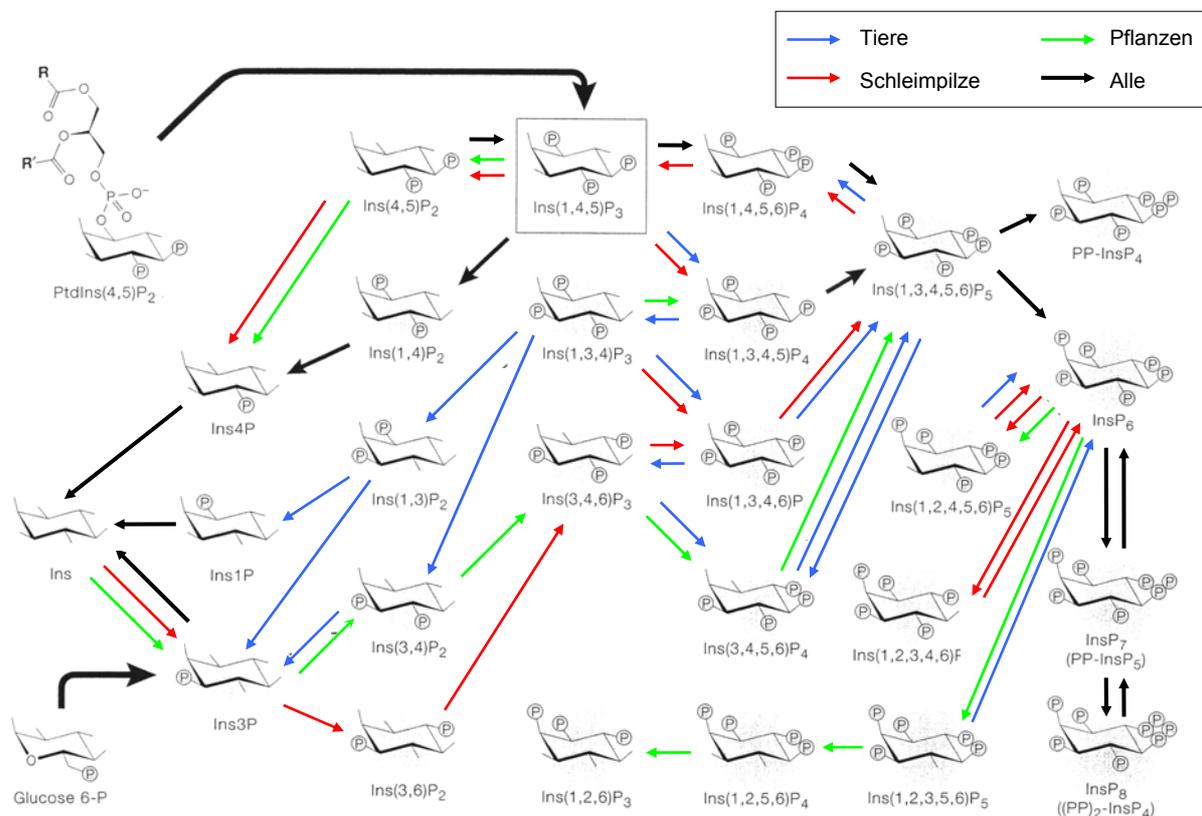


Abbildung 1.1.2.2 Schematische Übersicht der Inositolphosphate in eukaryontischen Zellen

In dieser Abbildung sind die metabolischen Zusammenhänge der Inositolphosphate von den niederen Schleimpilzen (rote Pfeile) über die Pflanzen (grüne Pfeile) bis hin zu den Tieren (blaue Pfeile) beschrieben. Wege die in allen Organismen identifiziert werden konnten sind mit schwarzen Pfeilen markiert [verändert nach Irvine et al., 2001].

Funktion des Inositolphosphats Ins-1,3,4,5-P₄

Ins-1,3,4,5-P₄ ist das katabole Produkt der Umsetzung des „second messengers“ Ins-1,4,5-P₃ durch die Aktivität der IP₃-Kinase und stellt wiederum selbst einen wichtigen Botenstoff dar, der wie sein Ausgangssubstrat InsP₃ eine essentielle Rolle in der Regulation zytosolischer Calciumkonzentrationen spielt. Ins-1,3,4,5-P₄ und Ins-1,4,5-P₃ werden über die Aktivität der gleichen 5-Phosphatase abgebaut, wobei diese Phosphatase mit einer 10fach höheren Affinität an Ins-1,3,4,5-P₄ bindet, es aber 100fach langsamer metabolisiert als das Substrat Ins-1,4,5-P₃. Kommt es innerhalb eines bestimmten Zeitraumes erneut zu einer Stimulation der Zellen durch Ins-1,4,5-P₃, kann das Ins-1,4,5-P₃ Signal nicht schnell abgebaut werden, da die 5-Phosphatase durch die Bindung an Ins-1,3,4,5-P₄ inhibiert ist. Bei diesem durch Hermosura et al. [2000] an der Mastzelllinie RBL-2H3 beobachteten Mechanismus, handelt es sich um eine kompetitive Inhibition der 5-Phosphatase durch Ins-1,3,4,5-P₄. Als Folge dieser Inhibition wird Ins-1,4,5-P₃ vor der Hydrolyse durch die 5-Phosphatase geschützt und seine Effektivität als „second messenger“ erhöht. Zusätzlich hat Ins-1,3,4,5-P₄ einen Einfluss auf die zytosolische Calciumkonzentration, indem es in unterschiedlichen Zelllinien aktivierend auf die Öffnung von Calciumkanälen in der Plasmamembran wirkt [Luckhoff et al., 1992; Tsubokawa et al., 1996; Szinyei et al., 1999]. Des Weiteren steuert Ins-1,3,4,5-P₄ synergistisch mit Ins-1,4,5-P₃ die Mobilisierung von Ca²⁺, indem die Absenkung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels in den ER-Speichern als Folge der Aktivierung des IP₃-Rezeptors zu einer Aktivierung des Ca²⁺-Einstroms über Kanäle in der Plasmamembran (SOCC= store operated calcium channel) führt.

Ins-1,3,4,5-P₄ bindet zusätzlich mit einer hohen Affinität an GAP 1^{IP₄BP}, das zur Familie der GAP 1 Proteine gehört [Irvine et al., 1999]. Für dieses Mitglied der Gap 1 Familie konnte *in vitro* eine stimulierende Wirkung auf die intrinsische GTPase Aktivität kleiner G-Proteine der ras Familie sowie von Rap 1a nachgewiesen werden.

Funktion des Inositolphosphats Ins-3,4,5,6-P₄

In epithelialen Zellen spielt das Ins-3,4,5,6-P₄ eine wichtige Rolle bei der Sekretion von Chlorid, indem es als ein physiologisch wichtiger Inhibitor für Ca²⁺ regulierende Cl⁻-Kanäle fungiert [Xie et al., 1996, 1998; Ismailov et al., 1996; Nilius et al., 1998]. Dieses Inositol-tetrakisphosphat Isomer wird aus dem Ins-1,4,5-P₃ gebildet und stellt mit seiner Wirkung auf den Chlorid-Kanal einen wichtigen Regulator des zellulären Elektrolythaushaltes dar.

Zusätzlich inhibiert das Inositoltrisphosphat Isomer Ins-1,3,4-P₃ kompetitiv die Ins(3,4,5,6)P₄ 1-Kinase und beeinflusst auf diese Weise ebenfalls die osmotischen Verhältnisse in der Zelle [Tan et al., 1997].

Funktion des Inositolphosphats Ins-1,4,5,6-P₄

Bisher gibt es wenig Hinweise, die auf eine spezifische Funktion dieses Inositoltetraakisphosphat Isomers als wichtiger „second messenger“ hindeuten. Einzige Hinweise liefert der beobachtete Anstieg der Konzentration von Ins-1,4,5,6-P₄ in Zellen, die mit *Salmonella dublin* infiziert wurden [Eckmann et al., 1997]. Diese Infektion inhibiert über einen unbekanntenen Mechanismus die von der PI3K ausgehende Signalweiterleitung, die wiederum durch die Aktivierung von EGF-Rezeptoren bewirkt wird.

Funktion des Inositolphosphats Ins-1,3,4,5,6-P₅

Bis auf wenige Ausnahmen ist Ins-1,3,4,5,6-P₅ das dominierende Inositolpentakisphosphat Isomer in Säugerzellen [Stephens et al., 1991]. In Erythrozyten unterschiedlicher Wirbeltier-Spezies verringert Ins-1,3,4,5,6-P₅ die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, nach einem Mechanismus der dem des 2,3-Bisphosphoglycerates gleicht [Coates M.L., 1975].

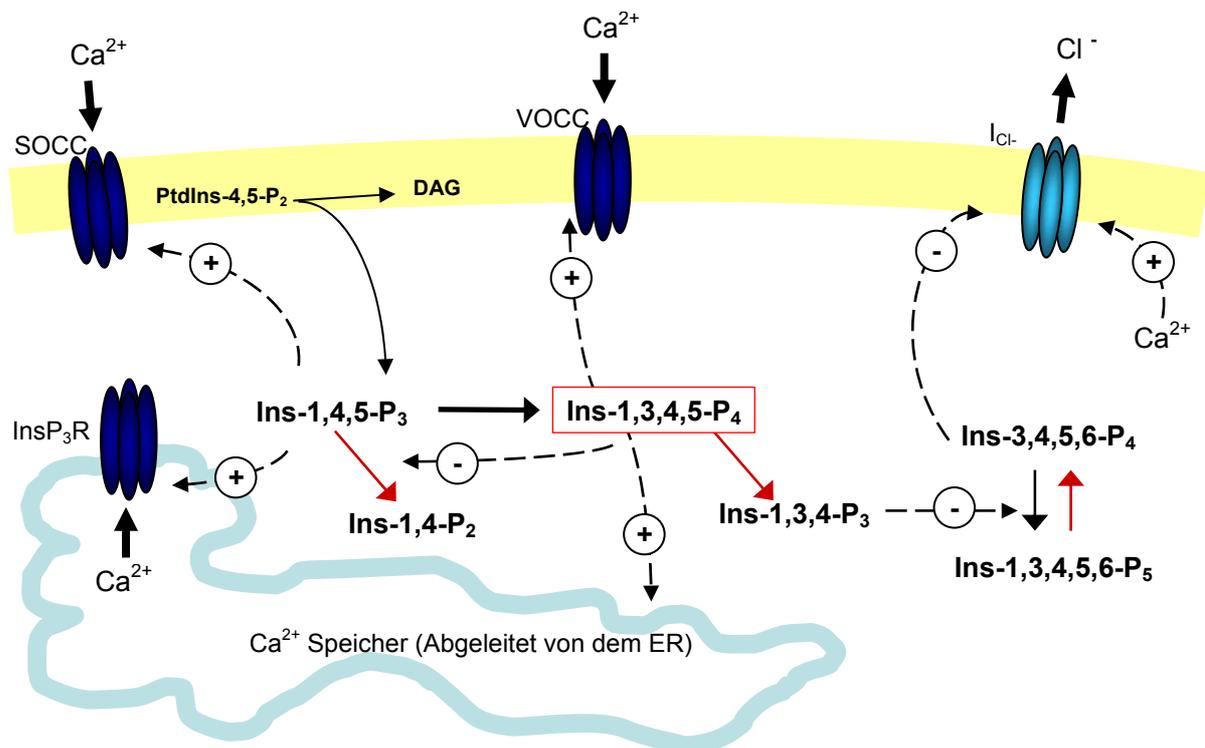


Abbildung 1.1.2.3 Wirkung von Inositolphosphaten, speziell der des Ins-1,3,4,5-P₄, auf den Elektrolythaushalt einer Zelle

Die hydrolytische Spaltung des membranständigen Lipids PtdIns-4,5-P₂ in DAG und Ins-1,4,5-P₃ eröffnet die Synthese von multiplen Inositolphosphaten, die als Folge der Aktivität von spezifischen Inositolphosphat-Kinasen und -Phosphatasen aus dem Eingangssubstrat Ins-1,4,5-P₃ generiert werden. Speziell die Synthese des Ins-1,3,4,5-P₄ hat einen direkten und indirekten Einfluss auf die osmotischen Verhältnisse der Zelle. Umsetzungen der einzelnen Inositolphosphate sind, sofern es sich um Phosphorylierungen handelt, mit einem schwarzen Pfeil, Dephosphorylierungen sind hingegen mit einem roten Pfeil aufgezeigt. Aktivierungen bzw. Inhibierungen von Kanälen oder Synthesewegen durch einzelne Inositolphosphate sind mit einem unterbrochenen Pfeil gekennzeichnet. (SOCC= Store operated Ca²⁺-channel, VOCC= Voltage operated Ca²⁺-channel, I_{Cl}⁻= Cl⁻-Kanal, InsP₃R= Ins-1,4,5-P₃-Rezeptor) [verändert nach Irvine et al., 2001]

Funktion des Inositolphosphats Ins-1,2,3,4,5,6-P₆

Das Ins-1,2,3,4,5,6-P₆ oder auch Phytat wurde als erstes Inositolphosphat entdeckt und bereits 1919 von Posternak als die wesentliche Speicherform von Phosphat in pflanzlichen Keimlingen beschrieben. Zusätzlich wurden in Pflanzen Hinweise auf eine Aktivierung von K⁺-Kanälen in Schließzellen durch dieses hochphosphorylierte Inositolphosphat entdeckt [Lerntin-Chlieh et al., 2000].

In den letzten Jahren sind auch in Mammalia viele unterschiedliche Hinweise auf die Funktion des Ins-1,2,3,4,5,6-P₆ entdeckt worden z.B. die Inhibition von Protein-Phosphatasen [Larsson et al., 1997] und die Aktivierung der PKC [Efanov et al., 1997]. Zusätzlich deuten viele *in vitro* Experimente auf eine Rolle dieses Inositolphosphates bei der Sekretion und dem vesikulären Transport hin, da eine Interaktion mit den vesikulären Adapter-Proteinen AP2 sowie AP180/AP3 [Vogelmaier et al., 1992; Norris et al., 1995], mit Arrestin [Gaidarov et al., 1999] und Synaptotagminen [Fukuda et al., 1995] nachgewiesen werden konnte. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtungen konnte bisher noch nicht bestätigt werden. Ein Problem bei der Bewertung der Hinweise stellt die hohe negative Ladung des Moleküls dar, die es mit vielen positiv geladenen Gruppen von Proteinen oder Kationen interagieren lässt, deren Relevanz *in vivo* nicht gegeben ist.

Eine weitere interessante Funktion des InsP₆ ist, dass es sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Zellen als Antioxidans wirkt [Graf et al., 1987; Hawkins et al., 1993].

Neuere Erkenntnisse über eine mögliche Rolle des Inositolphosphats im vesikulären Transport liefern die Untersuchungen von Hilton und Mitarbeitern [Hilton et al., 2001], die eine InsP₆ stimulierbare Proteinkinase identifizieren konnten die spezifisch die Proteine Pacsin/Syndapin I phosphoryliert. Diese Proteine spielen in Synapsen wiederum eine Rolle beim Recycling von Vesikeln.

Auch konnte im Zellkern von *S. cerevisiae* dem Inositolhexakisphosphat eine Rolle beim Export von mRNA aus dem Zellkern zugeordnet werden [York et al., 1999]. Neueste Ergebnisse zeigen diese Bedeutung hochphosphorylierter Inositolphosphate für einen effizienten nukleären mRNA-Export auch in Säugerzellen [Feng et al., 2001].

Abschließend konnte dem InsP₆ eine zweite Funktion im Zellkern zugeordnet werden. Bei *in vitro* Untersuchungen von DNA-Reparaturmechanismen nach Doppelstrang-Brüchen (DNA end-joining) an Zellkernextrakten konnte ein Faktor erkannt werden, der für die Aktivität einer DNA abhängigen Kinase essentiell ist. Zusätzlich zur Identifizierung dieses Faktors als InsP₆ konnte die putative InsP₆ Bindungsdomäne an der DNA abhängigen Kinase identifiziert werden [Hannakahi et al., 2000].

Eine kritische Diskussion der postulierten Funktionen für das hochphosphorylierte Inositolphosphat InsP₆ bietet der Review-Artikel von Shears [2001].

Funktionen der Inositolpyrophosphate InsP₇/InsP₈

Beide Inositolpyrophosphate konnten bisher in dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* nachgewiesen werden, wobei das InsP₇ mittlerweile auch in Säugerzellen identifiziert werden konnte [Alberts et al., 1997]. Fast alle Proteine die bisher mit InsP₆ interagieren, binden, teilweise mit einer noch höheren Affinität, an InsP₇ und InsP₈ [Ye et al., 1995].

1.2 Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase als ein zentrales Schaltelement des Inositolphosphatmetabolismus

1.2.1 Einordnung der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase in die Proteinfamilie der Inositolphosphat Kinasen

Die Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (IP3K) gehört zur Proteinfamilie der Inositolphosphat Kinasen (IPK), die aufgrund ihrer hochkonservierten katalytischen Domäne einander zugeordnet werden können. Zur Familie der Inositolphosphat-Kinasen gehören drei Subklassen: die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen, die Inositolhexakisphosphatkinasen (IP6K) und die Inositolpolyphosphatmultikinasen (IPMK). Diese Enzyme zeichnen sich durch das hochkonservierte Aminosäuremotiv **P-X-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G** aus, das als PDKG-Motiv bezeichnet wird [Bertsch et al., 2000; Deschermeier C., Dissertation, 2002].

1.2.2 Schlüsselfunktion der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase im Inositolphosphatmetabolismus

Die Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP3K) katalysieren hochspezifisch die Übertragung des γ -Phosphates von Adenosintrisphosphat (ATP) auf die 3'-Hydroxylgruppe am dritten Kohlenstoffatom des D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphates. Diese Reaktion dient nicht nur der sofortigen Generierung des D-myo-Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphats bei gleichzeitiger Entfernung des D-myo-Inositol-1,4,5-trisphosphates, des Weiteren kann darüber eine Equilibrierung bestimmter intrazellulärer D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat-Konzentrationen erfolgen. Das D-myo-Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat fungiert wiederum als Eingangsubstrat für die Biosynthese von multiplen Inositolphosphaten, die in ihren Funktionen als „second messenger“ wichtige zelluläre Prozesse steuern.

Mit der Synthese des D-myo-Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphats haben die Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP3K) gemeinsam mit den Inositolphosphatmultikinasen (IPMK) eine Schlüsselfunktion im Inositolphosphatstoffwechsel.

1.2.3 Isoformen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase in Vertebraten

Erste Hinweise auf die Existenz unterschiedlicher Isoformen oder proteolytischen Abbau der Kinase ergaben die Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen und Geweben, wie humanen Hirn-Homogenaten, aus der Ratte stammenden Zellen der Schilddrüse, humanen Lymphozyten und Blutplättchen [Takazawa et al., 1991; D'Santos et al., 1994; Communi et al., 1994].

Bisher konnten drei cDNA-Sequenzen, die für drei Isoformen der Inositoltrisphosphat 3-Kinase codieren, in Vertebraten identifiziert werden. Diese werden nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung als Isoform A, B sowie C bezeichnet.

Bereits 1990 wurde von Choi et al. die cDNA der Ratten-Isoform A kloniert, die für ein Protein bestehend aus 449 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von ~ 50kDa codiert. Die humane Isoform A mit einem berechneten Molekulargewicht von ~ 51kDa und eine weitere Isoform, als Isoform B bezeichnet, mit einem kalkulierten Molekulargewicht von ~ 53kDa wurden kurz darauf von Erneux und Mitarbeitern kloniert [Takazawa et al. 1991]. Eine weitere Isoform der humanen IP3K, als Isoform C bezeichnet, wurde ebenfalls von Erneux und Mitarbeitern kloniert [Dewaste et al., 2000]. Die cDNA dieser Isoform codiert für ein Protein bestehend aus 683 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von ~ 75kDa.

Allen bisher identifizierten Isoformen gemein ist ihr modularer Aufbau, der sich aus einer C-terminal gelegenen katalytischen Domäne, gefolgt von einer Calmodulin-Bindungsdomäne und einem N-terminalen Bereich zusammensetzt. Im Bereich ihrer katalytischen Domäne sowie ihrer Calmodulin-Bindungsdomäne weisen die Isoformen hohe Sequenzhomologien zueinander auf. Sequenzunterschiede ergeben sich hauptsächlich in den N-terminalen Bereichen, denen eine Funktion bei der Regulation und Zielsteuerung der Kinasen zukommt. Des Weiteren unterscheiden sich die Isoformen anhand ihres Expressionsmusters, ihrer Regulation und ihrer Lokalisation.

In Northern-Blot Analysen unterschiedlicher Rattengewebe (Thymusdrüse, Hoden, Gehirn, Milz, Leber, Niere, Herz, Lunge und Darm) konnte auf Ebene der mRNA für die Isoform B eine Expression in Geweben der Lunge, der Thymusdrüse, der Hoden, des Gehirns sowie des Herzens nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte durch Northern-Blot Analysen die Isoform A nur in den Geweben des Gehirns und der Hoden nachgewiesen werden [Vanweyenberg et al., 1995]. Die Expression der Isoform C konnte ebenfalls anhand von Northern-Blot Analysen unterschiedlicher humaner Gewebe nachgewiesen werden. Bei diesen Untersuchungen konnte ein Transkript von 3,9kb deutlich in den Geweben aus der Bauchspeicheldrüse, dem Skelettmuskel, der Leber, der Lunge, der Plazenta und dem Herz, sowie schwach in den Geweben aus der Niere und dem Gehirn detektiert werden [Dewaste et al., 2000].

1.2.4 Differentielle Regulation von Isoformen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase in Vertebraten

Bisher konnten zwei Typen von Mechanismen identifiziert werden über die eine Regulation der Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase erfolgt. Erstens eine direkte Bindung des Ca^{2+} / Calmodulin-Komplex an die Calmodulin-Bindungsdomäne und zweitens eine posttranslationale Modifikation in Form einer Phosphorylierung durch Proteinkinasen.

Während die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an die Isoform A maximal zu einer Verdoppelung der spezifischen Aktivität des Enzyms führt, konnte die spezifische Aktivität der Isoform B um fast das 20fache gesteigert werden [Communi et al., 1997; 1999]. Auf die Isoform C hingegen scheint die Anwesenheit von Ca^{2+} nicht aktivitätssteigernd zu wirken. So wurde in dieser Isoform in Abhängigkeit von der Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin die spezifische Aktivität lediglich um den Faktor 1,2-1,5 erhöht. Zusätzlich konnte in transfizierten COS-7 Zellen für die Isoform C eine Inhibition der Kinase-Aktivität in Anwesenheit von 10 μM Calcium beobachtet werden [Dewaste et al., 2000].

In vivo konnte sowohl für die Isoform A als auch für die Isoform B eine Phosphorylierung durch die Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMK II) nachgewiesen werden [Communi et al., 1997; 1999]. Zusätzlich konnte für die Isoform B *in vivo* eine Phosphorylierung durch die Protein Kinase C (PKC) beobachtet werden [Communi et al., 1999]. In beiden Isoformen bewirken diese posttranslationalen Modifikationen eine Steigerung der spezifischen Aktivität der Enzyme. Zusätzlich konnte für die Isoform A eine 25fach erhöhte Sensitivität gegenüber dem Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex nach Phosphorylierung ermittelt werden. Für alle drei Isoformen konnten weitere putative Phosphorylierungsstellen für unterschiedliche Serin/Threonin spezifische Proteinkinasen wie z.B. PKC, PKA, CaMK II, Caseinkinase I und II identifiziert werden, deren physiologische Relevanz bisher noch ungeklärt ist. Alle bisher beschriebenen Regulationsmechanismen erfolgen entweder in der katalytischen Domäne oder in der Calmodulin-Bindungsdomäne. Die Rolle der N-terminalen Bereiche insbesondere die Isoform B betreffend, deren N-terminaler Bereich fast 2/3 des Enzyms ausmacht, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Einzig die Funktion der N-terminalen 66 Aminosäuren der Isoform A konnte von Irvine und Mitarbeitern aufgeklärt werden. So konnte für diese Isoform eine Bindung an F-Aktin in dendritischen Dornen identifiziert werden, für die eine Aktin-Bindungsdomäne im äußersten N-Terminus der Kinase verantwortlich ist [Schell et al., 2001].

Eine weitere Rolle bei der Regulation könnten die auf Ebene der Primärstruktur in den N-terminalen Bereichen der Isoformen A und B angeordneten PEST-Sequenzen spielen [Choi et al., 1990; Dewaste et al., 2002]. PEST-Sequenzen fungieren normalerweise als proteolytische Signale, unter anderem auch für die Proteasen Calpain I und II und treten

häufig in Proteinen mit geringer Halbwertszeit auf [Rechensteiner, 1990]. So könnte auch über diesen Mechanismus eine Regulation der Inositoltrisphosphat 3-Kinasen erfolgen.

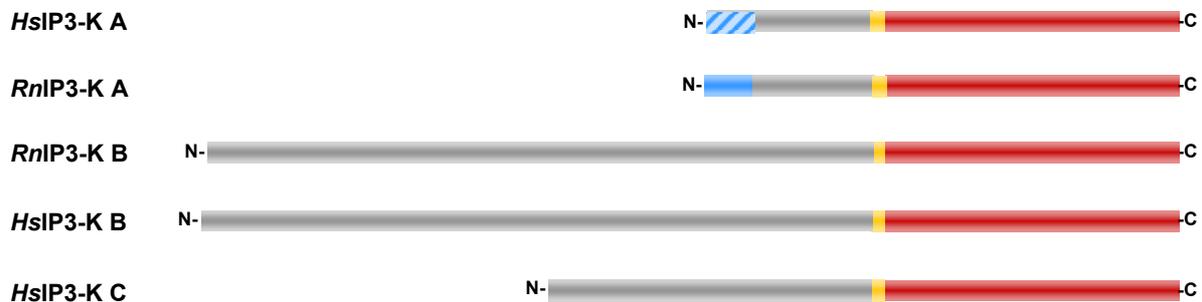


Abbildung 1.2.4.1 Schematische Darstellung der bisher identifizierten Isoformen der IP3K unterschiedlicher Spezies

An die C-terminal gelegene katalytische Domäne (rot) der Kinasen schließt sich die Calmodulin-Bindungsdomäne (gelb) an. In diesen Bereichen weisen die Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen Isoformen hohe Homologien zueinander auf. Unterschiede zwischen den Isoformen ergeben sich hauptsächlich in den grau dargestellten N-terminalen Bereichen der IP3K. Blau dargestellt ist die identifizierte Aktin-Bindungsdomäne in der Isoform A der Ratte, der dazu homologe Bereich in der humanen Isoform A ist schraffiert.

1.3 Mechanismen der Zielsteuerung und Regulation von Schlüsselenzymen des Phosphoinositid/Inositolphosphat Metabolismus

Viele Schlüsselenzyme des Phosphoinositid/Inositolphosphat Metabolismus werden über unterschiedliche Mechanismen zu ihrem Wirkungsort gesteuert und teilweise über ihre Zielsteuerung bzw. Lokalisation reguliert. Dabei kann die Steuerung zu und/oder die Lokalisation an einem Wirkungsort über eine direkte Bindung des Enzyms an Bestandteile des Wirkungsorts oder indirekt über die Bindung des Enzyms an Proteine die wiederum am Wirkungsort lokalisiert sind erfolgen.

Enzyme, die eine essentielle Rolle im Metabolismus der membranständigen, hydrophoben Phosphoinositide spielen, werden zu ihren Substraten an unterschiedliche Membranstrukturen gesteuert und sind dort hauptsächlich lokalisiert. Zu diesen Membranstrukturen gehören sowohl die Plasma- und Kernmembran als auch das Membransystem des ER und des Golgi-Apparates. Im Gegensatz zu den hydrophoben Phosphoinositiden deren Umsetzung ausschließlich an Membranen stattfindet, erfolgt die Verstoffwechslung der Inositolphosphate aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften bevorzugt im wässrigen Milieu bzw. dem Zytosol. Eine Zielsteuerung von Schlüsselenzymen des Inositolphosphatmetabolismus konnte bisher an vielfältige zelluläre Komponenten wie z.B. der Plasmamembran, dem Zytoskelett, dem ER und dem Zellkern beobachtet werden.

Da Zielsteuerung und Lokalisation der Enzyme oft einhergehen mit einer Regulation ihrer enzymatischen Aktivität und zusätzlich aus der Zielsteuerungsart und dem Lokalisationsort

auch teilweise die Art der Regulation abgeleitet werden kann, soll in diesem Kapitel auf die Topologie einiger Schlüsselenzyme des Phosphoinositid/Inositolphosphat Metabolismus detaillierter eingegangen werden. Des Weiteren werden einige Mechanismen der Zielsteuerung im Zusammenhang mit der Lokalisation z.B. spezifische Interaktionsdomänen wie die PH- und C2-Domänen anhand dieser Schlüsselenzyme erklärt.

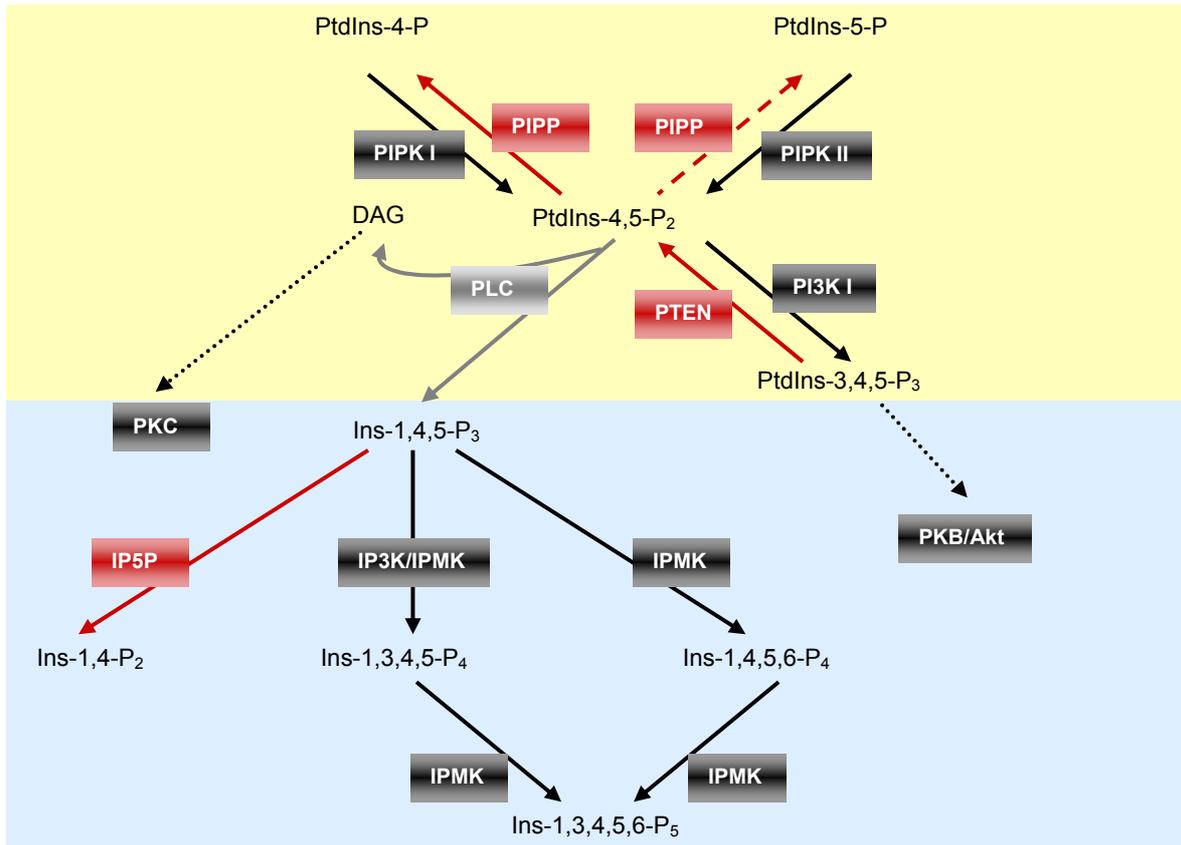


Abbildung 1.3.1 Schlüsselenzyme des Phosphoinositid/Inositolphosphat Metabolismus

In dieser Abbildung sind die von Schlüsselenzymen des gelb bzw. blau unterlegten Phosphoinositid-/Inositolphosphat Metabolismus katalysierten Reaktionen abgebildet. Dabei sind Phosphorylierungen durch Kinasen mit schwarzen, durchgezogenen Pfeilen markiert. Dephosphorylierungen durch Phosphatasen sind hingegen durch rote Pfeile markiert. Die Hydrolyse des PtdIns-4,5-P₂ durch das Enzym PLC ist grau dargestellt. Zusätzlich sind die Wirkung der Produkte DAG und PtdIns-3,4,5-P₃ auf die Kinasen PKC bzw. PKB/Akt mit einem unterbrochenen Pfeil gekennzeichnet. Auf die Topologie der dargestellten Schlüsselenzyme des Phosphoinositid/Inositolphosphat Metabolismus soll in diesem Kapitel näher eingegangen werden.

1.3.1 Topologie von Schlüsselenzymen des Phosphoinositid/Inositolphosphat Metabolismus

1.3.1.1 Die Phosphatidylinositol Phosphat Kinasen der Klasse I & II (PIPK I & II)

Die Phosphatidylinositol Phosphat Kinasen können zunächst anhand ihrer Substratspezifität generell in zwei Klassen unterteilt werden, die wiederum in drei Isoformen eingeteilt werden können [Ciruela et al., 2000]. Phosphatidylinositol Phosphat Kinasen der Klasse I phosphorylieren hauptsächlich PtdIns-4-P; PtdIns-5-P wird hingegen von der zweiten Klasse der

Phosphatidylinositol Phosphat Kinasen präferiert metabolisiert. Für viele Isoformen der Kinasen wurden bereits unterschiedliche Mechanismen der Zielsteuerung aufgedeckt.

So wird die Zielsteuerung an die Plasmamembran oder an den Golgi-Apparat der α -Isoform, die zu der ersten Klasse dieser Kinasen gehört, über die GTPasen ARF6 und ARF1 realisiert [Jones et al., 2000].

Bei der α -Isoform der Klasse II hingegen handelt es sich generell um ein Enzym mit einer vorherrschend zytosolischen Lokalisation, für das jedoch eine spezifische Zielsteuerung identifiziert werden konnte. So bewirkt eine Phosphorylierung dieser Isoform durch die Casein-Kinase II (CKII) eine Translokation der Kinase vom Zytosol zur Plasmamembran. Für die β -Isoform konnte ebenfalls eine Zielsteuerung über einen ganz anderen Mechanismus identifiziert werden. In dieser Isoform konnte mittels Transfektionsstudien an HeLa-Zellen eine isoform-spezifische 17 Aminosäuren umfassende α -Helix identifiziert werden, die für die Lokalisation der Kinase im Zellkern verantwortlich ist [Ciruela et al., 2000]. Im Gegensatz dazu scheint die γ -Isoform hauptsächlich am ER lokalisiert zu sein.

1.3.1.2 Die Phosphatidylinositol Phosphat Phosphatasen (PIPP)

Diese Gruppe von Phosphatasen kann zunächst in drei Kategorien aufgeteilt werden, die sich aufgrund ihrer Fähigkeit zur Hydrolyse von 3-, 4-, oder 5-phosphorylierten Phosphoinositiden unterscheiden. Aufgrund der Vielfalt unterschiedlicher Phosphatasen wird ihre Topologie nur anhand von zwei charakteristischen Vertretern diskutiert.

Einen prominenten Vertreter der 3-Phosphatasen stellt die auch als Tumorsuppressor beschriebene Phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog) dar, die damit den Antagonisten des PI3K vermittelten Signaltransduktionsweg bildet [Maehama et al., 2001]. Obwohl PTEN eine große Anzahl von putativen regulatorischen Modulen besitzt wie eine N-terminale Phosphoinositid-Bindungsdomäne, eine C2-Domäne, ein PDZ-Bindungsmotiv sowie PEST-Sequenzen und sein Substrat PtdIns-3,4,5-P₃ an der Plasmamembran lokalisiert ist, konnte für diese Phosphatase eine diffuse zytoplasmatische Verteilung beobachtet werden. Die identifizierte N-terminale Phosphoinositid-Bindungsdomäne dieser Phosphatase zeigt Homologien zu einem PtdIns-4,5-P₂-Bindungsmotiv, das in Aktin-regulatorischen Proteinen wie z.B. Gelsolin und Cortactin für die Zielsteuerung dieser Proteine zur Plasmamembran oder dem Zytoskelett verantwortlich ist. Die C2-Domäne der Phosphatase ist ein häufig auftretendes Motiv in Proteinen, die eine Rolle bei Phosphoinositid-vermittelten Signaltransduktionswegen spielen und vermittelt eine Ca²⁺-abhängige Bindung dieser Proteine an Membranen. PDZ-Bindungsmotive stellen Bindungsdomänen für PDZ-Proteine z.B. hDLG dar, die wiederum eine zentrale Rolle bei der Bildung von Protein-Komplexen an der Plasmamembran spielen.

Vertreter der 5-Phosphatasen stellen SHIP 1 und 2 (Src homology (SH) domain-containing inositol 5-phosphatase) dar, die beginnend am N-terminalen Bereich ihrer Sequenz eine SH2-Domäne (Src homology 2), gefolgt von einer zentralen Phosphatase-Domäne und eine prolinreiche Domäne beinhalten. Sequenzunterschiede ergeben sich hauptsächlich in der letztgenannten prolinreichen Domäne. Generell interagieren Proteine über prolinreiche Domänen mit SH3-Domänen anderer Proteine. Für SHIP 2 konnte in unstimulierten COS-7 Zellen eine Lokalisation am Leitsaum („leading-edge“) und im perinukleären, zytosolischen Bereich beobachtet werden. Nach Stimulation der Zellen mit EGF konnte eine Translokation der Phosphatase an Membrankräuselungen („membran ruffles“) beobachtet werden. Verantwortlich für diese Zielsteuerung scheint die prolinreiche Domäne der Kinase zu sein, über die eine Bindung an das wiederum Aktin-bindende Protein Filamin erfolgt [Dyson et al., 2001]. Die generelle Funktion der SH2-Domänen ist die spezifische Erkennung und Bindung von Phosphotyrosinen in Zielproteinen z.B. aktivierten Rezeptortyrosinkinasen. Über die Erkennung von Phosphotyrosinen die sich zumeist an Rezeptoren befinden erfolgt ein Zielsteuerung der SH2 beinhaltenden Proteine an die Membran [Pawson et al., 2002; Krauss, 2000].

1.3.1.3 Die Phosphatidylinositol 3-Kinasen der Klasse IA & IB (PI3K I)

Zur Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinasen gehören verschiedene Kinasen gleicher Funktion, die generell in drei Klassen unterteilt werden können. Die Kinasen unterscheiden sich anhand ihrer katalytischen Untereinheiten, dem Typus ihrer assoziierten Untereinheiten sowie ihrer Substratspezifität. Als ein Vertreter der Phosphatidylinositol 3-kinasen wird hier die Regulation und Zielsteuerung der zur Klasse IA gehörenden α -Isoform erläutert. Diese Isoform ist ein Heterodimer bestehend aus einer katalytischen (p110) - und einer regulatorischen (p85) Untereinheit. Die katalytische Untereinheit beinhaltet den Bereich der mit der regulatorische Untereinheit interagiert, eine Domäne, die für die Bindung des kleinen G-Proteins Ras verantwortlich ist, sowie eine Bindungsdomäne für Phosphoinositide. Die regulatorische Untereinheit beinhaltet zusätzlich zwei SH2-Domänen, eine SH3-Domäne und zwei prolinreiche Domänen [Fruman et al., 1998]. Eine Aktivierung z.B. des PDGF-Rezeptors führt zu einer Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinreste und bewirkt eine Zielsteuerung der Phosphatidylinositol 3-Kinasen über die SH2-Domänen an die Plasmamembran. Die generelle Funktion von SH3-Domänen besteht in ihrer Bindung an prolinreiche Sequenzen anderer Effektorproteine, die eine Rolle in Signaltransduktionswegen spielen. Über diese Funktion können sie nicht nur die subzelluläre Lokalisation des Proteins steuern, sondern auch regulativ auf die Aktivität und Substratspezifität von anderen Enzymen wirken.

1.3.1.4 Die Protein Kinase C (PKC)

Bei der Protein Kinase C Familie handelt es sich um Serin/Threonin spezifische Kinasen deren Aktivität abhängig ist von den Kofaktoren: Diacylglycerol (DAG), Phospholipiden wie Phosphatidylcholin und Ca^{2+} . Da bisher 12 Subtypen der Protein Kinase C in Säugern identifiziert werden konnten, die sich in ihrer Sequenz, Stimulation und Regulation unterscheiden wird auch in diesem Abschnitt die Topologie der PKC nur anhand eines Vertreters vorgestellt [Oancea et al., 1998].

Das ϵ -Isoenzym der Protein Kinase C gehört zu einer Subfamilie dieser Kinasen, die über Lipide (Phosphatidylserin, Diacylglycerol) stimuliert werden, gegenüber Ca^{2+} indes insensitiv sind [Ohno et al., 1988]. In der C1-Domäne dieses Isoenzym konnte ein putatives 8 Aminosäuren umfassendes Aktin-Bindungsmotiv identifiziert werden, das für die Lokalisation der Kinase an Aktin-Filamenten in stimulierten NIH 3T3 Fibroblasten verantwortlich ist. Zusätzlich konnte die Affinität der PKC- ϵ zu F-Aktin *in vitro* durch die Anwesenheit von stimulierenden Phorbolestern stark erhöht werden. Danach scheint diese Bindung zwischen PKC- ϵ und F-Aktin über einen allosterischen Effekt ausgehend von Stimulanzen positiv reguliert zu werden. Auch führte die Bindung an F-Aktin zu einer Erhöhung der Phosphotransferaseaktivität der Kinase, die auf eine Umwandlung des Enzyms in eine aktive Konformation hindeutet [Prekeris et al., 1998].

1.3.1.5 Die Phospholipase C (PLC)

Da es sich bei der Phospholipase C (siehe Abschnitt 1.1.2.1, Seite 10), um ein Enzym handelt von dem viele unterschiedliche Isoformen existieren, die sich nicht nur in ihrer Gewebsverteilung, sondern auch in ihrem strukturellen Aufbau unterscheiden, wird ausschließlich die Topologie der PLC- γ eingehender charakterisiert.

Beginnend am N-terminus der PLC- γ setzt sich das Enzym aus den folgenden Strukturelementen, einer PH-Domäne, einer EF-Hand Domäne, einer X-Domäne, zwei aufeinander folgenden SH2-Domänen, einer SH3-Domäne, einer Y-Domäne und einer C-terminal gelegenen C2-Domäne zusammen.

PH-Domänen sind typische Interaktionsdomänen von Phosphoinositid-bindenden Proteinen und zeichnen sich durch eine Sequenz von ~ 100 -120 Aminosäuren charakteristischer, konservierter Tertiärstruktur aus, über die eine Interaktion mit den Phosphoinositiden PtdIns-3,4-P_2 , PtdIns-4,5-P_2 oder PtdIns-3,4,5-P_3 erfolgen kann. Über die Funktion der EF-Hand Domäne im Zusammenhang mit Isoenzymen der PLC ist bisher nichts bekannt. Generell fungieren diese Domänen als Ca^{2+} -bindende Motive, über die eine Bindung von je einem Ca^{2+} erfolgt. Die X- und Y-Domänen, die allen Phospholipasen C gemein sind, bilden den Kern der katalytischen Domäne. Die Zielsteuerung der PLC- γ an den Plasmamembran durchspannenden aktivierten PDGF-Rezeptor erfolgt hauptsächlich über zwei der

beschriebenen Interaktionsdomänen. Zum einen bindet die weiter N-terminal gelegene SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosine des Rezeptors und zum anderen bindet die PH-Domäne an das membranständige PtdIns-3,4,5-P₃ [Rhee et al., 2001]. Dieser Mechanismus bewirkt nicht nur eine Zielsteuerung, sondern auch eine Aktivierung des Enzyms. Auf die Funktion der EF-Hand Domäne, der SH3-Domäne sowie der C2-Domäne bei der Rezeptor-vermittelten Aktivierung und Translokation der PLC- γ gibt es bisher keine eindeutigen Hinweise.

1.3.1.6 Die Protein Kinase B (PKB/Akt)

Die Protein Kinase B, auch als Akt bezeichnet, gehört zur Familie der Serin Kinasen und spielt eine Rolle bei der Signaltransduktion ausgehend von der PI3K. Die komplexe Aktivierung ausgelöst durch eine Agonist-stimulierte Aktivierung der PI3K erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst erfolgt eine Zielsteuerung der PKB an die Plasmamembran über die PH-Domäne der Kinase, die dort PtdIns-4,5-P₂ und PtdIns-3,4,5-P₃ bindet. Die Bindung an die Plasmamembran bewirkt eine Konformationsänderung der Kinase, worüber eine Autophosphorylierung oder Phosphorylierung durch eine andere Kinase am Serin 473 stattfindet. Die vollständige Aktivität erlangt die PKB über die Phosphorylierung des Threonin 308 mittels der PDK-1 (Protein-abhängige Kinase 1) [Scheid et al., 2002].

1.3.1.7 Die Inositoltrisphosphat 3-Kinase (IP3K)

Unterschiede zwischen Isoformen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen ergeben sich in den Aminosäuresequenzen ihrer nicht katalytisch-aktiven N-terminalen Bereiche (siehe Abschnitt 1.2.3, Seite 17). Bisher konnte nur für die Isoform A eine Zielsteuerung an Aktin in dendritischen Dornen neuronaler Zellen beobachtet werden. Diese Zielsteuerung wird über eine 66 Aminosäuren umfassende Aktin-Bindungsdomäne im äußeren N-terminalen Bereich der Kinase vermittelt [Schell et al., 2001]. Auf eine Zielsteuerung der beiden anderen Isoformen vermittelt über spezifische Bindungsdomänen gab es bisher keine Hinweise. Meine Ergebnisse zeigen jedoch, dass auch die Isoform B an Aktinfilamente binden kann.

1.3.1.8 Die Inositolphosphat 5-Phosphatase (IP5P)

Die Inositolpolyphosphat 5-Phosphatasen hydrolysieren spezifisch Phosphat an der D-5 Position von Inositolphosphaten und Phosphoinositiden. Allen Inositolpolyphosphat 5-Phosphatasen gemein sind zwei hoch konservierte katalytische Motive. Anhand ihrer Substratspezifität können sie jedoch generell in drei Gruppen unterteilt werden. Die auch als Typ I bezeichneten Phosphatasen hydrolysieren ausschließlich die hydrophilen Inositolphosphate Ins-1,4,5-P₃ und Ins-1,3,4,5-P₄ an der 5-Position. Die zweite Gruppe wird gebildet von den bereits vorgestellten Phosphatasen SHIP 1 und 2. Vertreter der Typ II Phosphatasen sind

auch die Synaptojanine I und II die sowohl die hydrophilen Inositolphosphate als auch die hydrophoben Phosphoinositide hydrolysieren.

Das Enzym, dessen Topologie nachfolgend repräsentativ für die Vertreter der Inositolpolyphosphat 5-Phosphatasen charakterisiert wird, gehört zur dritten Gruppe, zum Typ II dieser Phosphatasen und wird aufgrund seines hohen Gehaltes an Prolinen auch als PIPP (proline-rich inositol polyphosphate 5-phosphatase) bezeichnet [Mochizuki et al., 1999]. In der Aminosäuresequenz der PIPP konnten ein putatives SH3-Bindungsmotiv und sechs putative 14-3-3 ζ -Bindungsmotive identifiziert werden. Inwieweit diese Bindungsmotive für die beobachtete Lokalisation der Phosphatase an Aktin-reichen Membrankräuselungen verantwortlich sind, konnte bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Die Funktion der Phosphatase in diesen Membranbereichen könnte in einer Modulation der Funktion von Inositolphosphat- und Phosphoinositid-bindenden Proteinen liegen, die dort auch gehäuft auftreten.

1.3.1.9 Die Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK)

In Lokalisationsstudien unter Verwendung von EGFP- und EYFP-Fusionsproteinen konnte für die humane Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK) eine vorherrschende Lokalisation im Zellkern von NRK52E Zellen beobachtet werden. Verantwortlich für diese Zielsteuerung ist eine Anhäufung (Cluster) von 10 basischen Aminosäuren am C-Terminus der Kinase, die nicht einem klassischen monopartiten oder bipartiten Kernlokalisierungssignal (NLS) entspricht, aber als ein solches fungiert [Nalaskowski et al., 2002].

Zusammenfassend konnte eine Zielsteuerung der beschriebenen Schlüsselenzyme des Phosphoinositid/Inositolphosphat Metabolismus an folgende Zielorte über spezifische Mechanismen beobachtet werden:

Membranen

Plasmamembran

- Direkte Bindung von Phosphoinositiden über Phosphoinositid spezifische Interaktionsdomänen z.B. PH-Domänen, PX-Domänen, FYVE-Domänen und ENTH-Domänen.
- Indirekte Bindung über Phosphoinositid-bindende Proteine
- Indirekte Bindung an Phosphotyrosin-aktivierte Rezeptoren über SH2- oder PDZ-Domänen

Spezifische Bereiche der Plasmamembran (z.B. Aktin-reiche Membrankräuselungen)

ER/Golgi-Membransystem

Zytoskelett

Aktin-Zytoskelett

- Direkte Bindung über Aktin-Bindungsbereiche
- Indirekte Bindung über Aktin-bindende Proteine (ABPs)

Zellkern

- Direkter Transport über den Kernporenkomplex durch atypische und typische Kernlokalisationssignale (NLS) [Nalaskowski et al., 2002]

Für viele Isoformen/Isoenzyme der hier beschriebenen Schlüsselenzyme konnten weitere Zielsteuerungen an z.B. Intermediärfilamente (Isoformen der PKC binden an Vimentin) und Mikrotubuli beobachtet werden, die in diesem Abschnitt nicht diskutiert werden [Janmey, 1998].

In dieser Arbeit konnte in der IP3K B eine putative Aktin-Bindungsdomäne identifiziert werden die an Aktin-Filamente bindet. Da zusätzlich die IP3K A, eine Zielsteuerung zum und Lokalisation am Aktin-Zytoskelett zeigt, werden im folgenden Kapitel Grundlagen des Proteins Aktin erläutert.

1.4 Rolle des Proteins Aktin in Eukaryonten

Aktin wurde erstmals 1942 von F.B. Staub als eine Hauptkomponente von muskulären Proteinen und als Partner von Myosin im quergestreiften Kaninchenmuskel beschrieben. Zusammen mit Myosin (dicke Filamente) bildet Aktin die Grundlage des von Huxley [Huxley and Hanson, 1954] entworfenen Gleitfilamentmodells der Muskelkontraktion. In Muskelzellen ist Aktin das vorherrschende Strukturprotein, doch auch in allen anderen Zellen tritt Aktin auf und übernimmt dort vielfältige Aufgaben. Mit der Ausbildung des Zytoskeletts ist Aktin für die Form und Struktur von Zellen verantwortlich; es definiert die Polarität und ist zudem notwendig für die Zellbewegung und -teilung [Stossel et al., 1985].

Die Funktionalität und damit die Bedeutung des Proteins für die Zelle liegt in seiner Fähigkeit, reversibel zwischen zwei Aggregatzuständen hin und her zu wechseln. Zum einen kann Aktin im monomeren/globulären Zustand (G-Aktin) und zum anderen im polymeren/filamentösen Zustand (F-Aktin) vorliegen. Dabei ist die Bildung von Mikrofilamenten (auch als F-Aktin bezeichnet) über die Polymerisation von G-Aktin ein dynamischer Prozess, der von unterschiedlichen Faktoren abhängt (siehe Abschnitt 1.1.4, Seite 27). Über diesen Prozess werden hauptsächlich in Nicht-Muskelzellen ständig Mikrofilamente auf- und abgebaut, während Aktin in Muskelzellen in einem eher statischen Zustand vorliegt. Dabei konnte durch Röntgenstrukturanalysen sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen eine Polarität des Mikrofilaments und damit auch des monomeren Aktins abgeleitet werden. Man unterscheidet am Mikrofilament ein spitzes Ende (pointed end/minus Ende) und ein stumpfes Ende (barbed end/plus Ende).

1.4.1 Polymerisation von Aktin

Aktine sind hoch konservierte Proteine, von denen in Säugern bereits mehrere Isoformen identifiziert werden konnten, die sich jedoch nur geringfügig in ihrem Polymerisationsverhalten unterscheiden. Alle Aktine besitzen sowohl eine Bindungsstelle für Adenin-Nukleotide als auch für zweiwertige Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) und bestehen je nach Spezies aus 374 bis 376 Aminosäuren [Elzinger et al., 1973; Mornet und Ue, 1984]. Generell ist G-Aktin nur im ATP gebundenen Zustand fähig zu polymerisieren, wobei aufgrund der hohen zellulären ATP-Konzentration G-Aktin in der Zelle als ATP-Aktin vorliegt. Sowohl das gebundene Nukleotid als auch das gebundene Kation beeinflussen den Polymerisationvorgang und die Stabilität des Aktins.

Der Vorgang der Polymerisation erfolgt generell in drei Schritten:

Monomerenaktivierung

Durch den Austausch von Ca^{2+} (präpariertes Aktin hat auf Grund des Isolationsverfahrens Ca^{2+} gebunden) durch Mg^{2+} an der hoch affinen Bindungsstelle des G-Aktins (Monomere) erfahren die Monomere eine Konformationsänderung und werden als aktivierte/s Monomere/G-Aktin bezeichnet.

Nukleation

Die aktivierten Monomere können nun zu oligomeren Strukturen assoziieren, die eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Filamentbildung, als zur Dissoziation zu Monomeren haben. Dieser Vorgang wird als Nukleation oder Nukleusbildung bezeichnet.

Polymerisation

Aus den gebildeten Nuklei können jetzt neue Mikrofilamente entstehen oder es erfolgt bei schon vorhandenen Mikrofilamenten (F-Aktin) eine Aufpolymerisation auf diese Filamente. Generell haben aufpolymerisierende Monomere ATP (ATP-Aktin) gebunden, das nach der Bindung der Monomere an das Filament durch die intrinsische ATPase-Aktivität von Aktin hydrolysiert wird.

Die folgende Abbildung zeigt die einzelnen Schritte, über die eine *de novo* Bildung von Mikrofilamenten erfolgt.

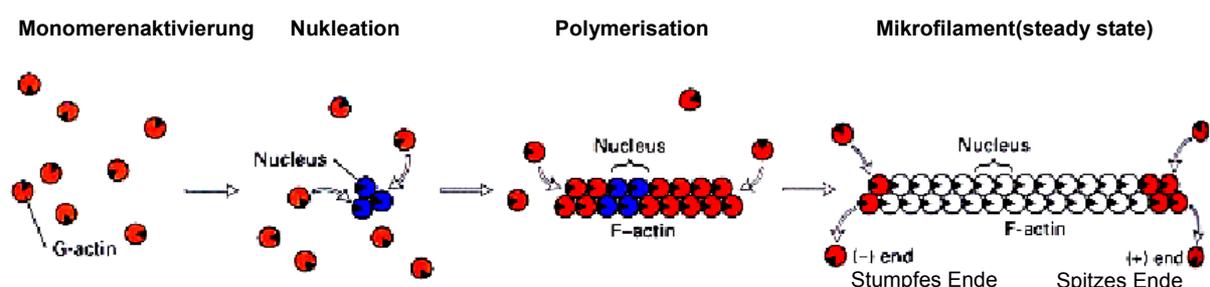


Abbildung 1.4.1.1 Polymerisation von Aktin mit einhergehender Mikrofilamentbildung

Zunächst erfolgt die Aktivierung von G-Aktin, das in diesem aktivierten Zustand oligomere Strukturen ausbildet. Auf diese gebildeten Nuklei können jetzt weitere aktivierte Monomere von beiden Seiten aufpolymerisieren und damit ein Mikrofilament (F-Aktin) bilden.

Das Polymerisationsverhalten von G-Aktin ist zum einen aufgrund der strukturellen Polarität des Aktins und zum anderen aufgrund der Hydrolyse des ATP nach der Bindung von G-Aktin an Mikrofilamente an beiden Enden des Mikrofilaments (stumpfes bzw. spitzes Ende) unterschiedlich. Am stumpfen Ende ist der Einbau von Monomeren schneller als am spitzen Ende und zusätzlich schneller als die Hydrolyse des ATP. Aus diesem Grund beinhaltet das stumpfe Ende hauptsächlich ATP-Aktin (ATP-Cap) [Carlier et al., 1994]. Am spitzen Ende ist dieser Vorgang umgekehrt, d.h. die Hydrolyse des ATP ist schneller als der Einbau von Monomeren, so dass dieses Ende hauptsächlich ADP-Aktin beinhaltet. Da ATP-Aktinmonomere langsamer vom Mikrofilament dissoziieren als ADP-Aktinmonomere, findet am stumpfen Ende vermehrt Assoziation/Aufbau und am spitzen Ende mehr Dissoziation/Abbau statt. Aktinfilamente wachsen daher in der Zelle hauptsächlich vom stumpfen Ende aus.

1.4.2 Das Aktin-Zytoskelett

Das aus Aktin bestehende Mikrofilamentsystem bildet zusammen mit Mikrotubuli und Intermediärfilamenten das Zytoskelett eukaryontischer Zellen aus. Dabei treten Mikrofilamente in bestimmten Bereichen der Zelle gehäuft auf und sind dort für die Ausbildung charakteristischer zellulärer Strukturen verantwortlich bzw. bilden selbst charakteristische Strukturen aus. Diese werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

Stressfilamente/Zugfasern („stress fibers“) sind in ruhenden, nicht lokomotorischen Zellen die dominierenden F-Aktin enthaltenden Strukturen und dienen neben der Stabilität auch der Verbindung von Zellen mit Substraten oder mit anderen Zellen. Sie treten als parallel zueinander verlaufende Mikrofilamente auf, die aus der perinukleären Region zu der Zellperipherie laufen, aber auch die ganze Zelle durchspannen können. Stressfilamente enden mit ihren schnell wachsenden Enden in „focal adhesion plaques“, in deren Bereich sie auch verankert sind. Im Bereich der „focal adhesion plaques“ sind sie über Aktin-bindende Proteine mit Integrinen und damit indirekt mit der extrazellulären Matrix verbunden.

Charakteristisch für Mikrofilamente ist auch ihre enge Anbindung an die Plasmamembran. So befindet sich ein dichtes Netzwerk von Mikrofilamenten unterhalb der Plasmamembran, das als kortikales/submembranöses Aktin bezeichnet wird und hauptsächlich der zellulären Stabilität dient.

Auch im Bereich von Zellfortsätzen, die speziell bei Bewegung und Formänderung erscheinen, treten Mikrofilamente in Form von Bündeln oder Netzwerken gehäuft auf. Die Fortsätze an der Frontseite werden dabei als Leitsaum („leading edge“) und Lamellipodia bezeichnet, während sehr feine, eher starre Fortsätze als Mikrospikes bezeichnet werden. Bei Nervenzellen werden lange Mikrospikes als Filopodia bezeichnet.

Ein dichtes Geflecht von Mikrofilamenten befindet sich auch im Bereich von Zelleinbuchtungen, so genannten Membrankräuselungen („membrane ruffles“).

1.4.3 Aktin-bindende Proteine

Der präzise zeitliche und räumliche Ablauf von Mikrofilamentbildung, -verlängerung und – „turnover“, sowie die Ausbildung von komplexen Netzwerken werden gesteuert über die Interaktion von Aktin mit Aktin-bindenden Proteinen (ABPs). Klassifiziert werden ABPs entweder durch ihre biochemischen Eigenschaften oder ihre Bindungsmechanismen. Generell können ABPs mit G-Aktin und/oder F-Aktin interagieren, dabei sind diese Interaktionen wiederum von multiplen Faktoren abhängig. Die folgende Abbildung zeigt charakteristische Auswirkungen von ABPs auf Aktin.

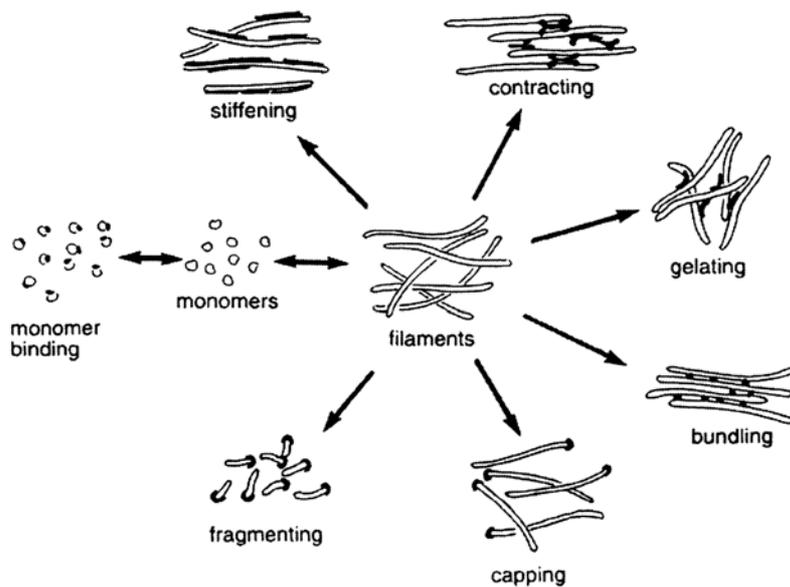


Abbildung 1.4.3.1 Schematische Darstellung direkter Interaktionen von Aktin-bindenden Proteinen mit Aktin

Aktin-bindende Proteine können an G-Aktin und/oder F-Aktin binden. Die Bindung an F-Aktin kann folgende Auswirkungen auf die Mikrofilamente haben: Versteifung, Kontraktion, Gelieren, Bündelung, Ummantelung („capping“) und Fragmentierung [Entnommen aus Dos Remedios, Molecular Interactions of actin, 2001].

Bei der Charakterisierung von ABPs stehen mehrere Fragen im Vordergrund, aus deren Aufklärung die biologische Relevanz der Aktin-Protein-Bindung für die Zelle oder den Organismus *in vivo* abgeleitet werden kann.

- Wie ist Identität des ABPs?
- Über welchen Mechanismus erfolgt die Bindung und wie wirkt sie sich auf Aktin aus?
- Wie wird die Bindung reguliert, folgt sie einer bestimmten Dynamik?
- Wie ist Struktur des ABPs?
- Wie ist die gewebsspezifische und zellspezifische Expression des ABPs?

Viele dieser Fragen konnten bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden, da bisher allein 75 verschiedene Klassen von ABPs identifiziert werden konnten, oftmals mit multiplen Isoformen und zudem jedes Jahr neue ABPs identifiziert werden [Pollard, 1993].

ABPs können auch anhand ihrer Aminosäuresequenz erkannt werden, so ist beispielsweise ein I/LWEQ Modul (benannt nach konservierten Aminosäuren der Domäne) oder eine ADF-H Domäne („actin-depolymerizing factor homology domain“) in einem Protein ein starker Hinweis auf eine Interaktion dieses Proteins mit Aktin [McCann and Craig, 1997; Lappalainen et al., 1998]. Auch die IP3K B weist im N-terminalen Bereich geringe Homologien zu dem I/LWEQ Modul auf, die auf eine Interaktion mit Aktin hindeuten. Da jedoch die theoretisch vorhergesagte Interaktion eines Proteins mit Aktin immer mittels biochemischer Experimente nachgewiesen werden muss, wurde in dieser Arbeit die direkte Bindung der IP3K B an Aktin unter anderem auch durch fluoreszenzspektroskopische Messungen nachgewiesen. Im folgenden Kapitel werden unterschiedliche Messmethoden die für einen Nachweis einer Interaktion eines Proteins mit Aktin zur Verfügung stehen kurz aufgezeigt. Anschließend erfolgt eine detaillierte Beschreibung der in dieser Arbeit angewendeten Messmethode.

1.4.3.1 Messmethoden zum Nachweis von Aktin-bindenden Proteinen

Viele Messmethoden zum Nachweis von Aktin-bindenden Proteinen leiten sich aus Methoden ab, die zunächst für die Aufklärung der Struktur von Aktin verwendet wurden. Zu diesen Methoden gehört z.B. die Röntgenstrukturanalyse, die Elektronenmikroskopie sowie die Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Spektroskopie (FRET), wobei diese Messmethoden sehr aufwendig sind. Zu den einfacheren, schneller anwendbaren Methoden gehören die Immunfluoreszenzmikroskopie, die Fluoreszenzspektroskopie und biochemische Methoden wie z.B. Kosedimentationsuntersuchungen.

Die Methode der Fluoreszenzspektroskopie soll hier ein wenig detaillierter erklärt werden, da sie zum einen in dieser Arbeit angewendet wurde und zum anderen eine Methode darstellt, mit der nicht nur die Bindung eines Proteins an Aktin nachgewiesen werden kann, sondern die auch eine genaue Quantifizierung dieser Bindung erlaubt.

Grundlage für Fluoreszenzspektroskopie ist die Tatsache, dass viele organische Substanzen spezifische Strahlungsenergie im sichtbaren Bereich des Spektrums absorbieren können und diese als energieärmere Fluoreszenzstrahlung wieder abgeben. Wird die Fluoreszenzstrahlung in Abhängigkeit bestimmter Parameter verändert, so lässt sich diese Substanz als Messgröße für die Veränderung dieser Parameter verwenden. Bei den angewendeten Messungen wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (NBD-CI) an Aktin gekoppelt, der bei einer bestimmten Wellenlänge (480nm) Strahlungsenergie aufnimmt und aufgrund dieser Anregung Fluoreszenzstrahlung bei einer Wellenlänge von 540nm wieder abgibt. Wird nun ein putativ interagierendes Protein (Ligand) mit entweder fluoreszenzmarkiertem G-Aktin oder F-Aktin

inkubiert und es findet eine Bindung statt, so steigt die gemessene Fluoreszenzintensität aufgrund der Bindung an (siehe auch Abschnitt 2.2.5, Seite 58). Da bei konstant gehaltener Aktinkonzentration die Fluoreszenzintensität mit der Menge an gebundenem Ligand korreliert, kann aus der Messung die Bindung eines Proteins an Aktin quantifiziert werden.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit war es die Regulation und subzelluläre Verteilung der Isoform B von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3 Kinase (IP3K B) zu untersuchen, die ein zentrales Schaltelement des Inositolphosphatmetabolismus darstellt. Um Hinweise auf bisher unbekanntes Regulationsmechanismen zu gewinnen, sollten neue potentielle Bindungspartner der Kinase identifiziert und charakterisiert werden. Insbesondere sollte dabei auf die Rolle des bislang uncharakterisierten N-terminalen Bereichs des Enzyms eingegangen werden, da in ihm Ansatzpunkte für neue Regulationsmechanismen vermutet wurden. Dieser N-terminale Bereich weist einerseits wenige Sekundärstrukturen auf, die andererseits inselartig angeordnet auftreten und putative Interaktionsdomänen darstellen könnten. Zusätzlich beinhaltet er einige prolinreiche Abschnitte, die mögliche Bindungsstellen für SH3-Domänen anderer Proteine darstellen könnten. Erste Hinweise auf potentielle Bindungspartner sollte die Untersuchung der subzellulären Verteilung des Enzyms mittels Expression von EGFP-Fusionsproteinen liefern. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, musste zunächst ein Konstrukt hergestellt werden, das die vollständige cDNA der IP3K B aus *Rattus norvegicus* beinhaltet. Dieses Konstrukt sollte als Template für die Herstellung unterschiedlicher weiterer Fusionskonstrukte dienen, die in Lokalisationsstudien eingesetzt werden sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> XL1Blue	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> BL21 Codon Plus (DE3)-RIL	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> TOP10F'	Invitrogen

2.1.2 Medien & Lösungen für die Bakterienkultur

LB Medium	4g Bacto-Trypton 2g Hefeextrakt 4g NaCl ad 400ml H ₂ O pH 7,2 (mit NaOH einstellen), autoklavieren
Soc Medium:	20g Bacto-Trypton 5g Hefeextrakt 0,5g NaCl 10ml 250mM KCl ad 1l H ₂ O, pH 7 (mit NaOH einstellen) autoklavieren 20ml 1M sterile Glucose zufügen
Agarplatten	4g Bacto-Trypton 2g Hefeextrakt 6g Bacto-Agar 0,5ml 4M NaCl ad 400ml H ₂ O autoklavieren

Die Kulturmedien und Agarplatten werden unter sterilen Bedingungen entsprechend ihrer Verwendung mit Antibiotika und anderen Zusätzen versehen.

2.1.3 Zelllinien (*Rattus norvegicus*)

- PC12 PC-12-Zellen (ATCC# CRL-1721) wachsen adhären und leiten sich von einem Phäochromozytom ab.
[Levi et al., 1985; Greene und Tischler, 1976; Biocca et al., 1983; Weber et al., 1996]
- NRK52E NRK-52E-Zellen (ATCC# CRL-1571; Cell Lines Service, Heidelberg) wachsen adhären und leiten sich von epithelialen Nierenzellen ab.

2.1.4 Medien & Lösungen für die Zellkultur

- PBS 8g NaCl
 0,2 g KCl
 1,44 g Na₂HPO₄
 0,24 g KH₂PO₄
 ad 1l dH₂O
 pH 7,4 (mit HCl einstellen)
 autoklavieren

Kulturmedium für PC12 Zellen:

RPMI 1640 versetzt mit 10% (v/v) Pferdeserum, 5% (v/v) fötalem Kälberserum und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Life Technologies).

Kulturmedium für NRK52E Zellen:

Dulbecco's MOD Eagle Medium versetzt mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Life Technologies).

OptiMEM

Trypsin-EDTA

Die verwendeten Zellkulturmedien und ihre entsprechenden Zusätze werden von Life Technologies bezogen.

2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation der Ratten IP3K B werden von MWG bezogen.

Oligonukleotide für Klonierung in pEGFP-N1

- 5'GFPK1 5'-CTC GAG ATG GGC CGC CTG CGA GGG GAC GCG-3'
3'GFPK1 5'-GGT ACC GCT CGG GGC GCT TGA ATA GCA GAG GT-3'

5'GFPB1Rn	5'-CTC GAG ATG GCG ACC CGC ATC CTC TCC CCA-3'
3'GFPB1Rn	5'-GGT ACC GCG ATT TGC GCC TCG AAC ATG CCC AC-3'
3'GFPB1verkRn	5'-GGT ACC GCC ACC TGC ACA TTT TGC AAT TCG CG-3'
5'GFPK2	5'-CTC GAG ATG AGC CCG CGT TTG GGT AGG GCT CGT-3'
3'GFPK2	5'-GGT ACC GCG GTC TGC TGG GGT CCT CGG ATT CC-3'
5'GFPK3	5'-CTC GAG ATG GGT GCT CAG GAG GAT GGA GGG-3'
3'GFPK3	5'-GGT ACC GCG GCT GAG TTG GGG TCC AGA GTG CG-3'

Oligonukleotide für QuikChange Mutagenese

5'Primer L124A	5'-GTG GCG ACC CGC ATC GCC TCC CCA CCT GGG CCG-3'
3'Primer L124A	5'-CGG CCC AGG TGG GGA GGC GAT GCG GGT CGC CAC-3'
5'Primer A132G	5'-CCT GGG CCG GAG GAG GGC CAG AGG AAG CTG AGG-3'
3'Primer A132G	5'-CCT CAG CTT CCT CTG GCC CTC CTC CGG CCC AGG-3'
5'Primer I138A	5'-CAG AGG AAG CTG AGG GCC CTG CAG CGC GAA TTG-3'
3'Primer I138A	5'-CAA TTC GCG CTG CAG GGC CCT CAG CTT CCT CTG-3'
5'Primer Q144A	5'-CTG CAG CGC GAA TTG GCC AAT GTG CAG GTG AAC CAG-3'
3'Primer Q144A	5'-CTG GTT CAC CTG CAC ATT GGC CAA TTC GCG CTG CAG-3'

Oligonukleotide für RT PCR

IS 1	5'-TCC CCA AGT GAG GAA CGG AGA-3'
IS 2	5'-CAG CTG GCA GGA CAT GCA GGG-3'
IS 3	5'-TTC AAG GCA GCT GCG AAT GGC-3'
IS 4	5'-GCA TCG CTG TTC AGA CTC ACA-3'
IS 5	5'-CAC ATC CGC CAT TAA CCG GTG-3'
IS 6	5'-GTC AGC GGT GAG TGG GCT GCC CTG GGA-3'
IS 7	5'-GTG GCG GGC AAG GTG GCA TGG-3'
IS 8	5'-CAG GTG AAC CAG AAA GTG GGC-3'
UB 184	5'-GTG CAG GTG AAC CAG AAA GTG-3'
UB 185	5'-GGC TGC CCC CAA GCA AGC CCA G-3'
UB 192	5'-TTG GGC TGG CCG CCT GCG AG-3'
UB 220	5'-GTC AGC GCT CAC TCT GGG CTT CTG-3'
UB 231	5'-GAG GTC TCG AAT GGC TGT GTA CTG CTA TGC-3'
UB232	5'-GTC CTT CGA GGG GTG TGT GCT GAG-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung

NP24	5'-GAC GTT GTA AAA ACG ACG GCC AGT G-3'
RP24	5'-AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC-3'

IS9 5'-ACA CCT GAA GTC ATC AAA AGA-3'

Weitere verwendete Oligonukleotide

3VLRnIP3KB 5'-GGT ACC GCG GTG AGT GGG CTG CCC TGG GA-3'
3'-VNT0PR 5'-CCG CGG CAG AGG CAG GGG ACC CCG AGG GCT-3'
IS 13 5'-CTC GAG ATG GCT GTG TAC TGC TAT GCC CTC-3'
IS 16 5'-CTC GAG GCT CAC TCT GGG CTT CTG CTG-3'
5K1BamH1 5'-GGA TCC ATG GGC CGC CTG CGA GGG GAC-3'
3K1EcoR1 5'-GAA TTC CTC GGG GCG CTT GAA TAG CAG A-3'

2.1.6 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	NEB Pharmacia MBI Boehringer Mannheim
Alkalische Phosphatase	NEB
T4-DNA-Ligase	Life Technologies
Taq-DNA-Polymerase	Life Technologies
Pfu-DNA-Polymerase	Promega

2.1.7 Kits

Silica Spin Kit for Plasmid DNA Minipreparation	Biometra
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems
Titan One Tube RT PCR System	Boehringer Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Boehringer Mannheim
LipofectAMINE PLUS Reagent Kit	Life Technologies
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Marathon Kit	Clontech
pGEM TEasy Kit	Promega

2.1.8 Plasmide

pEGFP-N1	Clontech
pEGFP-C1	Clontech
pDsRed1-N1	Clontech
pDsRed2-N1	Clontech
pECFP-Mem	Clontech

pECFP-ER	Clontech
pEGFP-Tub	Clontech
pEGFP-Actin	Clontech
pGEX-2T	Pharmacia

2.1.9 Antikörper

Monoklonaler Anti- β -tubulin	Boehringer Mannheim
Texas-Red markiertes IgG	Dianova
Anti-GST (Goat)	Pharmacia
Anti-Goat IgG (Sheep)	Sigma

2.1.10 Molekulargewichtsstandards

Proteinmarker, LMW-Marker	Bio-Rad
DNA-Marker, 100bp-Leiter, Gene Ruler 100bp ladder	Fermentas
DNA-Marker, 1kb-Leiter, Gene Ruler 1kb ladder	Fermentas

2.1.11 Puffer & Lösungen

50x TAE-Puffer	242g Tris/HCl 57,1ml Eisessig 100ml 0,5M EDTA pH 8,0 mit NaOH einstellen ad 1l dH ₂ O
1x <i>Taq</i> -Puffer	10mM Tris/HCl 50mM KCl 2mM MgCl ₂ 100 μ g/ml Gelatine pH 8,3
10x <i>Pfu</i> -Puffer	200mM Tris/HCl 100mM KCl 60mM Ammoniumsulfat 20mM MgCl ₂ 1% Triton X-100 100 μ g/ml BSA pH 8,2

6x DNA-Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol FF 15% (w/v) Ficoll 400 in wässriger Lösung
5x T4-Ligasepuffer	500mM Tris/HCl 100mM MgCl ₂ 50mM DTT 10mM ATP 200µg/ml BSA pH 7,5
RF I-Puffer	100mM RbCl 50mM MnCl ₂ × 4 H ₂ O 30mM Kaliumacetat 10mM CaCl ₂ × 2 H ₂ O 15% (w/v) Glycerol pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
RF II-Puffer	10mM MOPS 10mM RbCl 75mM CaCl ₂ × 2 H ₂ O 15% (w/v) Glycerol pH 6,8 mit Essigsäure einstellen, Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
P1	0,05M Tris/HCl, 0,01M EDTA, 0,05mg/ml RNase (pH 7,5)
P2	0,2M NaOH, 1% (w/v) SDS
P3	4M Guanidin/HCl, 0,75M Kaliumacetat (pH 4,6)
W1	4M Guanidin/HCl, 0,75M Kaliumacetat (pH 4,6)
W2	0,05M Tris/HCl, 0,01M EDTA, 200mM NaCl, 50% (v/v) Ethanol (pH 7,5)
Puffer E	50mM HEPES 1mM EDTA pH 7,5

Elutionspuffer	10mM reduziertes Glutathion 50mM Tris/HCl pH 8,0
Acrylamidlösung	30% Acrylamid 0,8% N,N-Methylbisacrylamid in dH ₂ O
Laemmli-Laufpuffer	0,025M Tris/HCl 0,192M Glycin 0,1% SDS
Trenngelbuffer (4-fach)	1,5 M Tris/HCl 0,4% SDS pH 8,8
Sammelgelbuffer (4-fach)	0,5M Tris/HCl 0,4% SDS pH 6,8
SDS Probenpuffer	0,062 M Tris/HCl 50mM DTT 0,01% Bromphenolblau 1% SDS 8,7% Glycerol pH 7,6
Färbelösung	0,5% Coomassieblau 9% Eisessig 45,2% Methanol 45,2% H ₂ O
Entfärbelösung	8% Eisessig 25% Ethanol 67% H ₂ O + Dowex 1X2 als Ionenaustauscher

Kathodenpuffer	25mM Tris/HCl 40mM 6-Aminocapronsäure 20% Methanol pH 7,6
Anodenpuffer (I u. II)	30mM (I) bzw. 300mM (II) Tris/HCl 20 % Methanol pH 10,4
1x TBS-Puffer	50mM Tris/HCl 15 mM NaCl pH 7,5
1x TTBS-Puffer	50mM Tris/HCl 150mM NaCl 0,12% Tween 20 pH 7,5
Ponceau-Färbelösung	0,2% (w/v) Ponceau S 3% (w/v) Essigsäure
primäre AK-Lösung	Anti-GST (Goat) 1:2000 in TTBS + 0,3% BSA
sekundäre AK-Lösung	Anti-Goat IgG (Sheep) 1:40000 in TTBS + 0,3 % BSA
AP-Puffer	100mM Tris/HCl 5mM MgCl ₂ 100mM NaCl pH 9,5
5% BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in 100% Dimethylformamid
7,7% NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid in 70% (v/v) Dimethylformamid

Aktinpuffer 5mM Triethanolamin
 0,2mM CaCl₂
 0,5mM ATP
 pH 7,5

2.1.12 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:
 Alexis Biochemicals, Aldrich, Amersham, Apotheke des UKE, Biomol, Biorad, Diagnostc,
 Fluka, Gibco, Merck, Pierce, Serva, Sigma, Roche und Roth

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung spezifischer DNA-Frag-
 mente zwischen zwei bekannten, flankierenden Sequenzen. Das Prinzip beruht auf der
 Fähigkeit einer hitzestabilen DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA durch, an den DNA-
 Strang hybridisierende Oligonukleotide (Primern), zu doppelsträngiger DNA aufzufüllen.

Eine typische Polymerasekettenreaktion besteht aus folgenden sich wiederholenden
 Schritten.

1. **Denaturierung**
2. **Annealing**
3. **Elongation**

Bei der RT-PCR wird in einem Schritt aus der eingesetzten RNA cDNA synthetisiert, die als
 Template für die sich anschließende PCR dient. Für die RT-PCR wird das Titan One Tube
 RT-PCR System verwendet.

Durchführung:

Der RT-PCR-Ansatz wird in einem 0,2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Ansatz für eine RT-PCR (Gesamtvolumen 20µl)	
10,5µl	ddH ₂ O
0,5µl	Template Rn RNA (1,5µg/µl)
1µl	upstream Primer (10µM)
1µl	downstream Primer (10µM)
4µl	5x RT-Puffer
0,5µl	Enzym Mix
1µl	dNTP's (10mM)
0,5µl	RNasin (40U/µl)
1µl	DTT (0,1M)

Die RT-PCR wird mit einem Heiß-Start beginnend im Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt.

1x	Reverse Transkription der mRNA in cDNA 30min bei 50°C, Denaturierung des Templates 2min 96°C
10x	Denaturierung des Templates für 30s bei 94°C, Annealing der Primer für 30s (Temperatur ist abhängig von T _m der eingesetzten Primer), Elongation (Zeit ist abhängig von der Fragmentlänge) bei 68°C
25x	Denaturierung des Templates für 30s bei 94°C, Annealing der Primer für 30s (Temperatur ist abhängig von T _m der eingesetzten Primer), Elongation (Zeit ist abhängig von der Fragmentlänge) + 5s pro zusätzlichen Zyklus bei 68°C
1x	Elongation für 7min bei 68°C

Die Elongationszeit hängt von der erwarteten Länge des Amplikons ab.

PCR-Fragmentlänge (kb)	<1	1,5	3	4,5	6
Elongationsszeit	45s	1min	2min	3min	4min

2.2.1.2 *Nested* Polymerasekettenreaktion (*Nested-PCR*)

Die *nested-PCR* wird angewendet um geringe Template-mengen zu detektieren, die in einer ersten PCR amplifiziert wurden, jedoch in der Gelelektrophorese nicht sicher nachweisbar sind. Dabei wird das in der ersten PCR entstandene Template in einer zweiten Amplifikationsrunde mit „enger“ gesetzten Primern erneut amplifiziert, um es anschließend in der Gelelektrophorese detektieren zu können.

Die bei der vorangegangenen RT-PCR entstandene geringe Menge des ersten Amplikons wird hierbei als Template für die sich anschließende *nested-PCR* eingesetzt. Für die *nested-PCR* wird das Expand High Fidelity PCR System verwendet.

Durchführung:

Der *nested-PCR*-Ansatz wird in einem 0,2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Ansatz für eine <i>nested</i> PCR (Gesamtvolumen 20µl)	
11µl	ddH ₂ O
4µl	Template (Amplikon aus RT-PCR)
1µl	<i>nested</i> upstream Primer (10µM)
1µl	<i>nested</i> downstream Primer (10µM)
2µl	10x PCR-Puffer (mit 15mM MgCl ₂)
0,5µl	Polymerase Mix (3,5U/µl)
0,5µl	dNTP's (10mM)

Die PCR erfolgt in dem Eppendorf Mastercycler Gradient.

1x	Denaturierung des Templates für 2min bei 96°C
25x	Denaturierung des Templates für 1min bei 94°C, Annealing der Primer für 1min (Temperatur ist abhängig von T _m der eingesetzten Primer), Elongation (Zeit ist abhängig von der Fragmentlänge) bei 72°C
1x	Elongation für 7min bei 72°C

Die Elongationszeit hängt von der erwarteten Länge des Amplikons ab.

PCR-Fragmentlänge (kb)	<1	1,5	3	6	10
Elongationsszeit	45s	1min	2min	4min	8min

2.2.1.3 Fusions-Polymerasekettenreaktion (Fusions-PCR)

Mit dieser Methode (entnommen aus dem Marathon Kit: „Generation of full-length cDNA by fusion and amplification“) können zwei überlappende cDNA Fragmente in einer ersten PCR fusioniert und in einer anschließenden zweiten PCR amplifiziert werden. Dabei dienen in der ersten PCR die sich überlappenden Fragmente selbst als Primer. In der sich anschließenden zweiten PCR werden sequenzspezifische Primer verwendet. Für die Fusions-PCR werden der Puffer und das Enzym aus dem Expand High Fidelity PCR System verwendet.

Durchführung:

Der primäre Fusions-PCR-Ansatz wird in einem 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Ansatz für eine primäre Fusions PCR (Gesamtvolumen 20µl)	
6µl	ddH ₂ O
10µl	Template 1 (cDNA Fragment 1, 1ng/µl)
1µl	Template 2 (cDNA Fragment 2, 10ng/µl)
2µl	10x PCR-Puffer (mit 15mM MgCl ₂)
0,5µl	Polymerase Mix (3,5U/µl)
0,5µl	dNTP's (10mM)

Die PCR erfolgt in dem Biometra Cycler.

5-40x	Denaturierung der Templates für 30s bei 94°C, Elongation für 30min bei 68°C
--------------	--

Der primäre Fusions-PCR Ansatz wird 1:10 und 1:100 in ddH₂O verdünnt, als Template für die anschließende zweite PCR eingesetzt und in einem 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Ansatz für eine sekundäre Fusions-PCR (Gesamtvolumen 50µl)	
36,5µl	ddH ₂ O
5µl	Template (verdünnter Ansatz aus vorangegangener PCR)
1µl	upstream Primer (10µM)
1µl	downstream Primer (10µM)
5µl	10x PCR-Puffer (mit 17,5mM MgCl ₂)
0,5µl	Polymerase Mix (3,5U/µl)
1µl	dNTP's (10mM)

Die PCR erfolgt in dem Eppendorf Mastercycler Gradient.

1x	Denaturierung des Templates für 2min bei 96°C
25x	Denaturierung des Templates für 1min bei 94°C, Annealing der Primer für 1min (Temperatur ist abhängig von T _m der eingesetzten Primer), Elongation bei 72°C (2min für jedes 1kb des Amplikons)
1x	Elongation für 5min bei 72°C

2.2.1.4 Analytische und präparative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die analytische PCR z.B. das Durchsuchen (Screenen) von Bakterienklonen, welche das gewünschte Insert tragen, werden die *Taq* Polymerase und der entsprechende Polymerase-Puffer verwendet. Die *Pfu* Polymerase und der entsprechenden Polymerase-Puffer werden für präparative PCR verwendet, da die *Pfu* Polymerase neben ihrer 5'→3'-Polymerase-Aktivität auch eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Aufgrund dieser Proofreading-Fähigkeit arbeitet diese Polymerase mit besonders hoher Genauigkeit.

Durchführung:

Der analytische-PCR-Ansatz wird in einem 0,2ml oder einem 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Ansatz für eine analytische PCR (Gesamtvolumen 20µl)	
12µl	ddH ₂ O
1µl	upstream Primer (10µM)
1µl	downstream Primer (10µM)
2µl	10x Taq-Puffer
1µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
1µl	MgCl ₂
1µl	dNTP's (10mM)

Als Template beim Screenen von Bakterienklonen wurde jeweils eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte aufgenommen und in den PCR-Ansatz direkt eingerührt.

Die PCR erfolgt in dem Eppendorf Mastercycler Gradient oder im Biometra Cycler.

1x	Denaturierung des Templates für 2min bei 94°C
25x	Denaturierung des Templates für 1min bei 94°C, Annealing der Primer für 1min (Temperatur ist abhängig von T _m der eingesetzten Primer), Elongation bei 72°C (1min für jedes 1kb des Amplikons)
1x	Elongation für 5min bei 72°C

Der präparative PCR-Ansatz wird in einem 0,2ml oder in einem 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Ansatz für eine präparative PCR (Gesamtvolumen 20µl)	
13µl	ddH ₂ O
1µl	Template (10ng/µl)
1µl	upstream Primer (10µM)
1µl	downstream Primer (10µM)
2µl	10x <i>Pfu</i> -Puffer
1µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2,8U/µl)
1µl	dNTP's (10mM)

Die PCR erfolgt in dem Eppendorf Mastercycler Gradient oder im Biometra Cycler.

1x	Denaturierung des Templates für 2min bei 94°C
25x	Denaturierung des Templates für 1min bei 94°C, Annealing der Primer für 1min (Temperatur ist abhängig von T _m der eingesetzten Primer), Elongation bei 72°C (2min für jedes 1kb des Amplikons)
1x	Elongation für 5min bei 72°C

2.2.1.5 QuikChange™ Mutagenese

Mit dieser Methode können Punktmutationen eingeführt werden, Aminosäuren ausgetauscht, deletiert oder inseriert werden. Als Template wird ein supercoiled, doppelsträngiger Vektor mit dem zu mutierenden Insert eingesetzt.

Für die QuikChange Mutagenese wird der QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Das Prinzip der QuikChange Mutagenese ist in Abbildung 2.2.5.1 schematisch dargestellt. Für die QuikChange Mutagenese werden zwei Primer, ein Strang und ein Gegenstrangprimer verwendet, die beide die gewünschte Mutation enthalten. Mit diesen zwei Primern erfolgt eine PCR mit einer Proofreading-Polymerase (*Pfu*-Polymerase), wobei die Mutation eingefügt wird. Als Produkte entstehen eine mutierte Plasmid-DNA und eine unmutierte Template Plasmid-DNA, die beide anschließend mit *Dpn* I hydrolysiert werden. *Dpn* I hydrolysiert spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, jedoch nicht un-methylierte. Die meisten Bakterienstämme besitzen das dam-Methylierungssystem, so dass die Plasmid-DNA automatisch mutiert ist und abgebaut wird.

QuikChange™ XL 1-Day Mutagenesis Method

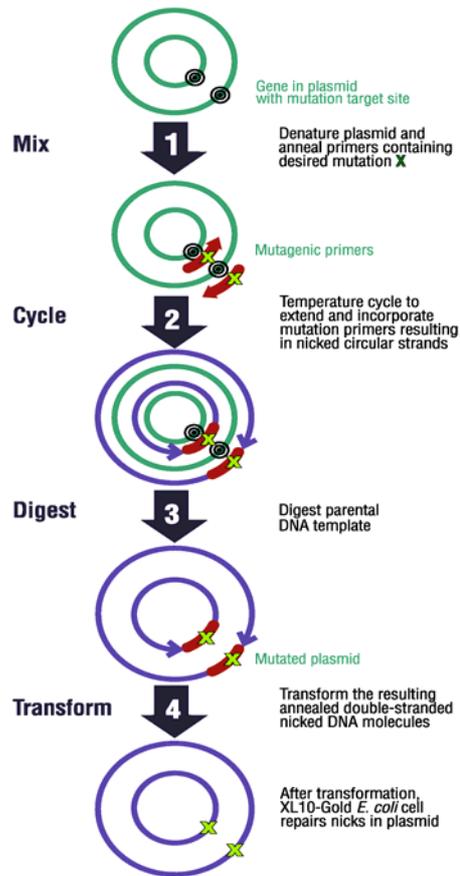


Abbildung 2.2.1.5 Prinzip der QuikChange™ Mutagenese

Nach QuikChange™ 1-Day Site-directed Mutagenesis Method; Stratagene Website: www.stratagene.com

Durchführung:

Der Ansatz für die QuikChange Mutagenese wird in einem 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Ansatz für eine QuikChange Mutagenese (Gesamtvolumen 50µl)	
38µl	ddH ₂ O
1µl	Template (10ng/µl)
2µl	upstream Mutageneseprimer (10µM)
2µl	downstream Mutageneseprimer (10µM)
5µl	10x <i>Pfu</i> -Puffer
1µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2,8U/µl)
1µl	dNTP's (10mM)

Die PCR erfolgt in dem Eppendorf Mastercycler Gradient.

1x	Denaturierung des Templates für 2min bei 95°C
16x	Denaturierung des Templates für 1min bei 95°C, Annealing der Primer für 1min (Temperatur ist abhängig von T _m der eingesetzten Primer), Elongation (2min für jedes 1kb des Amplikons) bei 68°C

40µl des Mutageneseansatzes werden mit der Restriktionsendonuklease 0,5µl *Dpn I* für 1h bei 37°C hydrolysiert und anschließend in einem 1%igem Agarosegel analysiert.

2.2.1.6 Analytische und präparative Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA nach ihrer Größe erfolgt in Agarosegelen.

Durchführung:

Für die Auftrennung von DNA Fragmenten mit einer zu erwartenden Größe von bis zu 1kb werden 2%ige (w/v) Agarosegele verwendet, bei größeren Fragmenten werden 1%ige (w/v) Gele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wird eingewogen, in TAE-Puffer unter aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) versetzt. Die Lösung wird zum Aushärten in eine Gelkammer mit Kamm überführt. Das erhärtete Agarosegel wird in der Gelkammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA wird mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des erhärteten Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 Volt für 30-40min. Das Agarosegel wird unter UV Licht fotografiert und die Größe der DNA Banden durch mitgelaufene Molekulargewichtsmarker bestimmt.

2.2.1.7 DNA Elution aus Agarosegelen

Die Gelextraktion erfolgt mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit.

Durchführung:

Die gewünschte DNA Bande wird unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei Fragmenten von 100bp-4kb werden pro 100mg Agarosegel 300µl QX1 zugegeben, bei kleineren Fragmenten 600µl und bei größeren 300µl QX1 und zusätzlich 200µl H₂O zugegeben. Dem Ansatz wird 10µl QIAEX II zugegeben und es erfolgt eine Inkubation bei 50°C. Während der 10minütigen Inkubation wird die Agarose aufgelöst und die DNA bindet an die Matrix (QIAEX II). Nach Zentrifugation befinden sich alle Verunreinigungen im Überstand und werden verworfen. Die Matrix wird mit QX 1 gewaschen um restliche Agarose-Verunreinigungen zu entfernen und erneut zentrifugiert. Die Matrix wird 2x mit Puffer PE gewaschen um restliche Salze zu entfernen. Der Überstand wird verworfen und die Matrix getrocknet. Die Elution der DNA erfolgt mit 10mM Tris-HCl (pH 8,5).

2.2.1.8 Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentration von DNA erfolgt durch Ethanolfällung.

Durchführung:

Die Proben werden 1/10 des Probenvolumen entsprechend mit 3M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt, gevortext, mit 100%igem Ethanol (2faches Probenvolumen) versetzt und wieder gevortext. Die 30minütige Inkubation erfolgt bei RT. Anschließend werden die Proben für 30min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und das entstandene DNA-Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation für 5min bei RT wird der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Das DNA-Pellet wird in ddH₂O resuspendiert.

2.2.1.9 A-Tailing von PCR-Produkten

Um PCR Produkte in den häufig verwendeten pGEM TEasy-Vektor klonieren zu können müssen diese über eine überhängende Desoxyadenosinbase an jedem Ende verfügen, da der linearisierte Vektor überhängende Desoxythyminebasen an den Enden besitzt. Verschiedene thermostabile Polymerasen z.B. die *Taq*-Polymerase fügen Template-unabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden der Amplikons während der PCR an. Thermostabile Polymerasen mit Proofreading-Aktivität (z.B. Pfu, Pwo) hingegen erzeugen während der PCR Fragmente mit glatten Enden. Mit diesen Amplikons muss daher vor der Ligation in pGEM-TEasy ein A-Tailing durchgeführt werden.

Durchführung:

Der A-Tailing Ansatz wird in einem 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

A-Tailing Ansatz (Gesamtvolumen 20µl)	
14µl	PCR Produkt
1µl	MgCl ₂ (50mM)
2µl	dATP (2mM)
2µl	10x <i>Taq</i> -Puffer
1µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl)

Der Ansatz wird 30min bei 72°C inkubiert und kann anschließend direkt für die Ligation in pGEM TEasy eingesetzt werden.

2.2.1.10 Ligation von DNA

Die T4-Ligase katalysiert unter Verbrauch von ATP die Bindung einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe zu einem Phosphodiester. Für Ligationen wurde die T4-DNA-Ligase mit dem entsprechenden T4 Ligasepuffer oder der pGEM TEasy Kit verwendet.

Durchführung:

Für einen Ligationsansatz werden 50 bis 100ng Vektor und die dreifache Menge (in mol) des zu legierenden Inserts eingesetzt.

Die Menge des einzusetzenden Inserts berechnet sich nach folgender Formel:

$$(\text{ng Vektor} \times \text{bp Insert} / \text{bp Vektor}) \times 3 = \text{ng Insert}$$

Die entsprechenden Mengen Vektor und Insert werden mit T4-Ligasepuffer und 1U T4-Ligase entweder bei 4°C (bei Ligation mit dem pGEM TEasy Kit) oder bei 16°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.11 Klonierung von RT-PCR Produkten

Die Amplikons aus der RT-PCR werden mit dem TOPO TA Cloning Kit in den TOPO Vektor ligiert. Statt einer Ligase wird bei dieser Methode ein mit Topoisomerase 1 aktivierter TA Vektor verwendet.

Durchführung:

Klonierungsansatz (Gesamtvolumen 5µl)	
2µl	Amplikon aus RT-PCR
1µl	Salz Lösung (1,2M NaCl, 0,06M MgCl ₂)
1µl	TOPO Vektor 10ng/µl
1µl	ddH ₂ O

Der Klonierungsansatz wird 5min bei RT inkubiert und anschließend in die chemisch superkompetenten *E. coli* TOP10F'-Zellen transformiert.

2.2.1.12 Plasmid DNA Minipräparation

Für die Plasmid DNA Minipräparation wird der Silica Spin Kit for Plasmid DNA Mini-preparation verwendet.

Durchführung:

2ml der Bakterienvorkulturen (siehe Abschnitt 2.2.2.2, Seite 50) werden in ein Eppendorftube überführt und in der Eppendorftischzentrifuge bei 5000rpm 5min pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200µl Puffer P1 resuspendiert. 200µl Puffer P2 werden zugefügt und das Gefäß 4-5mal invertiert. Die durchgeführte alkalische Lyse verursacht eine zähflüssige Konsistenz des Lysats. Anschließend werden 200µl Puffer P3 zugefügt und das Gefäß 4-5mal invertiert. Es fällt ein flockiger Niederschlag aus, der unter anderem aus schwerlöslichem Kalium-SDS besteht. Die Proben werden 5min bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand wird auf einen Spinfilter gegeben der in ein Eppendorftube platziert wurde. Die Proben werden 30s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Spin Filter wird mit 500µl Puffer W1 und anschließend mit 500µl Puffer W2 gewaschen. Ein weiterer

Zentrifugationsschritt dient zur vollständigen Entfernung des ethanolhaltigen Puffers W2. Abschließend wird der Spinfilter in eine saubere 1,5ml Eppendorftube umgesetzt und die DNA mit 100µl ddH₂O eluiert.

2.2.1.13 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wird über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm in einem Eppendorf Photometer mit UV-Lampe bestimmt. Eine optische Dichte von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA ungefähr einer Konzentration von 50µg/ml. Zur Ermittlung der Reinheit wird die Absorption bei 260nm und bei 280nm gemessen. Das Verhältnis der Absorptionen OD_{260nm}/OD_{280nm} beträgt für reine DNA $\geq 1,8$.

2.2.1.14 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen enzymespezifisch DNA-Sequenzen und hydrolysieren die DNA innerhalb bzw. außerhalb dieser Erkennungssequenz.

Durchführung:

Restriktionsansätze haben ein Volumen von 20µl oder 40µl. Für analytische Zwecke werden 0,5µg DNA, für präparative Ansätze 1µg DNA eingesetzt und pro Mikrogramm DNA mit 10U des entsprechenden Restriktionsenzym hydrolysiert. Die Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur) werden gemäß den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers gewählt. Die Reaktionsansätze werden mindestens 1h inkubiert.

2.2.1.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von doppelsträngigen DNA-Proben erfolgt nach der Dideoxy-Methode [Sanger et al., 1977, modifiziert].

Durchführung:

Pro Sequenzierungsansatz werden jeweils 300 bis 500ng Plasmid-DNA eingesetzt. Es wird das Big Dye Terminator Sequencing Kit verwendet.

Der Sequenzierungsansatz wird in einem 0,2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Sequenzierungsansatz (Gesamtvolumen 20µl)	
9,5µl	ddH ₂ O
1µl	Template (300 bis 500ng Plasmid DNA)
1,5µl	Sequenzierungsprimer (10µM)
5µl	Half-Term-Puffer
3µl	Big Dye Reaktionsmix

Die Sequenzierung erfolgt in dem Eppendorf Mastercycler Gradient.

25x	Denaturierung des Templates für 10s bei 96°C, Annealing des Sequenzierprimers für 5s bei 50°C Elongation für 4min bei 60°C
------------	--

Nach der Reaktion wird der Sequenzieransatz mit 40µl 96%-igem Ethanol gefällt und 30min bei 13000upm in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert. Der Ethanol wird abgenommen und das DNA-Pellet mit 60µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Danach wird 5min zentrifugiert, der Ethanol wird erneut abgenommen und das DNA-Pellet getrocknet.

Im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, UKE Hamburg, werden die Sequenzieransätze in einem automatischen Sequenzierer (ABI 733) auf einer Polyacrylamidmatrix elektrophoretisch aufgetrennt und die fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotide detektiert.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten werden an der sterilen Werkbank durchgeführt. Verwendete Lösungen und Geräte werden entweder steril vom Hersteller bezogen oder bei 121°C und 2bar für 35min autoklaviert. Die Desinfektion der Oberflächen erfolgt mit 80%igem Ethanol.

2.2.2.1 Transformation von Bakterien

Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Durchführung:

Jeweils 100µl chemisch kompetente Bakterien (OD_{600} von 7,5) werden 10min im Eisbad aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes bzw. des Plasmids werden die Bakterien 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für 1min. Die Transformationsansätze werden in jeweils 1ml LB-Medium überführt, unter Schütteln bei 37°C 1h inkubiert und unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten ausgestrichen. Diese Agarplatten werden über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37°C inkubiert.

Transformation chemisch superkompetenter Zellen

Für die Transformation chemisch superkompetenter Zellen werden die *E. coli* TOP10F'-Zellen von Invitrogen verwendet.

Durchführung:

50µl superkompetente Zellen werden im Eisbad aufgetaut, das Soc Medium wird bis auf RT aufgetaut. Der Ligationsansatz bzw. das enthaltene Plasmid werden zu den Zellen gegeben und mit der Pipette vorsichtig gemischt. Es erfolgt eine Inkubation der Transformationsansätze von 30min auf Eis an die sich ein Hitzeschock von 30s bei 42°C anschließt. 200µl

Soc Medium werden auf die Transformationsansätze gegeben und es erfolgt eine Inkubation von 1h unter Schütteln bei 37°C. Anschließend werden 50 bzw. 200µl der Ansätze auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.2.2 Kultur und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterienflüssigkulturen werden jeweils aus einer Bakterienkolonie gezogen. Zum Animpfen einer Bakterienkolonie wird diese von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 3ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, gegeben. Diese Vorkultur wird über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die auf Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien werden entweder direkt verwendet oder für kurzfristige Lagerung mit Parafilm verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-XL1-Blue werden 3ml LB-Medium, versetzt mit 12,5mg/ml Tetracyclin, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 100ml LB-Medium werden mit 1ml Vorkultur (siehe 2.2.2.2) angeimpft und bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6 erreichen. Die Kultur wird zunächst 15min auf Eis gekühlt und dann 15min mit 2000 Umdrehungen pro Minute (upm) bei 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 33,5ml eiskaltem RF I-Medium resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden bei 4°C und 2000upm zentrifugiert. Das Pellet wird in 8ml eiskaltem RF II-Medium resuspendiert und 15min auf Eis inkubiert. Je 100µl der Zellen werden in 1,5ml Eppendorftubes aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten werden an der sterilen Werkbank durchgeführt. Verwendete Lösungen und Geräte werden entweder steril vom Hersteller bezogen oder bei 121°C und 1,2bar für 35min autoklaviert. Die Desinfektion der Oberflächen erfolgt mit 80%igem Ethanol.

2.2.3.1 Kontinuierliche Kultivierung von PC12- und NRK52E Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. PC12- und NRK52E Zellen werden in ihren entsprechenden Medien in 250ml Gewebekulturflaschen kultiviert. Alle 3 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 10ml PBS (37°C) gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 3-5min mit 1ml Trypsin EDTA von der Flaschenoberfläche abgelöst und in 9ml Medium

resuspendiert. Jeweils 3ml der Zellsuspension werden in eine neue Gewebekulturflasche überführt und mit Medium auf 15ml aufgefüllt.

2.2.3.2 Transiente Transfektion von PC12- und NRK52E Zellen

Durch verschiedene Transfektionsmethoden kann Fremd-DNA in eukaryontische Zellen eingebracht werden. Zu diesen Methoden gehören die Elektroporation, die Calciumphosphatmethode, die Mikroinjektion und die Transfektion durch kationische Lipidreagenzien. Letztere wurden im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung des LipofectAMINE PLUS Reagent Kit durchgeführt. Kationische Lipidreagenzien bilden in wässrigen Lösungen Liposomen, deren Oberfläche positiv geladen ist (siehe Abbildung 2.2.3.2, Seite 52). Dadurch entsteht eine elektrostatische Anziehungskraft zwischen den Liposomen und dem Phosphatrückgrat der DNA sowie der negativ geladenen Oberfläche von Zellmembranen. Vermutlich assoziieren vier Liposomen mit der Fremd-DNA in Form eines Plasmids und transportieren die eingeschlossene DNA. Eine mRNA- und Proteinexpression von eingebrachter Fremd-DNA erfolgt für 24-48h, danach wird die Fremd-DNA durch Nukleasen abgebaut oder durch Teilung der Zellen aus Tochterzellen entfernt.

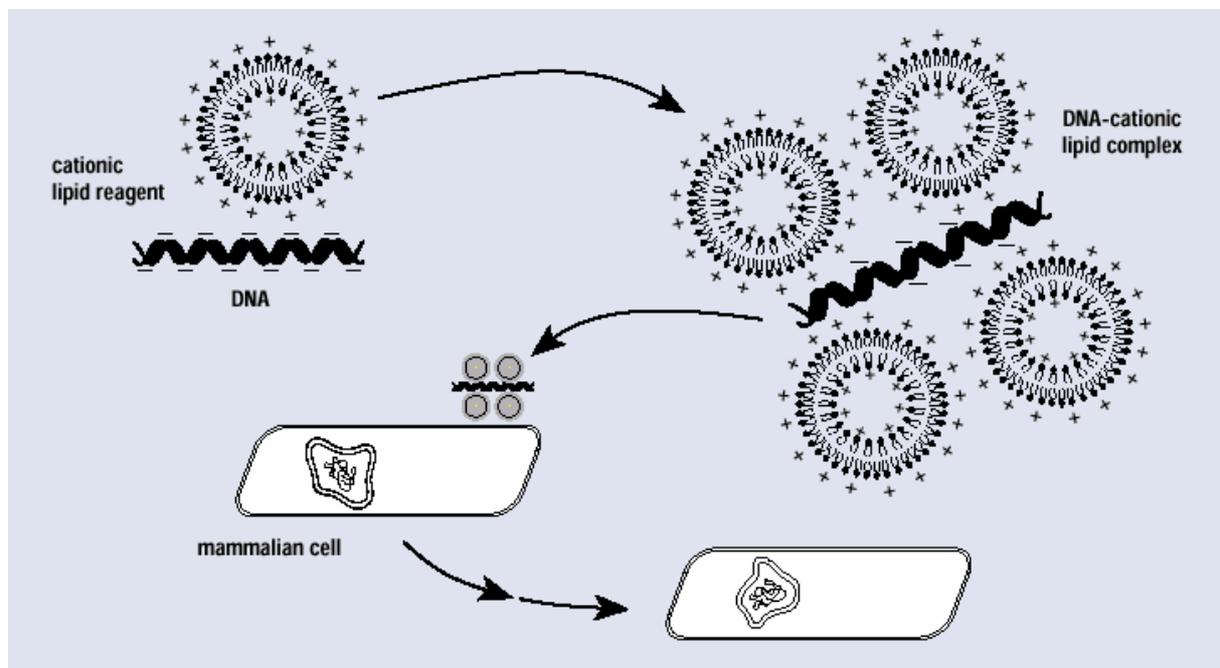


Abbildung 2.2.3.2 Prinzip der transienten Transfektion eukaryontischer Zellen

Zunächst erfolgt eine Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Lipiden und der negativ geladenen Fremd-DNA. Über die Lipide erfolgt die Einbringung der Fremd-DNA in die eukaryontische Zelle.

Durchführung:

Für die Transfektion werden $4 \cdot 10^4$ Zellen in insgesamt 400µl Kulturmedium in Chambered Slides ($A=1,8\text{cm}^2$) ausgesät und 24h kultiviert. Danach erfolgt die Liposomen vermittelte transiente Transfektion der Zellen.

In Polystyrolröhrchen **A** werden pro Kammer,

- 20µl OptiMEM
- 0,2µg Plasmid DNA
- 1µl Plus Reagenz gegeben.

Zuerst werden OptiMEM und Plasmid DNA für 1s gevortexen und danach wird Plus Reagenz zugegeben. Der Ansatz wird wieder für 1s gevortexen und 15 min bei RT inkubiert.

In Polystyrolröhrchen **B** werden pro Kammer,

- 20µl OptiMEM
- 1µl LipofectAMINE Reagenz gegeben.

Der Ansatz wird für 1s gevortexen und auf Röhrchen **A** gegeben. Der Transfektionsmix wird 1s gevortexen und mindestens für 15min bei RT inkubiert.

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und es werden jeweils 200µl OptiMEM pro Kammer zugegeben. Nach Inkubation wird der Transfektionsmix auf die Zellen geträufelt und es erfolgt eine 5stündige Inkubation im Brutschrank. Nach Inkubation werden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und in Kulturmedium für 24-48h weiter kultiviert.

2.2.3.3 Fixierung & Permeabilisierung eukaryontischer Zellen

Nach transienter Transfektion und eukaryontischer Expression der Fusionsproteine für 24-48h werden die Zellen für den Nachweis von Mikrofilamenten aufbereitet.

Durchführung:

Das Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen werden mit PBS (37°C) gewaschen. Die Fixierung erfolgt mit 3%igem (w/v) Paraformaldehyd in PBS (37°C) für 10-20min. Die Zellen werden 2x mit PBS gewaschen (37°C) und mit 0,3%igem (v/v) Triton-X-100 in PBS 3-5min bei 37°C permeabilisiert. Anschließend werden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 0,2%iger (w/v) Gelatine in PBS bei RT für 45min inkubiert. Abschließend werden die Zellen 3x mit PBS gewaschen.

2.2.3.4 Nachweis von Mikrofilamenten & Mikrotubuli

Der Nachweis von Filamenten des Zytoskeletts erfolgt durch spezifische Antikörper und markiertes Phalloidin.

Mikrofilamente: Nachweis durch FITC oder TRITC markiertes Phalloidin (SIGMA, Deisenhofen).

Mikrotubuli: Nachweis durch monoclonalen anti- β -tubulin Antikörper gefolgt von Inkubation mit Texas-Red markiertem IgG.

Durchführung:

Für den Nachweis der Mikrotubuli werden die Zellen für 45min mit primärer Antikörperlösung inkubiert und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit der sekundären Antikörperlösung für 45min im Dunkeln.

Mikrofilamente bzw. filamentöses Aktin (F-Aktin) werden durch Inkubation der Zellen mit fluoreszent markiertem Phalloidin für 45min im Dunkeln nachgewiesen.

Nach Inkubation der Zellen mit sekundärer Antikörperlösung oder Phalloidinlösung werden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und können unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert werden.

2.2.3.5 Fluoreszenzmikroskopische Auswertungen

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der fixierten sowie der lebenden Zellen erfolgt durch auf einem Monochromator basierenden Imaging System (Improvision, Heidelberg) in Verbindung mit einem Leica DM IRBE Fluoreszenzmikroskop bei 100facher Vergrößerung. Zur Bilddokumentation werden eine 12 bit grey-scale CCD Camera (typ C4742-95-12 NRB; Hamamatsu, Enfield) und die Software OpenLab 2.2.0 (Improvision, Heidelberg) verwendet.

Die Excitation des EGFP erfolgt bei einer Wellenlänge von 488nm und die von TRITC bei 520nm. Die Emission von EGFP erfolgt bei 510nm und von TRITC bei 572nm. Um konfokale Bilder zu erhalten wird eine mathematische Dekonvolution der auf Rohdaten basierenden Bilder durchgeführt. Diese Dekonvolution beruht auf dem Prinzip des „point-spread“ Algorithmus [Altherton et al., 1997] und wird mit dem Openlab Confocal Imaging Software Modul (Improvision, Heidelberg) durchgeführt.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Bakterielle Expression eines Glutathion-S-Transferase Fusionsproteins

Um die Aktin-Bindungseigenschaften eines Fragments aus dem N-terminalen Bereich der RnIP3K B *in vitro* zu studieren, wird dieser Abschnitt als Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsprotein heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) RIL exprimiert.

Durchführung:

Für die heterologe Expression werden 3ml LB Medium mit 3 μ l Ampicillin und 3 μ l Chloramphenicol versetzt und mit dem entsprechenden Klon unter sterilen Bedingungen angeimpft. Es erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator. Mit dieser Vorkultur werden 200ml LB Medium, versetzt mit 200 μ l Ampicillin, 200 μ l Chloramphenicol und

2ml Glucose, angeimpft. Die Kultur wird im Schüttelinkubator inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,5 erreicht ist. Die Induktion der Expression erfolgt durch die Zugabe von 0,5mM IPTG, da die Proteinexpression des pGEX Plasmids unter der Kontrolle des induzierbaren tac Promotors steht. Nach erneuter Inkubation für 2h werden die Zellen 15min bei 10000rpm (GSA-Rotor) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 15ml Puffer E resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

2.2.4.2 Lyse der Bakterien nach heterologer Expression eines Glutathion-S-Transferase Fusionsproteins

Durchführung:

Die in Puffer E resuspendierten Bakterien werden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Bei RT werden nacheinander 150 μl PMSF (0,1M), 75 μl Benzamidin (0,1M), 15 μl DTT (1M) und 750 μl Triton X-100 (10%) zugegeben. Die Lösung wird durch mehrmaliges invertieren gemischt, kurz auf Eis inkubiert und anschließend sonifiziert. Die entstehenden Zelltrümmer werden 10min bei 10000rpm (SS34 Rotor) abzentrifugiert und der Überstand wird bis zur Reinigung über Glutathion 4B Sepharose im Kühlraum auf Eis inkubiert.

2.2.4.3 Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase Fusionsproteins

Die Aufreinigung des Glutathion-S-Transferase Fusionsproteins erfolgt über Säulenchromatographie wobei Glutathion Sepharose 4B als Affinitätsmatrix dient.

Durchführung:

Die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins erfolgt im Kühlraum. In eine Säule werden 1,33ml Glutathion Sepharose 4B eingefüllt und die Matrix 2mal mit 10ml PBS gewaschen. Das Fusionsprotein wird auf die Säule gegeben. Unspezifisch gebundene Proteine werden durch 3x waschen mit 10ml PBS entfernt. Die Elution des GST Fusionsproteins erfolgt bei RT durch die Zugabe von 3mal 1ml Elutionspuffer. Der Elutionspuffer enthält reduziertes Glutathion, welches die Fusionsproteine von der Matrix verdrängt. Das Eluat wird aufgefangen, gepoolt und in Centricon YM 10 durch Zentrifugation bei 5000rpm (GSA Rotor) eingengt. Bis zur weiteren Verwendung wird das Eluat im Kühlraum auf Eis gelagert.

Die Säule wird nach der Elution des Fusionsproteins mit 10ml PBS gewaschen und kann durch Zugabe von 0,02% NaN_3 in PBS im Kühlraum aufbewahrt werden.

2.2.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung wird die Methode nach Bradford (Bradford M.M., 1976) angewendet. Zur Proteinbestimmung wurde das Coomassie Protein Assay Reagent von

Pierce (Bradford Reagenz) verwendet, der den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 enthält.

Durchführung:

Für die Erstellung einer Eichkurve wird 100µg/ml BSA als Standard verwendet.

Eichkurve:

BSA (µl)	H ₂ O (µl)
5	95
10	90
15	85
20	80
25	75
30	70
40	60
50	50
0	100

100µl Bradfordlösung werden, sowie auf die BSA Proben zur Erstellung der Eichkurve, als auch auf die Protein Proben gegeben. Die Absorption wird bei 595nm photometrisch im Spektrometer bestimmt. Anhand der Eichkurve kann der Proteingehalt in den Proben bestimmt werden.

2.2.4.5 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Anlagerung der SDS-Moleküle (Sodium Dodecyl Sulfate) an hydrophobe Aminosäureseitenketten werden die Proteine denaturiert. Aufgrund der eingebrachten negativen Ladungen durch das SDS sind Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich stark negativ geladen. Durch ihr Laufverhalten in einem Polyacrylamidgel kann man Proteinen so durch Vergleich mit Standards ein apparentes Molekulargewicht zuordnen. Man bedient sich der diskontinuierlichen Gelelektrophorese, wobei man die Proteine vor dem Erreichen des Trenngels in einem Sammelgel mit niedrigerem pH-Wert fokussiert. Das gelingt aufgrund der Tatsache, dass das im Laufpuffer enthaltene Glycin bei dem niedrigerem pH-Wert im Sammelgel ungeladen ist und so ausschließlich die Proteine als Ladungsträger zur Verfügung stehen. Dadurch wandern sie bei gleicher Spannung im Sammelgel viel schneller als im Trenngel.

Durchführung:

Die zu analysierenden Proben werden mit 4x SDS Probenpuffer versetzt, die in den Proben enthaltene Proteine durch 10minütiges Erhitzen bei 95°C denaturiert und mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgt für 2h bei 100V.

Zusammensetzung eines 15% SDS Gels (1mm)	
Trenngel 15%	Sammelgel 5%
5ml 30%Acrylamidlösung	0,833ml 30%Acrylamidlösung
2,5ml Trenngelpuffer mit SDS	1,25ml Sammelgelpuffer
2,4ml H ₂ O	2,842ml H ₂ O
50µl Ammoniumpersulfat	25µl Ammoniumpersulfat
50µl TEMED	50µl TEMED

Nach durchgeführter Elektrophorese werden die Proteine im Gel entweder mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (siehe Abschnitt 2.2.4.5) oder durch eine Inkubation in einer Färbelösung detektiert. Das Molekulargewicht der Proteine kann anhand des mitgelaufenen Molekulargewichtsmarker bestimmt werden. Das Gel wird anschließend im Geltrockner getrocknet.

2.2.4.5 Western-Blot (semi dry)

Der Western-Blot ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen. Zunächst werden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, dadurch kann ein spezifischer primärer Antikörper an das gewünschte Protein binden, der wiederum durch einen sekundären Antikörper detektiert werden kann. Der sekundäre Antikörper ist an das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt, wodurch an der Bindungsstelle eine Farb-reaktion katalysiert wird und die spezifischen Proteinbanden detektiert werden.

Durchführung:

Entsprechend der Gelgröße werden Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell) und Whatmanfilterpapier zugeschnitten und wie folgt in die Semi dry Blotkammer geschichtet:

- 3 Whatmanfilterpapiere durchtränkt mit Kathodenpuffer
- Polyacrylamidgel befeuchtet mit Kathodenpuffer
- Nitrocellulosemembran befeuchtet mit Kathodenpuffer
- 3 Whatmanfilterpapiere durchtränkt mit Anodenpuffer I
- 3 Whatmanfilterpapiere durchtränkt mit Anodenpuffer II

Der Transfer findet für 45min statt, wobei pro cm² Polyacrylamidgel 0,8mA Strom angelegt werden. Die Nitrocellulosemembran wird zur Detektion der übertragenen Proteine 5min mit Ponceau Färbelösung gefärbt, anschließend mit dH₂O gewaschen und die Banden der Molekulargewichtsmarker angezeichnet. Durch eine 30minütige Inkubation mit 3% BSA in TBS werden die unspezifischen Proteinbindungsstellen blockiert bevor eine Inkubation mit einem spezifischen primären Antikörper (Anti-GST) über Nacht bei 4°C erfolgt. Anschließend wird die Membran 3x mit 0,3% BSA in TTBS für jeweils 5min gewaschen und mit einem sekundären Antikörper für 1h bei RT inkubiert. Der sekundäre Antikörper wird durch

3maliges Waschen mit 0,3% BSA in TTBS entfernt. Abschließend erfolgt die Farbreaktion in 5ml AP-Puffer durch die Zugabe von 25µl NBT und 25µl BCIP.

2.2.4.6 Präparation von Aktin

Aktin wird aus der gestreiften Skelettmuskulatur von Kaninchen nach der Methode von Seszent-Györgyi [Seszent-Györgyi et al., 1951] isoliert.

Das verwendete Aktin wurde freundlicherweise von Prof. A. Wegner aus dem Institut für physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt, in dessen Institut auch die fluoreszenzspektroskopischen Messungen durchgeführt wurden.

2.2.4.7 Präparation von NBD-Aktin

NBD-Aktin wird nach der Vorschrift von Detmers et al. [1981] hergestellt.

Die Bindung von NBD-Cl an die Aminogruppe des Lysin 373 von Aktin bildet die Grundlage der fluoreszenzspektroskopischen Messungen. NBD-Cl zeigt keine Eigenfluoreszenz, erst nach der Bindung an Amino- und Thiolgruppen von Proteinen entsteht eine fluoreszierende Verbindung. Durch die Kopplung von G-Aktin an NBD-Cl erhält man fluoreszierendes Aktin.

Das verwendete NBD-Aktin wurde freundlicherweise von Prof. A. Wegner aus dem Institut für physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt.

2.2.5 Fluoreszenzspektroskopische Methoden

Viele organische Substanzen können spezifische Strahlungsenergie im sichtbaren Bereich des Spektrums absorbieren und als energieärmere Fluoreszenzstrahlung wieder abgeben. Wird die Fluoreszenzstrahlung in Abhängigkeit bestimmter Parameter verändert, so lässt sich diese Substanz als Messgröße für die Veränderung dieser Parameter verwenden.

Fluoreszierendes NBD-Aktin, das in Lösung leicht gelblich erscheint, bildet die Grundlage der hier durchgeführten fluoreszenzspektroskopischen Messungen. Wird NBD-Aktin durch die Zugabe von Salz polymerisiert, erhöht sich dabei die Fluoreszenzintensität und der Polymerisationsvorgang kann mit einem Fluoreszenzspektrometer verfolgt werden.

Alle Versuche werden mit einem Fluoreszenzspektrometer LS-50 (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Excitation des NBDs erfolgt bei 480nm, die emittierte Fluoreszenzstrahlung wird bei 540nm gemessen. Die Messungen werden in Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim) durchgeführt, welche zur Äquilibrierung der Proben in einem temperierbaren Kupferblock gestellt werden.

2.2.5.1 Präparation von polymeren NBD-Aktin

Durchführung:

Ungelabeltes G-Aktin wird mit 10% NBD-markiertem Aktin (9:1) gemischt. Dieses Gemisch wird auf eine Endkonzentration von 10µM Gesamtaktin mit Aktinpuffer verdünnt. Zu dem Ansatz werden KCl und MgCl₂ gegeben, bis eine Endkonzentration von 100mM bzw. 1mM erreicht ist. Durch Inkubation bis zu 1h bei 37°C polymerisiert G-Aktin und bildet F-Aktin. Der Polymerisationsvorgang wird durch einen 2,2 bis 2,3fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität des F-Aktins im Vergleich zum G-Aktin im Fluoreszenzspektrometer verfolgt.

2.2.5.2 *In vitro* Aktin-(GST-IP3K)-Bindungsassay

Bindet ein Protein an NBD-Aktin so steigt die initiale Fluoreszenz an und kann im Spektrometer verfolgt werden.

Durchführung:

In einer Quarzküvette werden zu polymerem oder monomerem NBD-Aktin (1µM) unterschiedliche Konzentrationen des GST-IP3K-Fusionproteins gegeben und die Fluoreszenzintensität im Spektrometer für 20min verfolgt. Als Kontrolle dient GST. Alle Messungen werden bei 37°C im Aktinpuffer mit einer Endkonzentration von 100mM KCl und 1mM MgCl₂ durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der cDNA der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (IP3K B) aus *Rattus norvegicus*

Um erste Hinweise auf potentielle Bindungspartner der Isoform B von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (IP3K B) zu gewinnen sollte zuerst die subzelluläre Verteilung des Enzyms mittels Expression von EGFP-Fusionsproteinen untersucht werden. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, musste ein Konstrukt hergestellt werden, das die vollständige cDNA der IP3K aus *Rattus norvegicus* beinhaltet. Dieses Konstrukt sollte als Template für die Herstellung unterschiedlicher weiterer Konstrukte dienen, die in Lokalisationsstudien eingesetzt werden sollten. Des Weiteren sollte mit diesem Konstrukt die in unserem Labor durch 5'-RACE amplifizierte codierende Sequenz der Ratten IP3K B verifiziert werden. Die in dieser 5'-RACE als Template eingesetzte mRNA wurde in unserem Labor aus Hirn (*Rattus norvegicus*) mit der Cäsiumchloridmethode aufgereinigt [Illies, Dissertation 2002].

3.1.1 Strategie zur Klonierung der IP3K B-cDNA

Als Methode zur Klonierung der IP3K B wurde eine RT-PCR mit genspezifischen Primern gewählt. Als Template diente die gesamte RNA aus Hirn (*Rattus norvegicus*). In einer ersten RT-PCR sollten die gesamte codierende Sequenz sowie die 5'-gelegenen 710 bp der Kinase amplifiziert werden. Die Amplifikation der Volllänge gelang nicht. Die 5'-gelegenen 710 bp, im Folgenden als Fragment 1 bezeichnet, wurden erfolgreich amplifiziert und in den Vektor pTOPO kloniert. (siehe Abbildung 3.1.2, Seite 63). Wiederholte Modifikationen zur Optimierung der RT-PCR führten nicht zu einer erfolgreichen Klonierung der gesamten cDNA in einer Reaktion.

Aus diesem Grund wurde eine Strategie entwickelt, in der die noch nicht amplifizierte cDNA in zwei weitere Sequenzabschnitte, Fragment 2 mit einer Länge von 1644bp und Fragment 3 mit einer Länge von 870bp, unterteilt wurde. Dabei wurden die eingesetzten Primer so konstruiert, dass durch RT-PCR überlappende Fragmente generiert wurden. Mittels RT-PCR konnten nur sehr geringe Mengen der Amplifikate der Fragmente 2 und 3 gewonnen werden, die nicht erfolgreich in die Vektoren pTOPO oder pGEM TEasy kloniert werden konnten. Auf Grund dessen wurden die Amplifikate der RT-PCR als Template in einer sich anschließenden *nested*-PCR eingesetzt. In dieser *nested*-PCR wurden mit jeweils zwei genspezifischen Primern verkürzte Abschnitte der Fragmente 2 und 3 amplifiziert. Mit dieser Strategie konnten zwei Fragmente generiert werden, die als Fragmente 2a (1464bp) und 3a (801bp) bezeichnet wurden (siehe Abbildung 3.1.1, Seite 62). Diese Amplifikate konnten erfolgreich in den Vektor pGEM TEasy kloniert werden.

Um die bisher erhaltenen cDNA Fragmente der Kinase (Fragment 1, 2a und 3a) zu einem vollständigen Klon zusammenzufügen wurde eine PCR-Methode angewendet die als „Generation of full-length cDNA by fusion and amplification“ im Marathon Kit (siehe Methoden Handbuch) beschrieben ist. Diese Methode setzt sich aus zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen zusammen. In der ersten PCR werden zwei überlappende cDNA Fragmente fusioniert und in einer anschließenden zweiten PCR amplifiziert. Dabei dient das Produkt der ersten PCR als Template für die zweite Reaktion. Eine Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist das Überlappen der zu fusionierenden cDNA Fragmente, da sie in der ersten PCR selbst als Primer dienen. In der darauf folgenden zweiten PCR werden sequenzspezifische Primer verwendet. Diese Methode wird im weiteren Verlauf als Fusions-PCR bezeichnet.

Um diese Methode anwenden zu können wurden die klonierten cDNA Fragmente 1, 2a und 3a mit sequenzspezifischen Primern in einer PCR amplifiziert. In der ersten Fusions-PCR wurden die Amplifikate der Fragmente 1 und 2a zu einem 2061bp großen Fragment fusioniert (Abbildung 3.1.4, Seite 64). Dieses als Fragment 4 bezeichnete Fragment wurde in den Vektor pGEM TEasy kloniert und für eine Fusion mit Fragment 3a mit sequenzspezifischen Primern erneut amplifiziert. Die vollständige cDNA der Kinase wurde durch eine abschließende Fusions-PCR gewonnen. In dieser abschließenden Reaktion wurden die Fragmente 4 und 3a zu einem 2805bp großen Fragment fusioniert (siehe Abbildung 3.1.5, Seite 64). Dieses als Fragment 5 bezeichnete Fragment entspricht der vollständigen codierenden cDNA der Ratten IP3K B. Eine Übersicht über die Strategie zur Klonierung und Amplifikation der vollständigen cDNA zeigt die folgende Abbildung.

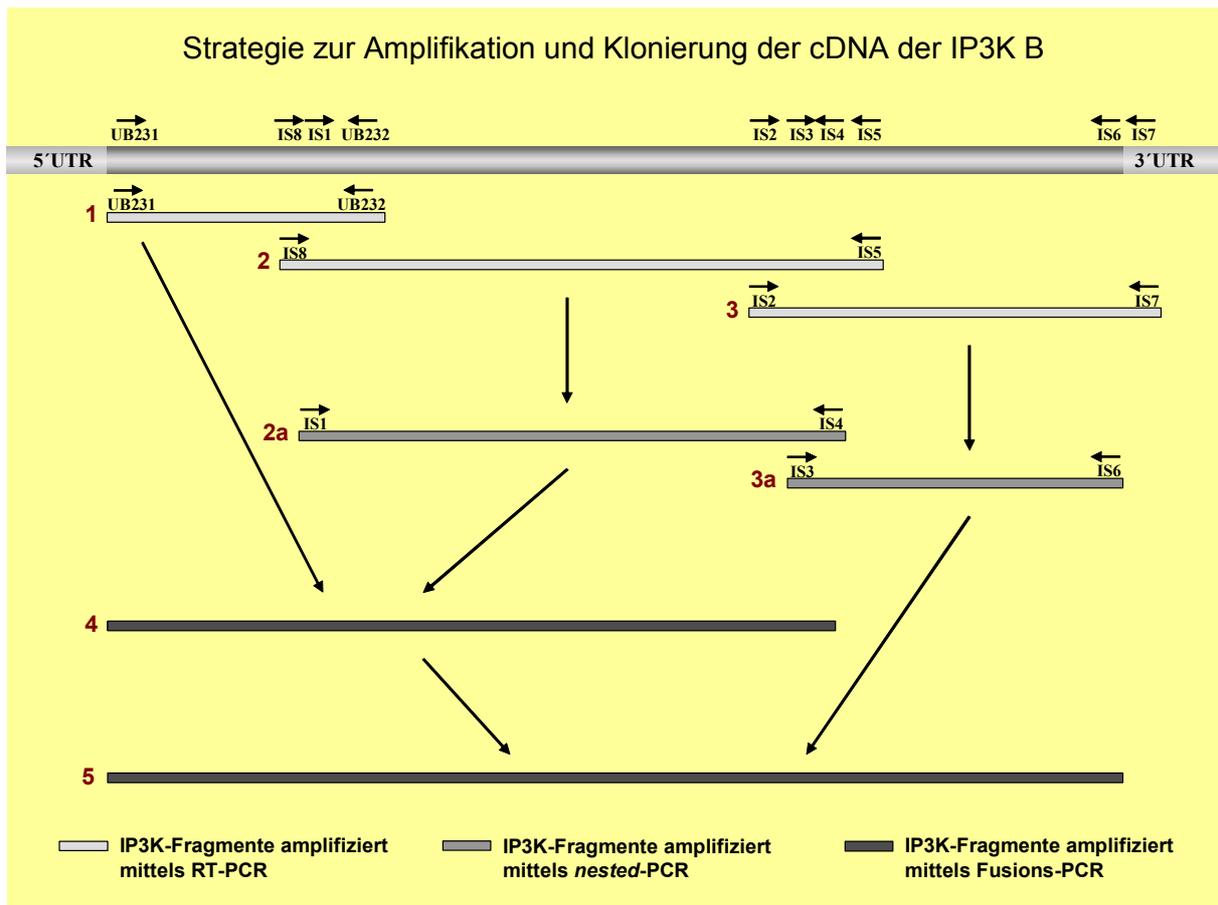


Abbildung 3.1.1 Strategie zur Amplifikation und Klonierung der cDNA der IP3K B

Der obere Balken stellt schematisch die vollständige cDNA der IP3K dar. Die Lage und Orientierung der verwendeten genspezifischen Primer sind oberhalb davon abgebildet. Mit roten Ziffern gekennzeichnete Balken zeigen die Größe der in unterschiedlichen PCR-Reaktionen amplifizierten Fragmente. Die Pfeile zeigen an, welche Fragmente als Template für die Amplifikation weiterer Fragmente dienten bzw. miteinander fusioniert wurden. Die Fragmente 1, 2 und 3 wurden mittels RT-PCR amplifiziert, die Fragmente 2a und 3a mittels *nested*-PCR. Durch Fusions-PCR entstanden die Fragmente 4 und 5. Fragment 5 entspricht der vollständig codierenden cDNA der Ratten IP3K B.

3.1.2 Amplifikation der IP3K B-cDNA Fragmente 1, 2 und 3 mittels RT-PCR

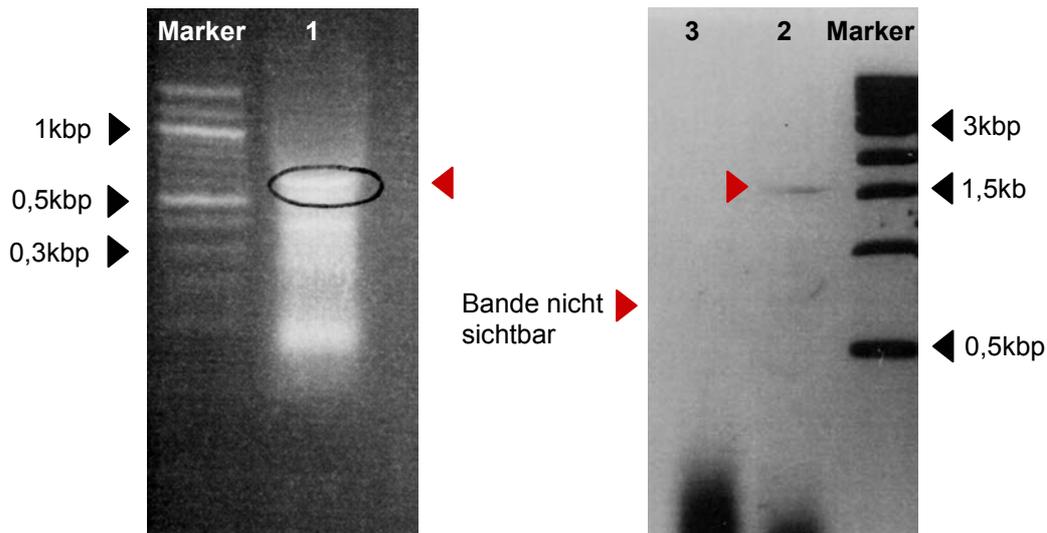


Abbildung 3.1.2 Amplifikation der Fragmente 1, 2 und 3 mittels RT-PCR

Das linke Agarosegel zeigt das Amplikon der ersten RT-PCR (Fragment 1). Mit dieser Reaktion wurden die 5'-gelegenen 710bp amplifiziert. Das mit einem roten Pfeil gekennzeichnete Amplifikat wurde aus dem Gel extrahiert, kloniert und sequenziert. Im rechten Gel sind die Amplikate der zweiten und dritten RT-PCR aufgetragen. Bahn 2 zeigt die Amplifikation des Fragmentes 2 mit einer Größe von 1644bp. Das in dieser Bahn mit einem roten Pfeil gekennzeichnete Amplifikat wurde aus dem Gel extrahiert, und als Template für die sich anschließende *nested*-PCR eingesetzt. Die Amplifikation des in Bahn 3 dargestellten Fragmentes 3 mit einer erwarteten Größe von 870bp führte nicht zu einer im Gel nachweisbaren DNA-Menge. Aus dem Bereich zwischen 0,5kb und 1kb wurde aus der Bahn 3 ein Gelstück ausgeschnitten, die DNA extrahiert und als Template in der sich anschließenden *nested*-PCR verwendet.

3.1.3 Amplifikation der IP3K B-cDNA Fragmente 2a und 3a mittels *nested*-PCR

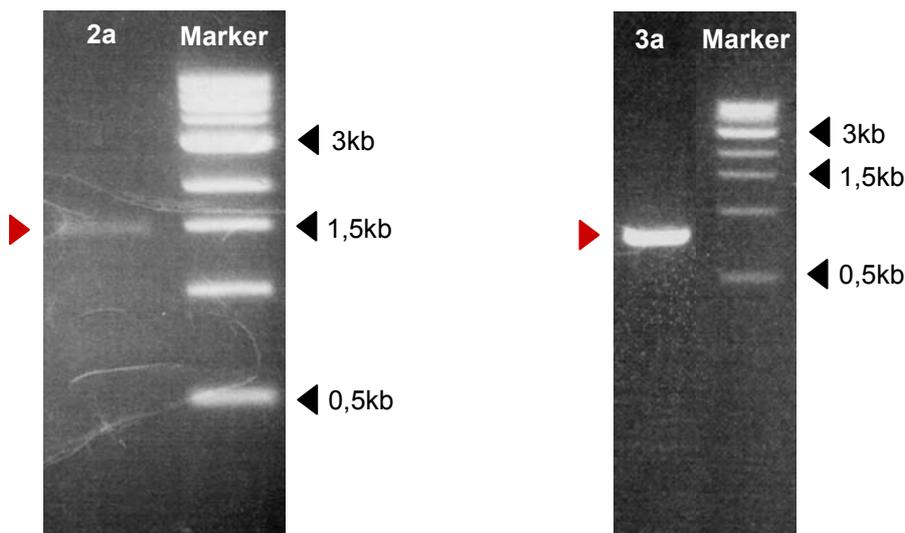


Abbildung 3.1.3 Amplifikation der Fragmente 2a und 3a mittels *nested*-PCR

Das linke Agarosegel zeigt das Amplikon der *nested*-PCR (Fragment 2a) mit einer Größe von 1464bp. Im rechten Gel ist das Amplikon der *nested*-PCR (Fragment 3a) mit einer Größe von 801bp zu sehen. Die mit einem roten Pfeil gekennzeichneten Amplikate wurden aus dem Gel extrahiert, kloniert und sequenziert.

3.1.4 Amplifikation des IP3K B-cDNA Fragmentes 4 mittels Fusions-PCR

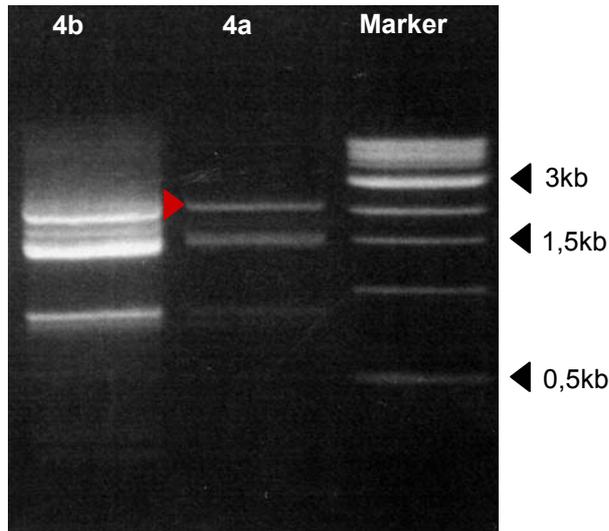


Abbildung 3.1.4 Amplifikation des Fragmentes 4 mittels Fusions-PCR

In beiden Bahnen (4a und 4b) des Agarosegels sind die Amplifikate der zweiten Reaktion der Fusions-PCR mit einer Größe von 2061bp in unterschiedlichen Mengen zu sehen, wobei in der Bahn 4b aufgrund der eingesetzten Templatemenge mehr Amplifikat entstanden ist. Das mit einem roten Pfeil gekennzeichnete Amplifikat wurde aus dem Gel extrahiert, kloniert und sequenziert.

3.1.5 Amplifikation des IP3K B-cDNA Fragmentes 5 mittels Fusions-PCR

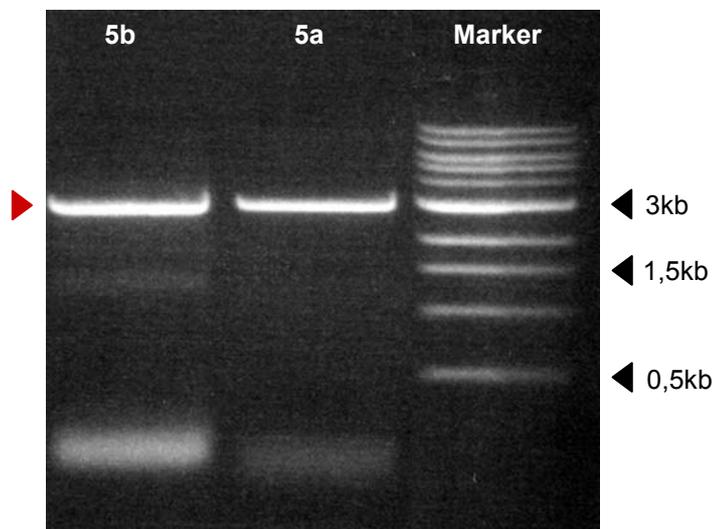


Abbildung 3.1.5 Amplifikation des Fragmentes 5 mittels Fusions-PCR

In beiden Bahnen (5a und 5b) des Agarosegels sind die Amplifikate des zweiten Schrittes der Fusions-PCR zu sehen. Die Amplifikate haben eine Größe von 2805bp und entsprechen der vollständigen IP3K B-cDNA. Das mit einem roten Pfeil gekennzeichnete Amplifikat wurde aus dem Gel extrahiert, kloniert und sequenziert.

3.2 Analyse der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (*Rattus norvegicus*) auf Ebene der cDNA Sequenz

Die mittels RT-PCR amplifizierte cDNA der Ratten IP3K B umfasst 2805 Basenpaare und codiert für ein Protein bestehend aus 934 Aminosäuren. Ihre cDNA Sequenz stimmt mit der bereits in 5'-RACE Experimenten amplifizierten cDNA Sequenz der IP3K B überein. Der Anteil der Nukleotide Guanin und Cytosin beträgt 58,36%, der Anteil der Nukleotide Adenin und Thymin beträgt demzufolge 41,64%. Eine genaue Aufschlüsselung zeigt die folgende Tabelle.

Nukleotid	Anzahl	Mol%
A	684	24,39
C	783	27,91
G	854	30,45
T	484	17,25

Auf die C-terminal gelegene katalytische Domäne des Enzyms folgt N-terminal die Calmodulin-Bindungsdomäne. Die Identifikation dieser beiden Domänen erfolgte durch den Sequenzvergleich mit der humanen und Ratten IP3K Isoform A sowie der Isoform C. Beide Sequenzbereiche sind in der Abbildung farblich hervorgehoben. Nicht farblich hervorgehoben ist der übrige Sequenzbereich der Kinase. Dieser, bisher uncharakterisierte Sequenzbereich, wird in dieser Arbeit als N-terminaler Bereich bezeichnet.

1	ATG GCT GTG TAC TGC TAT GCC CTC AAT AGC CTG GTG ATC ATG AAC	45
1	M A V Y C Y A L N S L V I M N	15
46	AGC ACC AAC GAG CTG AAG AGT GGC AGC CCC CTG CCC AGC GGC AGC	90
16	S T N E L K S G S P L P S G S	30
91	GAA ACG CCT CAG CCC TCC GGG AGG GCC GCG CTG AGC CCC GGC AGC	135
31	E T P Q P S G R A A L S P G S	45
136	GTC TTC AGC CCT GGG AGA GGC GCC TCC TTT CTC TTC CCC CCA GCA	180
46	V F S P G R G A S F L F P P A	60
181	GAG TCG CTG TCG CTG GAG GAG CCT GGG AGT GCT GGG GGT TGG CGC	225
61	E S L S L E E P G S A G G W R	75
226	AGC GGC CGA CGG AGG CTG AAT AGT AGC AGC GGT AGC GGA GGT GGC	270
76	S G R R R L N S S S G S G G G	90
271	AGC AGC AGC AGC AAC AGC AGC AGC AGC AGT GGC GTG GGC AGT CCC	315
91	S S S S N S S S S S G V G S P	105
316	AGT TGG GCT GGC CGC CTG CGA GGG GAC GCG CAG CAG GTG GTG GCG	360
106	S W A G R L R G D A Q Q V V A	120
361	ACC CGC ATC CTC TCC CCA CCT GGG CCG GAG GAG GCC CAG AGG AAG	405
121	T R I L S P P G P E E A Q R K	135
406	CTG AGG ATT CTG CAG CGC GAA TTG CAA AAT GTG CAG GTG AAC CAG	450
136	L R I L Q R E L Q N V Q V N Q	150
451	AAA GTG GGC ATG TTC GAG GCG CAA ATC CAG GCA CAG ACC TCT GCT	495
151	K V G M F E A Q I Q A Q T S A	165

496	ATT	CAA	GCG	CCC	CGA	AGC	CCG	CGT	TTG	GGT	AGG	GCT	CGT	TCG	CCC	540
166	I	Q	A	P	R	S	P	R	L	G	R	A	R	S	P	180
541	TCC	CCG	TGT	CCC	TTC	CGA	AGC	AGC	AGC	CAG	CCT	CCT	GAA	AGG	GTC	585
181	S	P	C	P	F	R	S	S	S	Q	P	P	E	R	V	195
586	TTG	GCT	CCA	TGT	TCC	CCA	AGT	GAG	GAA	CGG	AGA	ACA	AAG	TCC	TGG	630
196	L	A	P	C	S	P	S	E	E	R	R	T	K	S	W	210
631	GGA	GAA	CAA	TGT	ACA	GAG	ACC	CCA	GAT	GCC	AAC	TCC	AGG	AGG	AGA	675
211	G	E	Q	C	T	E	T	P	D	A	N	S	R	R	R	225
676	AGC	AGA	CTC	AGC	ACA	CAC	CCC	TCG	AAG	GAC	AAG	GAG	GGA	GTG	GCC	720
226	S	R	L	S	T	H	P	S	K	D	K	E	G	V	A	240
721	CCT	CTT	TTA	GGC	CCA	GCC	AGC	CCG	ACC	AGG	TTA	GGG	ACT	CAG	AGT	765
241	P	L	L	G	P	A	S	P	T	R	L	G	T	Q	S	255
766	CCA	TCT	ACT	TCA	GTG	AGA	ATG	GAA	AGA	GGT	TCC	CCG	GCC	AGT	CCC	810
256	P	S	T	S	V	R	M	E	R	G	S	P	A	S	P	270
811	CGC	TGT	GGC	TCA	CCC	ACA	CCC	ATG	GAA	ATT	GAC	AAG	AGG	ACT	GCT	855
271	R	C	G	S	P	T	P	M	E	I	D	K	R	T	A	285
856	CCC	TCA	CTG	GAG	CAC	TTT	GGG	ACT	AGC	TTA	ACG	TTG	GCC	ACT	AAA	900
286	P	S	L	E	H	F	G	T	S	L	T	L	A	T	K	300
901	GTG	GCA	GCT	TCG	GCC	GCA	TCC	GCT	GGA	CCA	CAC	CCT	GGA	CAT	GAT	945
301	V	A	A	S	A	A	S	A	G	P	H	P	G	H	D	315
946	TCT	GTT	CTC	ATG	GAG	GCA	GAC	TGT	GAG	CTA	GGG	GCC	ATG	CGC	CCC	990
316	S	V	L	M	E	A	D	C	E	L	G	A	M	R	P	330
991	TGG	GAG	GCC	CAC	CTG	GAG	AGA	CGG	GGG	CAG	TTT	CTG	GGC	AGG	GAG	1035
331	W	E	A	H	L	E	R	R	G	Q	F	L	G	R	E	345
1036	ACC	GGC	TCA	GCC	CCA	GAG	CCT	ATC	CGG	ACC	CAC	ATT	AGA	GAA	CCC	1080
346	T	G	S	A	P	E	P	I	R	T	H	I	R	E	P	360
1081	CCT	GGA	AGG	GTG	GAA	AGA	GTT	CAT	TCT	GTT	GGT	GGC	CAG	GGC	TCC	1125
361	P	G	R	V	E	R	V	H	S	V	G	G	Q	G	S	375
1126	TGG	ACA	CCT	GAA	GTC	ATC	AAA	AGA	CCA	GAA	GAG	GGA	ACT	GTG	GAT	1170
376	W	T	P	E	V	I	K	R	P	E	E	G	T	V	D	390
1171	GCC	CAA	AGC	TCA	GAG	CTC	TCA	GAG	AAC	CCG	AGA	TGG	TCT	AGA	CTG	1215
391	A	Q	S	S	E	L	S	E	N	P	R	W	S	R	L	405
1216	CCT	GGA	GAC	CCG	GGT	TCC	GTA	GGG	CCT	GAG	AAG	GGA	GGT	AGT	AGG	1260
406	P	G	D	P	G	S	V	G	P	E	K	G	G	S	R	420
1261	ATC	CCA	GGA	ATC	CGA	GGA	CCC	CAG	CAG	ACC	CTG	GAC	AGC	ATG	AGA	1305
421	I	P	G	I	R	G	P	Q	Q	T	L	D	S	M	R	435
1306	GAA	GGG	TCT	TCA	GCA	CTG	GGC	TTG	CTT	GGG	GGC	AGC	CAG	GCA	GCA	1350
436	E	G	S	S	A	L	G	L	L	G	G	S	Q	A	A	450
1351	CAG	CCA	GGG	AGC	ATG	GAT	GTG	GAG	ACA	GGC	ATT	AGT	TGT	GGC	AGA	1395
451	Q	P	G	S	M	D	V	E	T	G	I	S	C	G	R	465
1396	ATG	CTG	GAA	CCC	TTA	CCA	CCT	GGG	GAA	GTA	ACA	ACA	AAT	TTG	AAA	1440
466	M	L	E	P	L	P	P	G	E	V	T	T	N	L	K	480
1441	GAA	CCC	CAG	TGC	CTC	CCT	GGG	GAC	AGG	ATG	GGG	ATG	CAG	CCT	GAG	1485
481	E	P	Q	C	L	P	G	D	R	M	G	M	Q	P	E	495
1486	AGT	TCC	ATA	GTT	TGG	CCC	AGT	GCT	GTG	GAG	GAA	GCT	CCC	CTG	ATC	1530
496	S	S	I	V	W	P	S	A	V	E	E	A	P	L	I	510
1531	TGG	ACG	TGT	GAC	ACA	GGG	ATA	CAG	TTA	AAG	GGG	ACT	TGG	AGA	AGC	1575
511	W	T	C	D	T	G	I	Q	L	K	G	T	W	R	S	525
1576	CAA	GAT	GGA	GAT	GCT	CAT	CCT	AGC	TGC	CAA	GAG	AAG	TCC	CCA	GAC	1620
526	Q	D	G	D	A	H	P	S	C	Q	E	K	S	P	D	540
1621	CAG	AAG	GAC	AAG	GCC	TGC	AGC	CCC	AGC	AAC	ATC	CCG	GCC	ATC	CCT	1665
541	Q	K	D	K	A	C	S	P	S	N	I	P	A	I	P	555

1666	GCA	GTC	ATC	ATT	ACA	GAT	ATG	GGT	GCT	CAG	GAG	GAT	GGA	GGG	TTA	1710
556	A	V	I	I	T	D	M	G	A	Q	E	D	G	G	L	570
1711	GAG	GAG	ATC	CAA	GGA	AGC	CCT	CGG	GGT	CCC	CTG	CCT	CTG	AGG	AAG	1755
571	E	E	I	Q	G	S	P	R	G	P	L	P	L	R	K	585
1756	CTG	TCG	TCC	TCC	TCA	GCC	TCC	TCC	ACT	GGC	TTC	TCC	TCT	TCC	TAT	1800
586	L	S	S	S	S	A	S	S	T	G	F	S	S	S	Y	600
1801	GAG	GAC	TCG	GAG	GAG	GAC	ATC	TCC	AGT	GAC	CCT	GAG	CGC	ACT	CTG	1845
601	E	D	S	E	E	D	I	S	S	D	P	E	R	T	L	615
1846	GAC	CCC	AAC	TCA	GCC	TTT	TTG	CAT	ACC	TTG	GAC	CAG	CAG	AAG	CCC	1890
616	D	P	N	S	A	F	L	H	T	L	D	Q	Q	K	P	630
1891	AGA	GTG	AGC	AAG	TCA	TGG	AGG	AAG	ATA	AAG	AAC	ATG	GTG	CAG	TGG	1935
631	R	V	S	K	S	W	R	K	I	K	N	M	V	Q	W	645
1936	TCC	CCC	TTT	GTC	ATG	TCC	TTC	AAG	AAG	AAG	TAC	CCC	TGG	ATC	CAG	1980
646	S	P	F	V	M	S	F	K	K	K	Y	P	W	I	Q	660
1981	CTG	GCA	GGA	CAT	GCA	GGG	AGC	TTC	AAG	GCA	GCT	GCG	AAT	GGC	CGT	2025
661	L	A	G	H	A	G	S	F	K	A	A	A	N	G	R	675
2026	ATC	CTT	AAG	AAG	CAT	TGT	GAG	TCT	GAA	CAG	CGA	TGC	CTG	GAC	CGG	2070
676	I	L	K	K	H	C	E	S	E	Q	R	C	L	D	R	690
2071	TTA	ATG	GCG	GAT	GTG	CTG	AGG	CCC	TTC	GTG	CCA	GCC	TAC	CAT	GGC	2115
691	L	M	A	D	V	L	R	P	F	V	P	A	Y	H	G	705
2116	GAC	GTG	GTG	AAG	GAC	GGG	GAA	CGC	TAC	AAC	CAG	ATG	GAC	GAC	CTG	2160
706	D	V	V	K	D	G	E	R	Y	N	Q	M	D	D	L	720
2161	CTG	GCT	GAC	TTC	GAT	TCA	CCC	TGC	GTG	ATG	GAC	TGC	AAG	ATG	GGC	2205
721	L	A	D	F	D	S	P	C	V	M	D	C	K	M	G	735
2206	ATC	AGG	ACA	TAC	CTG	GAG	GAA	GAA	CTC	ACC	AAG	GCC	CGG	AAG	AAG	2250
736	I	R	T	Y	L	E	E	E	L	T	K	A	R	K	K	750
2251	CCT	AGC	TTG	CGG	AAG	GAC	ATG	TAC	CAG	AAG	ATG	GTG	GAG	GTG	GAC	2295
751	P	S	L	R	K	D	M	Y	Q	K	M	V	E	V	D	765
2296	CCT	GAG	GCC	CCC	ACT	GAA	GAG	GAG	AAA	GCC	CAG	AGA	GCT	GTG	ACC	2340
766	P	E	A	P	T	E	E	E	K	A	Q	R	A	V	T	780
2341	AAG	CCA	CGT	TAT	ATG	CAG	TGG	CGG	GAA	ACC	ATC	AGT	TCC	ACA	GCT	2385
781	K	P	R	Y	M	Q	W	R	E	T	I	S	S	T	A	795
2386	ACC	TTA	GGC	TTC	AGG	ATC	GAG	GGC	ATC	AAG	AAG	GAA	GAT	GGC	TCT	2430
796	T	L	G	F	R	I	E	G	I	K	K	E	D	G	S	810
2431	GTG	AAC	CGT	GAC	TTC	AAG	AAG	ACC	AAA	ACA	AGG	GAG	CAG	GTC	ACT	2475
811	V	N	R	D	F	K	K	T	K	T	R	E	Q	V	T	825
2476	GAG	GCC	TTC	AGA	GAA	TTC	ACT	AAA	GGA	AAC	CAG	AAC	ATC	CTG	ATT	2520
826	E	A	F	R	E	F	T	K	G	N	Q	N	I	L	I	840
2521	GCC	TAC	CGG	GAC	CGG	TTG	AAG	GCC	ATT	CGA	GAA	ACC	CTG	GAA	GTC	2565
841	A	Y	R	D	R	L	K	A	I	R	E	T	L	E	V	855
2566	TCT	CCC	TTC	TTC	AAG	TGC	CAT	GAG	GTC	ATT	GGC	AGC	TCT	CTC	CTC	2610
856	S	P	F	F	K	C	H	E	V	I	G	S	S	L	L	870
2611	TTC	ATC	CAC	GAC	AAG	AAG	GAG	CAA	GCC	AAG	GTG	TGG	ATG	ATT	GAC	2655
871	F	I	H	D	K	K	E	Q	A	K	V	W	M	I	D	885
2656	TTT	GGG	AAA	ACC	ACG	CCC	CTT	CCG	GAA	GGC	CAG	ACC	CTA	CAA	CAC	2700
886	F	G	K	T	T	P	L	P	E	G	Q	T	L	Q	H	900
2701	GAT	GTC	CCC	TGG	CAG	GAG	GGG	AAC	CGG	GAG	GAT	GGC	TAC	CTC	TCA	2745
901	D	V	P	W	Q	E	G	N	R	E	D	G	Y	L	S	915
2746	GGG	CTG	AAC	AAC	CTC	ATC	GAC	ATC	CTG	ACA	GAA	ATG	TCC	CAG	GGC	2790
916	G	L	N	N	L	I	D	I	L	T	E	M	S	Q	G	930

```

2791 AGC CCA CTC ACC TGA 2805
931  S  P  L  T  *  934

```

Abbildung 3.2.1 Die cDNA- und Aminosäuresequenz der IP3K B (*Rattus norvegicus*)

In der oberen Reihe ist die cDNA Sequenz dargestellt. Die Nukleotide sind, anfangend mit dem Codon für das Start-ATG und endend mit dem Codon für Stop-TGA, in Triplets dargestellt. Die Translation der cDNA Sequenz in Aminosäuresequenz erfolgte mit dem Programm BioEdit und ist jeweils in der zweiten Reihe aufgezeigt. Das START und STOP-Codon sind pink hervorgehoben. Gelb hervorgehoben ist der Bereich der Calmodulin-Bindungsdomäne. Rot ist der katalytisch aktive Bereich des Proteins markiert.

3.3 Analyse der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (*Rattus norvegicus*) auf Ebene der Aminosäuresequenz

3.3.1 Vergleich mit der humanen Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B Aminosäuresequenz

Die cDNA der humanen IP3K B codiert für ein Protein bestehend aus 946 Aminosäuren, die cDNA aus *Rattus norvegicus* für ein Protein bestehend aus 934 Aminosäuren. Die berechneten Molekulargewichte der Proteine liegen bei ~102kDa und ~101kDa. In ihrer Aminosäuresequenz sind die Enzyme zu ~75% identisch. Die Sequenzunterschiede liegen hauptsächlich im nicht katalytisch aktiven Bereich der Enzyme. Für den Sequenzvergleich wurde die von Dewaste et al. [2002] publizierte humane Sequenz der IP3K B herangezogen.

Ein besonderes Augenmerk bei der Analyse der Aminosäuresequenzen richtete sich auf die bisher uncharakterisierten N-terminalen Bereiche der Enzyme. Analysen mit dem Programm PEST-FIND führten zur Identifikation von vier putativen PEST-Sequenzen in der Aminosäuresequenz der Ratte (<http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/>). Zusätzlich zu diesen vier putativen PEST-Sequenzen konnte eine weitere in der humanen Aminosäuresequenz identifiziert werden. Bei PEST-Sequenzen handelt es sich um hydrophile Aminosäurecluster in denen die Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) gehäuft auftreten. Diese Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code geben den Sequenzen ihren Namen. Die PEST-Sequenzen fungieren als proteolytische Signale, unter anderem auch für die Protease Calpain. Im N-terminalen Bereich der untersuchten Kinasen treten die putativen PEST-Sequenzen gehäuft auf. Diese Beobachtung kann auf eine besondere Sensitivität der Enzyme gegenüber Proteolyse in diesem Bereich hindeuten. Generell beinhalten beide Proteinsequenzen insbesondere im N-terminalen Bereich einen hohen Anteil der Aminosäuren Serin und Prolin. So beträgt beispielsweise im N-terminalen Bereich der Ratten-Aminosäuresequenz (AS 1-629) der prozentuale Anteil der Aminosäuren Serin und Prolin 14,94% bzw. 10,65%, dabei treten Anreicherungen dieser Aminosäuren nicht nur in den Bereichen der putativen PEST-Sequenzen auf.

Zusätzlich beinhalten die N-terminalen Bereiche beider Sequenzen mehrere PXXP-Motive, die wiederum putative Bindungsstellen für SH3 Domänen anderer Proteine darstellen könnten [Kami et al., 2002].

Des Weiteren wurden die N-terminalen Bereiche der Sequenzen auf Homologien zu bereits bekannten Domänen untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Abschnitte aus den N-terminalen Bereichen einzeln untersucht. Recherchen unter Verwendung der Pfam Datenbank (<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>) führten zur Identifikation eines Abschnitts der Ähnlichkeiten zu einem I/LWEQ Modul zeigt. Das I/LWEQ Modul ist ein Aktin-Bindungsmotiv bestehend aus 4 Blöcken konservierter Aminosäuren und ist benannt nach der jeweiligen ersten konservierten Aminosäure. Ein dem Block 1 dieses Moduls ähnlicher Sequenzabschnitt konnte von dem verwendeten Programm im N-terminalen Bereich der Enzyme identifiziert werden. Die Blöcke 3 und 4 wurden nicht von dem Programm erkannt. Ihre Identifikation erfolgte durch den Sequenzvergleich mit Proteinen, die das gesamte Modul beinhalten. Block 2 des Moduls konnte weder in der Aminosäuresequenz der Ratte, noch in der humanen Sequenz identifiziert werden. Auf die Sequenzhomologien zwischen der IP3K B und Proteinen aus der I/LWEQ-Proteinfamilie, die ein charakteristisches I/LWEQ Modul aufweisen, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer eingegangen (siehe Abschnitt 3.7, Seite 82).

In der Calmodulin-Bindungsdomäne und der C-terminal folgenden katalytischen Domäne sind die Aminosäuresequenzen der Kinasen hoch konserviert. Die für die InsP₃- und ATP-Bindung wichtigen Aminosäuren liegen in der katalytischen Domäne und sind, so wie die gesamte katalytische Domäne, hoch konserviert.

```

Hs   : 1   MAVYCYALNSLVIMNSANEMKSGGGPGPSGSETPPPPRRRAVLSPGVSFSPGRGASFLFPP 60
      MAVYCYALNSLVIMNS NE+KSG P PSGSETP P RA LSPGVSFSPGRGASFLFPP
Rn   : 1   MAVYCYALNSLVIMNSTNELKSGS-PLPSGSETPQPSGRAALSPGVSFSPGRGASFLFPP 59

Hs   : 61  AESLSPEEPRSPGGWRSGRRRLNSSSGSGSGSSGSS-----VSSPSWAGRLRGDRQQVV 114
      AESLS EEP S GGWRSGRRRLNSSSGSG GSS S+ V SPSWAGRLRGD QQVV
Rn   : 60  AESLSLEEPGSAGGWRSGRRRLNSSSGSGGGSSSSSSSSSSSSSGVGSWAGRLRGDAQVV 119

Hs   : 115 AAGTILSPPGPPEEAKRKLRLIQRELQNVQVNQKVGMFEAHIQAQSSAIQAPRSPRLGRAHS 174
      A LSPPGPEEA+RKLRLIQRELQNVQVNQKVGMFEA IQAQ+SAIQAPRSPRLGRA S
Rn   : 120 ATRILSPPGPPEEAQRKLRLIQRELQNVQVNQKVGMFEAQIQAQTSAIQAPRSPRLGRARS 179

Hs   : 175 PSPCFRSSSQPPGRVLVQGARSEERRTKSWGEQCSETSGTDSGRKGGPSLCSQVKKGM 234
      PSPCFRSSSQPP RVL + SEERRTKSWGEQC+ET +S R+ S S+ K+G+
Rn   : 180 PSPCFRSSSQPPERV LAPCSPSEERRTKSWGEQCETETPDANSRRRSRLSTHPSKDEGEV 239

Hs   : 235 PPLPGRAAPTGSEAQGPSAFVRMEKGIPASPRCGSPTAMEIDKRGSPTPGTRSC LAPSLG 294
      PL G A+PT Q PS VRME+G PASPRCGSPT MEIDKR APSL
Rn   : 240 APLLGPASPTRLGTQSPSTSVRMERGSPASPRCGSPTMEIDK-----TAPSL 289

Hs   : 295 LFARSPFMATEVAARVTSTGPHRPQDLALTEPSGRARELEDLQPPEALVERQGFQFLGSET 354
      F S +AT+VAA S GPH D L E EL ++P EA +ER+GQFLG ET
Rn   : 290 HFGTSLTLATKVAASAASAGPHPGHDSVLMEADC---ELGAMRPWEAHLERRGQFLGRET 346

Hs   : 355 SPAPERGGPRDGEPPGKMGKGYLPCGMPGSGEPEVGKRPEETTTSVQSAESSDSLWSRL 414
      APE EPPG++ + + G GS PEV KRPEE TV QS+E S++ WSRL
Rn   : 347 GSAPEPIRTHIREPPGRVERVH-SVGGQGSWTPEVIKRP EEGTVDAQSSELSENPRWSRL 405

Hs   : 415 PRALASVGPPEARSGAPVGGGRWQLSDRVEGGSPTLGLLGGSPSAQPGTGNVEAGIPSGR 474
      P SVGPE+ S P G Q D + GS LGLLGG +AQPG+ +VE GI GR
Rn   : 406 PGDPGSVGPKEGGSRIPIGIRGPQOTLDSMREGSSALGLLGGQAAPGSMVDVETGISCGR 465

```

```

Hs : 475 MLEPLPCWDAAKDLKEPQCPPGDRVGVQPGNSRVWQGTMEKAGLAWTRGTGVQSEGTWES 534
      MLEPLP + +LKEPQC PGDR+G+QP +S VW +E+A L WT TG+Q +GTW S
Rn : 466 MLEPLPPGEVTTNLKEPQCLPGDRMGMQPESSIVWPSAVEEAPLIWTCDTGIQLKGTWRS 525

Hs : 535 QRQSDALPPELLPQDQDKPFLRKACSPSNIPA---VIITDMGTQEDGALEETQGSPRG 591
      Q D DA PS + DQ KACSPSNIPA VIITDMG QEDG LEE QGSPRG
Rn : 526 Q--DGDAHPSCQEKSPDQKD----KACSPSNIPAIPAVIITDMGAQEDGGLEEIQGSPRG 579

Hs : 592 NLPLRKLSSSSASSTGFSSSYEDSEEDISSDPERTLDPNSAFLHTLDQOKPRVSKSWRKI 651
      LPLRKLSSSSASSTGFSSSYEDSEEDISSDPERTLDPNSAFLHTLDQOKPRVSKSWRKI
Rn : 580 PLPLRKLSSSSASSTGFSSSYEDSEEDISSDPERTLDPNSAFLHTLDQOKPRVSKSWRKI 639

Hs : 652 KNMVHWSPPFVMSFKKKYPWIQLAGHAGSFKAAANGRILKKHCESEQRCLDRMLDVLVLPF 711
      KNMV WSPFVMSFKKKYPWIQLAGHAGSFKAAANGRILKKHCESEQRCLDRML DVLVLPF
Rn : 640 KNMVQWSPPFVMSFKKKYPWIQLAGHAGSFKAAANGRILKKHCESEQRCLDRMLADVLVLPF 699

Hs : 712 VPAYHGDVVKDGERYNQMDLLADFDSPCVMDCKMGIRTYLEEELTKARKKPSLRKDMYQ 771
      VPAYHGDVVKDGERYNQMDLLADFDSPCVMDCKMGIRTYLEEELTKARKKPSLRKDMYQ
Rn : 700 VPAYHGDVVKDGERYNQMDLLADFDSPCVMDCKMGIRTYLEEELTKARKKPSLRKDMYQ 759

Hs : 772 KMIEVDPEAPTEEEKAQRAVTKPRYMOWRETISSTATLGFRIEGIKKEDGTVNRDFKKT 831
      KM+EVDPEAPTEEEKAQRAVTKPRYMOWRETISSTATLGFRIEGIKKEDG+VNRDFKKT
Rn : 760 KMVEVDPEAPTEEEKAQRAVTKPRYMOWRETISSTATLGFRIEGIKKEDGSVNRDFKKT 819

Hs : 832 TREQVTEAFREFTKGNHNILIAAYRDLKAIKIRTTLEVPFFKCHEVIGSSLLFIHDKKEQA 891
      TREQVTEAFREFTKGN NILIAAYRDLKAIKIRTTLEVPFFKCHEVIGSSLLFIHDKKEQA
Rn : 820 TREQVTEAFREFTKGNQNILIAAYRDLKAIKIRETLEVPFFKCHEVIGSSLLFIHDKKEQA 879

Hs : 892 KVWMIDFGKTTPLPEGQTLQHDVPWQEGNREDGYLSGLNNLVDILTEMSQDAPLA 946
      KVWMIDFGKTTPLPEGQTLQHDVPWQEGNREDGYLSGLNNL+DILTEMSQ +PL
Rn : 880 KVWMIDFGKTTPLPEGQTLQHDVPWQEGNREDGYLSGLNNLIDILTEMSQGSPLT 934
  
```

Abbildung 3.3.1.1 Aminosäurealignment der humanen IP3K B mit der aus *Rattus norvegicus*

In dieser Abbildung wurden die humane Aminosäuresequenz der IP3K B (jeweils die erste Zeile) und die Aminosäuresequenz der IP3K B aus der Ratte (jeweils die dritte Zeile) mit dem Programm BioEdit aligniert. Die mittlere Zeile zeigt den Konsensus zwischen beiden Sequenzen. Bei übereinstimmender Aminosäure ist in dieser Zeile die entsprechende Aminosäure, bei verwandter Aminosäuren ein Kreuz (+) aufgeführt. Bereiche, in denen keine Übereinstimmung gefunden wurde, sind in dieser Zeile ausgespart. In dem Alignment sind die Bereiche grau umrahmt, die Homologien zu den Blöcken 1, 3 und 4 des ILWEQ Moduls zeigen. Gelb umrahmt ist der Bereich der Calmodulin-Bindungsdomäne. Grün dargestellt sind die Aminosäuren, die das typische InsP₃-Bindungsmotiv (MDCK) ausbilden. An der ATP Bindung maßgeblich beteiligte Aminosäuren (DFG) sind in der Abbildung blau hervorgehoben. Die putativen PEST-Sequenzen wurden mit dem Programm PEST-FIND identifiziert und sind in der Abbildung rot hervorgehoben. Dabei wurden nur PEST-Sequenzen mit einem vorhergesagten PEST-FIND Score von > +5 berücksichtigt und in der folgenden Tabelle dargestellt.

	Aminosäuren	PEST-FIND Score
Hs	21 KSGGGPGPSGSETPPPPR 38	+14.35
Rn	21 KSGSPLPSGSETPQPSGR 38	+10.33
Hs	392 RPEETTQSVQSAESSDSLWSR 413	+10.15
Rn	383 RPEEGTVDAQSSELSNPR 401	+11.96
Hs	536 RQSDALPPELLPQDQDK 554	+6.29
Hs	597 KLSSSSASSTGFSSSYEDSEEDISSDPER 625	+17.39
Rn	585 KLSSSSASSTGFSSSYEDSEEDISSDPER 613	+17.39
Hs	772 KMIEVDPEAPTEEEK 786	+10.68
Rn	760 KMVEVDPEAPTEEEK 774	+11.32

3.3.2 Analyse der putativen Sekundärstruktur der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (*Rattus norvegicus*)

Um Hinweise auf neue potentielle Regulationsmechanismen sowie auf die Zielsteuerung der IP3K B zu gewinnen, sollte zunächst die subzelluläre Verteilung des Enzyms in Lokalisationsstudien untersucht werden. Dabei sollte insbesondere auf die Rolle des bisher uncharakterisierten N-terminalen Bereichs eingegangen werden. Für diese Lokalisationsstudien sollten Fragmente aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B cDNA, zur Erzeugung von EGFP-Fusionsproteinen, in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert und die generierten Fusionskonstrukte in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Zur Auswahl geeigneter Fragmente wurde nach der Analyse der Primärstruktur (Abschnitt 3.3.1, Seite 68) auch eine Analyse der putativen Sekundärstruktur mit dem NPS Server (Pôle Bio-Informatique Lyon, http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server) durchgeführt. Abbildung 3.3.2.1 zeigt schematisch die prädizierten Sekundärstrukturelemente, eine detaillierte Darstellung der Sekundärstruktur ist in Abbildung 3.3.2.2 dargestellt. Alpha Helices und Beta Stränge sind in beiden Abbildungen jeweils blau bzw. rot gezeichnet. In gelb bzw. in grau sind die Knäuelstrukturen (random coil) des Enzyms dargestellt. Für den Bereich der Calmodulin-Bindungsdomäne (Aminosäuren 629-665) und der katalytischen Domäne (Aminosäuren 666-934) wird ein hoher Anteil geordneter Sekundärstruktur, dominiert von Alpha Helices (~38%) und wenigen Beta Strängen (~8%) vorhergesagt. Der in dieser Arbeit als N-terminaler Bereich des Enzyms definierte Abschnitt der Kinase scheint, relativ zu den beiden ersten Domänen, sehr wenig strukturiert zu sein. Größere alpha-helicale Abschnitte werden für die Bereiche zwischen den Aminosäuren 130-165 und zwischen den Aminosäuren 290-340 vorhergesagt. Beta Stränge (~10%) befinden sich in fast regelmäßigen Abständen verteilt im ganzen N-terminalen Bereich. Ein Grund für den geringen Anteil an Alpha Helices (~10%) liegt möglicherweise in dem hohen Anteil an Prolinen, die aufgrund ihres starren fünfgliedrigen Ringes als „Alpha Helix Brecher“ fungieren. Diese Proline sind ein wesentlicher Bestandteil der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen PEST-Sequenzen.

Anhand dieser Sekundärstrukturvorhersage und der Analyse der Aminosäuresequenz wurden drei Abschnitte aus dem N-terminalen Bereich des Enzyms ausgewählt. Ein kürzerer Abschnitt dominiert von Alpha Helices, der den zu Block 1 des I/LWEQ Moduls homologen Bereich umfasst (Fragment 1) und ein längerer Abschnitt mit verschiedenen Strukturelementen, der den zu Block 3 des Moduls homologen Bereich umfasst (Fragment 2). Des Weiteren wurde ein kürzerer Abschnitt mit vorhergesagter Knäuelstruktur, der den zu Block 4 des I/LWEQ homologen Bereich umfasst, (Fragment 3) ausgewählt. In beiden Abbildungen sind diese drei Abschnitte eingezeichnet.

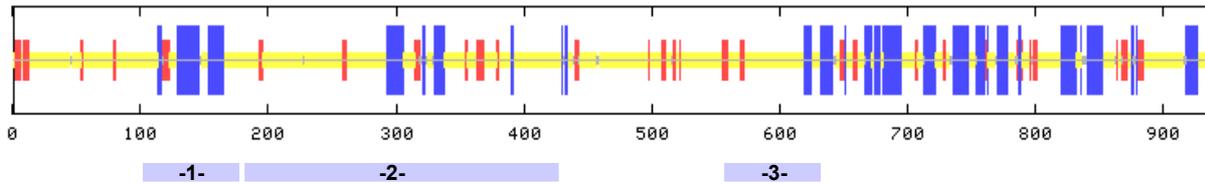


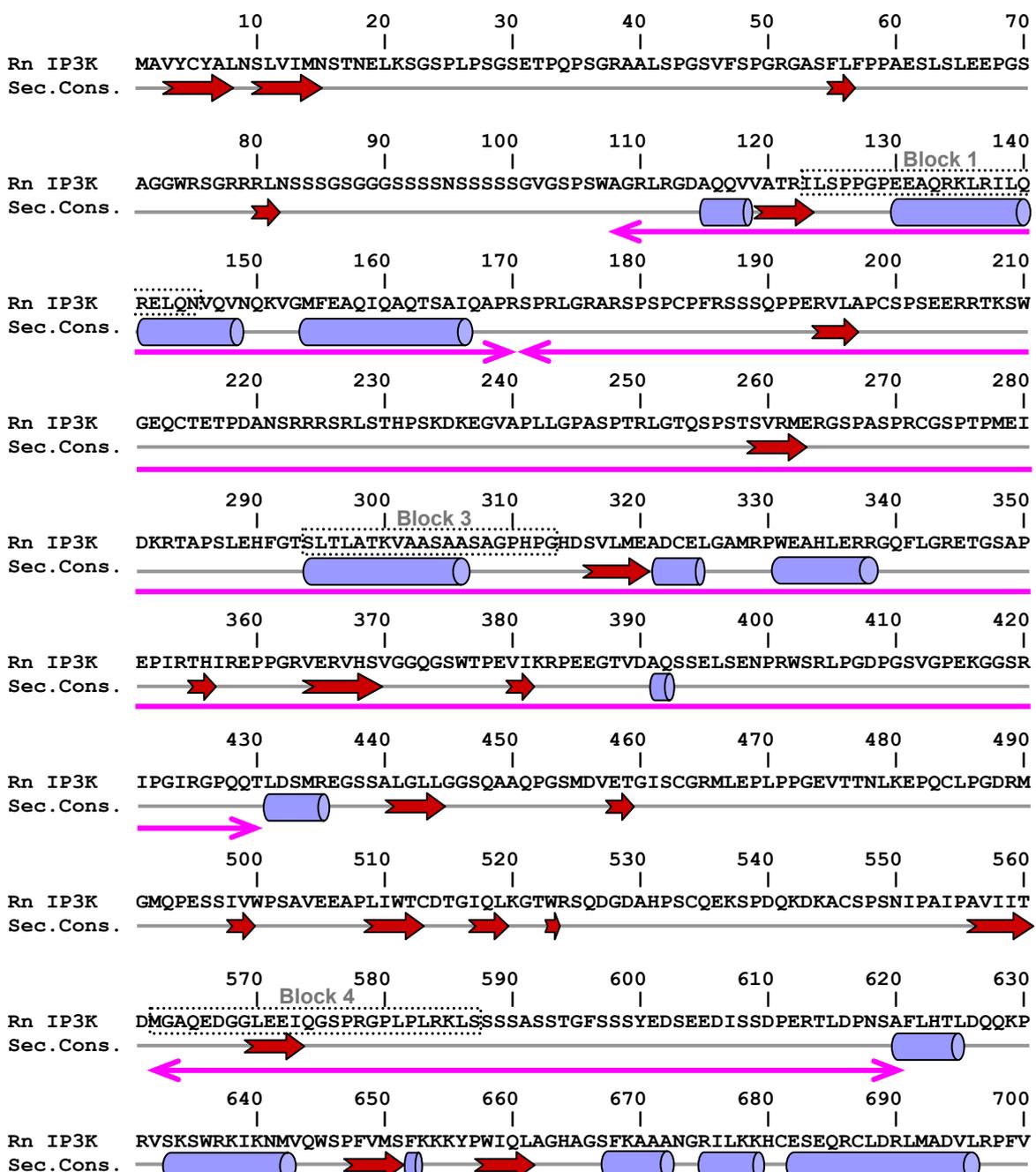
Abbildung 3.3.2.1 Schematische Übersicht der vorhergesagten Sekundärstrukturelemente für die IP3K B (*Rattus norvegicus*)

Putative Alpha Helices und Beta Stränge sind rot bzw. blau dargestellt. Gelb ist sind Knäuelstrukturen dargestellt. Die generierten Fragmente sind mit grauen Balken eingezeichnet und umfassen folgende Aminosäuren:

Fragment 1: Aminosäuren 108-170

Fragment 2: Aminosäuren 170-430

Fragment 3: Aminosäuren 561-620



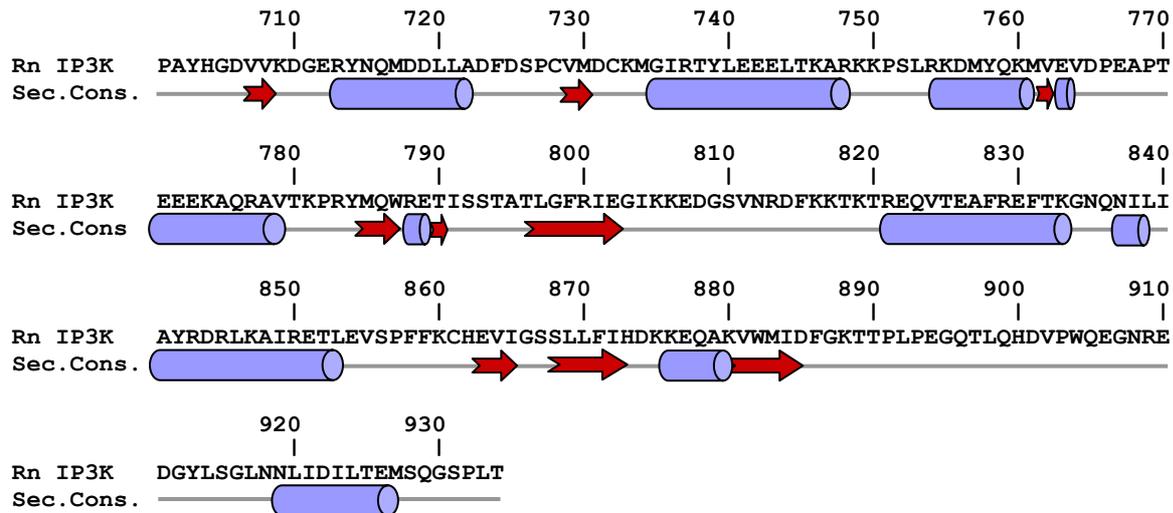


Abbildung 3.3.2.2 Detaillierte Vorhersage der Sekundärstrukturelemente für die IP3K B (*Rattus norvegicus*)

In dieser Abbildung wurde mit den Programmen DPM, DSC, GOR4, HNNC, PHD, Predator, SIMPA96 und SOPM die Aminosäuresequenz der IP3K B untersucht und die putative Sekundärstruktur des Enzyms vorhergesagt. In der oberen Reihe ist die Aminosäuresequenz dargestellt und darunter die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente (Sec.Cons.). Die Abschnitte der IP3K B, die Homologien zu Block 1, 3 und 4 des I/LWEQ Moduls aufweisen, sind umrahmt. Mit Pfeilen sind die Fragmente gekennzeichnet, die zunächst ausgewählt und in Lokalisationsstudien untersucht wurden. Die prädizierten Strukturelemente kombinieren das Ergebnis der 8 Programme. Die folgende Darstellung zeigt anhand eines Beispiels die Ergebnisse der verwendeten Programme und den daraus resultierenden Konsens. Dieser Konsens wird in den Abbildungen als Sec.Cons. bezeichnet. In der Tabelle darunter sind Sekundärstrukturelemente erklärt und ihr Auftreten in der Struktur des Enzyms dargestellt.

Rn IP3K DGYLSGLNNLIDILTEMSQGSPLT
DPM tcctccccceeeeeehhtcccccc
DSC cccccccccccccccccccccccc
GOR4 ccccccccchhhhhhhhccceec
HNNC ccchhhhhhhhhhhhhccccccc
PHD cccccchhhhhhhhhhhccccccc
Predator ccccccccchhhhhhcccccccc
SIMPA96 cccccchhhhhhhhhhhccccccc
SOPM hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhtttccce
Sec.Cons. ccccc?h?hhhhhhhhccccccc

Strukturelement	abs. Anzahl Reste N-term. As 1-628	Anteil (%) N-term. As 1-628	abs. Anzahl Reste C-term. As 629-934	Anteil (%) C-term. As 629-934
Alpha Helix (h)	64	10,17	115	37,58
Beta Strang (e)	61	9,7	24	7,84
Knäuelkonfiguration (c)	486	77,27	152	49,67
Schleife (t)	0	0	0	0
Uneindeutiges Element (?)	18	2,86	15	4,9

3.4 Generierung von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B-EGFP Fusionskonstrukten

Die Analyse der putativen Sekundärstruktur sowie die Vorhersage von Domänenhomologien führte zur Auswahl von drei Abschnitten aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B-cDNA. Fragment 1 und 2 beinhalten zum I/LWEQ-Modul homologe Sequenzen und prädizierte Se-

kundärstruktur, Fragment 3 beinhalten eine zu dem I/LWEQ-Modul homologe Sequenz sowie eine putative PEST-Sequenz. Zusätzlich beinhalten Fragment 2 und 3 mehrere PXXP-Motive.

Um die Expression und subzelluläre Verteilung der ausgewählten Abschnitte in Zelllinien zu untersuchen, wurden sie in den eukaryontischen Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert. Dieses Plasmid codiert ein „Enhanced“ Grün Fluoreszierendes Protein (EGFP), das als Fluorophor im generierten Fusionsprotein fungiert. Fragmente der IP3K B-cDNA wurden unter Beachtung des Leserasters in die „multiple cloning site“ (MCS) vor die im Plasmid enthaltene, für das EGFP codierende cDNA kloniert. Die Transkription der IP3K B-EGFP Fusions-mRNA steht unter der Kontrolle des starken Cytomegalie-Virus-Promotors (CMV-Promotor). Für die Termination der IP3K B-GFP Fusions-mRNA ist eine SV40-Polyadenylierungssequenz verantwortlich. Die Klonierung der IP3K B-cDNA in dieses Plasmid führt zur Fusion mit der cDNA des EGFP unter Erhaltung eines kontinuierlichen Leserasters. Nach transienter Transfektion von eukaryontischen Zellen mit den generierten Fusionskonstrukten kann die Expression der Fusionsproteine durch Visualisierung des Fluorophors untersucht werden.

Zunächst wurden Abschnitte der IP3K B cDNA mittels PCR mit genspezifischen Primern amplifiziert, um Fragmente zu generieren. Mit diesen Primern wurden in die Fragmente Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Xho I* und *Kpn I* eingeführt. Diese Schnittstellen befinden sich auch in dem Vektor und ermöglichen eine gerichtete Umklonierung. Zusätzlich wurde mit dem jeweiligen 5'-Primer ein ATG für den Start der Transkription eingeführt. Nach erfolgreicher PCR wurden die Amplifikate in den Vektor pGem TEasy zwischenkloniert und zur Kontrolle sequenziert. Für die Umklonierung wurden die im pGem TEasy enthaltenen Fragmente mit den Restriktionsendonukleasen *Xho I* und *Kpn I* hydrolysiert. Das Plasmid pEGFP-N1 wurde ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Für die Ligation wurde jeweils ein hydrolysiertes cDNA Fragment der IP3K B cDNA mit dem hydrolysierten Plasmid pEGFP-N1 inkubiert. Mit dieser Methode wurden drei IP3K B-EGFP Fusionskonstrukte erzeugt:

Fusionskonstrukt 1: IP3K B (Aminosäuren 108-170)-GFP

Amplifiziert mit den Primern: 5'GFPK1 5'-CTC GAG ATG GGC CGC CTG CGA GGG GAC GCG-3'

3'GFPK1 5'-GGT ACC GCT CGG GGC GCT TGA ATA GCA GAG GT-3'

Fusionskonstrukt 2: IP3K B (Aminosäuren 170-430)-GFP

Amplifiziert mit den Primern: 5'GFPK2 5'-CTC GAG ATG AGC CCG CGT TTG GGT AGG GCT CGT-3'

3'GFPK2 5'-GGT ACC GCG GTC TGC TGG GGT CCT CGG ATT CC-3'

Fusionskonstrukt 3: IP3K B (Aminosäuren 561-620)-GFP

Amplifiziert mit den Primern: 5'GFPK3 5'-CTC GAG ATG GGT GCT CAG GAG GAT GGA GGG-3'

3'GFPK3 5'-GGT ACC GCG GCT GAG TTG GGG TCC AGA GTG CG-3'

Die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen sind in den für die Generierung der IP3K B-EGFP Fusionskonstrukte verwendeten Primern in grün dargestellt, das jeweilige Start-ATG ist rot markiert.

Die drei generierten IP3K B-GFP Fusionskonstrukte sowie alle weiteren eingesetzten Fusionskonstrukte wurden zur Kontrolle mit dem für die Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Das hydrolysierte Fusionskonstrukt wurde nachfolgend in einem Agarosegel aufgetrennt. Anhand dieser Auftrennung konnte überprüft werden, ob in dem hydrolysierten Fusionskonstrukt die einklonierte cDNA der IP3K B vorhanden ist.

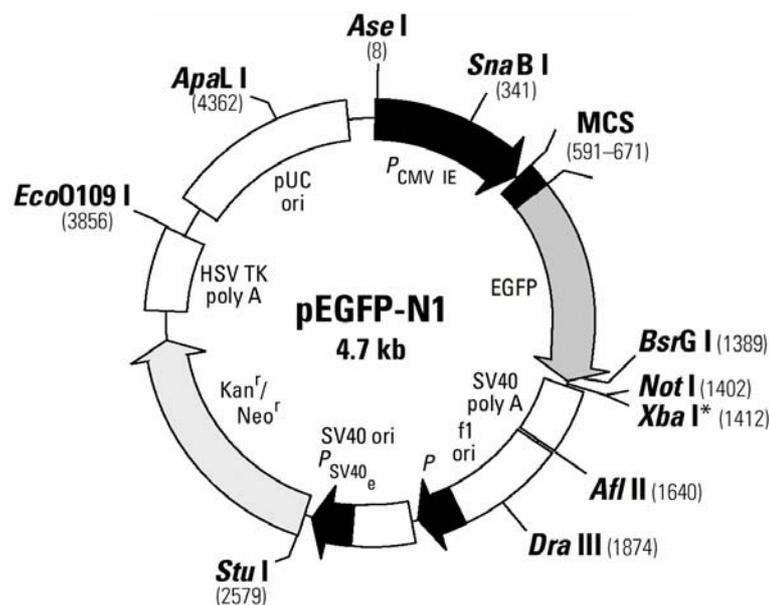


Abbildung 3.4.1 Schematische Vektorkarte des Plasmids pEGFP-N1

EGFP= Enhanced Green Fluorescent Protein codierende Sequenz, f1 ori= Replikationsursprung des Phagen f1, HSV TK poly A= 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 Simiam Virus 40, SV40 poly A= Simiam Virus 40 Polyadenylierungssequenz

Um die Expression der IP3K B-EGFP Fusionsproteine in Lokalisationsstudien untersuchen zu können, wurden anschließend eukaryontische Zellen mit diesen Fusionskonstrukten transient transfiziert.

3.5 Lokalisation von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B-EGFP Fusionsproteinen in eukaryontischen Zellen

3.5.1 *In vivo* Lokalisation der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B -EGFP Fusionsproteine 1, 2 und 3 in PC12 Zellen

Die Untersuchung der Expression und subzellulären Verteilung der generierten IP3K B-EGFP Fusionsproteine sollte im eukaryontischen Zellsystem erfolgen. Zu diesem Zweck

wurden eukaryontische Zellen mit den Fusionskonstrukten transient transfiziert. Als Transfektionsmethode wurde die Lipofektion mit Lipofectamin Plus gewählt. Mit dieser Methode wurden die generierten IP3K B-EGFP Fusionskonstrukte zunächst in PC12 Zellen eingebracht. Die PC12 Zelllinie wurde gewählt, da Vorversuche in unserem Labor zeigten, dass diese Zelllinie die endogene IP3K B exprimiert. Nach Expression der Fusionskonstrukte für 24h wurde die subzelluläre Verteilung der IP3K B-EGFP Fusionsproteine im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als Kontrolle wurden PC12 Zellen mit dem „leeren“ Plasmid pEGFP-N1 transfiziert, welches nur das EGFP-Protein allein exprimiert. Der Vergleich mit der Kontrolle erlaubte den Einfluss der IP3K B auf die subzelluläre Verteilung des EGFP zu studieren. Die Expression des unfusionierten EGFP führt laut Hersteller zu einer homogenen Verteilung des Fluorophors im Zellkern und im Zytoplasma. Ursache für die auch nukleäre Lokalisation des EGFP ist dessen geringe Molekulargewichtsgröße und ein kryptisches, schwaches Kernlokalisierungssignal (NLS) in seiner Aminosäuresequenz [Prof. Mayr, persönliche Mitteilung].

Die Transfektion der PC12 Zellen mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-EGFP) führte zu einer distinkten Lokalisation der exprimierten Fusionsproteine. Die Fusionsproteine lokalisierten an filamentartigen Strukturen die die gesamte Zelle durchziehen. Diese Strukturen weisen Ähnlichkeiten zu dem Filamentsystem des Zytoskeletts auf. Auch im Bereich der Zellmembran bzw. des subplasmalemmalen Bereichs konnte eine deutliche Lokalisation der Fusionsproteine beobachtet werden. Zusätzlich war ein kleiner Teil der Fluoreszenz im zytosolischen Bereich in granulärer Form zu beobachten. Im Bereich des Kerns war das Fusionsprotein nur extrem schwach lokalisiert. Im Gegensatz dazu konnte in den Kontrollzellen eine homogene Verteilung des Fluorophors im gesamten Zytoplasma sowie im Bereich des Zellkerns beobachtet werden. Folglich ist der 63 Aminosäuren umfassende Abschnitt aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B für die beobachtete spezifische Lokalisation des Fusionsproteins 1 verantwortlich.

Die Transfektion von PC12 Zellen mit den Fusionskonstrukten 2 (IP3K B (As 170-430)-EGFP) und 3 (IP3K B (As 561-620)-EGFP) führte zu keiner spezifischen Lokalisation der Fusionsproteine. In den Zellen konnte eine subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine im Zytoplasma und im Zellkern beobachtet werden. Die intrazelluläre Verteilung der Fusionsproteine 2 und 3 ist vergleichbar mit der Verteilung des EGFP in den Kontrollzellen. Demnach scheinen die Abschnitte 2 und 3 aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B keinen feststellbaren Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung des Fluorophors zu haben.

Bemerkenswert ist allerdings, dass für beide Fusionsproteine eine geringe Akkumulation im nukleären Bereich beobachtet werden konnte, obwohl zumindest das Fusionsprotein 2 nicht passiv in den Zellkern diffundieren kann, da es mit einer kalkulierten Molekulargewichtsgröße von ~ 55kDa über der Grenze für passive Diffusion liegt [Cole und Hammell C.M., 1998].

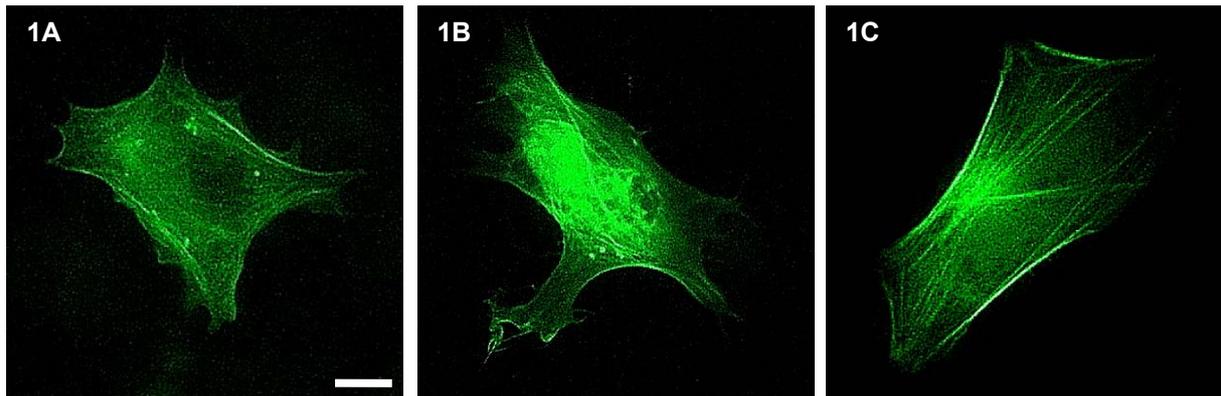


Abbildung 3.5.1.1 Lokalisation des Fusionsproteins 1 in vitalen PC12 Zellen

PC12 Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression des Fusionsproteins 1 wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop *in vivo* mikroskopiert. Alle drei Bilder (1A, B und C) zeigen die Lokalisation des Fusionsproteins 1. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m.

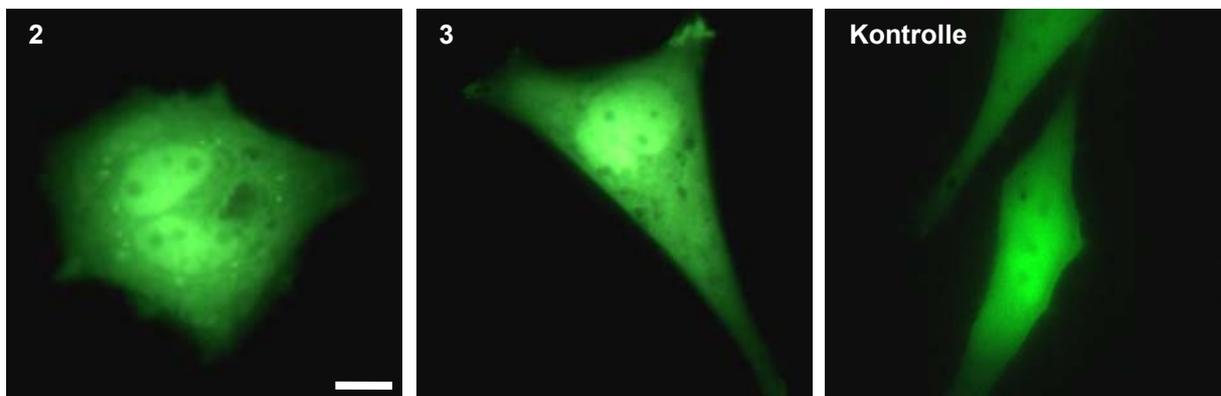


Abbildung 3.5.1.2 Intrazelluläre Verteilung der Fusionsproteine 2 und 3 sowie des EGFP in vitalen PC12 Zellen

PC12 Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 2 (IP3K B (As 170-430)-EGFP), dem Fusionskonstrukt 3 (IP3K B (As 561-620)-EGFP) oder mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfiziert. Nach 24stündiger Expression der Fusionsproteine 2 und 3 bzw. des EGFP wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop *in vivo* mikroskopiert. Das linke Bild (2) zeigt die intrazelluläre Verteilung des Fusionsproteins 2; das mittlere Bild (3) zeigt die des Fusionsproteins 3 und das rechte Bild (Kontrolle) die Verteilung des EGFP. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m.

3.5.2 *In vivo* Lokalisation des Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B-EGFP Fusionsproteins 1 in NRK52E Zellen

Um die definierte Lokalisation des Fusionsproteins 1 (IP3K B(108-170)-EGFP) in einem anderen Zelltyp zu verifizieren, wurde für weitere Untersuchungen eine zweite Zelllinie herangezogen. NRK52E Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 transient transfiziert. Diese Zelllinie wurde gewählt, da die Expression der endogenen IP3K B in dieser Zelllinie nachgewiesen werden konnte [Soriano et al., 1997]. Auf eine Transfektion der Zellen mit den Fusionskonstrukten 2 und 3 wurde verzichtet, da mit diesen Konstrukten transfizierte PC12 Zellen keine Veränderungen gegenüber den Kontrollzellen zeigten. Auch in transfizierten NRK52E Zellen konnte eine Lokalisation des Fusionsproteins 1 an filamentartigen Strukturen

beobachtet werden, die Ähnlichkeiten zum Filamentsystem des Zytoskeletts aufweisen. Zusätzlich zu dieser definierten Lokalisation konnte im Hintergrund eine diffuse, schwach granuläre Verteilung des Fusionsproteins im Zytoplasma und im Bereich des Zellkerns beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollzellen ausschließlich eine homogene Verteilung des Fluorophors im Zytoplasma und im Zellkern. Folglich ist, wie in den PC12 Zellen, auch in den NRK52E Zellen, der 63 Aminosäuren umfassende Abschnitt aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B für die spezifische Lokalisation des Fusionsproteins 1 verantwortlich.

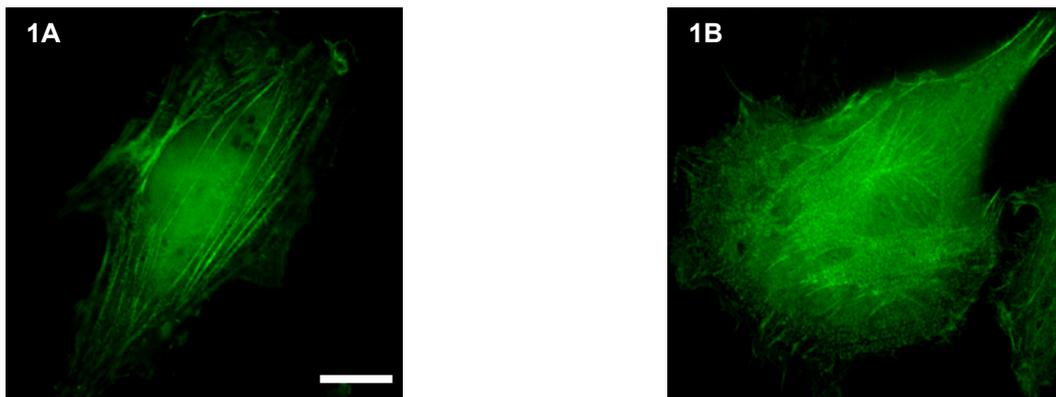


Abbildung 3.5.2.1 Lokalisation des Fusionsproteins 1 in vitalen NRK52E Zellen

NRK52E Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression des Fusionsproteins 1 wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop *in vivo* mikroskopiert. Beide Bilder (1A und B) zeigen die Lokalisation des Fusionsproteins 1. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m.

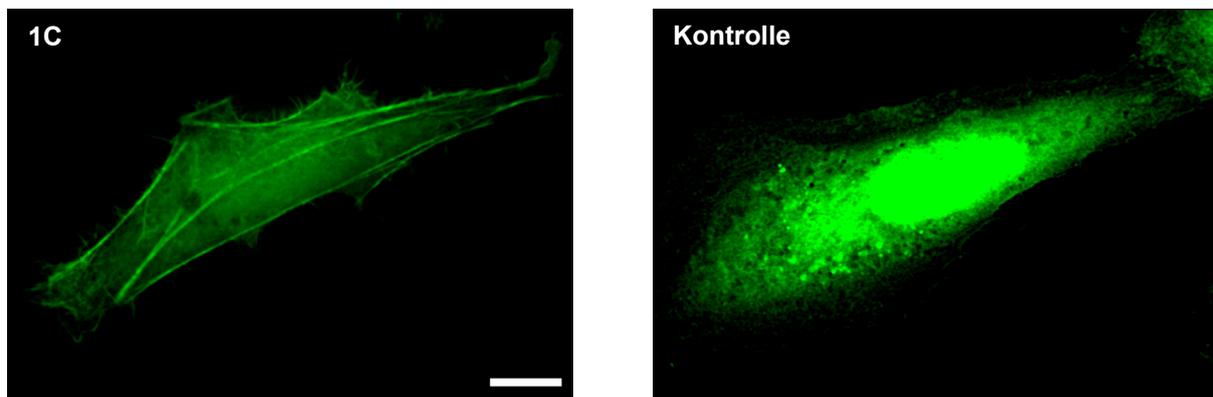


Abbildung 3.5.2.2 Lokalisation des Fusionsproteins 1 und subzelluläre Verteilung des EGFP in vitalen NRK52E Zellen

NRK52E Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-EGFP) oder dem Plasmid pEGFP-N1 transfiziert. Nach 24stündiger Expression des Fusionsproteins 1 bzw. des EGFP wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop *in vivo* mikroskopiert. Das linke Bild (1C) zeigt die Lokalisation des Fusionsproteins 1 und das rechte Bild (Kontrolle) die Verteilung des EGFP. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m.

3.6 Kolokalisation des Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B-EGFP Fusionsproteins 1 mit F-Aktin *in vivo*

Zur Identifikation der filamentartigen Strukturen, an denen das Fusionsprotein 1 in PC12- und NRK52E Zellen lokalisiert, wurde die zelluläre Verteilung des Filamentsystems in Lokalisationsstudien untersucht. Zunächst wurden zwei der drei Zytoskelett ausbildenden Filamente, die Mikrotubuli und die Mikrofilamente, nachgewiesen, da die Lokalisation des Fusionsproteins 1 an diese Strukturen erinnert. Die Detektion der Mikrotubuli erfolgte durch Antikörper gegen β -Tubulin, die der Mikrofilamente durch fluoreszent markiertes Phalloidin. Derart modifiziertes Phalloidin dient dem Nachweis von Mikrofilamenten (F-Aktin), indem es sich an die Aktinuntereinheiten in Mikrofilamenten anlagert und deren Depolymerisation verhindert.

Die Lokalisationsstudien wurden zunächst nur an einer Zelllinie durchgeführt. PC12 Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-EGFP) transient transfiziert. Nach Expression des Fusionsproteins 1 wurden diese Zellen fixiert und durch Immunfluoreszenz entweder die Mikrotubuli oder die Mikrofilamente nachgewiesen. Der Nachweis der Mikrotubuli führte nicht zu einer Identifikation der filamentartigen Strukturen an denen das EGFP-Fusionsprotein 1 lokalisiert. Es konnte in diesen Zellen keine Kolokalisation des Fusionsproteins 1 mit Mikrotubuli nachgewiesen werden.

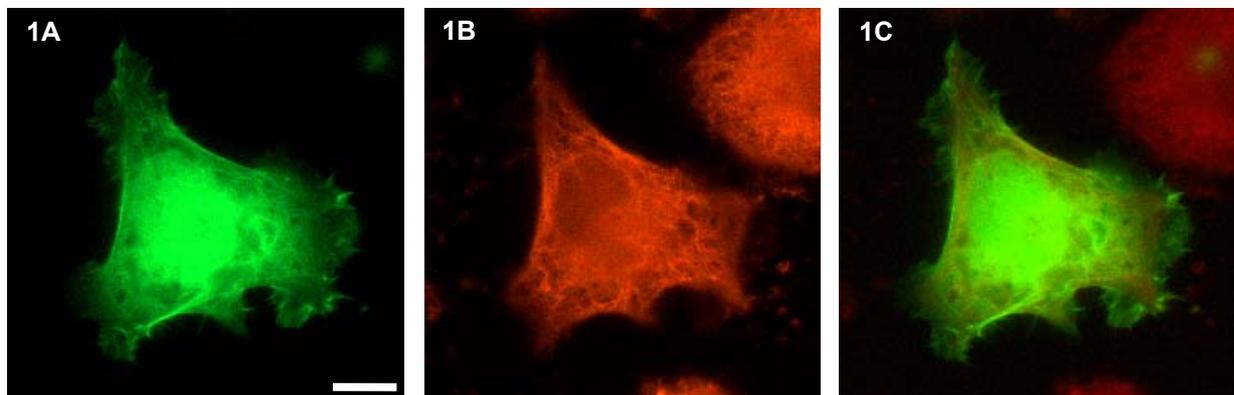


Abbildung 3.6.1 Lokalisation des Fusionsproteins 1 und Mikrotubuli in fixierten PC12 Zellen

PC12 Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression des Fusionsproteins 1 wurden durch Immunfluoreszenz die Mikrotubuli nachgewiesen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Das linke Bild (1A) zeigt die Lokalisation des Fusionsproteins 1, das mittlere Bild (1B) die Mikrotubuli und im rechten Bild (1C) sind beide Bilder übereinander gelegt. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m.

Im Gegensatz dazu führte der Nachweis der Mikrofilamente durch markiertes Phalloidin zu einer Identifikation der filamentartigen Strukturen an denen das Fusionsprotein lokalisiert. In diesen Zellen konnte eine Kolokalisation des Fusionsproteins 1 mit F-Aktin beobachtet werden. Diese Kolokalisation drückt sich in der gelben Färbung der Kompositbilder aus.

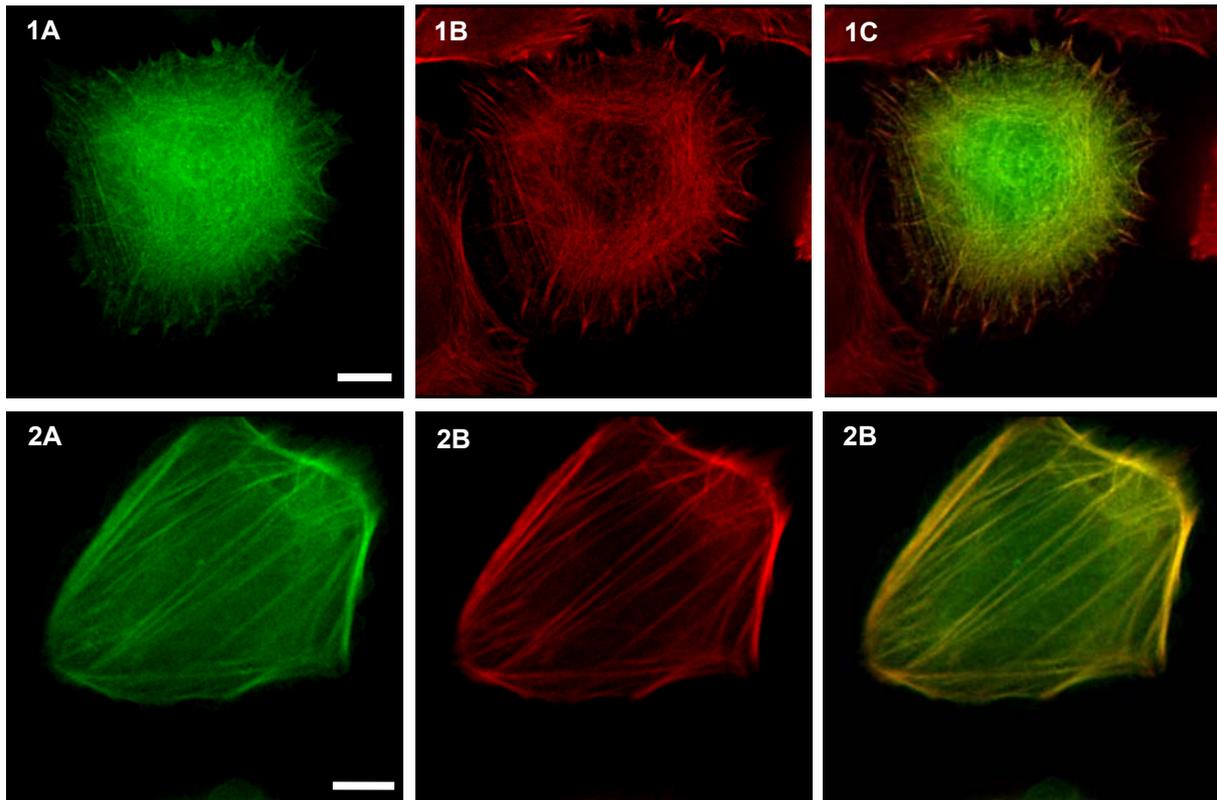


Abbildung 3.6.2 Kolokalisation des Fusionsproteins 1 mit F-Aktin in fixierten PC12 Zellen

PC12 Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression des Fusionsproteins 1 wurde durch Inkubation mit markiertem Phalloidin F-Aktin nachgewiesen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die linken Bilder (1A, 2A) zeigen die Lokalisation des Fusionsproteins 1, die mittleren Bilder (1B, 2B) F-Aktin und in den rechten Bildern (1C, 2C) sind beide Bilder übereinander gelegt. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m.

Zusätzlich wurde Fragment 1 in das Plasmid pDsRed-N1 kloniert, um die Kolokalisation des EGFP-Fusionsproteins 1 mit F-Aktin zu verifizieren. In diesem Plasmid wird das Fluorophor durch ein rot fluoreszierendes Protein, das aus der Koralle *Discosoma sp.* stammt, gebildet. Nach erfolgreicher Klonierung wurden PC12 Zellen mit dem generierten Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-DsRed1) transient transfiziert. Der Nachweis des F-Aktins erfolgte durch FITC (grün) markiertes Phalloidin. Nach Expression des DsRed-Fusionsproteins 1 konnte ebenfalls eine Kolokalisation mit F-Aktin in PC12 Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz zu der Kolokalisation des EGFP-Fusionsproteins 1 mit Aktin konnte eine Kolokalisation des DsRed-Fusionsproteins 1 mit dem Mikrofilamentsystem nicht im gesamten intrazellulären Bereich der Zellen beobachtet werden, da eine Verteilung des Fusionsproteins in einigen peripheren Bereichen der Zelle nicht beobachtet werden konnte bzw. die Fluoreszenzintensität in diesen Bereichen zu gering war. Diese Beobachtung kann möglicherweise auf die beschriebene Zytotoxizität des DsRed-Proteins bei der Expression als Fusionsprotein zurückgeführt werden. Das DsRed-Protein neigt bei Fusion mit einem anderen Protein dazu Tetramere zu bilden, die wiederum die Funktion und Lokalisation des

Fusionsproteins behindern [Angleson et al., 1997]. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Lokalisationsstudien ausschließlich EGFP-Fusionsproteine eingesetzt.

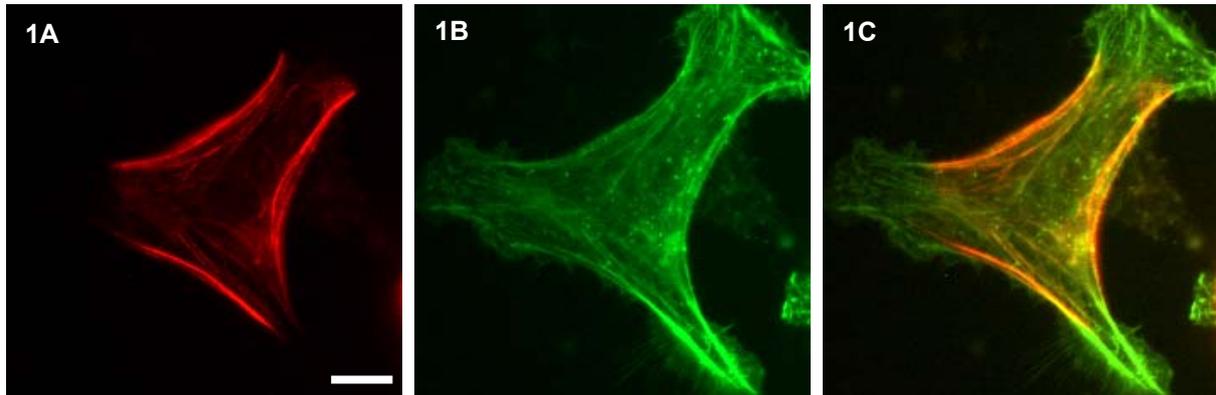
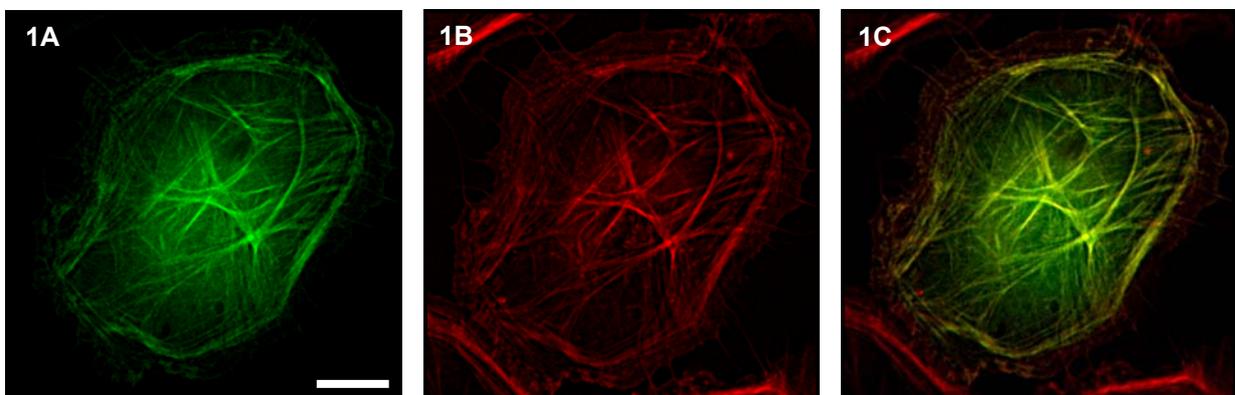


Abbildung 3.6.3 Kolokalisation des Fusionsproteins 1 mit F-Aktin in fixierten PC12 Zellen

PC12 Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-DsRed1) transfiziert. Nach 24stündiger Expression des Fusionsproteins 1 wurde durch Inkubation mit markiertem Phalloidin F-Aktin nachgewiesen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Das linke Bild (1A) zeigt die Lokalisation des Fusionsproteins 1, das mittlere Bild (1B) F-Aktin und in dem rechten Bild (1C) sind beide Bilder übereinander gelegt. Der weiße Balken repräsentiert 10µm.

Die Kolokalisation des Fusionsproteins 1 mit F-Aktin wurde anhand von weiteren Lokalisationsstudien mit NRK52E Zellen verifiziert. Auf den Nachweis der Mikrotubuli durch spezifische Antikörper wurde verzichtet. NRK52E Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-EGFP) transient transfiziert. Nach Expression des Fusionsproteins 1 wurden diese Zellen fixiert und die Mikrofilamente durch markiertes Phalloidin nachgewiesen. Auch in diesem Zellsystem konnte eine Kolokalisation des Fusionsprotein 1 mit F-Aktin nachgewiesen werden. Diese Kolokalisation drückt sich in der gelben Färbung der jeweils rechts dargestellten Kompositbilder aus.



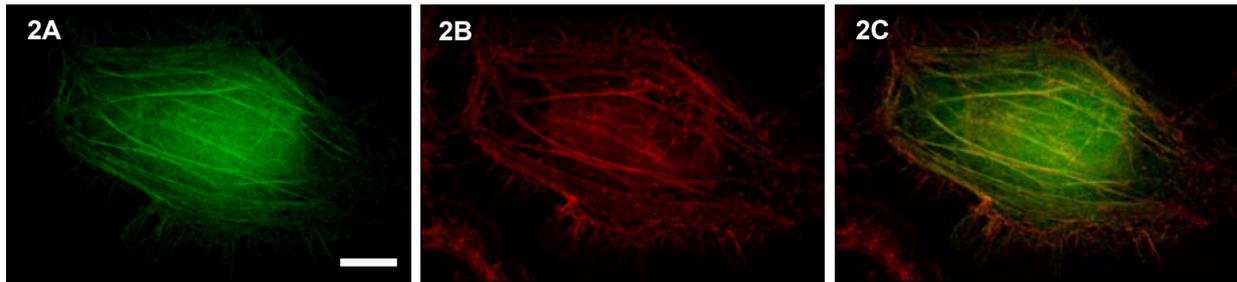


Abbildung 3.6.4 Kolokalisation des Fusionsproteins 1 mit F-Aktin in fixierten NRK52E Zellen
NRK52E Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1 (IP3K B(As 108-170)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression des Fusionsproteins 1 wurde durch Inkubation mit markiertem Phalloidin F-Aktin nachgewiesen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die linken Bilder (1A, 2A) zeigen die Lokalisation des Fusionsproteins 1, die mittleren Bilder (1B, 2B) F-Aktin und in den rechten Bildern (1C, 2C) sind beide Bilder übereinander gelegt. Der weiße Balken repräsentiert 10µm.

3.7 Homologien zwischen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B und Proteinen mit einem Aktin-Bindungsmotiv

Aus dem N-terminalen Bereich der Ratten IP3K B konnte ein Abschnitt (Fragment 1) identifiziert werden, der fusioniert mit EGFP eine Kolokalisation mit F-Aktin zeigt. Aus diesem Grund wurde die Aminosäuresequenz dieses Bereichs eingehender auf Homologien zu bekannten Aktin-Bindungsbereichen untersucht. Datenbankrecherchen mit Abschnitten des N-terminalen Bereichs der IP3K B ergaben Sequenzhomologien zu I/LWEQ Modulen (siehe Abschnitt 3.3.1, Seite 67). Bisher wurden in 23 Proteinen I/LWEQ Module identifiziert, die über dieses Modul mit Aktin interagieren [McCann and Craig 1997, 1999]. Damit ist das Vorhandensein eines I/LWEQ Moduls in einem Protein ein starker Hinweis für eine Interaktion dieses Proteins mit Aktin. I/LWEQ Module sind folglich Aktin-Bindungsmotive. Das I/LWEQ Modul besteht aus 4 aufeinander folgenden Blöcken konservierter Aminosäuren. Abschnitte, die Homologien zu den Blöcken 1, 3 und 4 zeigen, konnten im N-terminalen Bereich der humanen und Ratten IP3K B identifiziert werden. Homologe Abschnitte zu Block 2 konnten in den Aminosäuresequenzen beider Spezies nicht identifiziert werden.

Ein zu Block 1 homologer Abschnitt dieses Moduls ist in Fragment 1 (As 108-170) enthalten, das als Fusionsprotein 1 eine Kolokalisation mit F-Aktin zeigt. Zu den Blöcken 3 und 4 homologe Abschnitte sind in den als EGFP-Fusionsproteine nicht lokalisierenden Fragmenten 2 (As 170-430) und 3 (As 561-620) enthalten. Die Homologien zwischen den Abschnitten aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B Kinasen und Proteinen mit einem charakteristischen I/LWEQ Modul sind in dem folgenden Alignment dargestellt.

Block 1					
HsIP3Kinase B	115	AAGFLSPPGPTEE-AKRKLRIL-Q-RELQNVQVNO-KVGMFEAHI	154		
RnIP3Kinase B	120	ATRIISPPGPTEE-AQRKLRIL-Q-RELQNVQVNO-KVGMFEAQI	159		
HsHip1	697	NERILGCCTSLMQA-IQV-LIVASKDLOREIVESGR-GTASPKE	737		
HsTn1	2342	EEQILEAAKSIATAA-TSA-LVKAASAAQRELVAQKVGAIANA	2383		
ScSla2	769	PKPILLSLALMIIDA-VVA-LVKAAIQCQNEIATTTTSIPLNQFYI	810		
Block 3					
HsIP3Kinase B	295	LFGASL-TMATEVAARVT----STGPHRQ-DIALTEPSGR	329		
RnIP3Kinase B	290	HFGTSL-TLATKVAASAA----SAGPHPGH-D-SVLMEADC	323		
HsHIP1	775	GKFEELMVCSEHIAASTAQL-VAASKVKADKD-SPNLAQLQ	813		
HsTn1	2419	ASQEKLISSAKQVAASTAQLLVA-CKVKADQD-SEAMKRLQ	2457		
ScSla2	849	TSPEQFIVASKEVAASTIQL-VAASRVKESI-HSKAQDKLE	887		
Block 4					
HsIP3Kinase B	567	PAVIIT-DMGTOEDGALE-ETQGSF-RGNLP-LRKLS\$SS	602		
RnIP3Kinase B	557	PAVIIT-DMGAQEDGGLE-EIQGSF-RGPLP-LRKLS\$SS	590		
HsHip1	850	LTQIKRQEMDSQVRV-LELENELQKERQKLGELRKKHYEL	888		
HsTn1	2495	VGIAQ-IIAAQEEM-LRKERELEEARKKLAQIRQQQYKF	2532		
ScSla2	926	EHTLKTAEEMEQVEI-LKLEQSLSNARKRLGEIRRHAYYN	964		

Abbildung 3.7.1 Alignment der Blöcke 1, 3 und 4 des I/LWEQ Moduls mit homologen Bereichen aus den IP3K B

Die Aminosäuresequenzen aus dem N-terminalen Bereich beider IP3K B Spezies (*Hs* und *Rn*) wurde im Bereich der Blöcke 1, 3 und 4 mit Aminosäuresequenzen aus Proteinen verglichen die ein charakteristisches I/LWEQ Modul aufweisen. Für diesen Vergleich wurde die Sequenz des humanen Hip1 (HsHip1), des humanen Talin 1 (HsTn1) und die des Sla2p (ScSla2p) aus der Hefe herangezogen. Die Blöcke 1, 3 und 4 des I/LWEQ Moduls sind umrahmt. Die Homologien zwischen den Aminosäureresten sind durch graue Hinterlegung und die starke Hervorhebung der jeweiligen Reste dargestellt. Dunkelgrau hinterlegt sind identische bzw. ähnliche Aminosäuren die in allen fünf Sequenzen auftauchen, hellgrau hinterlegt sind identische bzw. ähnliche Aminosäuren, die in drei oder vier der Sequenzen auftauchen.

3.8 Kolokalisation des Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B-EGFP Fusionsproteins 4 mit F-Aktin *in vivo*

Fragment 1 (IP3K B (As 108-170)) kolokalisiert als EGFP-Fusionsprotein mit F-Aktin und zeigt Homologien zu Block 1 des I/LWEQ Moduls. Die Fragmente 2 (IP3K B (As 170-430)) und 3 (IP3K B (As 561-620)) weisen Homologien zu den Blöcken 3 und 4 des I/LWEQ Moduls auf, zeigen jedoch keine Kolokalisation mit F-Aktin. Um die Bindungseigenschaften des gesamten Abschnitts aus der IP3K B der Homologien zu dem I/LWEQ Modul aufweist zu erforschen, wurde ein weiteres Fragment (Fragment 4) generiert. Fragment 4 umfasst die Aminosäuren 108-583 der IP3K B und beinhaltet alle drei Abschnitte die Homologien zu den Blöcken 1, 3 und 4 des I/LWEQ Moduls aufweisen. Die letzten 4 Aminosäuren des zu Block 4 homologen Bereiches wurden nicht mit einbezogen, da diese Aminosäuren Bestandteil einer putativen PEST-Sequenz sind, die den höchsten PEST-FIND Score aufweist (siehe Abschnitt 3.3.1, Seite 68). Die ersten 107 Aminosäuren der IP3K B wurden ebenfalls nicht

mit einbezogen, da dieser äußere N-terminale Bereich bei bakterieller Überexpression unlöslich war. Grund hierfür ist offensichtlich die extrem hydrophobe, einem N-terminalen Signalpeptid ähnliche, N-terminale Sequenz gefolgt von einer Prolin- und Glycin-reichen Sequenz. Fragment 4 wurde als EGFP-Fusionsprotein in Lokalisationsstudien an PC12- und NRK52E Zellen auf seine Kolokalisation mit F-Aktin untersucht.

Die Transfektion beider Zelllinien mit dem Fusionskonstrukt 4 (IP3K B(As 108-583)-EGFP) führte zu einer distinkten Lokalisation der exprimierten Fusionsproteine. Die Fusionsproteine lokalisierten erneut an filamentartigen Strukturen. Durch die Inkubation der Zellen mit markiertem Phalloidin konnten diese filamentartigen Strukturen als F-Aktin identifiziert werden. Fragment 4 kolokalisiert als EGFP-Fusionsprotein ebenfalls wie Fragment 1 mit F-Aktin. Zusätzlich konnte auch eine diffuse Verteilung des Fusionsproteins 4 im Bereich des Zytoplasmas und ebenfalls im Bereich des Zellkerns beobachtet werden. Auch bei diesem Fusionsprotein kann eine passive Diffusion in den Zellkern ausgeschlossen werden, da dieses Fusionsprotein mit einer kalkulierten Molekulargewichtsgröße von ~78kDa deutlich über der Ausschlussgrenze für passive Diffusion liegt.

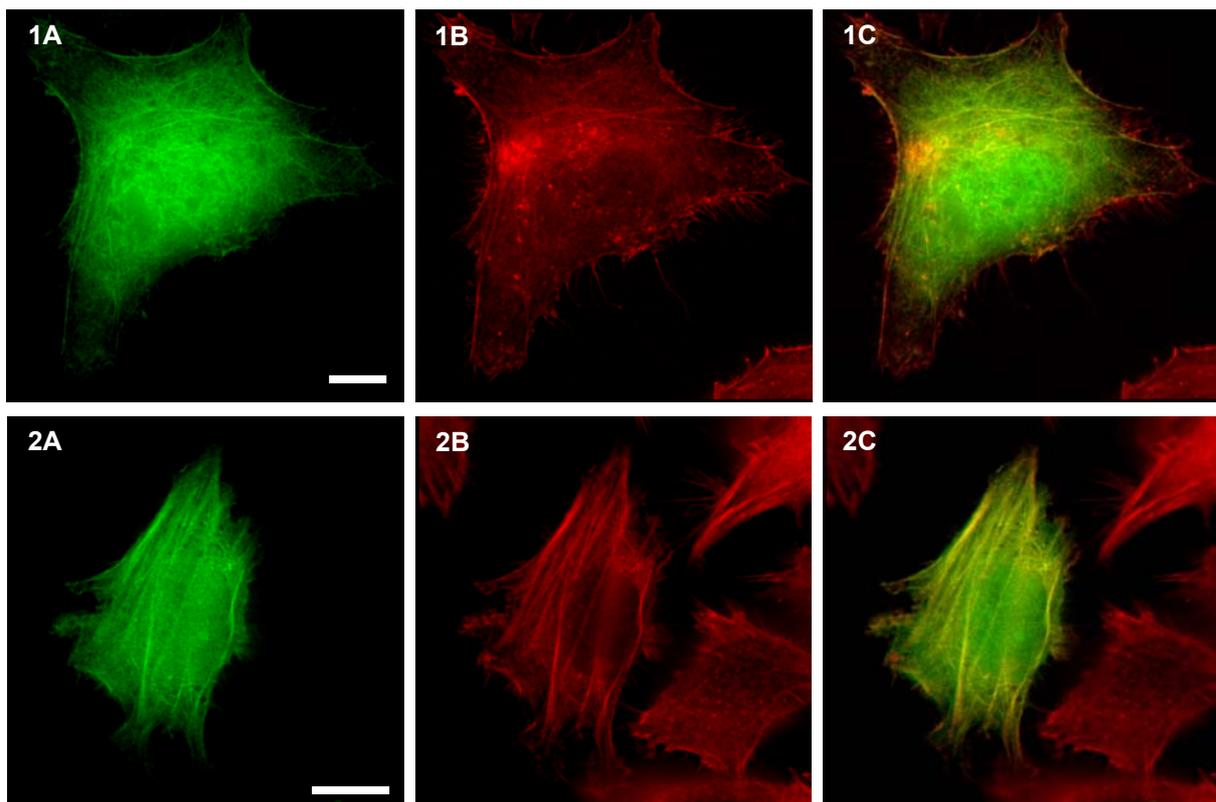


Abbildung 3.8.1 Kolokalisation des Fusionsproteins 4 mit F-Aktin in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen

Beide Zelllinien wurden mit dem Fusionskonstrukt 4 (IP3K B(As 108-585)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression des Fusionsproteins 4 wurde durch Inkubation mit markiertem Phalloidin F-Aktin nachgewiesen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In der oberen Reihe sind NRK52E Zellen, in der unteren PC12 Zellen abgebildet. Die linken Bilder (1A, 2A) zeigen die Lokalisation des Fusionsproteins 4, die mittleren Bilder (1B, 2B) F-Aktin und in den rechten Bildern (1C, 2C) sind beide Bilder übereinander gelegt. Der weiße Balken repräsentiert 10µm.

3.9 Bakterielle Expression und Reinigung des GST-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B Fusionsproteins 1

Fragment 1 (As 108-170) aus dem N-terminalen Bereich der Ratten IP3K B kolokalisiert als EGFP-Fusionsprotein *in vivo* mit F-Aktin. Zusätzlich weist die Sequenz im Bereich dieses Fragments Homologien zum Block 1 des I/LWEQ Moduls auf. Dies deutet wiederum auf eine direkte Bindung des Fragments an F-Aktin hin. Um die Aktin-Bindungseigenschaften des Fragments 1 *in vitro* zu studieren, wurde es als Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert. Die Expression und Reinigung des Fragments als GST-Fusionsprotein ermöglicht die Durchführung eines Aktin-Bindungsassays. Unter Anwendung dieses Assays kann, wenn vorhanden, eine direkte Bindung zwischen Fragment 1 und Aktin mittels Fluoreszenzspektroskopie *in vitro* nachgewiesen werden.

Zur Generierung eines GST-Fusionsproteins wurde Fragment 1 (As 108-170) in den prokaryontischen Expressionsvektor pGEX-2T umklontiert. Dieses Plasmid codiert unter anderem für die Glutathion-S-Transferase (GST), die der Aufreinigung des Fusionsproteins dient. Fragment 1 der IP3K B-cDNA wurde unter Beachtung des Leserasters in die „Multiple Cloning Site“ (MCS) „downstream“ von der im Plasmid enthaltenen, für die GST codierende cDNA kloniert.

Zunächst wurde Fragment 1 der IP3K B cDNA mittels PCR mit genspezifischen Primern amplifiziert. Mit diesen Primern wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *BamH I* und *EcoR I* eingeführt. Diese beiden Schnittstellen befinden sich auch in dem Vektor und ermöglichen eine gerichtete Umklonierung. Zusätzlich wurde mit dem 5'-Primer ein ATG für den Start der Transkription eingeführt. Für die Amplifikation des Fragmentes 1 wurden folgenden Primer verwendet:

5K1BamH1 5'-**GGA TCC ATG** GGC CGC CTG CGA GGG GAC-3'

3K1EcoR1 5'-**GAA TTC** CTC GGG GCG CTT GAA TAG CAG A-3'

Die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen sind in den für die Generierung des GST-IP3K B Fusionskonstrukts verwendeten Primern in grün dargestellt, das Start ATG ist rot markiert.

Nach erfolgreicher PCR wurde das Amplifikat in den Vektor pGEM TEasy zwischenklontiert und sequenziert. Für die Umklonierung wurden das im pGEM TEasy enthaltene Fragment 1 mit den Restriktionsendonukleasen *BamH I* und *EcoR I* hydrolysiert. Das Plasmid pGEX-2T wurde ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen restringiert. Für die Ligation wurde das hydrolysierte Fragment 1 der IP3K B cDNA mit dem hydrolysierten Plasmid pGEX-2T inkubiert.

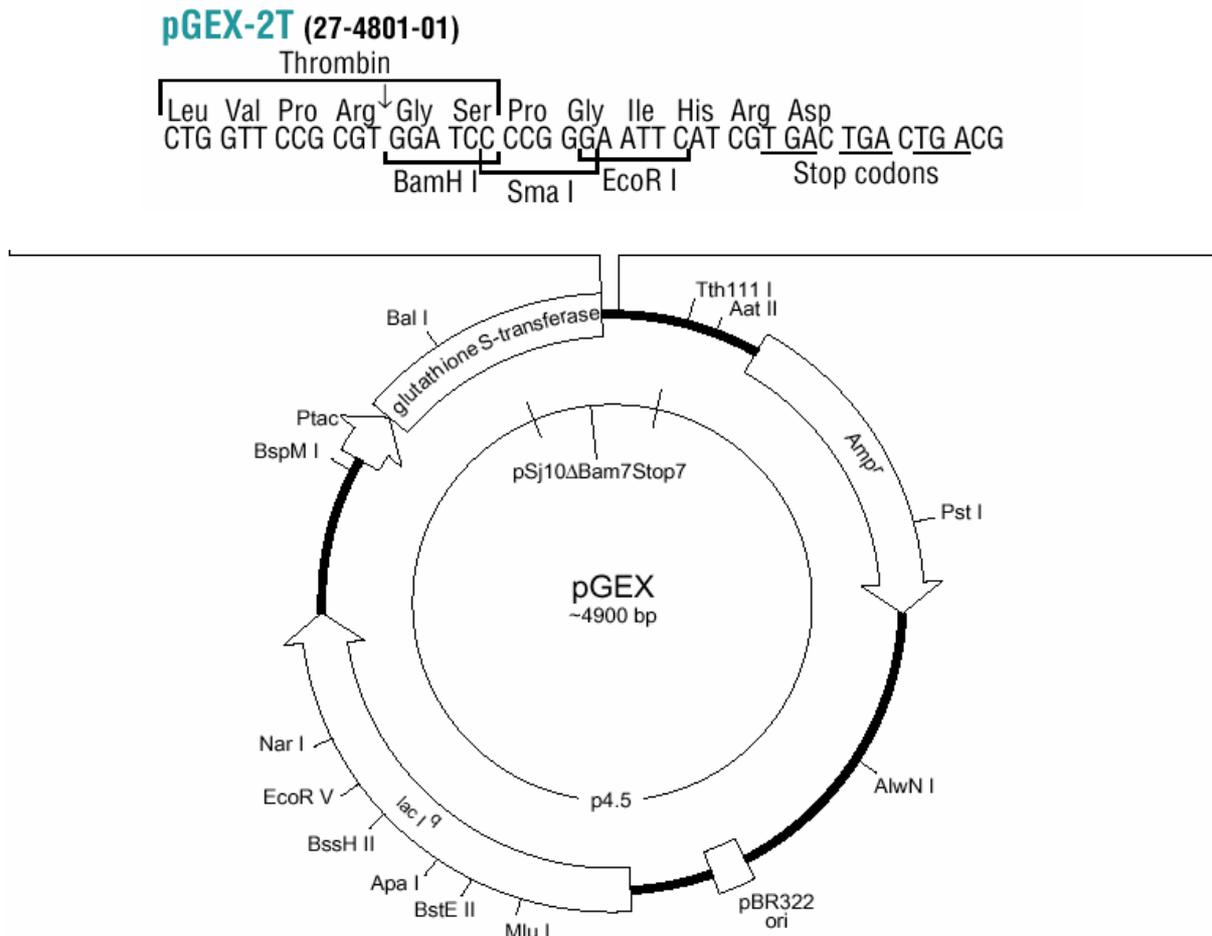


Abbildung 3.9.1 Detaillierte Übersicht der „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Plasmids pGEX-2T und schematische Vektorkarte des Plasmids pGEX

Glutathione S-transferase = Glutathion S-Transferase codierende Sequenz, Amp^r = Ampicillin Resistenzgen, pBR322 ori = Replikationsursprung des Plasmids BR322, lac I^q = lac Repressor codierende Sequenz, Ptac = tac Promotor

Für die Expression wurden *E. coli* BL21 (DE3) RIL mit dem GST-Fusionskonstrukt sowie dem Plasmid pGEX-2T transformiert. Die heterologe Expression der Proteine erfolgte durch die Zugabe von IPTG, da die Proteinexpression des pGEX-2T Plasmids unter der Kontrolle des induzierbaren tac Promotors steht.

Wie in der folgenden Abbildung erkennbar, konnte Fragment 1 aus der IP3K B erfolgreich als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert werden und befand sich nach der Lyse der Bakterien im Überstand. Das kalkulierte Molekulargewicht des IP3K B Fragmentes (As 108-170) beträgt ~7kDa, das der GST 26kDa. Das GST-Fusionsprotein hat somit ein berechnetes Molekulargewicht von ~33kDa. Als Kontrolle wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die GST mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dieser Nachweis ist in dem folgenden Western-Blot gezeigt. Neben den 33kDa großen Fusionsproteinen sind einige kleinere offensichtlich proteolytisch entstandene Polypeptidbanden nachweisbar, die einen geringen Anteil des immunoreaktiven

Materials ausmachen. Da dieses Material noch mit dem Anti-GST Antikörper reagiert, wurde das Polypeptid offensichtlich C-terminal proteolytisch degradiert.

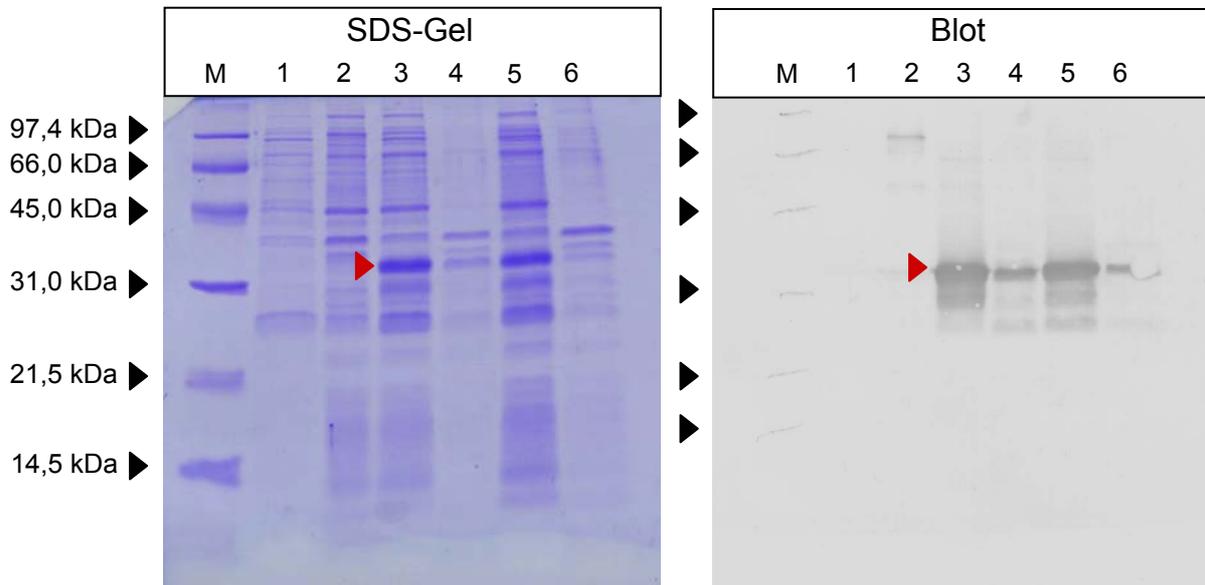


Abbildung 3.9.2 Expression und Nachweis des GST-Fusionsproteins

In dem linken Bild ist die Expression des GST-Fusionsproteins im SDS-Gel dargestellt. Der Marker (M) zeigt die Molekulargewichte der einzelnen Proteinbanden an. In den Bahnen 1 und 2 ist eine Probe lysierter Bakterien 1h bzw. 2h vor Induktion der Expression aufgetragen. In den Bahnen 3 und 5 ist der lösliche Überstand lysierter Bakterien nach einstündiger Expression des Fusionsproteins aufgetragen. Das Fusionsprotein läuft bei einer Molekulargewichtsgröße von ~33kDa und ist mit einem roten Pfeil markiert. In den Bahnen 4 und 6 ist das Pellet lysierter Bakterien nach einstündiger Expression des Fusionsproteins aufgetragen.

In dem rechten Bild sind die Proteine des SDS-Gels mittels Semi-dry Blot Verfahren auf Nitrocellulosemembran übertragen worden. Die Banden des Markers sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet, sie entsprechen den Banden des Markers im SDS-Gel. Die Bahnen 1-6 entsprechen den Bahnen 1-6 des SDS-Gels. Das GST-Fusionsprotein wurde mit einem Anti-GST Antikörper nachgewiesen und ist mit einem roten Pfeil markiert.

Als Kontrolle für den sich anschließenden Aktin-Bindungsassay wurde zusätzlich, zu dem GST-IP3K B Fusionsprotein, die GST alleine exprimiert. Die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins sowie der GST erfolgte über Säulenchromatographie. Dabei diente Glutathion Sepharose 4B als Affinitätsmatrix. Wie in der folgenden Abbildung erkennbar, ließen sich das GST-Fusionsprotein und die GST (Kontrolle) über Affinitätschromatographie gut aufreinigen.

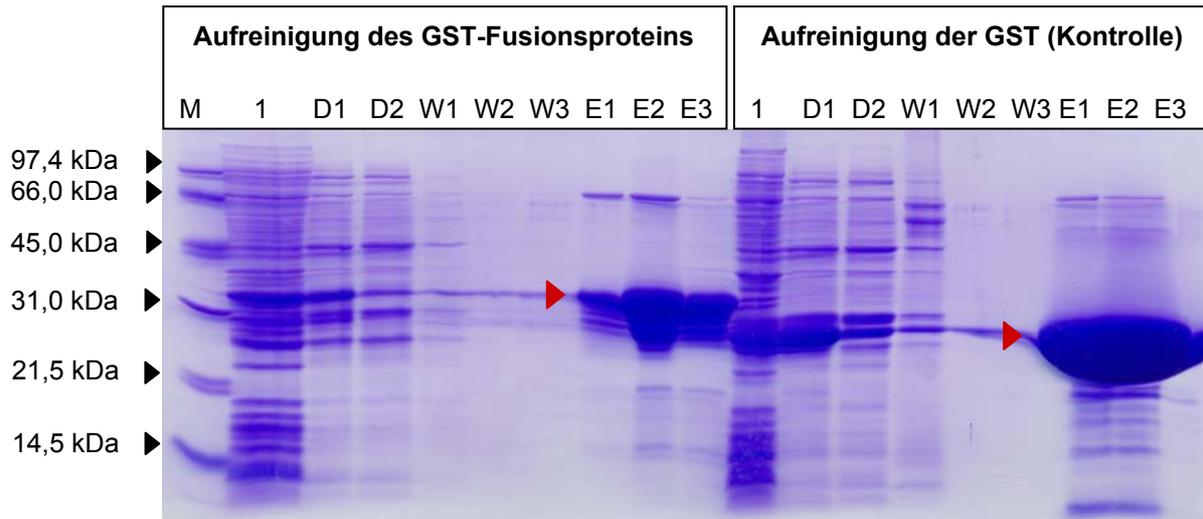


Abbildung 3.9.3 Aufreinigung des GST-Fusionsproteins und der Glutathion S-Transferase

In diesem SDS-Gel ist die Reinigung des GST-Fusionsproteins und der Glutathion S-Transferase (GST) über Glutathion Sepharose 4B dargestellt. Der Marker zeigt die Molekulargewichtsgröße der einzelnen Proteinbanden an. In den jeweiligen ersten Bahnen ist der Überstand lysierter Bakterien nach Expression des Fusionsproteins bzw. der GST aufgetragen. In den Bahnen D sind die Durchläufe nach Säulenaufgabe aufgetragen. In den mit W bezeichneten Bahnen sind die unterschiedlichen Waschfraktionen aufgetragen. Die Elution des Fusionsproteins bzw. der GST erfolgte durch die Zugabe von reduziertem Glutathion. Die Elutionsproben sind in den mit E gekennzeichneten Bahnen aufgetragen. Die roten Pfeile markieren das aufgereinigte GST-Fusionsprotein (~ 33kDa) bzw. die aufgereinigte GST (26kDa).

Abschließend wurde die Proteinmenge der aufgereinigten Proben durch einen Bradford-Assay bestimmt. Zusätzlich wurde mit dem Programm Image Master 1D [Pharmacia] anhand von SDS-Gelen der prozentuale Anteil des Fusionsproteins ermittelt der offensichtlich während der Aufreinigung degradiert wurde. Fragment 1 aus der IP3K B wurde als GST-Fusionsprotein in einem sich anschließenden Aktin-Bindungsassay eingesetzt. Als Kontrolle in diesem Assay diente die parallel aufgereinigte Glutathion-S-Transferase.

3.10 Direkte Bindung des GST-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B Fusionsproteins 1 an F-Aktin *in vitro*

Um die direkte Bindung des GST-IP3K B (As 108-170)-Fusionsproteins an Aktin *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Aktin-Bindungsassay durchgeführt. Dieser Aktin-Bindungsassay basiert auf fluoreszenzspektroskopischen Messungen. Grundlage für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen bildet fluoreszierendes NBD-Aktin in der G-Aktin oder F-Aktin Form, das mit dem GST-Fusionsprotein oder der GST als Kontrolle inkubiert wurde. Bindet ein Protein an NBD-Aktin so steigt die Fluoreszenz rasch bis zu einem bestimmten, höheren Wert an und kann im Fluoreszenzspektrometer verfolgt werden. Findet demnach eine direkte Interaktion zwischen dem GST-Fusionsprotein und Aktin statt, so kann diese festgestellt und quantifiziert werden.

Die Messungen wurden unter Anleitung von Prof. A. Wegner im Institut für physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Das verwendete Aktin wurde ebenfalls freundlicherweise von Prof. A. Wegner zur Verfügung gestellt.

In dem Aktin-Bindungsassay wurde zunächst fluoreszierendes polymeres/filamentöses Aktin (F-Aktin) eingesetzt, da in Lokalisationsstudien eine Kollokalisierung des EGFP-Fusionsproteins 1 mit F-Aktin beobachtet werden konnte. Zunächst wurde fluoreszierendes monomeres Aktin (G-Aktin) durch eine einstündige Inkubation bei 37°C zu F-Aktin polymerisiert. Der Polymerisationsvorgang wurde über einen 2,2 bis 2,3fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität des F-Aktins im Vergleich zum G-Aktin im Fluoreszenzspektrometer verfolgt [Detmers et al., 1981].

Für den Aktin-Bindungsassay wurden nun steigende Konzentrationen des GST-IP3K-Fusionsproteins zu fluoreszierendem F-Aktin (1µM) gegeben und die Veränderungen der Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzspektrometer über einen Zeitraum von 20min gemessen. Bei diesen Messungen konnte ein Anstieg der Fluoreszenzintensität (FI) beobachtet werden. Demzufolge bindet das GST-IP3K-Fusionsprotein direkt an F-Aktin. In der folgenden Tabelle sowie der sich anschließenden Graphik ist die Konzentrationsabhängigkeit dieser Bindung abgebildet. Die relative Fluoreszenzintensität ergibt sich aus: $(FI - FI_{\min}) / (FI_{\max} - FI_{\min})$ der einzelnen Messungen.

Das GST-IP3K-Fragment wurde während der Aufreinigung zu ~ 30% durch die Aktivität von Proteasen degradiert. Auf Grund der Annahme, dass dieses proteolytierte Protein nicht mehr an Aktin binden kann, wurde von den eingesetzten Probenkonzentrationen jeweils 30% abgezogen und diese korrigierten Werte für die Erstellung einer Bindungskurve eingesetzt.

GST-IP3K-Fragment (µM)	GST-IP3K-Fragment (µM) (korrigierter Wert)	Relative Fluoreszenzintensität
0	0	0
1	0,7	0,0888
2	1,4	0,0777
4	2,8	0,2277
6	4,2	0,3666
8	5,5	0,4833
10	7,0	0,4444
12	8,4	0,4944
14	9,8	0,5444
16	11,2	0,5944
18	12,6	0,5111
20	14,0	0,6222

Die Daten erlauben die Erstellung von zwei unterschiedlichen Bindungskurven, die einen hyperbolen (schwarz dargestellt) oder einen sigmoiden Verlauf haben. Aus beiden Kurven kann eine Dissoziationskonstante K_d für die Bindung des Fusionsproteins an F-Aktin berechnet werden. Dabei ist die Dissoziationskonstante nur im Falle einer hyperbolischen Bindungskurve gleich der Konzentration an freiem Ligand (GST-IP3K Fragment), bei der ge-

rade die Hälfte des Proteins (Aktin) als Protein-Ligand-Komplex vorliegt. Durch hyperbolisches Fitting der Daten ergibt sich ein K_d Wert von $6,746\mu\text{M}$, während sich durch sigmoides Fitting ein Hill-Koeffizient von ~ 2 und ein K_d Wert von $9,886\mu\text{M}$ ergibt. Dieser letztgenannte Wert entspricht nur dem K_d Wert für das erste, von in diesem Falle zwei kooperativ gebundenen Fusionsproteinen. Die halbmaximale Bindung ergibt sich hier bei $\sim 2\mu\text{M}$ Fusionsprotein.

Gemessen an den ermittelten Korrelationskoeffizienten (R^2) von 0,955 bzw. 0,9715 scheint der sigmoide Fit der Daten besser zu sein. Demzufolge findet eine positive kooperative Bindung von zwei Fusionsproteinen an eine F-Aktin-Bindungsstelle statt, die sich aus dem Hill Koeffizient ($H \approx 1,888$) direkt ableiten lässt.

Positiv-kooperative Bindung heißt, dass die Bindung des ersten Liganden mit niedrigerer Affinität geschieht, als die der nachfolgenden Liganden. Das heißt, wenn eine erste Bindungsstelle im Oligomer (in diesem Fall F-Aktin) mit Ligand (in diesem Fall GST-IP3K Fragment) besetzt ist, steigt die Affinität der noch nicht besetzten Bindungsstelle deutlich an. Als Funktion für die makroskopische Beschreibung der kooperativen Bindung des Fusionsproteins an Aktin wurde die Hill-Gleichung ($B=B_{\text{max}} \cdot L^H / (K_d + L^H)$) verwendet. Dabei steht in diesem Fall B für die relative Fluoreszenzintensität und L für das GST-IP3K Fragment.

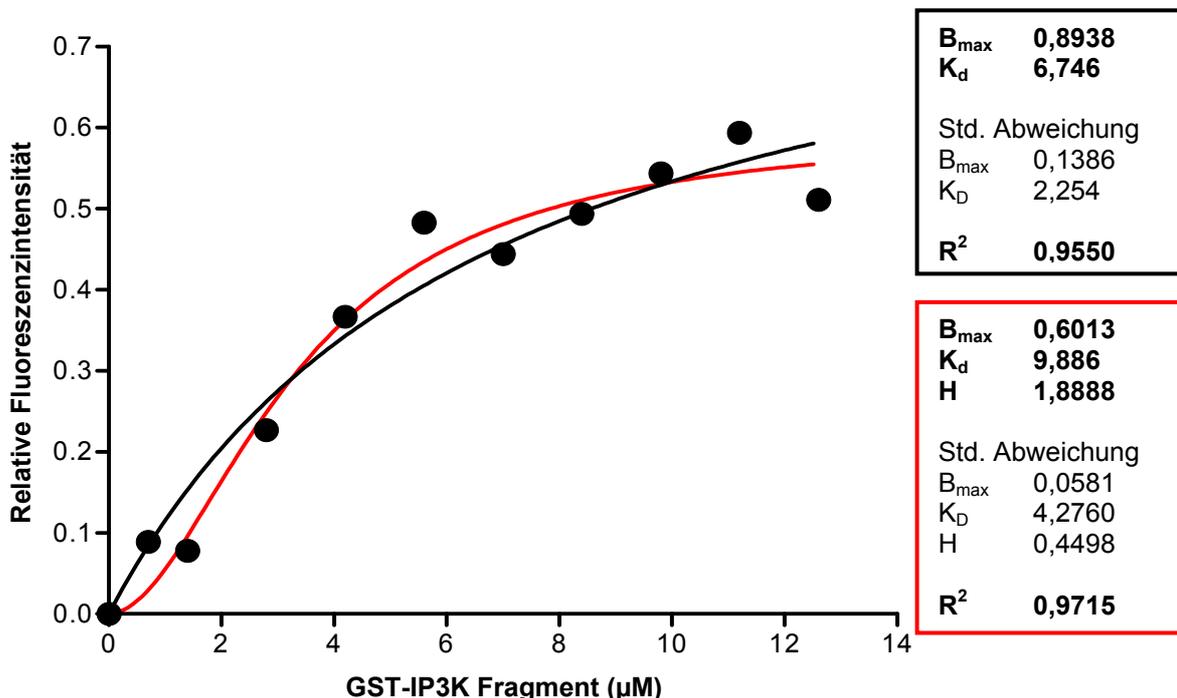


Abbildung 3.10.1 Konzentrationsabhängigkeit der Bindung des GST-IP3K-Fusionsproteins an F-Aktin

Steigende Konzentrationen des GST-IP3K-Fragmentes wurden mit fluoreszent markiertem F-Aktin ($1\mu\text{M}$) inkubiert und der Anstieg der Fluoreszenz über einen Zeitraum von 20min im Spektrometer verfolgt. Aus den einzelnen Messungen wurde die relative Fluoreszenzintensität bei der entsprechenden Konzentration des GST-IP3K-Fragmentes ermittelt. Jede einzelne Messung wird durch einen Messpunkt in der Graphik repräsentiert. Der hyperbolische Fit der Daten ist schwarz, während der sigmoide Fit rot dargestellt ist. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Prism (K_d = Dissoziationskonstante; H = Hill Koeffizient; R^2 = Korrelationskoeffizient)

Als Kontrolle wurde fluoreszent markiertes F-Aktin mit unterschiedlichen Konzentrationen an GST inkubiert. In diesen Messungen konnte kein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden.

Um die Aktin-Bindungseigenschaften des GST-IP3K B-Fusionsproteins weitergehend zu untersuchen, wurde das Fusionsprotein auch mit fluoreszent markiertem G-Aktin ($1\mu\text{M}$) inkubiert und die Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 20min gemessen. In diesen Messungen wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen des GST-IP3K-Fusionsproteins sowie Puffer als Kontrolle eingesetzt. Wie in der folgenden Abbildung dargestellt, konnte kein unterschiedlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität zwischen Pufferkontrolle und den zwei Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an Fusionsprotein beobachtet werden. Demnach bindet das GST-IP3K-Fusionsprotein spezifisch an F-Aktin. Eine Bindung an G-Aktin findet nicht statt. Der leichte, initiale Anstieg der Fluoreszenz in der abgebildeten Graphik beruht auf dem Austausch von an G-Aktin gebundenem Ca^{2+} durch Mg^{2+} [Frieden, 1982].

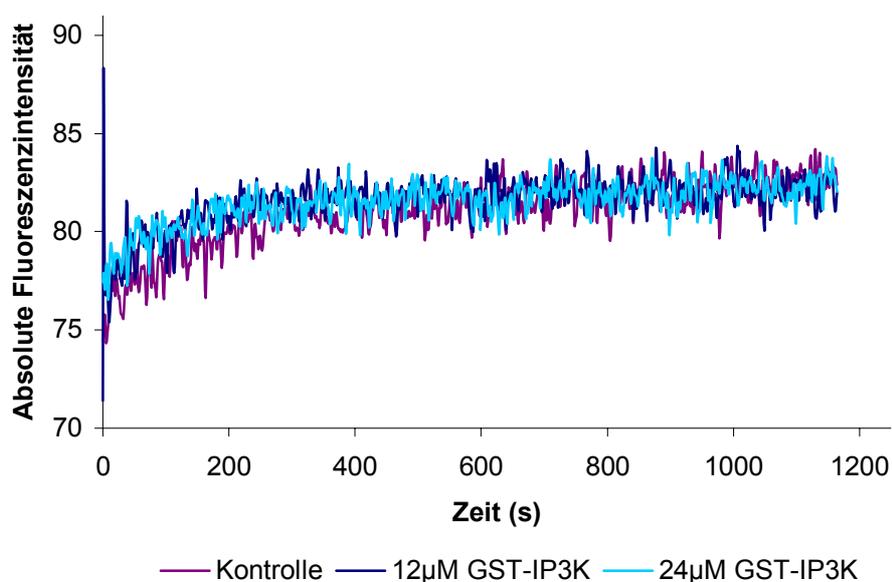


Abbildung 3.10.2 Zeitverlauf der Inkubation des GST-IP3K-Fusionsprotein mit G-Aktin

Fluoreszent markiertes G-Aktin ($1\mu\text{M}$) wurde für 20min mit $12\mu\text{M}$ bzw. $24\mu\text{M}$ GST-IP3K B-Fusionsprotein inkubiert und die Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 20min im Spektrometer verfolgt. Als Kontrolle wurde markiertes G-Aktin zusätzlich mit Puffer inkubiert.

3.11 Intrazelluläre Lokalisation von punkt-mutierten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B-EGFP Fusionsproteinen

3.11.1 Generierung von punkt-mutierten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (As 108-170)-EGFP Fusionskonstrukten mittels QuikChange™ Mutagenese

Ein 63 Aminosäuren umfassender Abschnitt (Fragment 1: As 108-170) aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B kolokalisiert als EGFP-Fusionsprotein mit F-Aktin und bindet als GST-Fusionsprotein direkt an F-Aktin (siehe Abschnitt 3.6 und 3.10, Seite 79 und 88). Damit stellt dieser Sequenzabschnitt eine Aktin-Bindungsdomäne dar. Zusätzlich weist ein Abschnitt dieser Domäne Homologien zum Block 1 des I/LWEQ Moduls auf. Das gesamte Modul, bestehend aus den Blöcken 1, 2, 3 und 4, vermittelt in Proteinen der I/LWEQ-Proteinfamilie die Interaktion mit Aktin [McCann and Craig, 1997; 1999].

Anhand weiterer Lokalisationsstudien wurde die Aktin-Bindungsdomäne der IP3K B weiter charakterisiert. Dabei stand folgende Frage im Vordergrund: Handelt es sich bei dem IP3K B Sequenzabschnitt (As 108-170), der mit F-Aktin direkt interagiert, um einen bisher uncharakterisierten Aktin-Bindungsdomänen-Typ oder können die Aktin-Bindungseigenschaften dieses Sequenzabschnitts ausschließlich auf den Bereich, der Homologien zum I/LWEQ Modul (As 115-154) aufweist, zurückgeführt werden? Sind also die Homologien zum Block 1 des I/LWEQ Moduls nicht zufällig, sondern für die Aktin-Bindung relevant?

Zwei Kategorien von Konstrukten sollten insbesondere Rückschlüsse auf diese Fragestellung zulassen. Zunächst wurden basierend auf dem in Abbildung 3.7.1 dargestellten Alignment Aminosäuren mutiert, die zwischen Block 1 des I/LWEQ Moduls und dem homologen Sequenzabschnitt der IP3K B konserviert sind. Diese Aminosäuren sind bevorzugte Kandidaten für die Ausbildung einer korrekten 3D Domänenstruktur und vermutlich auch für die direkte Vermittlung der Aktin-Bindung [McCann und Craig, 1999].

Es wurden die konservierten Aminosäuren durch ähnliche Aminosäuren ersetzt, um die Sekundärstruktur in diesem Bereich nicht drastisch zu verändern. Würde die Sekundärstruktur durch einen Aminosäureaustausch gravierend verändert, so könnte aus den Ergebnissen der Lokalisationsstudien nicht mit Sicherheit abgeleitet werden, ob die mutierte Aminosäure eine essentielle Funktion hat, da die Domäne eventuell überhaupt nicht mehr ausgebildet werden kann. Aus diesem Grunde wurde ein relativ konservativer Austausch der Aminosäuren durchgeführt. Folgende Mutanten der IP3K B Aktin-Bindungsdomäne (Fragment 1) aus *Rattus norvegicus* wurden generiert:

Mutante 1: IP3K B Fragment 1(L124A)-EGFP

Mutante 2: IP3K B Fragment 1(A132G)-EGFP

Mutante 3: IP3K B Fragment 1(I138A)-EGFP

Mutante 4: IP3K B Fragment 1(Q144A)-EGFP

Alle Mutanten des IP3K B(As 108-170)-EGFP Fusionskonstruktes bzw. der fusionierten Aktin-Bindungsdomäne wurden zur Kontrolle nach erfolgter Mutagenese vollständig sequenziert.

Die folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt des vorangehend in Abbildung 3.7.1 dargestellten Blockalignments des I/LWEQ Moduls, sowie die ausgetauschten Aminosäuren.

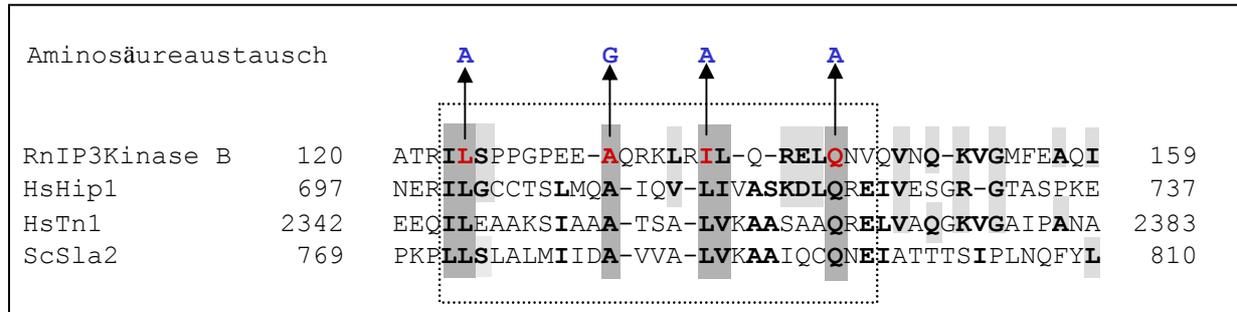


Abbildung 3.11.1.1 Aminosäureaustausch durch QuikChange™ Mutagenese im IP3K B-EGFP Fusionskonstrukt 1

Die Aminosäuresequenz aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B (*Rattus norvegicus*) wurde im Bereich des Blocks 1 mit Aminosäuresequenzen aus Proteinen verglichen, die ein charakteristisches I/LWEQ Modul aufweisen. Für diesen Vergleich wurde die Sequenz des humanen Hip1 (HsHip1), des humanen Talin 1 (HsTn1) und die des Sla2p (ScSla2p) aus der Hefe herangezogen. Der Bereich des Blocks 1 ist umrahmt. Die Homologien zwischen den Aminosäureresten sind durch graue Hinterlegung der jeweiligen Reste dargestellt. Dunkelgrau hinterlegt sind identische bzw. ähnliche Aminosäuren die in allen vier Sequenzen auftauchen, hellgrau hinterlegt sind identische bzw. ähnliche Aminosäuren die in zwei oder drei der Sequenzen auftauchen. Die für Mutagenesestudien ausgewählten Aminosäuren sind rot gekennzeichnet, die Pfeile zeigen an zu welchen Aminosäuren diese mutiert wurden.

3.11.2 Intrazelluläre Lokalisation von „single-site“ Mutanten des Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B (As 108-170)-EGFP Fusionsproteins

Um die generierten Mutanten des IP3K B(As 108-170)-EGFP Fusionskonstrukts auf ihre Lokalisation mit F-Aktin zu untersuchen, wurden transiente Transfektionsstudien an zwei Zelllinien durchgeführt.

Nach Expression der Mutante 1 (IP3K B Fragment 1(L124A)-EGFP) in NRK52E- und PC12 Zellen wurden die Mikrofilamente dieser Zellen durch TRITC markiertes Phalloidin nachgewiesen. In beiden Zelllinien konnte eine Kolokalisation der mutierten und EGFP fusionierten Bindungsdomäne mit F-Aktin beobachtet werden. Diese Kolokalisation ist deutlich in den links abgebildeten Kompositbildern zu erkennen. Demzufolge ist das Leucin 124 aus der IP3K B weder notwendig für die Ausbildung der Bindungsdomäne noch für die direkte Aktin-Bindung.

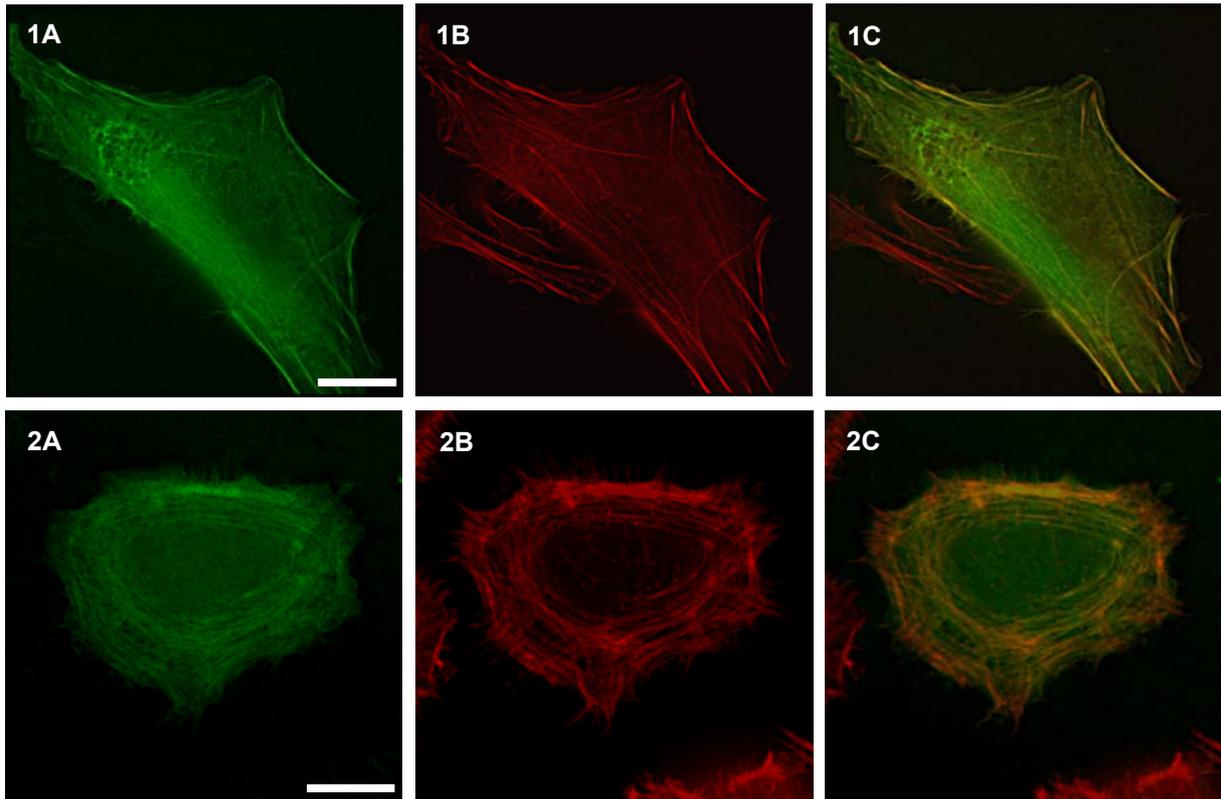


Abbildung 3.11.2.1 Kolokalisation der Mutante 1 mit F-Aktin in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen

Beide Zelllinien wurden mit der Mutante 1 (IP3K B Fragment 1(L124A)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression der Mutante 1 wurde durch Inkubation mit markiertem Phalloidin F-Aktin nachgewiesen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In der oberen Reihe sind NRK52E Zellen, in der unteren PC12 Zellen dargestellt. Die linken Bilder (1A, 2A) zeigen die Lokalisation der Mutante 1, die mittleren Bilder (1B, 2B) F-Aktin und in den rechten Bildern (1C, 2C) sind beide Bilder jeweils übereinander gelegt. Der weiße Balken repräsentiert 10µm.

Nach Expression der Mutante 2 (IP3K B Fragment 1(A132G)-EGFP) in beiden Zelllinien konnte ebenfalls eine Kolokalisation dieser Mutante mit F-Aktin festgestellt werden. Im Gegensatz zu Mutante 1 konnte zusätzlich eine stärker ausgeprägte Verteilung des mutierten Fusionsproteins im Bereich des Zytoplasmas und des Kerns beobachtet werden. Diese Beobachtung könnte auf eine geringere Bindungsintensität der mutierten Bindungsdomäne zu F-Aktin hindeuten. In den Kompositbildern ist gelb die Kolokalisation und grün die zusätzlich beobachtete intrazelluläre Verteilung der Mutante 2 zu erkennen. Das Alanin 132 könnte demnach eine Funktion bei der Ausbildung der Domänenstruktur oder bei der direkten Bindung an F-Aktin haben. Falls Alanin 132 direkt die Bindung der Domäne an Aktin vermittelt, müssen auch weitere Aminosäuren an dieser Bindung beteiligt sein, da in den transfizierten Zellen noch immer eine ausgeprägte Kolokalisation mit F-Aktin beobachtet werden konnte.

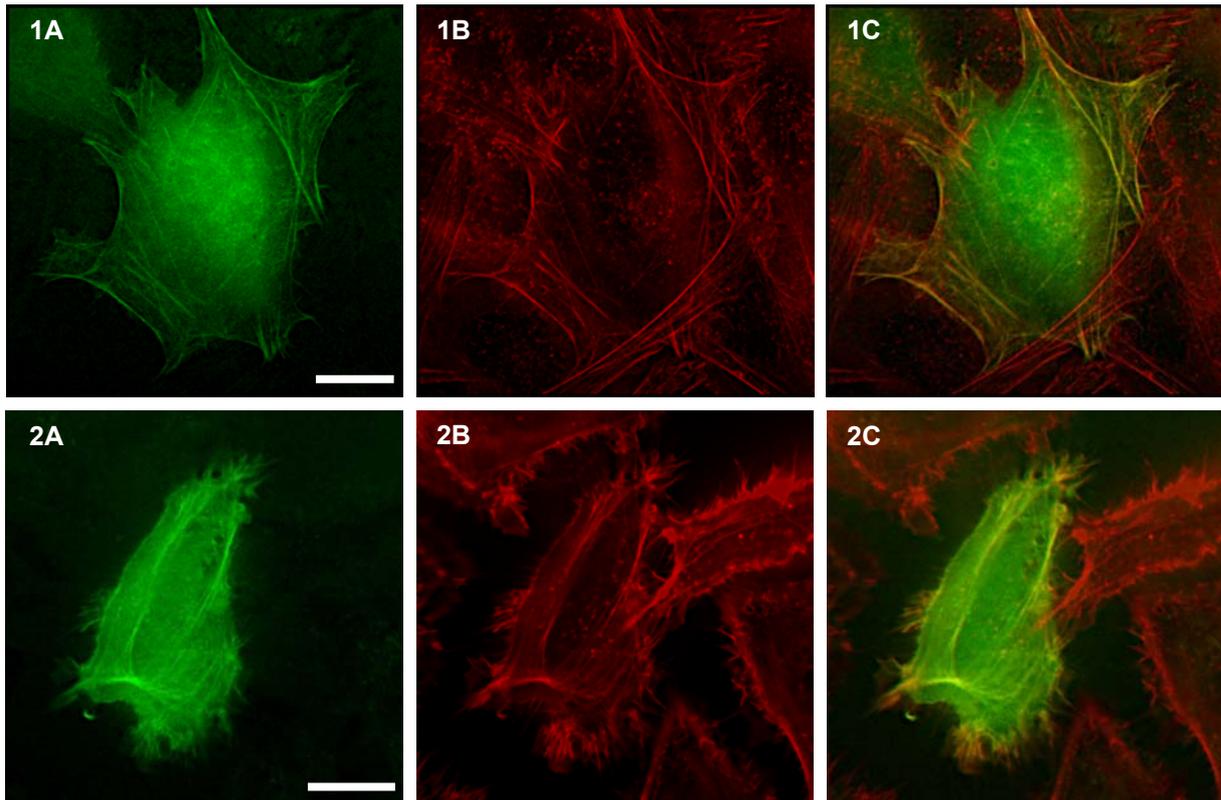


Abbildung 3.11.2.2 Lokalisation der Mutante 2 in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen

Beide Zelllinien wurden mit der Mutante 2 (IP3K B Fragment 1(A132G)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression der Mutante 2 wurde durch Inkubation mit markiertem Phalloidin F-Aktin nachgewiesen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In der oberen Reihe sind NRK52E Zellen, in der unteren PC12 Zellen dargestellt. Die linken Bilder (1A, 2A) zeigen die Lokalisation der Mutante 2, die mittleren Bilder (1B, 2B) F-Aktin und in den rechten Bildern (1C, 2C) sind beide Bilder jeweils übereinander gelegt. Der weiße Balken repräsentiert 10µm.

Die Lokalisation der Mutante 3 (IP3K B Fragment 1(I138A)-EGFP) in NRK52E- und PC12 Zellen deckt sich mit der beobachteten Lokalisation der Mutante 1. In beiden Zelllinien konnte eine Kolokalisation der mutierten Bindungsdomäne mit F-Aktin beobachtet werden. Diese Kolokalisation ist deutlich an der gelben Färbung der Kompositbilder zu erkennen. Demzufolge beeinflusst der Austausch des Isoleucins 138 weder die Ausbildung der Domäne, noch ist dieser Rest notwendig für die Aktin-Bindung.

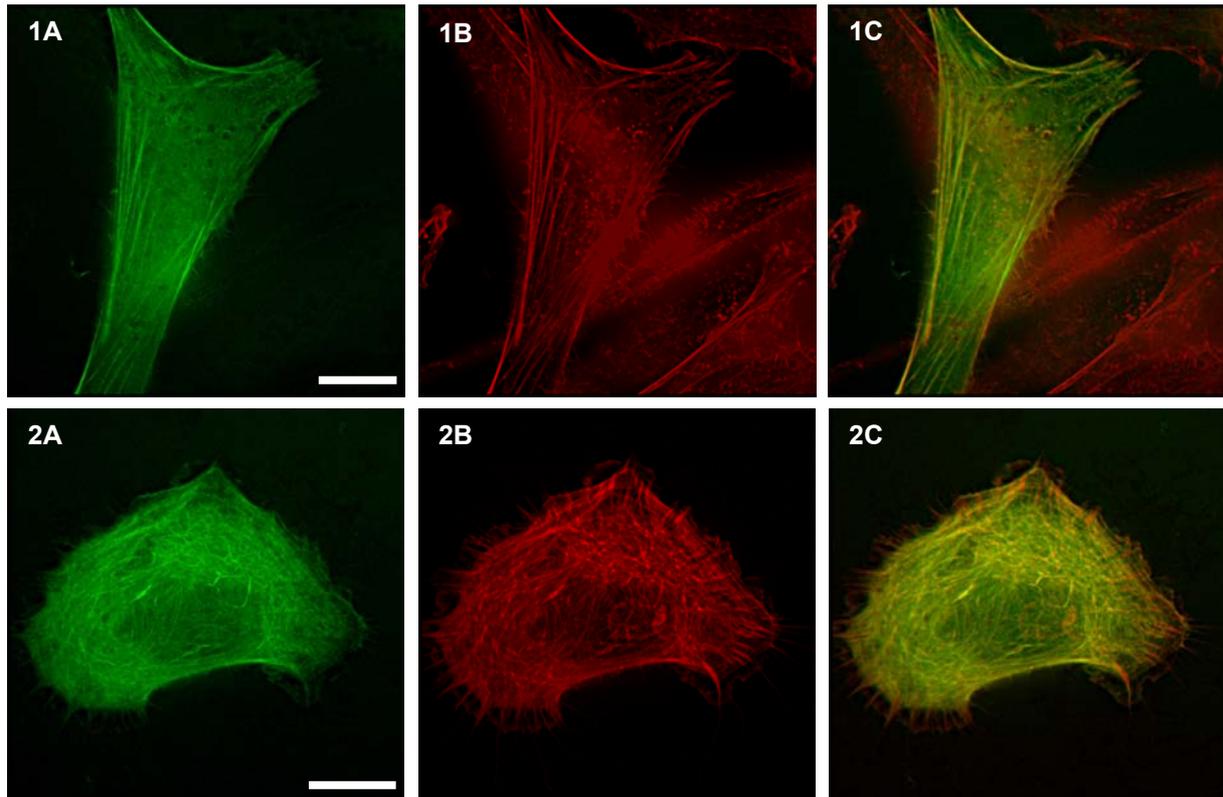


Abbildung 3.11.2.3 Kolokalisation der Mutante 3 mit F-Aktin in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen

Beide Zelllinien wurden mit der Mutante 3 (IP3K B Fragment 1(I138A)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression der Mutante 3 wurde durch Inkubation mit markiertem Phalloidin F-Aktin nachgewiesen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In der oberen Reihe sind NRK52E-Zellen, in der unteren PC12 Zellen dargestellt. Die linken Bilder (1A, 2A) zeigen die Lokalisation der Mutante 3, die mittleren Bilder (1B, 2B) F-Aktin und in den rechten Bildern (1C, 2C) sind beide Bilder jeweils übereinander gelegt. Der weiße Balken repräsentiert 10µm.

Nach Expression der Mutante 4 (IP3K B Fragment 1(Q144A)-EGFP) in beiden Zelllinien konnte ebenfalls eine Kolokalisation dieser Mutante mit F-Aktin festgestellt werden. Im Gegensatz zu den Mutanten 1 und 3 konnte dabei auch eine Lokalisation der mutierten Bindungsdomäne im Bereich des Zytoplasmas und im Bereich des Kerns beobachtet werden. Dies konnte ebenso nach Expression der Mutante 2 in beiden Zelllinien beobachtet werden. In den Kompositbildern ist gelb die Kolokalisation und grün die zusätzlich beobachtete intrazelluläre Verteilung der Mutante 4 zu erkennen. Das Glutamin 144 könnte wie das Alanin 132 demnach eine Funktion bei Ausbildung der Domänenstruktur oder aber eine Rolle bei der Aktin-Bindung spielen. Glutamin 144 scheint jedoch nicht allein die Bindung der Domäne an Aktin zu vermitteln, da das mutierte Fusionsprotein in den transfizierten Zellen weiterhin deutlich mit F-Aktin kolokalisiert.

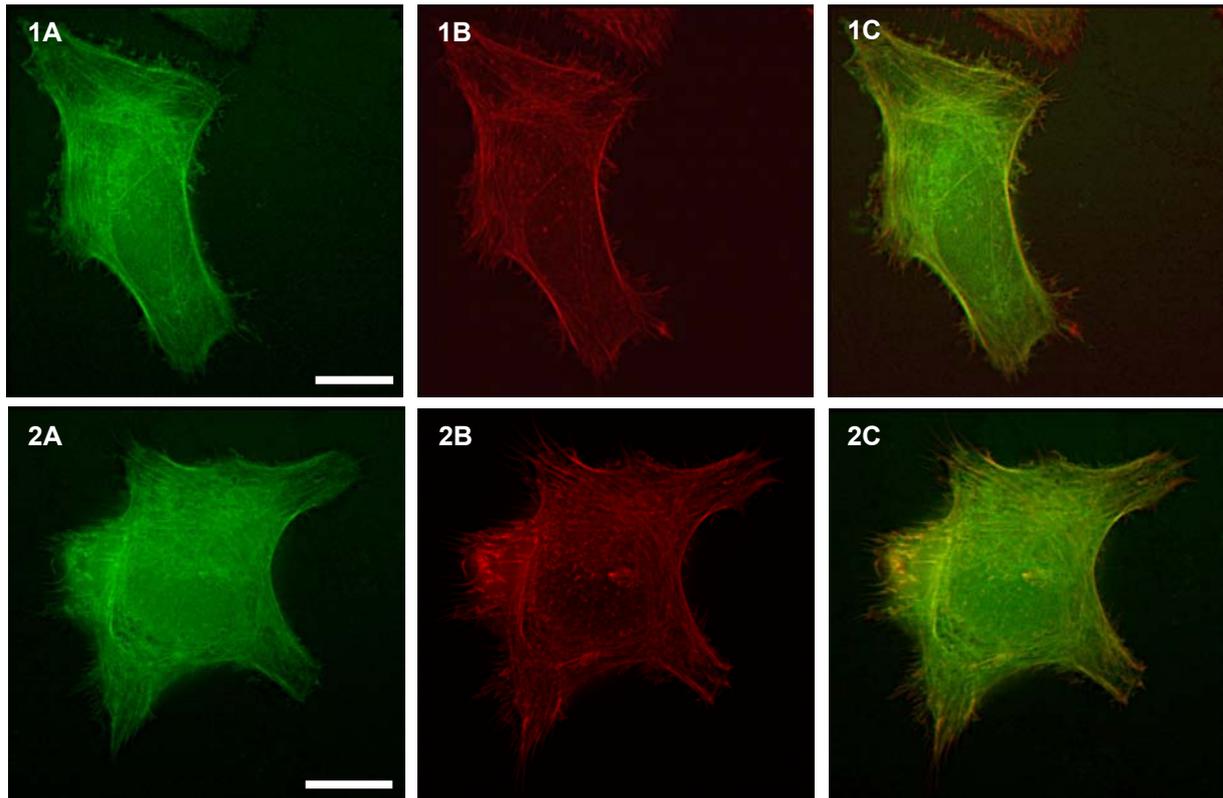


Abbildung 3.11.2.4 Lokalisation der Mutante 4 in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen

Beide Zelllinien wurden mit der Mutante 4 (IP3K B Fragment 1(Q144A)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression der Mutante 4 wurde durch Inkubation mit markiertem Phalloidin F-Aktin nachgewiesen. Die Zellen wurden bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In der oberen Reihe sind NRK52E-Zellen, in der unteren PC12 Zellen dargestellt. Die linken Bilder (1A, 2A) zeigen die Lokalisation der Mutante 4, die mittleren Bilder (1B, 2B) F-Aktin und in den rechten Bildern (1C, 2C) sind beide Bilder jeweils übereinander gelegt. Der weiße Balken repräsentiert 10µm.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ausbildung der Aktin-Bindungsdomäne weder durch den Austausch einer der untersuchten Aminosäuren verhindert wird, noch ist eine der analysierten Aminosäuren notwendig für die Bindung an Aktin.

Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der im zytosolischen Bereich deutlicher ausgeprägten unspezifischen Verteilung des EGFP-Fusionsproteins der Mutanten 2 und 4 um einen Effekt handelt, der verursacht wird durch den Aminosäureaustausch in dem zu Block 1 des I/LWEQ Moduls homologen Abschnitt der Bindungsdomäne. Möglicherweise nehmen die Aminosäuren Alanin 132 und Glutamin 144 bei der Bindung an F-Aktin eine spezifische Rolle ein. Dieser Effekt könnte die Bindung negativ beeinflussen und ursächlich für die beobachtete Akkumulation von ungebundenem Fusionsprotein sein. Eine Verstärkung des möglichen Effektes könnte weitere Rückschlüsse auf die Rolle der Aminosäuren Alanin 132 und Glutamin 144 zulassen, die zwischen Block 1 des I/LWEQ Moduls und der IP3K B-Bindungsdomäne konserviert sind. Um eine Verstärkung des möglichen Effektes zu bewirken, könnten Doppelmutanten generiert werden, in denen diese beiden konservierten Aminosäuren zusammen konservativ ausgetauscht vorliegen.

3.12 Intrazelluläre Lokalisation von verkürzten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B Fragment 1-EGFP Fusionsproteinen

3.12.1 Generierung von verkürzten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B EGFP-Fusionskonstrukten

Die identifizierte Aktin-Bindungsdomäne (Fragment 1: As 108-170) aus der IP3K B beinhaltet einen Abschnitt (As 123-146) der Homologien zu Block 1 des I/LWEQ Moduls aufweist. Wie bereits diskutiert, vermittelt das gesamte Modul, bestehend aus den Blöcken 1, 2, 3 und 4, in Proteinen der I/LWEQ-Proteinfamilie die Interaktion mit Aktin [McCann and Craig, 1997; 1999]. Nach Mutagenese einzelner Aminosäuren im Block 1-homologen Abschnitt der Bindungsdomäne, konnte weiterhin eine Kolo-kalisation der Mutanten mit F-Aktin beobachtet werden. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass nicht allein der Block 1 homologe Abschnitt für die Ausbildung der Bindungsdomäne verantwortlich ist.

Anhand weiterer Transfektionsstudien mit der verkürzten Bindungsdomäne sollten folgende Fragen beantwortet werden: Wird die Kolo-kalisation der Bindungsdomäne mit F-Aktin allein durch den Abschnitt, der Homologien zu Block 1 aufweist, vermittelt? Ist dieser Sequenzabschnitt damit ein abgewandeltes I/LWEQ Modul, oder beinhaltet die IP3K B einen neuen Aktin-Bindungsdomänen-Typ?

Zur Aufklärung dieser Fragen, wurde basierend auf dem Blockalignment (Abbildung 3.7.1, Seite 83) und der Sekundärstrukturanalyse (Abbildung 3.3.2.2, Seite 73) die Bindungsdomäne (As 108-170) um mehrere Aminosäuren verkürzt. Es wurden zwei EGFP-Fusionskonstrukte generiert, die beide den Abschnitt der IP3K B beinhalten, der Homologien zum Block 1 des I/LWEQ Moduls aufweist, um aufzuklären, ob die Aminosäuresequenz dieses Abschnitts die Kolo-kalisation mit F-Aktin allein vermittelt. EGFP-Fusionskonstrukt 1a umfasst die Aminosäuren 120-159 der Kinase und beinhaltet einen β -Strang gefolgt von zwei putativen α -Helices. EGFP-Fusionskonstrukt 1b umfasst die Aminosäuren 120-148. Dieses Konstrukt wurde um den α -helicalen Abschnitt der Aminosäuresequenz C-terminal verkürzt.

Die Generierung der EGFP-Fusionskonstrukte sowie die Klonierungskontrolle erfolgte wie vorangegangen beschrieben (siehe Abschnitt 3.4, Seite 73).

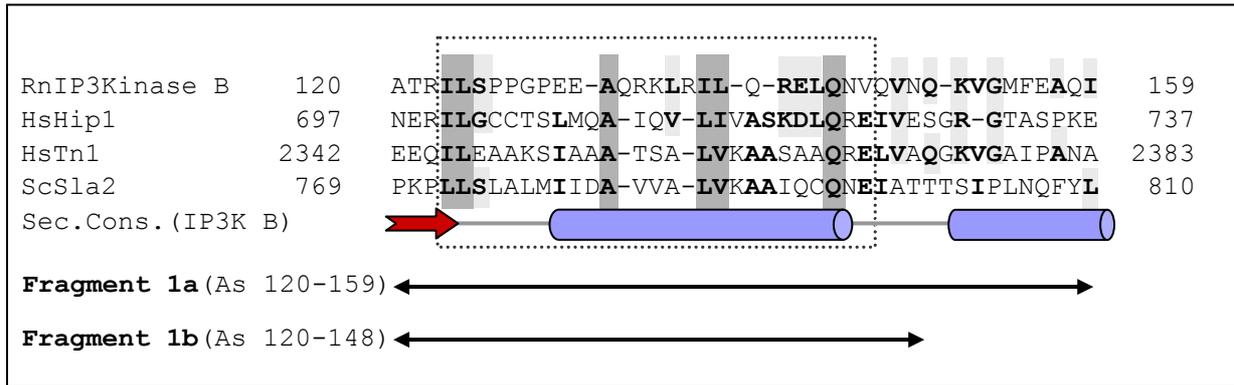


Abbildung 3.12.1.1 Aminosäuresequenzbereich der Fragmente 1a und 1b des IP3K B-EGFP Fusionskonstrukts

Die Aminosäuresequenz aus dem N-terminalen Bereich der Ratten IP3K B wurde im Bereich des Blockes 1 mit Aminosäuresequenzen aus Proteinen verglichen die ein charakteristisches /LWEQ Modul aufweisen. Für diesen Vergleich wurde die Sequenz des humanen Hip1 (HsHip1), des humanen Talin 1 (HsTn1) und die des Sla2p (ScSla2p) aus der Hefe herangezogen. Block 1 ist umrahmt. Die Homologien zwischen den Aminosäureresten sind durch graue Hinterlegung der jeweiligen Reste dargestellt. Dunkelgrau hinterlegt sind identische bzw. ähnliche Aminosäuren, die in allen vier Sequenzen auftauchen, hellgrau hinterlegt sind identische bzw. ähnliche Aminosäuren, die in zwei oder drei der Sequenzen auftauchen. Die putativen Sekundärstrukturelemente sind farblich dargestellt (siehe Legende der Abbildung 3.3.2.2). Die Pfeile zeigen die Bereiche aus der Aminosäuresequenz der IP3K B, die für die Generierung der Fragmente 1a und 1b ausgewählt wurden.

3.12.2 Intrazelluläre Lokalisation von verkürzten Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B Fragment 1-EGFP-Fusionsproteinen

Die generierten IP3K B-EGFP-Fusionproteine wurden in transienten Transfektionsstudien auf ihre Kolo-kalisation mit F-Aktin untersucht.

Nach Expression der Fusionsproteine 1a (IP3K B Fragment 1a(As 120-159)-EGFP) und 1b (IP3K B Fragment 1b(As 120-148)-EGFP) in NRK52E Zellen wurde die Expression der Fusionsproteine im Fluoreszenzmikroskop untersucht. F-Aktin wurde durch TRITC markiertes Phalloidin nachgewiesen. Weder das exprimierte Fusionsprotein 1a noch 1b zeigten eine Kolo-kalisation mit F-Aktin. In den Zellen konnte eine intrazelluläre Verteilung der Fusionsproteine im Bereich des Zytoplasmas und des Kerns beobachtet werden. Die Verteilung der Fusionsproteine deckt sich mit der Verteilung des EGFPs in den transfizierten Kontrollzellen. Der Nachweis des F-Aktins durch Phalloidin ist nicht dargestellt.

Diese Beobachtungen lassen zwei Rückschlüsse zu. Erstens ist die für eine Ausbildung der Aktin-Bindungsdomäne notwendige Aminosäuresequenz in beiden Fusionskonstrukten nicht mehr vollständig enthalten. Zweitens beruht die Kolo-kalisation der Bindungsdomäne mit F-Aktin nicht ausschließlich auf dem Bereich, der Homologien zu Block 1 des /LWEQ Moduls aufweist.

Danach könnte es sich bei dem 63 Aminosäuren umfassenden Sequenzabschnitt der IP3K B um eine bisher uncharakterisierte Aktin-Bindungsdomäne handeln, deren Ähnlichkeiten zum /LWEQ Modul wahrscheinlich zufällig sind.

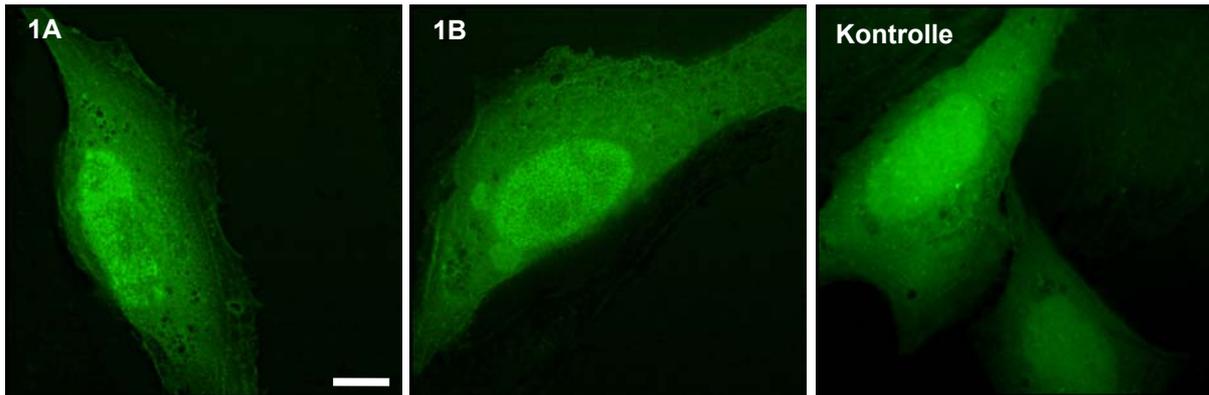


Abbildung 3.12.2.1 Subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine 1a und 1b in NRK52E Zellen
NRK52E Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt 1a (IP3K B Fragment 1a(As 120-159)-EGFP) oder 1b (IP3K B Fragment 1b(As 120-148)-EGFP) transfiziert. Nach 24stündiger Expression der Fusionsproteine wurden die Zellen bei 100facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Das linke Bild (1A) zeigt die subzelluläre Verteilung des Fusionsproteins 1a, das mittlere Bild (1B,) zeigt die subzelluläre Verteilung des Fusionsproteins 1b. Rechts ist die Expression des EGFP allein als Kontrolle gezeigt. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m.

4 Diskussion

4.1 Aktin-Bindungsgebiete in eukaryontischen Proteinen

Obwohl die Anzahl von identifizierten Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) ständig wächst, konnten anhand von Aminosäuresequenzanalysen bisher nur fünf charakteristische Typen von Aktin-Bindungsgebieten (auch Aktin-Bindungsmotive/domänen/module genannt) in einigen ABPs identifiziert werden. Zu diesen charakteristischen Gebieten gehören die CH Domänen („calponin homology domain“), die Gelsolin homologen Domänen, das Thymosin- β 4/WH2 Motiv („WASP homology domain 2“), die ADF-H Module („actin-depolymerizing factor homology domains“) und des Weiteren die I/LWEQ Module [McCann and Craig, 1997; Lappalainen et al., 1998; Stradal et al., 1998; Paunola et al., 2001]. Dabei weisen nicht nur die unterschiedlichen Typen von Aktin-Bindungsgebieten eine große Heterogenität zueinander auf, sondern auch die Vertreter innerhalb eines Typs von Bindungsgebiet variieren beispielsweise in ihren proteinbiochemischen Eigenschaften. Während Vertreter der CH Domänen und WH2 Motive spezifisch F-Aktin bzw. G-Aktin binden können, konnte für die Vertreter der ADF-H- und I/LWEQ Module sowie der Gelsolin homologen Domänen sowohl eine Bindung an F-Aktin, als auch an G-Aktin nachgewiesen werden. Insbesondere die Aktin-Bindungsdomäne vom CH Domänen-Typ wird kontrovers diskutiert [Stradal et al., 1998]. Zunächst wurde eine 250 Aminosäuren umfassende Aktin-Bindungsdomäne bestehend aus zwei „Tandem repeats“ in Aktin-vernetzenden Proteinen identifiziert. Sequenzvergleiche mit anderen Proteinen führten zu einer Einengung und Unterteilung dieser 250 Aminosäuren umfassenden Aktin-Bindungsdomäne auf jeweils 100 Aminosäuren, die nun als CH Domänen bezeichnet wurden und charakteristischerweise jeweils autonom eine Bindung der Proteine an F-Aktin vermitteln. CH Domänen konnten mittlerweile in insgesamt 104 Proteinen (z.B. Filamin, α -Actinin) und Signalmolekülen (z.B. Vav, IQGAP) nachgewiesen werden. Viele dieser Proteine besitzen zwei oder vier CH Domänen, wobei nach neuen Erkenntnissen in einigen Proteinen nur die weiter N-terminal angeordnete CH Domäne im isolierten Zustand Aktin bindet, während die weiter C-terminal angeordnete Domäne im isolierten Zustand nur sehr schwach oder überhaupt nicht an Aktin bindet [Stradal et al., 1998]. Eine maximale Bindungsaffinität der Proteine an Aktin wird nur erreicht, wenn beide CH Domänen vorhanden sind. Obwohl beide CH Domänen auf Ebene der Primärstruktur äquivalent sind, haben sie unterschiedliche Aktin-Bindungsaffinitäten. Demnach scheinen noch weitere Faktoren an der Aktin-Bindung beteiligt zu sein, über die eine Regulation dieser Bindung erfolgt und die nicht auf Ebene der Primärstruktur identifiziert werden können.

Die verschiedenen Typen von Aktin-Bindungsgebieten zeichnen sich durch eine hohe Konservierung und Verbreitung über Speziesgrenzen hinaus aus. So konnten beispielsweise

ausgehend von den Hefen über die Vertebraten bis hin zu den Mammalia Vertreter aller drei Proteinfamilien, in denen das ADF-H Modul konserviert ist, identifiziert werden.

4.2 Vergleich zwischen dem I/LWEQ Modul und einem zum I/LWEQ Modul homologen Abschnitt aus der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B auf Ebene der Primär- und putativen Sekundärstruktur

Wie bereits in Abschnitt 3.7 dieser Arbeit aufgezeigt, konnte im N-terminalen Bereich der IP3K B aus *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus* ein Abschnitt identifiziert werden, der Homologien zu einem Aktin-Bindungsmotiv, dem I/LWEQ Modul (auch als „Talin homology domain“ bezeichnet), aufweist [McCann and Craig, 1997]. I/LWEQ Module konnten in 23 Proteinen identifiziert werden. Die I/LWEQ-Protein Superfamilie kann in vier Gruppen aufgeteilt werden: erstens die metazoen Taline, zweitens die Talin Homologen aus *Dictyostelium discoideum*, drittens die metazoen „Huntingtin interacting proteins“ (Hip1) und viertens die in Hefen vorkommenden Proteine vom Typ Sla2p (Synthetic Lethal with ABP1). Bei allen bisher identifizierten Vertretern der I/LWEQ-Proteinfamilie bestehen die I/LWEQ Module aus vier Blöcken (Block 1, 2, 3 und 4) konservierter Aminosäuren und sind im C-terminalen Bereich der Proteine lokalisiert [McCann and Craig, 1999]. Im Gegensatz dazu konnten in der IP3K B nur drei Abschnitte identifiziert werden, die Homologien zu den Blöcken 1, 3 und 4 aufweisen. Diese Abschnitte sind im N-terminalen Bereich der Kinase lokalisiert. Homologien zu Block 2 konnten in beiden Spezies nicht identifiziert werden.

Als Grundlage für einen detaillierten Vergleich des I/LWEQ Moduls mit dem homologen Abschnitt aus der IP3K B wurde die Aminosäuresequenz des murinen Talin 1 (*MmTn1*) herangezogen. In dem murinen Protein Talin umfasst das gesamte I/LWEQ Modul 186 Aminosäuren mit 16 invarianten Resten. Die Blöcke dieses Moduls sind in kurzen Abständen hintereinander angeordnet. Beispielsweise umfasst im murinen Talin der Abstand zwischen Block 1 und 2 19 Aminosäuren, der zu Block 3 10 Aminosäuren und der wiederum zu Block 4 55 Aminosäuren. Die Blöcke sind charakterisiert durch vier putative α -Helices, während die Bereiche zwischen diesen Helices putative Schleifen ausbilden. In der IP3K B hingegen umfasst der gesamte Abschnitt, der Homologien zu diesem Modul aufweist, 468 Aminosäuren und beinhaltet ausschließlich vier der invarianten Reste, die für das I/LWEQ Modul des murinen Talins charakteristisch sind. Auch wurden α -Helices nur für die zu Block 1 und Block 3 homologen Abschnitte der Kinase vorhergesagt. Der zu Block 4 homologe Abschnitt erscheint relativ unstrukturiert (siehe Abbildung 3.3.2.2, Seite 73).

Aufgrund der geringen Analogien in Primär- und putativer Sekundärstruktur zwischen dem Abschnitt aus der IP3K B, der Homologien zu dem I/LWEQ Modul aufweist, und dem I/LWEQ Modul kann von diesem Gesichtspunkt ein charakteristisches I/LWEQ Modul für die IP3K B ausgeschlossen werden, d.h. eine Zugehörigkeit zu einer der Gruppen von I/LWEQ-

Proteinen ist nicht gegeben. Zudem ist es auch sehr unwahrscheinlich, dass die IP3K B eine neue Gruppe der I/LWEQ-Protein Superfamilie darstellt. Dagegen spricht außerdem ein weiterer Unterschied, welcher in der Intron/Exon Struktur festgestellt werden konnte. Während in der humanen IP3K B ein Exon den gesamten I/LWEQ Modul homologen Bereich codiert, wird beispielsweise in dem humanen Protein Hip1 das I/LWEQ Modul von sechs individuellen Exons codiert. Diese Beobachtung spricht gegen einen gemeinsamen Vorläufer und damit auch gegen eine Verwandtschaft der Proteine. So scheint es sich entweder um eine zufällige Ähnlichkeit oder aber um einen Vorgang von konvergenter Evolution zu handeln.

4.3 Vergleich zwischen den *in vivo* Aktin-Bindungseigenschaften von Proteinen aus der I/LWEQ-Proteinfamilie und der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B

Für Vertreter aus jeder Gruppe der I/LWEQ-Protein Superfamilie konnte eine Interaktion mit Aktin über ihr I/LWEQ Modul nachgewiesen werden. Das isolierte, aus allen vier Blöcken bestehende I/LWEQ Modul des murinen Hip1r (Hip1-related protein/Hip12) kolokalisiert als GFP-Fusionsprotein *in vivo* mit F-Aktin [Engqvist-Goldstein et al., 1999]. Auch die isolierten I/LWEQ Module des murinen Talin 1 und des Sla2p aus *Saccharomyces cerevisiae* kolokalisieren als GFP-Fusionsproteine *in vivo* mit F-Aktin Stressfilamenten („stress fibers“) in transfizierten CHO-Zellen [McCann and Craig, 1999]. Zusätzlich konnte *in vitro* für die isolierten I/LWEQ Module von mindestens einem Mitglied aus jeder Gruppe der I/LWEQ-Proteinfamilie eine direkte Bindung an Aktin nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist das Vorhandensein eines I/LWEQ Moduls in einer Aminosäuresequenz ein deutlicher Hinweis für eine direkte Interaktion dieses Proteins mit Aktin.

Obwohl die IP3K B nur sehr schwache Homologien zu einem Aktin-Bindungsmotiv, nämlich zu drei von vier Blöcken des I/LWEQ Moduls, aufweist und wahrscheinlich nicht zur I/LWEQ-Proteinfamilie gehört, könnte die N-terminale Sequenz der IP3K B eine ähnliche Funktionalität wie das I/LWEQ Modul aufweisen und folglich eine Aktin-Bindung vermitteln. Um Hinweise auf die Aktin-Bindungseigenschaften der IP3K B zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit zunächst der Abschnitt aus dem N-terminalen Bereich der Kinase, welcher Homologien zu dem I/LWEQ Modul aufweist, in Lokalisationsstudien untersucht. Die Expression dieses isolierten Sequenzbereichs aus der IP3K B (Fragment 4: As 108-583) als EGFP-Fusionsprotein führte in NRK52E- und PC12 Zellen zu einer Kolokalisation mit F-Aktin (siehe Abschnitt 3.8, Seite 83). Insbesondere an F-Aktin Stressfilamenten konnte diese Kolokalisation deutlich beobachtet werden, jedoch auch im Bereich des Plasmamembran assoziierten kortikalen Aktin-Netzwerks. Für diese spezifische Lokalisation des EGFP-Fusionsproteins muss der 475 Aminosäuren umfassende Sequenzbereich aus dem N-terminalen Bereich der

Kinase verantwortlich sein, da in Kontrollzellen, die mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfiziert wurden, eine homogene Verteilung des EGFPs im zytoplasmatischen und nukleären Bereich der Zellen beobachtet wurde. Die homogene Verteilung des Fluorophors in den Kontrollzellen deckt sich mit der vom Hersteller beschriebenen Verteilung des Fluorophors [Living Colors® User Manual, Clontech, 1999]. Demnach scheint die zum I/LWEQ Modul homologe Sequenz der IP3K B eine ähnliche Funktionalität wie das I/LWEQ Modul in Proteinen der I/LWEQ-Proteinfamilie aufzuweisen, d.h. eine Interaktion der Proteine mit Aktin zu vermitteln. Obwohl isolierte I/LWEQ Module aus repräsentativen Vertretern der I/LWEQ-Proteinfamilie als GFP-Fusionsproteine mit Aktin kolokalisieren, bedeutet dies nicht, dass diese Kolokalisation im gesamten Bereich des Aktin-Zytoskeletts zu beobachten ist. Zusätzlich unterscheidet sich auch die Lokalisation der isolierten Aktin-Bindungsdomäne in einigen Proteinen erheblich von der Lokalisation der endogenen Proteine. So konnte in Transfektionsstudien mit dem isolierten I/LWEQ Modul aus dem Protein Talin eine Kolokalisation des Fusionsproteins an Stressfilamenten im gesamten zellulären Bereich beobachtet werden, während das endogene Protein nur nach Stimulation im Bereich der Plasmamembran assoziierten „Focal Adhesion Plaques“ mit Aktin kolokalisiert [McCann and Craig, 1999; Martel et al., 2001]. Sowohl das isolierte I/LWEQ Modul aus dem Protein Talin als auch das gesamte Protein bewirken eine Bündelung und Aggregation der Stressfilamente [McCann and Craig, 1999; Zang et al., 1996]. Diese Beobachtung spiegelt die Funktion des Proteins und insbesondere auch die des I/LWEQ Moduls wieder. In Bereich der lokal konzentrierten „Focal Adhesions“ bündelt Talin die Enden der Stressfilamente und stellt über Integrine die Verbindung mit der extrazellulären Matrix her. Dabei wird die Assoziation mit der Plasmamembran in diesem Bereich über die PtdIns-4,5-P₂ bindende PH Domäne des Proteins vermittelt und reguliert [Martel et al., 2001]. Im Gegensatz zum Talin führte die Transfektion des zu dem I/LWEQ Modul homologen Sequenzbereichs (Fragment 4) aus der IP3K B nicht zu morphologischen Veränderungen der Stressfilamente (eigene Beobachtungen) und hat demnach offensichtlich nicht die gleiche Funktion wie das I/LWEQ Modul aus dem Protein Talin (siehe Abbildung 4.3.1, Seite 105).

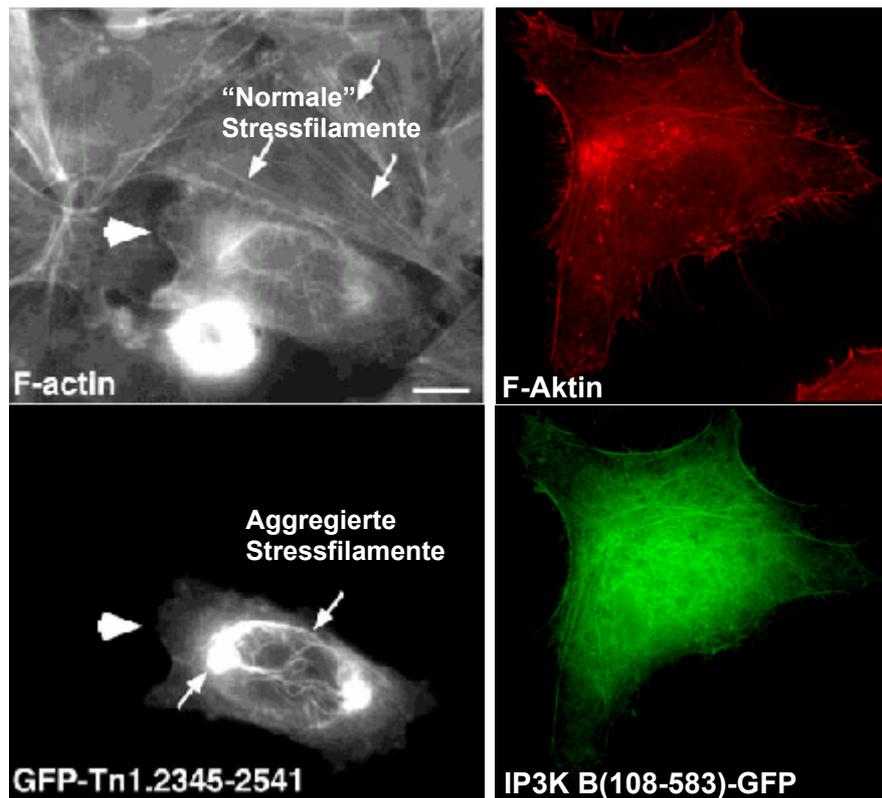


Abbildung 4.3.1 Vergleich zwischen der Lokalisation des isolierten I/LWEQ Moduls aus dem murinen Talin 1 in CHO Zellen und der Lokalisation des isolierten I/LWEQ Moduls homologen Abschnitt aus der IP3K B (*Rattus norvegicus*) in NRK52E Zellen

Die linken Bilder zeigen transfizierte CHO-Zellen, die rechten transfizierte NRK52E Zellen. In den oberen Bildern wurde F-Aktin durch Inkubation mit markiertem Phalloidin nachgewiesen. Das untere linke Bild zeigt die Expression des isolierten I/LWEQ Moduls aus dem murinen Talin 1 als GFP-Fusionsprotein. Das untere rechte Bild zeigt die Expression des isolierten Sequenzabschnitts aus der IP3K B, der Homologien zu dem I/LWEQ Modul aufweist. Die kleinen Pfeile zeigen Stressfilamente, die großen Pfeile deuten auf die transfizierte CHO-Zelle [verändert nach McCann and Craig, 1999].

Das isolierte I/LWEQ Modul aus Hip1R zeigt in Transfektionsstudien eine Kollokalisierung mit Aktin im Bereich von Membrankräuselungen („Membrane ruffles“), während das endogene Hip1R eine punktförmige kortikale und perinukleäre Lokalisation, jedoch keine spezifische Kollokalisierung mit Aktin zeigt. Für dieses Protein konnten Kollokalisierungen mit Clathrin, AP2 und Transferrin nachgewiesen werden, die darauf hindeuten, dass Hip1R ein Bestandteil von Clathrin-umhüllten „pits“ („Clathrin coated pits“) und -Vesikeln ist und demnach eine Rolle bei der Endozytose spielt. Eine mögliche Funktion des Proteins ist, Verbindungen zwischen „coated pits“ und dem Zytoskelett herzustellen und dadurch die Ausknospung von Vesikeln zu erleichtern [Engquist-Goldstein et al., 1999]. Folglich haben viele Proteine der I/LWEQ-Proteinfamilie unterschiedliche zelluläre Funktionen und beinhalten aufgrund dieser verschiedenen Funktionen neben dem I/LWEQ Modul weitere Interaktionsdomänen, die regulativ auf die spezifische Lokalisation der Proteine wirken.

So könnte sich die beobachtete Lokalisation des isolierten zum I/LWEQ Modul homologen Bereichs der IP3K B auch von der Lokalisation des endogenen Proteins deutlich

unterscheiden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen unter Verwendung von IP3K B spezifischen Antikörpern deuten eher auf eine Zielsteuerung des gesamten Proteins an das Membransystem des Endoplasmatischen Retikulums (ER) hin [Soriano et al., 1997]. Dieser Aspekt wird in Abschnitt 4.6.2 eingehend diskutiert.

Das EGFP-Fusionsprotein, das den zum I/LWEQ Modul homologen Abschnitt aus der IP3K B beinhaltet, zeigte in Lokalisationsstudien keine ausschließliche Kolo-kalisation mit F-Aktin (eigene Beobachtungen). Zusätzlich konnte eine diffus-granuläre Verteilung des EGFP-Fusionsproteins im Bereich des Zytoplasmas und möglicherweise auch im Bereich des Zellkerns beobachtet werden. Die zusätzliche Verteilung im zytoplasmatischen Bereich könnte bedingt sein durch die starke Überexpression des EGFP-Fusionskonstruktes, da die Proteinexpression unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors steht. Möglicherweise sind bei dieser Überexpression alle Bindungsstellen am F-Aktin bereits abgesättigt und das überschüssige Fusionsprotein kann dort nicht mehr lokalisieren. Um die Verteilung des Fusionsproteins im Bereich des Nukleus zu erklären, gibt es mehrere Diskussionsansätze. Zum einen könnte das Fusionsprotein nicht im Kern, sondern im Bereich des den Kern umgebenden Zytoplasmas verteilt sein und damit den Eindruck einer Lokalisation im nukleären Bereich vermitteln. Dies ist jedoch nicht wahrscheinlich, da bei der angewandten konfokalen Mikroskopie mittels einer mathematischen Dekonvolution nur das Fluoreszenzlicht aus einer definierten Ebene für die Aufnahme eines Bildes verwendet wurde. Die Fluoreszenzstrahlung aus den darüber und darunter liegenden Ebenen wurde mittels mathematischer Dekonvolution unter Anwendung des „point-spread“ Algorithmus herausgefiltert (siehe auch Abschnitt 2.2.3.5, Seite 54).

Zweitens könnte von der IP3K B der Fluorophor (EGFP) abgespalten werden und dieser aufgrund seiner geringen Molekulargewichtesgröße von ~27kDa passiv in den Kern diffundieren. Das EGFP-IP3K-Fusionsprotein hingegen kann nicht passiv in den Kern diffundieren, da es mit einer kalkulierten Molekulargewichtesgröße von ~78kDa deutlich über der Ausschlussgrenze für passive Diffusion (>40kDa) liegt [Cole und Hammell, 1998]. Inwieweit das EGFP von der IP3K B abgespalten wird und dadurch das Fusionsprotein in den transfizierten Zellen degradiert vorliegt, könnte durch Western Blotting unter Verwendung eines EGFP-Antikörpers untersucht werden.

Für einen aktiven Transport in den Kern müsste in der Aminosäuresequenz des Fusionsproteins ein Kernlokalisierungssignal („nuclear localization signal“ (NLS)) vorhanden sein. Ein NLS vermittelt den aktiven Transport von Proteinen und Makromolekülen über den Kernporenkomplex in den Zellkern. Für NLS gibt es kein striktes Sequenzmotiv („consensus“), meistens beinhalten diese Motive einen hohen Anteil der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Sie können dennoch in drei Klassen unterteilt werden [Hicks und Raikhel, 1995].

Klasse	NLS	Protein (Beispiel)
bipartite NLS	<u>RKRKESNRESARRSRYRK</u>	Transkriptionsfaktors Opaque-2
SV40-like NLS	MSE <u>RKRREKL</u>	Transkriptionsfaktors R
Mat α 2-like NLS	MISEAL <u>RKAIGKR</u>	Transkriptionsfaktors R

Die für NLS charakteristischen basischen Aminosäuren sind in der vorangegangenen Tabelle unterstrichen.

Durch Datenbankrecherchen unter Verwendung der PROSITE Datenbank konnte im katalytischen Bereich der IP3K B-Aminosäuresequenz ein Abschnitt identifiziert werden, der dem Konsensus eines bipartiten NLS (As 805 KKEDGSVNRDFKTKTRE 822) gehorcht. Da dieses putative NLS nicht in dem N-terminalen Aminosäuresequenzabschnitt liegt, der Homologien zu dem I/LWEQ Modul aufweist und nicht für die Generierung des EGFP-Fusionsproteins verwendet wurde, kann auch kein aktiver Transport des Fusionsproteins, vermittelt durch dieses putative NLS, über den Kernporenkomplex stattfinden.

Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzliche, bisher unidentifizierte atypische NLS in der Fragment 4 umfassenden Aminosäuresequenz der IP3K B enthalten sind, welche für die nukleäre Verteilung des EGFP-Fusionskonstrukts in den transfizierten Zellen verantwortlich sind.

Wie bereits in den Abschnitten 3.8 und 4.1 angeführt kolokalisiert das isolierte I/LWEQ Modul aus verschiedenen Proteinen als GFP-Fusionsprotein mit F-Aktin. Diese Untersuchungen wurden ausschließlich an Proteinen mit einem charakteristischem I/LWEQ Modul, bestehend aus vier Blöcken konservierter Aminosäuren, durchgeführt. Dem gegenüber stehen die durchgeführten eigenen Untersuchungen, in denen auch der zu dem I/LWEQ Modul schwache Homologien aufweisende Abschnitt aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B (bestehend aus den Blöcken 1, 3 und 4) als EGFP-Fusionsprotein mit F-Aktin kolokalisiert. Diesem I/LWEQ Modul homologen Abschnitt aus der IP3K B fehlt der zu Block 2 Homologien aufweisende Abschnitt. Bisher gibt es in der Literatur keine Hinweise darauf, dass an der Interaktion des I/LWEQ Moduls mit F-Aktin einer der vier Blöcke nicht beteiligt ist. Untersuchungen an Punktmutanten der Proteine Talin und Sla2p, in denen ein konserviertes Arginin in Block 4 des Moduls durch Glycin ausgetauscht wurde, deuten auf eine essentielle Bedeutung des Blocks 4 für die Interaktion mit Aktin hin [McCann und Craig, 1997, 1999]. So konnte in diesen Untersuchungen für die mutierten I/LWEQ Module weder eine Kolokalisation als GFP-Fusionsproteine mit F-Aktin noch eine direkte Bindung als GST-Fusionsproteine an F-Aktin mehr festgestellt werden [McCann and Craig, 1999]. Das konservierte Arginin konnte auch in dem zu Block 4 des I/LWEQ Moduls homologen Abschnitt der IP3K B an Position 584 identifiziert werden. Es wurde jedoch nicht in dem Fragment 4 umfassenden Sequenzbereich der IP3K B (As 108-583) mit einbezogen. Dennoch

konnte für dieses Fragment als EGFP-Fusionsprotein eine Kolo­kalisierung mit F-Aktin nachgewiesen werden. Damit stehen die eigenen Beobachtungen im Gegensatz zu denen von McCann und Craig beschriebenen, in denen diesem konservierten Arginin und demzufolge Block 4 eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit F-Aktin zugeschrieben wird. Diese Untersuchungen deuten auch darauf hin, dass die Homologien des N-terminalen Bereichs der IP3K B zu den I/LWEQ Modulen der I/LWEQ-Proteine eher zufälliger Natur sind und nicht auf einem gemeinsamen Vorläufer beruhen.

Hierfür sprechen auch die Ergebnisse weiterer eigener Experimente, in denen im N-terminalen Bereich der IP3K B durch Verkürzung des exprimierten Polypeptids ein für die Kolo­kalisierung mit F-Aktin essentieller Sequenzbereich identifiziert werden konnte. Dieser Sequenzbereich beinhaltet weder die zu Block 3 noch die zu Block 4 des I/LWEQ Moduls homologen Bereiche der Kinase. Der als Fragment 1 (As 108-170) bezeichnete Sequenzabschnitt umfasst 63 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs und beinhaltet auch den zu Block 1 des I/LWEQ Moduls homologen Abschnitt (As 117-141) der IP3K B. Anhand von Lokalisationsstudien an NRK52E- und PC12 Zellen konnte zunächst in lebenden Zellen eine Lokalisation des Fragmentes 1 (As 108-170) als EGFP-Fusionsprotein an filamentartigen Strukturen beobachtet werden. Diese Strukturen konnten durch Inkubation mit TRITC markiertem Phalloidin als F-Aktin identifiziert werden. In den transfizierten Zellen konnte insbesondere eine Kolo­kalisierung des EGFP-Fusionsproteins mit Aktin an Stressfilamenten und am kortikalen Aktin-Netzwerk beobachtet werden. Auch im Bereich von Mikrospi­kes konnte eine Lokalisation des Fusionsproteins beobachtet werden. Diese Lokalisation ist durch Pfeile in Abbildung 4.3.2 auf der folgenden Seite markiert. Die Ausbildung von Stressfilamenten konnte in eigenen Experimenten auch in untransfizierten Zellen beobachtet werden und kann demnach wahrscheinlich nicht auf die Expression des EGFP-Fusionsproteins zurückgeführt werden. Möglicherweise führen jedoch die Überexpression des Fusionsproteins oder die eingesetzten Transfektionsreagenzien doch zu einer verstärkten Formierung der Stressfilamente, in deren Bereich das Fusionsprotein mit Aktin kolo­kalisiert. Da jedoch auch in anderen Bereichen des zellulären Zytoskeletts, wie dem kortikalen Aktin-Netzwerk sowie den Mikrospi­kes, eine Kolo­kalisierung mit Aktin nachgewiesen werden konnte, scheint diese Interaktion auch unter physiologischen Bedingungen relevant zu sein.

Des Weiteren konnte eine diffuse Verteilung des EGFP-Fusionsproteins im nukleären Bereich beobachtet werden (siehe umkreiste Bereiche in Abbildung 4.3.2, Seite 109). Eine mögliche nukleäre Verteilung konnte, wie bereits beschrieben, auch bei der Expression des Fragmentes 4 als EGFP-Fusionsprotein beobachtet werden. Diese Verteilung wird möglicherweise durch die starke Überexpression des Fusionsproteins und der daraus resultierenden Übersättigung der Bindungsstellen an F-Aktin hervorgerufen. Im Gegensatz zu der Molekulargewichtsgröße des EGFP-Fusionsproteins 4 (gesamter zum I/LWEQ Modul

homologer Bereich) liegt die Molekulargewichtsgröße des EGFP-Fusionsproteins 1 mit ~34kDa noch unter der Ausschlussgröße für passive Diffusion in den Kern.

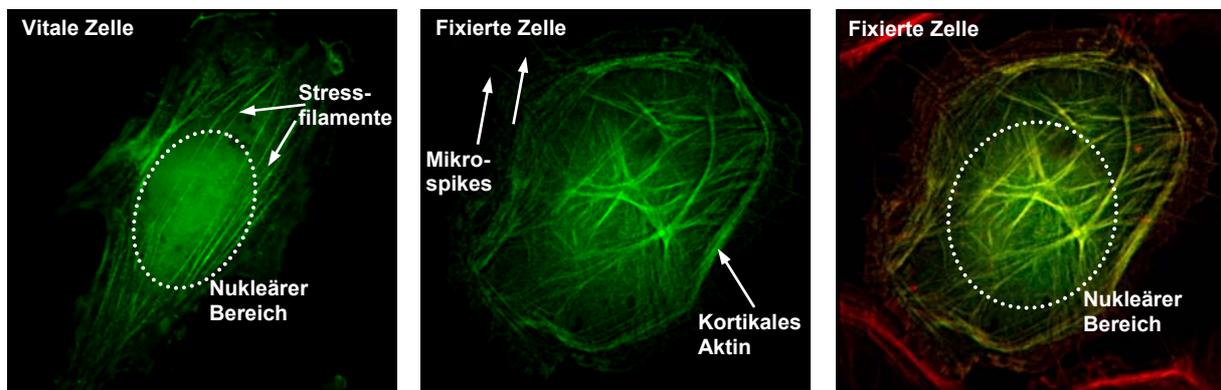


Abbildung 4.3.2 Lokalisation des Fragmentes 1 (As 108-170) als EGFP-Fusionsprotein in NRK52E Zellen

Die linke Zelle wurde nach Expression des Fusionsproteins mit PBS gewaschen und lebend mikroskopiert. Die mittlere und links abgebildete Zelle wurde mit Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit TRITC-Phalloidin inkubiert. Das mittlere Bild zeigt die Lokalisation des Fusionsproteins, während das rechte Kompositbild die Kolokalisation mit F-Aktin zeigt.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits eine Kolokalisation des Fragmentes 4 (umfasst Block 1, 3 und 4 des I/LWEQ Modul homologen Abschnitts) als EGFP-Fusionsprotein mit F-Aktin beobachtet werden. Da allerdings durch weitere Lokalisationsstudien bereits für die ersten 63 Aminosäuren (beinhaltet nur Block 1 des I/LWEQ Modul homologen Abschnitts) des Fragmentes 4 als EGFP-Fusionsprotein eine Kolokalisation mit Aktin beobachtet werden konnte, scheinen diese Aminosäuren der IP3K B schon die Interaktion mit Aktin zu vermitteln.

In weiteren Lokalisationsstudien wurden zwei Fragmente aus dem N-terminalen Bereich der IP3K B in transienten Transfektionsexperimenten untersucht, die ebenfalls Homologien zu dem I/LWEQ Modul aufweisen. Die Fragmente 2 (As 170-430) und 3 (As 561-620) beinhalten jeweils Block 3 bzw. Block 4 des I/LWEQ Modul homologen Abschnitts der Kinase, jedoch nicht den Abschnitt (Fragment 1) der autonom mit Aktin kolokalisiert. Zusätzlich beinhalten beide Fragmente mehrere PXXP Motive, die wiederum den minimalen „core“ für die Bindung von SH3 Domänen anderer Proteine darstellen [Kami et al., 2002]. Die Expression beider Fragmente als EGFP-Fusionsproteine ergab eine zytosolische und nukleäre Verteilung der Fusionsproteine. Diese ist übereinstimmend mit der Verteilung des EGFPs in Kontrollzellen, obwohl das Fusionsprotein 2 aufgrund seines berechneten Molekulargewichts von 55kDa nicht passiv in den Kern diffundieren kann. Eine Kolokalisation mit F-Aktin oder eine andere spezifische Lokalisation der Fusionsproteine konnten nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung muss jedoch nicht bedeuten, dass die zu den Blöcken 3 und 4 homologen Abschnitte aus der IP3K B keine entscheidende Rolle bei der Bindung des gesamten zum

I/LWEQ Modul homologen Bereichs an Aktin spielen. Möglicherweise sind ihre Bindungsaffinitäten zu F-Aktin in dieser isolierten Form zu gering, um als EGFP-Fusionsproteine eine direkt sichtbare Kolokalisation mit F-Aktin hervorzurufen. Außerdem könnten diese Fusionsproteine auch mit zytoplasmatischen Proteinen interagieren, wodurch keine spezifische Lokalisation hervorgerufen wird.

Festzuhalten bleibt, dass die Fusionsproteine nicht mit Aktin kolokalisieren und auch keine prägnanten intrazellulären Lokalisationen zeigen, die Rückschlüsse auf spezifische Interaktionspartner erlauben.

Der mit F-Aktin kolokalisierende Aminosäuresequenzabschnitt der IP3K B könnte eine neuartige Aktin-Bindungsdomäne darstellen, die eine Zielsteuerung und Lokalisation der IP3K B an Aktin vermittelt. Wie bereits einleitend beschrieben führten Untersuchungen an der hauptsächlich neuronal exprimierten Isoform A zur Identifikation einer 66 Aminosäuren umfassenden Aktin-Bindungsdomäne in dieser IP3K Isoform [Schell et al., 2001]. In der Isoform A konnte sowohl nach Expression der isolierten Aktin-Bindungsdomäne als GFP-Fusionsprotein, als auch nach Expression der gesamten Kinase als GFP-Fusionsprotein eine Kolokalisation mit F-Aktin beobachtet werden. Demnach erfolgt eine Zielsteuerung des gesamten Enzyms an Aktin über diese Domäne. Im Gegensatz zu der in eigenen Experimenten identifizierten, putativen Aktin-Bindungsdomäne der Isoform B, umfasst die Aktin-Bindungsdomäne der Isoform A die äußeren 66 N-terminalen Aminosäuren und weist keinerlei Homologien zu Block 1 des I/LWEQ Moduls auf.

4.4 *In vitro* Aktin-Bindungseigenschaften der putativen Aktin-Bindungsdomäne aus der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B

Proteine können entweder direkt oder indirekt über Aktin-bindende Proteine mit Aktin assoziiert sein (siehe Abschnitt 1.4.3, Seite 29) [Hitt und Luna, 1994]. Folglich kann aus einer Kolokalisation eines Proteins mit Aktin nicht eine direkte Bindung an Aktin abgeleitet werden. Außerdem kann anhand von Lokalisationsstudien auch nicht definitiv geklärt werden, ob ein Protein spezifisch nur F-Aktin oder auch G-Aktin bindet. Aus diesem Grund wurde der Sequenzabschnitt aus der IP3K B, für den als EGFP-Fusionsprotein eine Kolokalisation mit Aktin beobachtet werden konnte, bakteriell exprimiert, um anschließend *in vitro* einen Aktin-Bindungstest durchführen zu können. Durch diesen Bindungstest konnte ausschließlich eine direkte Bindung des exprimierten GST-IP3K B(As108-170)-Fusionsproteins an F-Aktin nachgewiesen werden. Die Aktin-Bindung des GST-Fusionsproteins wird eindeutig nur über das exprimierte Fragment der IP3K B vermittelt, da bei Kontrollen mit der parallel exprimiertem GST allein keine Aktin-Bindung festgestellt werden konnte. Demzufolge handelt es sich bei dem 63 Aminosäuren umfassenden Sequenzabschnitt der IP3K B um eine Aktin-Bindungsdomäne, die spezifisch und direkt mit F-Aktin interagiert. Für die Aktin-Bindung konnten

dabei Dissoziationskonstanten (K_d) von $6,7\mu\text{M}$ (hyperbolisches Fitting der Daten) bzw. von $9,9\mu\text{M}$ (sigmoides Fitting der Daten) ermittelt werden. Der sigmoide Verlauf der Aktin-Bindungskurve deutet auf eine kooperative Bindung des Fusionsproteins an F-Aktin hin. Die kooperative Bindung könnte durch eine Dimerisierung des Fusionsproteins ausgelöst werden, da die endogene GST Dimere ausbildet [Walker et al., 1993; McTigue et al., 1995]. Möglicherweise befinden sich jedoch auch am F-Aktin zwei Bindungsstellen für das Fusionsprotein, die eine kooperative Bindung der Fusionsproteine ermöglichen.

Für die von Irvine und Mitarbeitern identifizierte IP3K Isoform A konnte ebenfalls eine direkte Bindung der bakteriell exprimierten Aktin-Bindungsdomäne (As 1-66) als Fusionsprotein in Kosedimentationsexperimenten an F-Aktin nachgewiesen werden. Nach diesen Untersuchungen ergibt sich bei dieser Isoform eine Dissoziationskonstante (K_d) von $2,6\mu\text{M}$ für die Bindung an F-Aktin. Die Dissoziationskonstante der Isoform A liegt damit im gleichen, geringen mikromolaren Bereich wie die der Isoform B [Schell et al., 2001]. Die ermittelten Dissoziationskonstanten beider Isoformen sprechen nicht für eine hoch affine Bindung der exprimierten Fusionsproteine an Aktin. Sie sind jedoch sehr typisch für viele Aktin-bindende Proteine, sowie generell für Interaktionen mit dem Zytoskelett und beruhen in den meisten Fällen auf den hohen Dissoziationsraten von ca. $1-10\text{s}^{-1}$, mit denen die Bindungen erfolgen. In hohen Dissoziationsraten und hohen Dissoziationskonstanten äußert sich die Labilität und Dynamik, die für eine kontinuierliche Reorganisation des Mikrofilament-Systems notwendig ist. [Pollard, 1993].

Die Aktin-Bindungsdomäne der IP3K B beinhaltet auch den Abschnitt, der Homologien zum Block 1 des I/LWEQ Moduls aufweist, jedoch nicht die Abschnitte, die Homologien zu den Blöcken 3 und 4 aufweisen. Obwohl nach eigenen Untersuchungen für eine Interaktion mit F-Aktin 63 Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich ausreichen, bedeutet dies nicht, dass die Blöcke 3 und 4 mit Homologien zum I/LWEQ Modul keine Rolle bei der Aktin-Bindung spielen. Eine Beteiligung der Blöcke 3 und 4 an der Bindung könnte die Affinität der IP3K B zu Aktin erhöhen.

Aus den durchgeführten Aktin-Bindungsuntersuchungen kann die Natur der F-Aktin Bindung nicht abgeleitet werden. Viele Aktin-bindende Proteine führen zu einer Vernetzung, Umarmung, Bündelung oder Versteifung der Aktin-Filamente. Ob die IP3K B solche Eigenschaften besitzt, kann aus den durchgeführten Messungen jedoch nicht abgeleitet werden. Diese Fragestellung könnte durch elektronenmikroskopische Experimente geklärt werden.

4.5 Eine putative, neuartige Aktin-Bindungsdomäne in der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B

Anhand von weiteren Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Aminosäuren, die zwischen Block 1 des I/LWEQ Moduls und der IP3K B konserviert sind,

offensichtlich nicht die Funktion der isolierten Aktin-Bindungsdomäne beeinflusst. Zusätzlich scheint für die Ausbildung der Aktin-Bindungsdomäne nicht der Abschnitt, der Homologien zu Block 1 des I/LWEQ Moduls aufweist, auszureichen. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Aktin-Bindungsdomäne der IP3K B einen neuen Aktin-Bindungsdomänen-Typ darstellt, dessen Ähnlichkeiten zu Aktin-Bindungsdomänen aus Proteinen der I/LWEQ-Proteinfamilie offensichtlich zufällig sind. Abbildung 4.5.1 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der durchgeführten Transfektionsstudien, die zu dieser Schlussfolgerung führten.

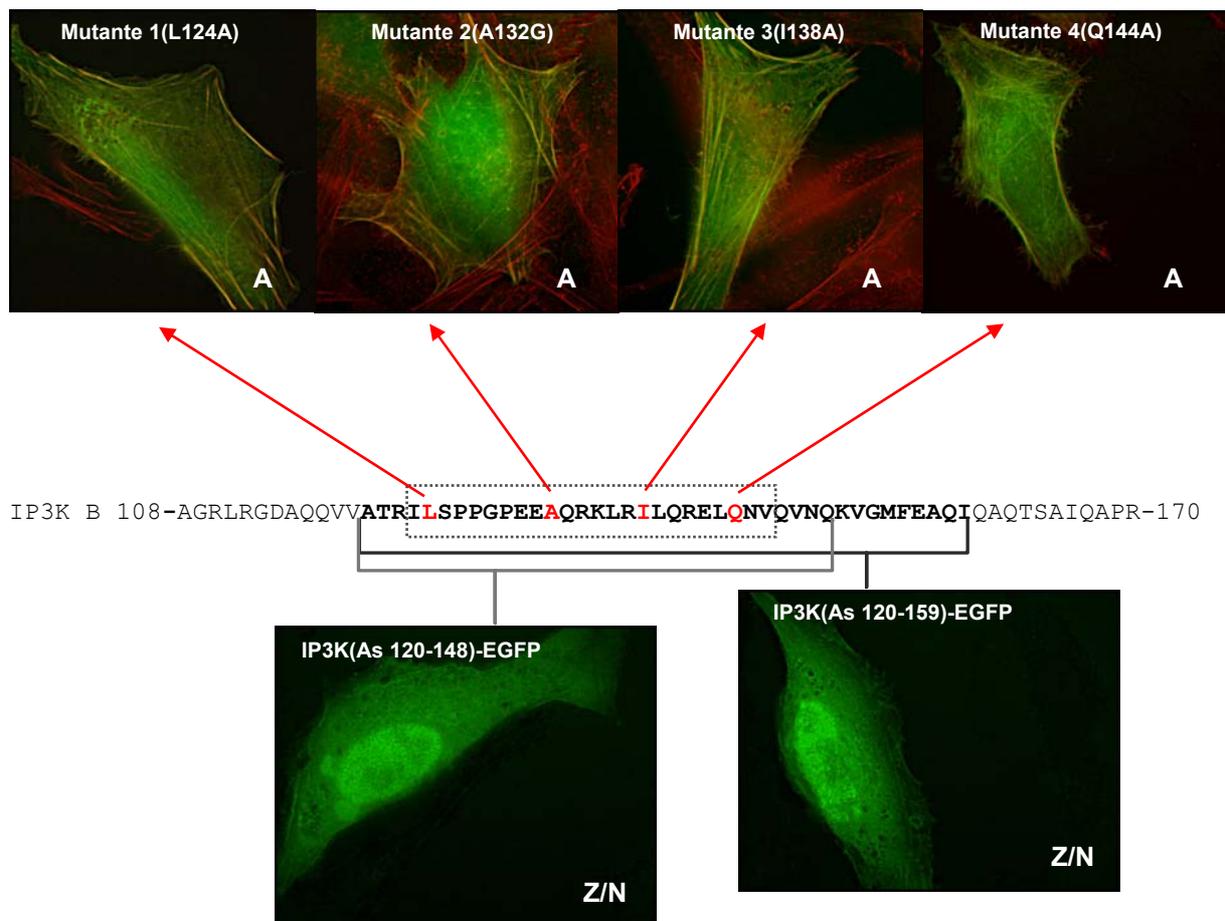


Abbildung 4.5.1 Lokalisation der veränderten Aktin-Bindungsdomäne als EGFP-Fusionsprotein in NRK52E Zellen

Die dargestellte Aminosäuresequenz zeigt die putative Aktin-Bindungsdomäne der IP3K B. Die stärker hervorgehobenen Aminosäuren zeigen den Abschnitt, der Homologien zu dem I/LWEQ Modul aufweist, wobei der zu Block 1 des I/LWEQ Moduls homologe Bereich umrahmt ist. Mutierte Aminosäuren sind hervorgehoben. Die Lokalisation der mutierten Aktin-Bindungsdomäne ist in der oberen Bilderserie gezeigt, während die Lokalisation der verkürzten Aktin-Bindungsdomäne in den unteren Bildern gezeigt wird. Dabei geben die Klammern an, welche Bereiche der Aktin-Bindungsdomäne in den Lokalisationsstudien auf ihre Kolokalisation mit F-Aktin untersucht wurden. (A = Kolokalisation mit Aktin, Z/N = Lokalisation im zytoplasmatischen und nukleären Bereich)

4.6 Lokalisation der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen in Säugern

4.6.1 Vergleich zwischen der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B im Bereich der putativen Aktin-Bindungsdomäne mit den Isoformen A und C

Während die IP3K Isoform A über ihre N-terminale Aktin-Bindungsdomäne direkt mit F-Aktin interagiert und in dendritischen Dornen neuronaler Zellen mit Aktin kolokalisiert, ergaben Lokalisationsstudien an der Isoform C eine zytosolische Verteilung der exprimierten Kinase in transient transfizierten NRK52E Zellen [Schell et al., 2001; Nalaskowski, persönliche Mitteilung]. Die Ergebnisse der Lokalisationstudien wurden unter der Verwendung der vollständigen Aminosäuresequenzen und verkürzter Aminosäureabschnitte der Kinasen erzielt.

Die identifizierte Aktin-Bindungsdomäne in der IP3K B zeigt auf Ebene der Primärstruktur Ähnlichkeiten (~23% identisch bei Einführung mehrerer, größerer Lücken) zu der von Irvine und Mitarbeitern beschriebene Aktin-Bindungsdomäne der Isoform A [Schell et al., 2001]. Charakteristisch für die Aktin-Bindungsdomäne in der Isoform A ist ein prolinreicher Abschnitt, bestehend aus insgesamt 6 Prolinen, gefolgt von einer putativen α -Helix. Die Aktin-Bindungsdomäne der Isoform B beinhaltet insgesamt nur vier Proline, wobei drei dieser Proline auch N-terminal von einer putativen α -Helix liegen. Auffallend ist, dass die Ähnlichkeiten zwischen beiden Aktin-Bindungsdomänen hauptsächlich im zentralen Bereich der Domänen auftreten. Die in der folgenden Abbildung umrahmte Sequenz könnte ein mono- oder bipartites „Core Motiv“ darstellen, wobei die Isoform A im „Core Motiv“ den Aminosäureeinschub SVGE enthalten würde. Das putative „Core Motiv“ kann für die Interaktion der IP3K B Aktin-Bindungsdomäne mit Aktin aber nicht allein verantwortlich sein, da ein Fusionsprotein, das nicht die ganze Aminosäuresequenz, jedoch das „Core Motiv“ der Domäne beinhaltet, nicht mehr mit Aktin kolokalisiert (eigenen Beobachtungen).

Im Gegensatz zu der Isoform A zeigt die Isoform C auf Ebene der Primärstruktur kaum Ähnlichkeiten zu der Isoform B in deren Aktin-Bindungsdomänenbereich. Zusätzlich konnten auf Ebene der putativen Sekundärstruktur keine Ähnlichkeiten zwischen der Isoform C und B festgestellt werden.

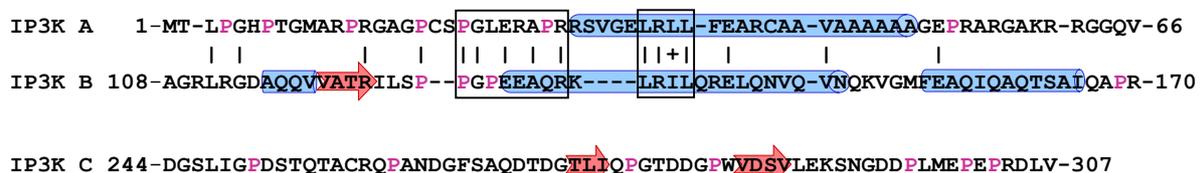


Abbildung 4.6.1.1 Vergleich von Aminosäuresequenz und putativer Sekundärstruktur der IP3K-Isoformen im Bereich der IP3K A und B Aktin-Bindungsdomänen (*Rattus norvegicus*)

Die obere Spalte zeigt die Aminosäuresequenz der Isoform A, die mittlere die der Isoform B und darunter die der Isoform C. Das mögliche „Core Motiv“ zwischen den Aminosäuresequenzen der Isoformen A und B ist umrahmt. Die Pfeile stellen putative β -Stränge dar, die putativen Helices sind als blaue Zylinder dargestellt. Proline sind in der Aminosäuresequenz farblich hervorgehoben.

In der Isoform A erfolgt über die Aktin-Bindungsdomäne der Kinase eine Zielsteuerung des gesamten Proteins an F-Aktin. Ob die identifizierte Aktin-Bindungsdomäne der Isoform B auch eine Zielsteuerung des gesamten Proteins an das Aktin-Zytoskelett vermittelt, konnte bisher nicht geklärt werden. Fusionsproteine, in denen die gesamte Aminosäuresequenz dieser Isoform N- oder C-terminal mit EGFP fusioniert wurde, konnten in transfizierten Zellen nicht nachweisbar exprimiert werden. Für diese Beobachtung gibt es mehrere Erklärungsansätze. Zum einen könnte der IP3K-EGFP-Fusionsvektor von den Zellen nicht aufgenommen werden. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da mittels Transfektion Plasmide bis zu einer Größe von ~20kb in Zellen eingebracht werden können und die Größe des IP3K-EGFP-Fusionsplasmids nur 7,5kb beträgt [Hanahan, 1983]. Zum anderen könnte das Fusionsprotein in den Zellen durch Proteolyse in kurzer Zeit abgebaut werden, so dass bereits 24h nach der Transfektion keine sichtbare Expression mehr beobachtet wird. Würde das Fusionsprotein degradiert, müssten aber proteolytische Abbauprodukte in den Proteasomen der transfizierten Zellen sichtbar sein, dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die endogene IP3K B wird in Zellen nur sehr gering exprimiert und ist in Zelllysaten nur nach Anreicherung über z.B. Calmodulin-Affinitätschromatographie nachweisbar. [Soriano et al., 1997; Fanick, persönliche Mitteilung]. Möglicherweise wirkt die Überexpression der gesamten IP3K B zytotoxisch, so dass Zellen, die das Fusionsprotein exprimieren, sofort absterben. Da die Überexpression verschiedener IP3K B-Fragmente, die nicht die N-terminalen 107 Aminosäuren beinhalten, in Zellen gelang, verursachen vermutlich diese Aminosäuren die Toxizität. Zur weiteren Untersuchung könnten Fusionskonstrukte generiert und untersucht werden, die ausschließlich diese N-terminalen 107 Aminosäuren des Proteins beinhalten. Darüber hinaus könnte auch erst das zweite, auf das weiter 5'-wärts liegende ATG-Codon folgende ATG-Codon das eigentliche Start-Codon darstellen. Demzufolge wäre die von uns exprimierte Vollängenform der IP3K B unphysiologisch lang gewesen. Möglicherweise führt sowohl ein falsches Start-Codon als auch die extrem hydrophobe N-terminale Sequenz zu einer zytotoxischen Wirkung des exprimierten Polypeptids.

4.6.2 Lokalisation der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B in Säugern

Die intrazelluläre Lokalisation der IP3K B aus *Rattus norvegicus* wurde bereits 1997 von Banting und Mitarbeitern untersucht [Soriano et al., 1997]. Lokalisationsstudien in denen COS-7- und HeLa Zellen mit einem IP3K B(As 276-934)-Fusionskonstrukt transient transfiziert wurden, ergaben eine juxt nukleäre Lokalisation der Fusionsproteine. Das in diesen Experimenten verwendete Fusionskonstrukt beinhaltet jedoch nicht den Sequenzbereich, der nach eigenen Erkenntnissen die Aktin-Bindungsdomäne (As 108-170) ausbildet. Zum Zeitpunkt der durchgeführten Untersuchungen war die Aminosäuresequenz noch nicht

vollständig bekannt. Das Fehlen der N-terminalen 275 Aminosäuren und damit auch der Aktin-Bindungsdomäne scheint ursächlich für die gegenteiligen Ergebnisse der Lokalisationsstudien zu sein. Damit sprechen diese Untersuchungen weder für noch gegen eine Zielsteuerung des gesamten Proteins an Aktin.

In weiteren Untersuchungen wurde jedoch die Expression der IP3K B unter Verwendung eines Peptid-Antikörpers untersucht, der gegen ein Peptidmotiv (276-MERGSPASPRC-286) aus dem N-terminalen Bereich der Kinase gerichtet ist. Dieser Antikörper erkennt laut Soriano et al. [1997] spezifisch die Isoform B der IP3K und reagiert nicht mit der Isoform A. Eine Kreuzreaktion mit der Isoform C kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da dieses Sequenzmotiv in der IP3K C nicht auftaucht. Mit diesem Antikörper konnte die Expression der endogenen IP3K B in der ER-reichen Membranfraktion aufgearbeiteter Rattenlebern nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte die endogene IP3K B eine vorherrschende juxtanukleäre Lokalisation in NRK Zellen, die auf eine Assoziation mit Membranen in diesem Bereich hindeutet. Auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte eine Lokalisation an unterschiedlichen Membranen wie z.B. der nukleären und der des ER beobachtet werden. Da andere Autoren die Aktivität der IP3K B hauptsächlich im Zytosol nachweisen konnten, postulierten Banting und Mitarbeiter eine duale Lokalisation der IP3K B [Krijnse Locker et al., 1994; Soriano et al., 1997]. Um diese Vermutung zu bestätigen, transfizierten die Autoren Zellen mit einem IP3K-Fusionskonstrukt. Nach Aufarbeitung und Fraktionierung der Zellen konnte die Expression des Fusionskonstrukts sowohl in der membranreichen Fraktion, als auch in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden. Da nach Behandlung der Zellen mit 4M Harnstoff das Fusionskonstrukt nur noch in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden konnte, postulieren die Autoren, dass die Membran-Assoziation abhängig ist von einer konformationsspezifischen Protein-Protein Wechselwirkung [Soriano et al., 1997]. Nach diesen Untersuchungen lokalisiert die IP3K B im Zytosol und an ER-Membranen der Zelle. Dabei scheinen die Hinweise auf eine zytosolische Lokalisation nicht sehr deutlich, da bei einer Überexpression, wie sie auch von den Autoren durchgeführt wurde, viel überschüssiges Fusionsprotein entsteht, dass bei Übersättigung der physiologischen Bindungsstellen wahrscheinlich im Zytosol akkumuliert. Eine Akkumulation von überschüssigem Fusionsprotein im Zytosol aufgrund einer Übersättigung der nativen Bindungsstellen konnte auch bei der Expression der IP3K B Aktin-Bindungsdomäne beobachtet werden (eigene Beobachtungen). Zusätzlich könnte auch bei der Aufarbeitung und Fraktionierung membrangebundenes Fusionsprotein abgelöst werden und in die zytosolische Fraktion gelangen.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser Untersuchungen jedoch gegen eine Zielsteuerung des gesamten Proteins an Aktin. Sie deuten darauf hin, dass es neben der Aktin-Bindungsdomäne in der IP3K B noch einen weiteren Sequenzabschnitt gibt, der entweder direkt oder indirekt die Lokalisation am ER vermittelt. Diese zweite „Targeting-Domäne“

muss sich C-terminal von der Aktin-Bindungsdomäne befinden, da in von Banting und Mitarbeitern transfizierten Zellen bereits eine juxt nukleäre Lokalisation zeigen. Diese deckt sich mit der von Proteinen, die an Membranen des ER lokalisiert sind [Soriano et al., 1997]. Möglicherweise wird in untransfizierten Zellen von dem verwendeten IP3K B spezifischen Antikörper ein anderes ER-assoziiertes Protein erkannt und in transfizierten Zellen das Fusionsprotein, da es dort stark abundant ist.

4.7 Spezifische Funktion der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B in Säugern

Die Funktion der IP3K ist die Umsetzung des, als Antwort auf einen extrazellulären Stimulus, an der Plasmamembran gebildeten Botenstoffs InsP_3 (Inositol 1,4,5-trisphosphat). InsP_3 bewirkt durch seine Bindung an InsP_3 -Rezeptoren die Aktivierung der Rezeptoren und eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern des ER. Als Produkt der Metabolisierung des InsP_3 durch die IP3K wird InsP_4 gebildet. Sowohl InsP_3 als auch InsP_4 stellen wichtige Botenstoffe dar und werden von der gleichen 5-Phosphatase abgebaut. Diese Phosphatase hat zwar eine höhere Affinität zu InsP_4 , metabolisiert es jedoch langsamer als InsP_3 . Aus diesem Grund ist die Phosphatase bei einem zweiten Stimulus, der zu einer Bildung von InsP_3 führt, gehemmt und kann das InsP_3 -Signal nicht schnell abbauen [Hermosura et al. 2000]. Als Folge dieser Inhibition wird InsP_3 vor der Hydrolyse durch die 5-Phosphatase geschützt und seine Effektivität als Ca^{2+} -mobilisierender Botenstoff erhöht. Möglicherweise beeinflusst InsP_4 auch die zytosolische Calciumkonzentration direkt, indem es in unterschiedlichen Zelllinien aktivierend auf die Öffnung von Calciumkanälen in der Plasmamembran wirkt [Luckhoff et al., 1992; Tsubokawa et al., 1996; Szinyei et al., 1999]. Zudem steuern beide Botenstoffe den Einstrom des Calciums aus dem extrazellulären Raum, indem die Absenkung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in den ER-Speichern, als Folge der Aktivierung des InsP_3 -Rezeptors, zu einer Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms über Kanäle in der Plasmamembran (SOC= store operated calcium channel) führt. Indem die IP3K InsP_3 abbaut, stellt die Kinase selbst einen zentralen Regulator der zytosolischen Calciumkonzentration dar. Die Ca^{2+} -regulierende Rolle der IP3-Kinasen spiegelt sich auch in der hohen Regulierbarkeit der Isoform A und B durch Calcium wieder, wobei insbesondere auf die Isoform B die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin und die Phosphorylierung durch CaMK II stark aktivierend wirkt [Communi et al., 1997; 1999]. Die Isoform C hingegen ist durch Calcium nur schwach regulierbar [Dewaste et al., 2001].

Auch eine Zielsteuerung der IP3K B an bestimmte zelluläre Komponenten könnte regulativ wirken, wenn über diese Zielsteuerung z.B. die Nähe zum Substrat hergestellt wird. Da in der Isoform B eine Aktin-Bindungsdomäne identifiziert werden konnte, könnte bei einer Zielsteuerung des gesamten Proteins an Aktin die daraus resultierende Lokalisation regulativ

wirken. Möglicherweise erfolgt eine Zielsteuerung der endogene IP3K B an das kortikale Aktin-Netzwerk sowie an Stressfilamente, da in transfizierten Zellen eine ausgeprägte Kolo-kalisation der Fusionsproteine mit dem kortikalen Aktin-Netzwerk und Stressfilamenten beobachtet werden konnte (eigene Beobachtungen). Typisch für das kortikale Aktin-Netzwerk ist seine enge Anbindung an die Plasmamembran. Auch die Stressfilamente enden an der Plasmamembran mit ihren schnell wachsenden Enden im Bereich der „Focal Adhesions“. Durch die Bindung an Aktin könnte folglich eine Assoziation der IP3K B mit der Plasmamembran, insbesondere in Bereichen der „Focal Adhesions“ hergestellt werden. Möglicherweise könnte über die Bindung an Aktin auch die Nähe zu InsP_3 -Rezeptoren hergestellt werden. Für alle drei Isoformen der InsP_3 -Rezeptoren konnte neben ihrer vorherrschenden Lokalisation in Membranen des ER auch eine partielle Kolo-kalisation mit Aktin-Filamenten nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte für die Isoform II des InsP_3 -Rezeptors eine Kolo-kalisation mit Talin im Bereich von „Focal Adhesions“ beobachtet werden. Ein der Isoform I des InsP_3 -Rezeptor ähnliches Protein weist neben seiner Lokalisation an Membranen des Sarkoplasmatischen Retikulums auch eine Lokalisation an Caveolen (Einstülpungen der Plasmamembran) auf [Fujimoto et al., 1995; Sugiyama et al., 2000]. Möglicherweise dirigiert eine Zielsteuerung der IP3K B an Aktin das Protein nicht nur in die Nähe seines Substrats, dem InsP_3 , sondern zudem auch in die Nähe des Substrat-Wirkungsorts, dem InsP_3 -Rezeptor. Die spezifische Lokalisation der IP3K würde dazu führen, dass Stimulations-abhängig gebildetes InsP_3 sofort an der Plasmamembran zu InsP_4 umgesetzt würde, bevor eine Aktivierung von InsP_3 -Rezeptoren in diesem Bereich oder an Membranen des ER stattfinden könnte. Folglich würde die InsP_4 -Konzentration lokal stark ansteigen. Das InsP_4 Signal würde jedoch schnell, hauptsächlich über die Aktivität von Inositolphosphat-Kinasen weiter metabolisiert, da in stimulierten Zellen eine ausgeprägte Erhöhung der Konzentrationen von InsP_5 , InsP_6 und den Inositolpyrophosphaten PP- InsP_5 und $(\text{PP})_2\text{-InsP}_4$ beobachtet wurde, während die Konzentrationen von InsP_4 Isomeren kaum anstieg [Pittet et al., 1989; Sasakawa et al., 1992].

Dem Inositolphosphat InsP_6 werden multiple Funktionen in der Zelle zugesprochen, die jedoch kontrovers diskutiert werden [Shears, 2001]. An der Plasmamembran könnte InsP_6 eine wichtige Rolle beim vesikulären Transport und der Sekretion spielen, da Synaptotagmine, AP2, AP3 mit InsP_6 interagieren. Während die Adapterproteine AP2 und AP3 in frühen endozytotischen Prozessen die Polymerisation von Clathrin unterstützen, fungieren Synaptotagmine als Ca^{2+} -Sensoren und vermitteln exozytotische Prozesse [Ibata et al., 1998; Timermann et al., 1992; Vogelmeier et al., 1992; Norris et al., 1995; Ye et al., 1995]. Mittlerweile konnten Synaptotagmine auch in vielen nicht neuronalen Zellen nachgewiesen werden (unter anderem auch in NRK-Zellen), zusätzlich konnte die Funktion der Synaptotagmine um endozytotische Prozesse erweitert werden [Tucker und Chapman, 2002]. Die Bindung von

InsP₆ an Adapterproteine führt zu einer Inhibition der „Clathrin cage“ Assemblierung, während die Bindung an Synaptotagmine möglicherweise das „Andocken“ und Fusionieren exozytotischer Vesikel an der Plasmamembran verhindert [Mizutani et al., 1998]. Zusammenfassend stellt InsP₆ einen allgemeinen Antagonisten des endozytotischen vesikulären Transports dar [Shears, 1998]. Eine kurzfristig erhöhte Konzentration von InsP₄, verursacht durch eine direkte Metabolisierung des nach Stimulation gebildeten InsP₃, könnte über eine nachfolgende Bildung von InsP₆ an der Plasmamembran vesikuläre Transportprozesse hemmen.

Eine direkte Umsetzung des InsP₃ zu InsP₄ hätte zudem Auswirkungen auf die zytosolische Calciumkonzentration, da InsP₃ seine Signalwirkung als Ca²⁺-mobilisierender „second messenger“ zunächst nicht komplett entfalten könnte. Der primäre Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration, ausgelöst über eine Aktivierung von InsP₃-Rezeptoren an Membranen von ER-Speichern, würde verringert oder unterdrückt. Bei einem zweiten extrazellulären Signal, das zu einer Aktivierung der PLC und nachfolgender Bildung von InsP₃ führt, könnte InsP₃ seine Signalwirkung entfalten, da die 5-Phosphatase durch die vorangegangene InsP₄-Bildung und -Bindung inhibiert ist [Hermosura et al. 2000]. Eine Lokalisation der IP3K in der Nähe der InsP₃-Bildung könnte im Bezug auf Ca²⁺-Signale folgende Auswirkungen haben: Keine nachweisbare oder eine verringerte Ca²⁺-Antwort auf den ersten extrazellulären Stimulus in Form von einer geringeren Ca²⁺-Freisetzung, geringeren Ca²⁺-Oszillationen und einer kürzeren Ca²⁺-Transiente, während ein zweiter Stimulus ein starkes Ca²⁺-Signal verursachen würde.

Eine starke Erhöhung der basalen zytosolischen Ca²⁺-Konzentration könnte nicht nur in Form einer Bindung von Ca²⁺/Calmodulin sowie einer Phosphorylierung durch CamK II aktivierend auf die IP3K B wirken, möglicherweise spielen weitere posttranslationale Veränderungen der Kinase auch eine Rolle. Einen Hinweis darauf könnten die putativen PEST-Sequenzen geben, die hauptsächlich in den nicht katalytischen Bereichen der IP3-Kinasen (Isoform B) beider Spezies (Mensch und Ratte) identifiziert werden konnten. Diese Polypeptid-Sequenzen stellen unter anderem auch mögliche Erkennungsmotive für die Proteasen Calpain I und II (μ -Calpain und m-Calpain) dar [Rechensteiner and Rogers, 1996]. Calpaine sind zytosolische Cystein-Proteasen, die durch Ca²⁺ aktiviert werden und in der Nähe von Membranen sowie am Zytoskelett ihre Substratproteine limitiert proteolysieren [Sato and Kawashima, 2001]. Dabei erfolgt die Spaltung von Substratproteinen immer im Bereich zwischen zwei Domänen. Calpain I und II werden ubiquitär exprimiert, wobei Calpain I das vorherrschende Calpain in Neuronen, Erythrozyten, T-Lymphozyten und Blutplättchen ist. Die Aktivierung der Calpaine ist ein komplexer Prozess, an dessen Beginn die über Signalkaskaden verursachte Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration steht. Die Bindung von Ca²⁺ an Calpain verursacht zunächst eine Konformationsänderung der Protease,

gefolgt von einer Translokation an Substrate und/oder über Phospholipide an Membranen. Nach limitierter Autolyse an den N-Termini der katalytischen und regulatorischen Unter-einheiten der Protease erfolgt die Erkennung und Spaltung von Substratproteinen. Nach Proteolyse der Substrate regulieren die Calpaine sich selbst herunter. Zu den Substraten der Calpaine gehören verschiedene Signalmoleküle und Proteine, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind sowie weitere Proteine. Calpaine spalten *in vitro* unter anderem auch aktivierte Isoformen der PKC, wodurch diese, teilweise unabhängig von ihrer Regulation durch Ca^{2+} /Phospholipide/DAG, aktiviert werden. Derart modifizierte Isoformen der PKC werden als PKM bezeichnet. Beispielsweise weist die proteolysierte PKC δ im Vergleich zur unproteolysierten PKC δ zwar die gleiche Affinität zu ihrem Substrat auf, setzt es jedoch 3fach schneller um [Fujise et al., 1994]. Bei anderen Proteinen bewirkt die Proteolyse durch Calpain hingegen eine Inaktivierung.

In vitro werden die Calpaine I und II bei einer Konzentration an freiem Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) von 10-50 μM bzw. von 250-350 μM aktiviert [Pal et al., 2001]. Nach Aktivierung von Rezeptoren durch Agonisten (Bradykinin, OKT3) konnte in PC12 Zellen und in T-Lymphozyten ein globales Ca^{2+} -Signal bzw. ein Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, vermittelt über die InsP_3 -Signalwirkung, von bis zu 800nM gemessen werden [Grohovaz et al., 1991; Guse et al., 1999]. Durch lokal begrenzte Ca^{2+} -Signale können jedoch insbesondere an der Plasmamembran über den VOCC (voltage-operated Ca^{2+} channel) und SOCC (store-operated Ca^{2+} channel) vermittelten Einstrom von Ca^{2+} höhere Ca^{2+} -Konzentrationen erreicht werden [Bootsman et al., 2002]. Diese starken, lokal begrenzten Ca^{2+} -Signale könnten, insbesondere auf das vorherrschend Plasmamembran-assoziierte Calpain I *in vivo* aktivierend wirken, das im Vergleich zum Calpain II schon bei geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert wird [Cressman et al., 1995].

In Experimenten an der Isoform A konnte *in vitro* limitierte Proteolyse durch Calpaine beobachtet werden, die durch Calpain Inhibitoren verhindert werden konnte [Lee et al., 1990]. Limitierte Proteolyse durch Calpaine könnte hauptsächlich am N-terminalen Bereich des Proteins erfolgen, da beispielsweise in der IP3K B (*Rattus norvegicus*) drei der vier putativen PEST-Sequenzen dort identifiziert wurden (eigene Beobachtungen). Auch in eigenen, unveröffentlichten Beobachtungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Reinigung von IP3K Isoformen in Anwesenheit von Ca^{2+} (durch CaM-Sepharose Affinitätschromatographie) ohne Proteasehemmer zur überwiegenden Isolierung von ~50-55kDa großen, enzymatisch vollaktiven katalytischen Fragmenten der Isoform B führt. Dies deutet darauf hin, dass die Isoformen A und B Substrate für Calpaine darstellen.

Calpain verursachte irreversible posttranslationale Modifikationen könnten in stimulierten Zellen nicht nur die Lokalisation, sondern auch die Aktivität der IP3K B beeinflussen. So könnte der Bereich der Aktin-Bindungsdomäne vom „Rest“ des Enzyms abgespalten werden

und das N-terminal verkürzte Enzym vom Aktin abdissoziieren. Möglicherweise erfolgt dann über eine zweite „Targeting-Domäne“ eine Translokation der proteolysierten IP3K B an Membranen von Ca^{2+} -Speichern und in die Nähe von InsP_3 -Rezeptoren, da von Banting und Mitarbeitern eine Lokalisation an Membranen des ER beobachtet werden konnte [Soriano et al., 1997]. Ein Abbau des InsP_3 -Signals an seinem Wirkungsort hätte zu Folge, dass eine weitere Ca^{2+} -Freisetzung über InsP_3 -Rezeptoren gehemmt würde. Zusätzlich könnte die Proteolyse auch regulativ auf die Aktivität des Enzyms wirken. Möglicherweise wirkt die Proteolyse nach einem ähnlichen Mechanismus wie für Isoformen der PKC beschrieben aktivitätssteigernd auf die IP3K B.

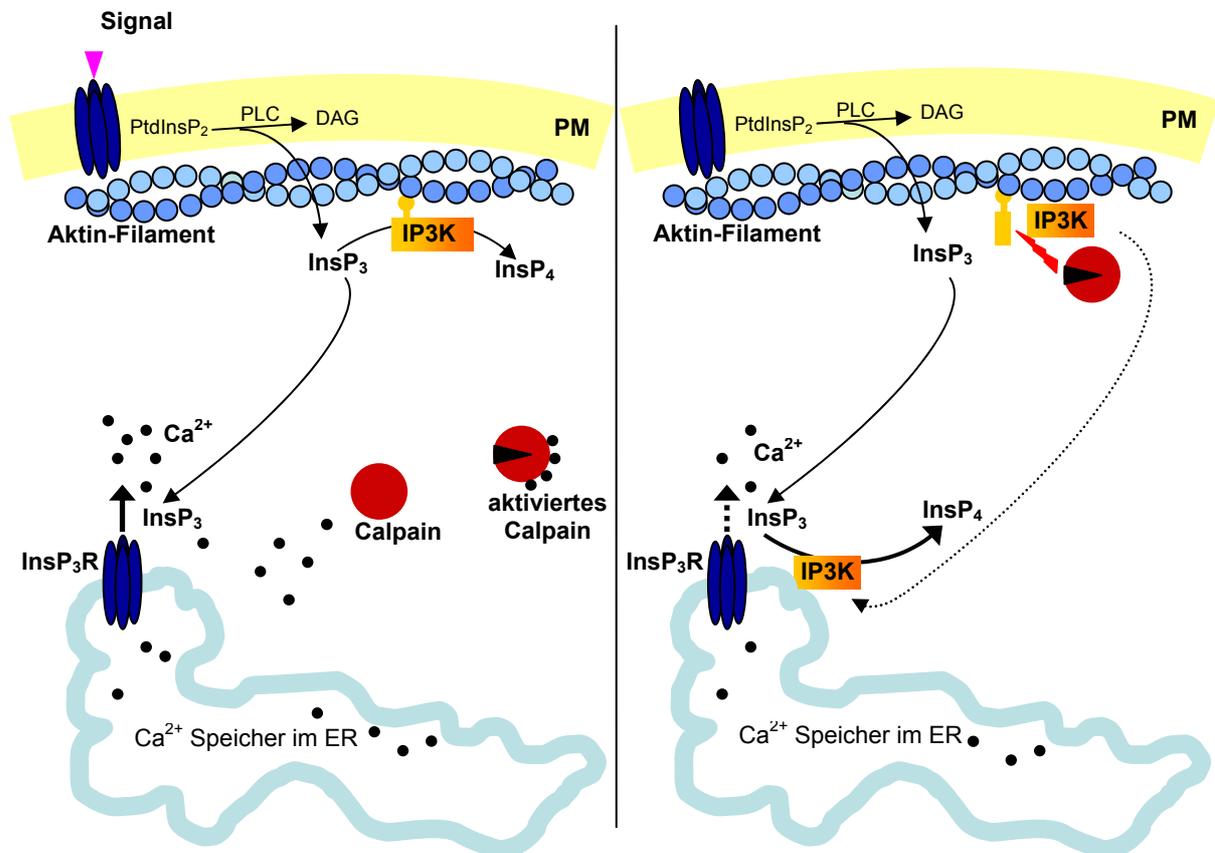
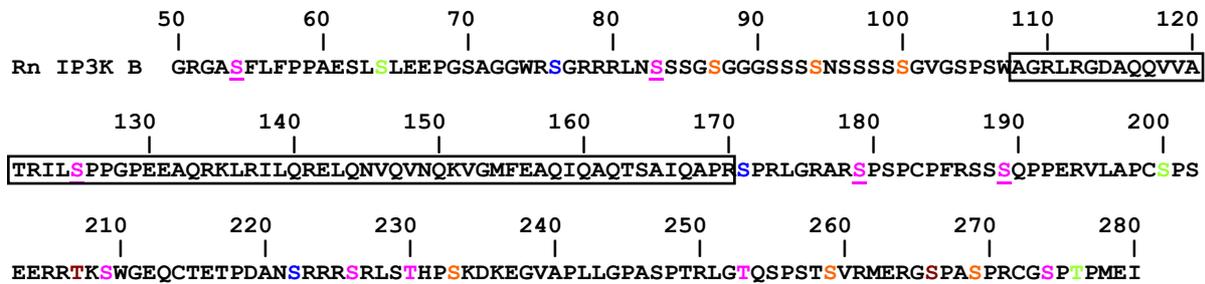


Abbildung 4.7.1 Schematische Darstellung putativer posttranslationaler Modifikation der IP3K B durch Calpaine

Eine Stimulation der Zelle führt zu einer Aktivierung der PLC, die das membranständige PtdIns-4,5-P₂ zu InsP_3 und DAG hydrolysiert. InsP_3 wird in der Nähe seines Entstehungsorts durch die Aktin-gebundene IP3K B zu InsP_4 phosphoryliert. Ein Teil des InsP_3 diffundiert durch das Zytosol zu InsP_3 -Rezeptoren an ER-Membranen und bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} über die Rezeptoren aus dem Lumen des ER. Anhaltende höhere Ca^{2+} -Signale bewirken die Aktivierung und Translokation von zytosolischen Proteasen, den Calpainen. Diese Calpaine könnten die Aktin-assozierte IP3K B durch limitierte Proteolyse N-terminal verkürzen und damit möglicherweise auch die Aktivität des Enzyms beeinflussen. Würde bei der Proteolyse die Aktin-Bindungsdomäne vom Rest des IP3K B abgetrennt, könnte das Enzym an ER-Membranen in die Nähe von InsP_3 -Rezeptoren transloziert werden (unterbrochener Pfeil) und dort das InsP_3 -Signal abbauen.

Darüber hinaus könnten weitere posttranslationale Modifikationen durch spezifische Proteinkinasen sowohl regulativ auf die Aktivitäts als auch auf die Lokalisation der IP3K B wirken. Insbesondere in den Abschnitten, die unmittelbar N- und C-terminal von der putativen Aktin-Bindungsdomäne liegen, konnten viele mögliche Phosphorylierungsstellen mit dem Programm PhosphoBase (www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/predict/predform) identifiziert werden. Eine Phosphorylierung in der Nähe oder im Bereich der Aktin-Bindungsdomäne verursacht durch aktivierte Proteinkinasen, könnte die Interaktion der Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett beeinflussen [Senter et al., 1995].

Zukünftige Experimente könnten die Rolle von posttranslationale Modifikationen (z.B. durch Calpaine und Proteinkinasen) für die Regulation der Aktivität und der Lokalisation der IP3K B aufklären.



CaMKII	PKA	CKI	CKII	PKC
S-54 RGASFLF	S-54 RGASFLF	S-87 SSSSGGGG	S-64 ESLLEE	S-76 GWRSGRR
S-83 RLNSSSG	S-83 RLNSSSG	S-94 SSSSNSS		
S-125 RILSPPG	S-125 RILSPPG	S-100 SSSSSGVG		
S-179 RARSPSP	S-179 RARSPSP			S-171 APRSPRL
S-189 RSSSQPP	S-189 RSSSQPP		S-200 APCSPSE	
S-209 RTKSWGE	T-207 RRTKSW		S-209 RTKSWGE	
S-226 RRRSRLS	S-226 RRRSRLS	S-226 SRRRSRLS		S-222 DANRRR
T-230 RLSHPS	T-230 RLSHPS	S-233 STHPSKDK		
T-253 RLGQTQSP	T-253 RLGQTQSP	T-253 TRLGQTQSP		
		S-259 SPSTSVRM		S-259 PSTSVRM
	S-266 RGSPAS	S-269 SPASPRC		S-269 SPASPRC
S-274 RCGSPTP	S-274 RCGSPTP		T-276 GSPTPME	

Abbildung 4.7.2 Mögliche Phosphorylierungsstellen in der Nähe der putativen Aktin-Bindungsdomäne der IP3K B

In der oberen Aminosäuresequenz der IP3K B sind Reste, die putative Phosphorylierungsstellen für unterschiedliche Proteinkinasen darstellen, farblich hervorgehoben. Unterstrichene Reste bilden putative Phosphorylierungsstellen für mehrere Proteinkinasen. Zusätzlich ist der Bereich der putativen Aktin-Bindungsdomäne umrahmt. In der Tabelle sind die Reste der einzelnen Phosphorylierungsstellen unterschiedlicher Proteinkinasen detailliert abgebildet, wobei Reste, die Phosphorylierungsstellen für mehrere Proteinkinasen darstellen, besonders hervorgehoben sind (CaMKII = Calmodulin-abhängige Kinase II; PKA = cAMP-abhängige Kinase, CK I und II = Casein Kinase I und II, PKC = Protein Kinase C).

5 Zusammenfassung

Die Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP3K) haben eine zentrale Funktion in der Signaltransduktion. Ausgehend von dem an der Plasmamembran nach Aktivierung der Rezeptor-gekoppelten Phospholipase C (PLC) generierten Inositol 1,4,5-trisphosphat (InsP₃) wird durch die katalytische Aktivität der IP3K das Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat (InsP₄) gebildet. Sowohl InsP₃ als auch InsP₄ sind wichtige intrazelluläre „second messenger“. Während InsP₃ durch Aktivierung von InsP₃-Rezeptoren die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern bewirkt, stellt InsP₄ ein wichtiges Intermediat bei der Bildung vieler hochphosphorylierter Inositolphosphate dar, welche vermutlich regulatorisch auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie den Transport von Vesikeln, den mRNA-Export aus dem Zellkern, die DNA-Rekombination, den Elektrolythaushalt und den ras-Signaltransduktionsweg wirken. Darüber hinaus wird dem InsP₄ selbst eine Funktion in einigen der erwähnten zellulären Prozesse zugeschrieben [Irvine and Schell, 2001]. Bislang konnten drei Isoformen (bezeichnet als A, B und C) der IP3K identifiziert werden, die in ihren bereits umfangreich analysierten Calmodulin-Bindungsdomänen und katalytischen Domänen hoch konserviert sind, aber in ihren variablen N-terminalen Bereichen kaum Homologien zueinander aufweisen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des bislang uncharakterisierten N-terminalen Bereichs der ubiquitär exprimierten IP3K Isoform B zu untersuchen, um neue Ansatzpunkte für Regulationsmechanismen zu gewinnen. Neue potentielle Bindungspartner der Kinase sollten identifiziert und charakterisiert werden. In Transfektionsexperimenten wurden ausgewählte N-terminale Fragmente der Kinase mit EGFP fusioniert und in eukaryontischen Zellen auf ihre Lokalisation untersucht. Dabei konnte ein Fragment identifiziert werden, das an spezifischen zellulären Strukturen lokalisierte, die durch Immunfluoreszenzexperimente als Aktin-Filamente identifiziert wurden. Um aufzuklären, ob zwischen dem IP3K-Fragment und Aktin eine direkte Interaktion stattfindet, wurde dieses Fragment zunächst als GST-Fusionsprotein exprimiert, gereinigt und anschließend in einem auf fluoreszenzspektroskopischen Methoden basierenden Aktin-Bindungsassay *in vitro* analysiert. Eine direkte Bindung des IP3K-Fragmentes an F-Aktin konnte nachgewiesen und eine Bindung an G-Aktin ausgeschlossen werden. Die gemessene Dissoziationskonstante (K_d) für die Aktin-Bindung liegt im mikromolaren Bereich. Durch Mutagenese und Trunkierung des identifizierten IP3K-Fragments konnte die Größe der neuartigen Aktin-Bindungsdomäne und deren neuartiger Charakter (keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bisher identifizierten Aktin-Bindungsdomänen) definiert werden.

Damit konnte in der IP3K B eine neuartige Aktin-Bindungsdomäne identifiziert werden, die möglicherweise, wie vor kurzem für die Isoform A beschrieben, auch in der Isoform B eine Zielsteuerung der Kinase an das Aktin-Zytoskelett bewirkt [vgl. Schell et al., 2001]. Diese

Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit dem Konzept einer funktionellen Spezialisierung der verschiedenen Isoformen der IP3K, die durch die variablen N-terminalen Bereiche vermittelt wird.

6 Literatur

- Albert, C. (1997). Biological variability in the structure of diphosphoinositol polyphosphates in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cells. *Biochem. J.* 327, 553-560
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G. (1997). 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* 7, 776-789
- Ali, N., Duden, R., Bembenek, M.E., and Shears, S.B. (1995). The interaction of coatamer with inositol polyphosphates is conserved in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 310, 279-284
- Altherton, T.J., Wilson, S., Morrey, R.I. and Waterfall, A. (1997). Digital Confocal Imaging Reaseach Report RR333, Dep. Of Computer Science, University of Warwick, Coventry (UK).
- Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R., Hawkins, P.T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.* 8, 684-691
- Barkalow, W., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Hartwig, J.H. (1996). Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein. *J. Cell. Biol.* 134, 389-399
- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S.R., Howe, K.L., and Sonnhammer. E.L.L. (2000). The Pfam contribution to the annual NAR database issue. *Nucleic. Acids Research.* 28, 263-266
- Bertsch, U., Deschermeier, C., Fanick, W., Girkontaite, I., Hillemeier, K., Johnen, H., Weglöhner, W., Emmerich, F., Mayr, G.W. (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, 1557-1564
- Bertsch, U., Haefs, M., Möller, M., Deschermeier, C., Fanick, W., Kitzerow, A., Ozaki, S., Meyer, H.E., and Mayr, G.W. (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
- Bootman, M.D., Lipp, P., Berridge, M.J. (2001). The organisation and functions of local Ca(2+) signals *J. Cell Sci.* 114, 2213-2222
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Carrier, M.F., Valentin-Ranc, C., Combeau, C., Fievez, S., Pantoloni, D. (1994). Actin polymerization: regulation by divalent metal ion and nucleotide binding, ATP hydrolysis and binding of myosin. *Adv Exp Med Biol* 358, 71-81
- Chen, R.H., Corbalan-Garcia, S., Bar-Sagi, D. (1997). The role of the PH domain in the signal-dependent membrane targeting of Sos. *EMBO J.* 16, 1351-1359

- Cheng, X., Ma, Y., Moore, M., Hemmings, B.A., Taylor, S.S. (1998). Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9849-9854
- Choi, K.Y., Kim, H.K., Lee, S.Y., Moon, K.H., Sim, S.S., Kim, J.W., Chung H.K., and Rhee. S.G. (1990). Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Science* 248, 64-66
- Ciruela, A., Hinchliffe, K., Divecha. N., Irvine, R.F. (2000). Nuclear targeting of the β isoform of Typ II phosphatidylinositol phosphate kinase (phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase) by its α -helix 7. *Biochem. J.* 346, 587-591
- Clandinin, T., DeModena, J., and Sternberg, P. (1998). Inositol trisphosphate mediates a RAS-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*. *Cell* 92, 523-533
- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268
- Coates, M.L. (1975). Hemoglobin function in vertebrates: an evolutionary model. *J. Mol. Evol.* 6, 285-307
- Cole, C.N., Hammell C.M. (1998). Nucleocytoplasmic transport: driving and directing transport. *Curr Biol.* 8, R368-72
- Communi, D., Dewaste, V., and Erneux,. C. (1999). Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 14734-14742
- Communi, D., Vanweyenberg, V., Erneux, C. (1994). Purification and biochemical properties of a high-molecular-mass inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme in human platelets. *Biochem. J.* 298, 669-673
- Communi, D., Vanweyenberg, V., and Erneux, C. (1997). D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A is activated by receptor activation through a calcium:calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation mechanism. *EMBO J.* 16, 1943-1952
- Cressman, C.M., Mohan, P.S., Nixon, R.A., Shea, T.B. (1995). Proteolysis of protein kinase C: mM and microM calcium-requiring calpains have different abilities to generate, and degrade the free catalytic subunit, protein kinase M. *FEBS Lett.* 367, 223-227
- Cullen, P.J., Hsuan, J.J., Truong, O., Letcher, A.J., Jackson, T.R., Dawson, A.P., and Irvine, R.F. (1995). Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P₄-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature* 376, 527-530
- Currie, R.A., Walker, K.S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C.P. (1999). Role of Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem. J.* 337, 575-583
- De Camilli, P., Chen, H., Hyman, J., Panepucci, E., Bateman, A., Brunger, A.T. (2001). The ENTH domain. *FEBS Letters* 513, 11-18
- De Larco, J.E. and Todaro, G.J. (1978). Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J. Cell. Physiol.* 94, 335-342

- 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
- Detmers, P., Weber, A., Elzinga, M., and Stephens, R.E. (1981). 7-chloro-4-nitro-2-oxo-1-3-diazole actin as a probe for actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 256, 99-105
- Dewaste, V., Pouillon, V., Moreau, C.S., Shears, S.B., Takazawa, K., and Erneux, C. (2000). Cloning and expression of a cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C. *Biochem. J.* 352, 343-351
- Dewaste, V., Roymans, D., Moreau, C., and Erneux, C. (2002). Cloning and Expression of a Full-Length cDNA Encoding Human Inositol 1,4,5- Trisphosphate 3-Kinase B. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 291, 400-405
- Dyson, J.M., O'Malley, C.J., Becanovic J., Munday, A.D., Berndt, M.C., Coghill, I.D., Nandurkar, H.H., Ooms, L.M., Mitchell C.A. (2001). The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP-2, bind filamin and regulates submembraneous actin. *J.C.B.* 155, 1065-1079
- Dos Remedios, C.G., Thomas, D.D. (2001). *Molecular Interactions of actin*, Springer Verlag, Heidelberg.
- Dove, S.K., Cooke, F.T., Douglas, M.R., Sayers, L.G., Parker, P.J., Michell, R.H. (1997). Osmotic stress activates Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* 390, 187-192
- Dowler, S., Currie, R.A., Campbell, D.G., Deak, M., Kular, G., Downes, C.P., Alessi, D.R. (2000). Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem. J.* 351, 19-31
- D'Santos, C.S., Communi, D., Ludgate, M., Vanweyenberg, V., Takazawa, K., Erneux, C. (1994). Identification of high molecular weight forms of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in rat thymus and human lymphocytes. *Cell Signal* 6, 335-44
- Eckmann, L. (1997). D-myo-inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in responds to salmonella invasion inhibits phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14456-14460
- Efanov, A.M., Zaitsev, S.V., Berggren, P.O. (1997). Inositol hexakisphosphate stimulates non Ca^{2+} - mediated and primes Ca^{2+} mediated exocytosis of insulin by activating protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4435-4439
- Engqvist-Goldstein, A.E., Kessels, M.M., Chopra, V.S., Hayden, M.R., and Drubin, D.G. (1999). An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J. Cell. Biol.* 147(7), 1503-1518
- Feng, Y., Wentz, S.R., Majerus, P.W. (2001). Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 875-879
- Fleischer, B., Xie, J., Mayrleitner, M., Shears, S.B., Palmer, D.J., and Fleischer, S. (1994). Golgi coatomer binds, and forms K(+)-selective channels gated by, inositol polyphosphates. *J. Biol. Chem.* 269, 7826-17832

- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Science* 275, 665-668
- Frieden, C. (1982). The Mg²⁺-induced conformational change in rabbit skeletal muscle G-actin. *J. Biol. Chem.* 257, 2882-2886
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., Cantley L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 481-507
- Fujimoto, T., Miyawaki A., Mikoshiba, K. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments. *J Cell Sci.* 108, 7-15
- Fujise, A., Mizuno, K., Ueda, Y., Osada, S., Hirai, S., Takayanagi, A., Shimizu, N., Owada, MK., Nakajima, H., Ohno, S. (1994) Specificity of the high affinity interaction of protein kinase C with a physiological substrate, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate. *J. Biol. Chem.* 269, 31642-31648
- Fukami, K. Furuhashi K., Inagaki, M., Endo, T., Hatno, S., Takenawa, T. (1992). Requirement of phosphatidyl 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function . *Nature* 359, 150-152
- Fukuda, M., Kojima, T., Aruga, J., Niinobe M., Mikoshiba, K. (1995). Functional diversity of C2 domains of synaptotagmin family. Mutational analysis of inositol high polyphosphate binding domain. *J. Biol. Chem.* 270, 26523-26527
- Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L. Keen, J.H. (1999). Arrestin function in G-protein coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* 18, 871-881
- Gaullier, J.M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H., Aasland, R. (1998). FYVE fingers bind PtdIns-3-P. *Nature (London)* 394, 432-433
- Glaser, M., Wanaski, S., Buser, C.A., Boguslavsky, V., Rashidzada, W., Morris, A. (1996). Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) produces reversible inhibition of phospholipases C by sequestering Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in lateral domains. *J. Biol. Chem.* 271, 26187-26193
- Graf, E., Empson, K.L., Eaton, J.W. (1987). Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* 262, 1164-1150
- Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 2424-2428
- Grohovaz, F., Zacchetti, D., Clementi, E., Lorenzon, P., Meldolesi J., Fumagalli G. (1991) [Ca²⁺]_i imaging in PC12 cells: multiple response patterns to receptor activation reveal new aspects of transmembrane signaling. *J Cell Biol.* 113, 1341-1350
- Guse, A.H., da Silva, C.P., Berg, I., Skapenko, A.L., Weber, K., Heyer, P., Hohenegger M., Ashamu, G.A., Schulze-Koops, H., Potter, B.V., Mayr G.W. (1999) Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* 398, 70-73
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580

- Hanakahi, L.A., Bartlet-Jones, M., Chappell, C., Pappin, D., West S.C. (2000). Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair. *Cell* 102, 721-729
- Hao, W., Tan, Z., Prasad, K., Reddy, K.K., Chen, J., Prestwich, G.D., Falck, J.R., Shears S.B., and Lafer, E.M. (1997). Regulation of AP-3 function by inositides. Identification of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate as a potent ligand. *J. Biol. Chem.* 272, 6393-6398
- Hawkins, P.T. (1993). Inhibition of iron catalysed hydroxyl radical formation by inositol phosphates: a possible biological function for myo-inositol hexakisphosphate. *Biochem. J.* 294, 929-934
- Hermosura, M.C. (2000). InsP_4 facilitates store-operated calcium influx by inhibition of InsP 5-phosphatase. *Nature* 408, 735-740
- Hicks, G.R., Raikhel, N.V. (1995). Nuclear localization signal binding proteins in higher plant nuclei *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 734-738
- Hilton, J.M., Plomann M., Ritter B., Modregger J., H.N. Freeman, Falk J.R., Murali Krishna U., Tobin A.B. (2001). Phosphorylation of an synaptic vesicle associated protein by inositol hexakisphosphate-regulated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 16341-16347
- Hitt, A.L, Luna, E.J. (1994) Membrane interactions with the actin cytoskeleton *Curr Opin Cell Biol.* 6, 120-30
- Huttelmaier, S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B.M., Rudiger, M. (1998). The interaction of cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by Phosphatidyl 4,5-bisphosphate. *Curr. Biol.* 8, 479-488
- Illies, C. (2002). *In vivo* Lokalisation der humanen Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat bindenden Proteine Centaurin alpha 1 und 2. Dissertation
- Imagawa, M., Sakaue, R., Tanabe, A., Osada, S., and Nishihara, T. (2000). Two nuclear localization signals are required for nuclear translocation of nuclear factor 1-A. *FEBS Lett.* 484, 118-24
- Irvine, R.F., and Schell, M.J. (2001). Back in the water: The return of the inositol phosphates. *Nature Reviews.* 2, 327-338
- Irvine, R.F., McNulty, T.J., and Schell, M.J. (1999). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger-a special role in neurons? *Chem. Phys. Lipids.* 98, 49-57
- Ismailov, I.I., Fuller, C.M., Berdiev, B.K., Shlyonsky, V.G., Benos, D.J., Barrett, K.E. (1996). A biologic function for an "orphan" messenger: D-myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate selectively blocks epithelial calcium-activated chloride channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 10505-10509
- Itho, T., Koshiba, S.T., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., and Takenawa, T. (2001). Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 291, 1047-1051
- Janmey, P.A. (1998). The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Phys. Reviews* 78, 763-781.

- Jones, D.H., Morris, J.B., Morgan, C.P., Kondo, H., Irvine R.F., Cockcroft, S. (2000). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* 275, 13962-13966
- Kay, B.K., Yamabhai, M., Wendland, B., and Emr, S.D. (1999). Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci.* 8, 435-438
- Kami, K., Takeya, R., Sumimoto, H., Kohda, D. (2002) Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67 (phox), Grb2 and Pex13p. *EMBO J.* 21, 4268-76
- Kingston, R.E. (1996). In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., eds.), pp. 4.2.5-4.2.9, John Wiley & Sons Inc., New York
- Klarlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A., Czech, M.P. (1997). Signaling by phosphatidylinositide 3,4,5-trisphosphate through protein containing pleckstrin and sec7 homology domains. *Science* 275, 1927-1930
- Klarlund, J.K., Rameh, L.E., Cantley, L.C., Buxton, J.M., Holik, J.J., Sakelis, C. (1998). Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 1859-1862
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nuc. Acids Res.* 15, 8125-8148
- Lappalainen, P., Kessels, M.M., Jamie, M., Cope, T.V., Drubin, D.G. (1998). The ADF homology (ADF-H) domain: A highly exploited actin-binding module. *Mol. Biol. Cell.* 9, 1951-1959
- Larsson, O. (1997). Inhibition of phosphatases and increased Ca²⁺-channel activity by inositol hexakisphosphate. *Science* 278, 471-474
- Lassing, I., Lindberg, U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 314, 472-474
- Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P., Parker, P. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK-1. *Science* 281, 2042-2045
- Lee, S.Y., Sim, S.S., Kim, J.W., Moon, K.H., Kim, J.H., and Rhee, S.G. (1990). Purification and properties of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 265, 9434-9440
- Lerntin-Chlieh, F., MacRobbie, E.A., Brearley, C.A. (2000). Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺ -inward rectifying conductance in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8687-8692
- Levi, A., Elderidge, J.D., and Paterson, B.M. (1985). Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science.* 229, 393-395

- Li, Z., Wahl, M.I., Eguinoa, A., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., Witte, O.N. (1997). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-kinase gamma activates Bruton's tyrosine kinase in concert with Src family kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13820-13825
- Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C.S., Cantley, L. (1994). Novel function of Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **269**, 21403-21406
- Living Colors® User Manual. (1999) PT2040, Clontech
- Llinas, R., Sugimori, M., Lang, E.J., Morita, M., Fukuda, M., Niinobe, M. and Mikoshiba, K. (1994). The inositol high-polyphosphate series blocks synaptic transmission by preventing vesicular fusion: a squid giant synapse study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 12990-12993
- Lu, P.J., Shieh, W.R., Rhee, S.G., Yin, H.L., Chen, C.S. (1996). Lipid products of phosphoinositide 3-kinase bind human profilin with high affinity. *Biochemistry* **35**, 14027-14034
- Luckhoff, A. and Clapham, D.E. (1992). Inositol 1,3,4,5-trisphosphate activates an endothelial Ca^{2+} -permeable channel. *Nature* **355**; 356-358
- Maehama, T., Taylor, G.S., Dixon, J.E. (2001). PTEN and Myotubularin: Novel Phosphoinositide Phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 247-279
- Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M.R., Albiges-Rizo, C. (2001). Conformation, localization and integrin-binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **276**, 21217-21227
- McCann, R.O., and Craig, S.W. (1997). The I/LWEQ module: a conserved sequence that signifies F-actin binding in functionally diverse proteins from yeast to mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **94**, 5679-5684
- McCann, R.O., and Craig, S.W. (1999). Functional genomic analysis reveals the utility of the I/LWEQ module as a predictor of protein:actin interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**(1), 135-140
- Miki, H., Miura, K., Takenawa, T. (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP_2 -dependent manner downstream of tyrosin kinases. *EMBO J.* **15**, 5326-5335
- Mikoshiba, K., Fukuda, M., Ibata, K. Kabayama, H., and Mizutani, A. (1999). Role of synaptotagmin, a Ca^{2+} and inositol polyphosphate binding protein, in neurotransmitter release and neurite outgrowth. *Chem. Phys. Lipids* **98**, 59-67
- Mizutani, A., Fukuda, M., Niinobe, M., and Mikoshiba, K. (1997). Regulation of AP-2-synaptotagmin interaction by inositol high polyphosphates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 128-131
- Mochida, S., Fukuda, M., Niinobe, M., Kobayashi, H., and Mikoshiba, K. (1997). Roles of synaptotagmin C2 domains in neurotransmitter secretion and inositol high-polyphosphate binding at mammalian cholinergic synapses. *Neuroscience* **77**, 937-943

- Mochizuki, Y., Takenawa, T. (1999). Novel inositol polyphosphate 5-phosphatase localizes at membrane ruffles. *J. Biol. Chem.* *274*, 36790-36795
- Mornet, D., Ue, K. (1984). Proteolysis and structure of skeletal muscle actin *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 3680-3684
- Muguruma, M., Matsumura, S., and Fukazawa, T. (1990). Direct interaction between talin and actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *171*, 1217-1223
- Nalaskowski, M., Deschermeier, C., Fanick, W., Mayr, G.W. (2002). The human homologue of yeast ArgRIII protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization. *Biochem. J.* *366*, 549-556
- Niggli, V., Kaufmann, S., Goldmann, W.H., Weber, T., and Isenberg, G. (1994). Identification of functional domains in the cytoskeletal protein talin. *Eur. J. Biochem.* *1994*, *224*, 951-957
- Nilius, B., Prenen, J., Voets, T., Eggermont, J., Bruzik, K.S., Shears, S.B., Droogmans G. (1998). Inhibition by inositol tetrakisphosphates of calcium- and volume-activated Cl⁻ currents in macrovascular endothelial cells. *Pflugers Arch.* *435*, 637-644
- Norris, F.A., Ungewickell E., Majerus, P.W. (1995). Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP3/AP180) and inhibit cage clathrin assembly in vitro. *J. Biol. Chem.* *270*, 214-217
- Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S., Suzuki, K. (1988) A novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family. *Cell* *53*, 731-741
- Oancea, E., Meyer, T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* *95*, 307-318
- Pal, G.P., Elce, J.S., Jia, Z. (2001). Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.*, *276*, 47233-47238
- Palmer, R.H., Dekker, L.V., Woscholski, R., Le Good, J.A., Gigg, R., Parker, P.J. (1995). Activation of PRK1 by phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate and by phosphatidyl 3,4,5-trisphosphate. A comparison with protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.* *270*, 22412-22416
- Paris, S., Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Bigay, J., Antonny, B., Chabre, M. (1997). Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J. Biol. Chem.* *272*, 22221-22226
- Pawson, T., Raina, M., Nash, P. (2002) Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Letters* *513*, 2-10
- Paunola, E, Mattila P.K., Lappalainen, P. (2002) WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers *FEBS Lett* *513*, 92-97
- Pittet, D., Schlegel, W., Lew, DP., Monod, A., Mayr, GW. (1989) Mass changes in inositol tetrakis- and pentakisphosphate isomers induced by chemotactic peptide stimulation in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* *264*, 18489-18493

- Pollard TD, Bhandari D, Maupin P, Wachsstock D, Weeds AG, Zot HG (1993) Direct visualization by electron microscopy of the weakly bound intermediates in the actomyosin adenosine triphosphatase cycle. *Biophys J.* 64, 454-471
- Ponting, C.P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci.* 5, 2353-2357
- Rapoport, I., Miyazaki M., Boll, W., Duckworth B., Cantley, L.C., Shoelson S. (1997). Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by Ap-2 complexes. *EMBO J.* 16, 2240-2250
- Rechensteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267-271
- Rees, M.K., and Young, M. (1967). Studies on the isolation and molecular properties of homogeneous globular actin. *J. Biol. Chem.* 242, 4449-4458
- Rhee, S.G. (2001). Regulation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 281-312
- Saito, K., Scharenberg, A.M., Kinet, P.J. (2001). Interactions between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk. *J. Biol. Chem.* 276, 16201-16206
- Sasakawa, N., Nakaki, T., Kashima, R., Kanba, S., Kato, R. (1992) Stimulus-induced accumulation of inositol tetrakis-, pentakis-, and hexakisphosphates in N1E-115 neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 58, 2116-2123
- Sato, K., Kawashima S. (2001) Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol. Chem.* 382, 743-751.
- Scheid, M.P., Marignani, P.A., Woodgett, J.R. (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6247-6260
- Schell, M.J., Erneux, C., and Irvine, R.F. (2001). Inositol (1,4,5)-trisphosphate 3-kinase A associates with F-actin and dendritic spines via its N-terminus. *J. Biol. Chem.* 276, 37537-37546
- Shears, S.B. (1998). The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochim Biophys Acta.* 1436, 49-67
- Shears, S.B. (2001). Assessing the functional omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell Signalling* 13, 151-158
- Senter, L., Ceoldo, S., Meznaric Petrusa, M., Salviati, G. (1995) Phosphorylation of dystrophin: Effects on actin binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 57-63
- Soriano, S., Thomas, S., High, S., Griffiths, G., D'Santos, C.P., Cullen, P., and Banting, G. (1997). Membrane association, localization and topology of rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B: implications for membrane traffic and Ca^{2+} homeostasis. *Biochem. J.* 324, 579-589
- Stephens, L.R. (1991) Myo-inositol pentakisphosphates. Structure, biological occurrence and phosphorylation to myo-inositol hexakisphosphate. *Biochem. J.* 275, 485-499

- Stossel, T.P., Chaponnier, C., Ezzell, R.M., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Kwiatkowski, D.J., Lind, S.E., Smith, D.B., Southwick, F.S., Yin, H.L., et al. (1985) Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu Rev Cell Biol.* 1, 353-402
- Stradal, T., Kranewitter, W., Winder, S.J., Gimona, M. (1998). CH domains revisited. *FEBS Lett* 431, 134-137
- Sugiyama, T., Matsuda, Y., Mikoshiba, K. (2000). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor associated with focal contact cytoskeletal proteins. *FEBS Lett.* 466, 29-34
- Szinyei, C., Bennisch, T., Reiser, G., Reymann, K.G. (1999). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate enhances long-term potentiation by regulating Ca^{2+} - entry in rat hippocampus. *J. Physiol.* 516, 855-868
- Takazawa, K., Perret, J., DuMont, J.E., and Erneux, C. (1991). Molecular cloning and expression of a new putative inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme. *Biochem. J.* 278, 883-886
- Takazawa, K., Perret, J., DuMont, J.E., and Erneux, C. (1991). Molecular cloning and expression of a human brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 529-535
- Takazawa, K., VanDekerckhove, J., DuMont, J.E, and Erneux, C. (1990). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a rat brain cDNA encoding a Ca^{2+} /calmodulin-sensitive inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem. J.* 272, 107-112
- Takenawa, T., Itho, T. (2001). Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1533, 190-206
- Tan, Z., Bruzik, K.S., Shears, S.B. (1997). Properties of the inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate 1-kinase purified from rat liver. Regulation of enzyme activity by inositol 1,3,4-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 272, 2285–2290
- Tang Y., Yu, J., Field, J. (1999). Signals from the Ras, Rac and Rho GTPases converge to the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1881-1891
- Tempel, M., Goldman, H.-W., Isenberg, G., Sackmann, E. (1995) Interaction of the 47kDa talin fragment and the 32kDa vinculin fragment with acidic phospholipids: a computer analysis. *Biophys. J.* 69, 228-241
- Timerman, A.P., Mayrleitner, M.M., Lukas, T.J., Chadwick, C.C., Saito, A., Watterson, D.M., Schindler, H., and Fleischer, S. (1992). Inositol polyphosphate receptor and clathrin assembly protein AP-2 are related proteins that form potassium-selective ion channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 8976-8980
- Thomas, S., Brake, B., Luzio, J.P., Stanley, K., and Banting, G. (1994). Isolation and sequence of a full length cDNA encoding a novel rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1220, 219-222
- Toker, A. (2002). Phosphoinositides and signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 761-779.
- Tsubokawa, H., Oguro, K., Robinson, H.P.C., Masuzawa, T., Kawei, N. (1999). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate enhances the calcium current in hippocampal CA1 neurones of the gerbil after ischaemia. *J. Physiol.* 497, 67-78

- Tucker, W.C., Chapman, E.R. (2002) Role of synaptotagmin in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Biochem J.* 366, 1-13
- Vanweyenberg, V., Communi, D., D'Santos, C.S., and Erneux, C. (1995). Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase isoenzymes. *Biochem. J.* 306, 429-435.
- Vogelmaier, S.M. (1992). Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 158-163
- Waelter S., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Nordhoff, E., Lurz, R., Goeler, H., Gauss, C. Sathasivam, K., Bates, G.P., Lehrach H., and Wanker, E.E. (2001). The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and α -adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1807-1817
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* 108, 139-150
- Xie, W., Kaetzel, M.A., Bruzik, K.S., Dedman, J.R., Shears, S.B., Nelson D.J. (1996) Inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate inhibits the calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance in T84 colonic epithelial cells *J. Biol. Chem.* 271, 14092–14097
- Xie, W., Solomons, K.R.H., Freeman, S., Kaetzel M.A., Bruzik K.S., Nelson D.J., Shears S.B. (1998). Regulation of Ca²⁺-dependent Cl⁻ conductance in a human colonic epithelial cell line (T₈₄): cross-talk between Ins(3,4,5,6)P₄ and protein phosphatases *J. Physiol.* 510, 661–673
- Xu, Y., Seet, L., Hanson, B., Hong, W. (2001). The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *Biochem. J.* 360, 513-530
- Ye, W., Ali, N., Bembenek, M.E., Shears, S.B., Lafer E.M. (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, 1564–1568
- York, J.D., Odom, A.R., Murphy, R., Ives, E.B., Wenthe, S.R. (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 285, 96-100
- Zang, J., Robson, R.M., Schmidt, J.M., Stromer, M.H. (1996). Talin can crosslink actin filaments into both networks and bundles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 530-537
- Zhu, D.M., Tekle, E., Huang, C.Y., and Chock, P.B. (2000). Inositol tetrakisphosphate as a frequency regulator in calcium oscillations in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 275, 6063-6066

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

allgemeine Abkürzungen

1D, 2D	1-, 2-dimensional
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ABP	Aktin-bindendes Protein
abs.	absolut
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /CaM-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CRAC	calcium release activated current
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
E.coli	Escherichia coli
EGF	epidermal growth factor
F-Aktin	Filamentöses/Polymeres Aktin
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
G	Guanosin
G-Aktin	Monomeres/Globuläres Aktin
GST	Glutathion S-Transferase
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hs	Homo sapiens
Ins 1,4,5 P ₃	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat
Ins 1,4,5 P ₃ 3-Kinase	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
IP	Inositolphosphat
IP3K	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
IP3K B	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B
IP6K	Inositolhexakisphosphatkinase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IPMK	Inositolpolyphosphatmultikinase

kb	Kilobasen
K_d	Dissoziationskonstante
l	Liter
LMW	low molecular weight
m	Meter
M	molar
Mm	Mus musculus
μ	mikro
MCS	multiple cloning site
Mg^{2+}	Magnesium
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano
NADH	hydriertes Nikotinsäureamidadenindinukleotid
NBD-Cl	7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NLS	nuclear localization signal
nM	nanomolar
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEP	Phosphoenolpyruvat
PH-Domäne	pleckstrin homology-Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PK	Pyruvatkinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP-InsP ₅	Diphosphoinositolpentakisphosphat
Rn	Rattus norvegicus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
PtdIns	Phosphatidylinositol
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec, s	Sekunde
T	Thymin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(and-6-)Isothiocyanate
U	enzymatische Einheit (unit; 1 U entspricht 1 μ mol/min)

UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
µm	Mikrometer
v_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
wt	Wildtyp
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

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

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1.1	Schematische Darstellung des Phosphoinositidmetabolismus	3
Abb. 1.1.1.2	Rolle des PtdIns-4,5-P ₂ in Signaltransduktionswegen.....	7
Abb. 1.1.1.3	Rolle von PtdIns-3,4,5-P ₃ /PtdIns-3,4,-P ₂ /PtdIns-3-P in Signaltransduktionswegen	9
Abb. 1.1.2.1	Aktivierung von Isoenzymen der Phospholipase C (PLC).....	11
Abb. 1.1.2.2	Schematische Übersicht der Inositolphosphate in eukaryontischen Zellen	12
Abb. 1.1.2.3	Wirkung von Inositolphosphaten, speziell der des Ins-1,3,4,5-P ₄ , auf den Elektrolyt- haushalt einer Zelle	14
Abb. 1.2.4.1	Schematische Darstellung der bisher identifizierten Isoformen der IP3K unter- schiedlicher Spezies.....	19
Abb. 1.3.1	Schlüsselenzyme des Phosphoinositid/Inositolphosphat Metabolismus.....	20
Abb. 1.4.1.1	Polymerisation von Aktin mit einhergehender Mikrofilamentbildung	27
Abb.1.4.3.1	Schematische Darstellung direkter Interaktionen von Aktin-bindenden Proteinen mit Aktin.....	29
Abb. 2.2.1.5	Prinzip der QuikChange™ Mutagenese	45
Abb. 2.2.3.2	Prinzip der transienten Transfektion eukaryontischer Zellen.....	52
Abb. 3.1.1	Strategie zur Amplifikation und Klonierung der cDNA der IP3K B.....	62
Abb. 3.1.2	Amplifikation der Fragmente 1, 2 und 3 mittels RT-PCR.....	63
Abb. 3.1.3	Amplifikation der Fragmente 2a und 3a mittels <i>nested</i> -PCR.....	63
Abb. 3.1.4	Amplifikation des Fragmentes 4 mittels Fusions-PCR	64
Abb. 3.1.5	Amplifikation des Fragmentes 5 mittels Fusions-PCR	64
Abb. 3.2.1	Die cDNA- und Aminosäuresequenz der IP3K B (<i>Rattus norvegicus</i>).....	68
Abb. 3.3.1.1	Aminosäurealignment der humanen IP3K B mit der aus <i>Rattus norvegicus</i>	70
Abb. 3.3.2.1	Schematische Übersicht der vorhergesagten Sekundärstrukturelemente für die IP3K B (<i>Rattus norvegicus</i>)	72
Abb. 3.3.2.2	Detaillierte Vorhersage der Sekundärstrukturelemente für die IP3K B (<i>Rattus norvegicus</i>)	73
Abb. 3.4.1	Schematische Vektorkarte des Plasmids pEGFP-N1.....	75
Abb. 3.5.1.1	Lokalisation des Fusionsproteins 1 in vitalen PC12 Zellen	77
Abb. 3.5.1.2	Intrazelluläre Verteilung der Fusionsproteine 2 und 3 sowie des EGFP in vitalen PC12 Zellen	77
Abb. 3.5.2.1	Lokalisation des Fusionsproteins 1 in vitalen NRK52E Zellen	78
Abb. 3.5.2.2	Lokalisation des Fusionsproteins 1 und subzelluläre Verteilung des EGFP in vitalen NRK52E Zellen	78
Abb. 3.6.1	Lokalisation des Fusionsproteins 1 und Mikrotubuli in PC12 Zellen	79
Abb. 3.6.2	Kolokalisation des Fusionsproteins 1 mit F-Aktin in fixierten PC12 Zellen.....	80
Abb. 3.6.3	Kolokalisation des Fusionsproteins 1 mit F-Aktin in fixierten PC12 Zellen.....	81
Abb. 3.6.4	Kolokalisation des Fusionsproteins 1 mit F-Aktin in fixierten NRK52E Zellen.....	82
Abb. 3.7.1	Alignment der Blöcke 1, 3 und 4 des I/LWEQ Moduls mit homologen Bereichen aus den IP3K B.....	83
Abb. 3.8.1	Kolokalisation des Fusionsproteins 4 mit F-Aktin in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen.....	84
Abb. 3.9.1	Detaillierte Übersicht der „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Plasmids pGEX-2T und schematische Vektorkarte des Plasmids pGEX.....	86
Abb. 3.9.2	Expression und Nachweis des GST-Fusionsproteins	87
Abb. 3.9.3	Aufreinigung des GST-Fusionsproteins und der Glutathion S-Transferase	88
Abb. 3.10.1	Konzentrationsabhängigkeit der Bindung des GST-IP3K-Fusionsproteins an F-Aktin	90
Abb. 3.10.2	Zeitverlauf der Inkubation des GST-IP3K-Fusionsprotein mit G-Aktin	91
Abb. 3.11.1	Aminosäureaustausch durch QuikChange™ Mutagenese im IP3K B-EGFP Fusionskonstrukt 1	93
Abb. 3.11.2.1	Kolokalisation der Mutante 1 mit F-Aktin in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen	94
Abb. 3.11.2.2	Lokalisation der Mutante 2 in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen.....	95
Abb. 3.11.2.3	Kolokalisation der Mutante 3 mit F-Aktin in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen	96
Abb. 3.11.2.4	Lokalisation der Mutante 4 in fixierten NRK52E- und PC12 Zellen.....	97
Abb. 3.12.1.1	Aminosäuresequenzbereich der Fragmente 1a und 1b des IP3K B-EGFP Fusionskonstrukts.....	99
Abb. 3.12.2.1	Subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine 1a und 1b in NRK52E Zellen	100

Abb. 4.3.1	Vergleich zwischen der Lokalisation des isolierten I/LWEQ Moduls aus dem murinen Talin 1 in CHO Zellen und der Lokalisation des isolierten I/LWEQ Moduls homologen Abschnitt aus der IP3K B (<i>Rattus norvegicus</i>) in NRK52E Zellen.....	105
Abb. 4.3.2	Lokalisation des Fragmentes 1 (As 108-170) als EGFP-Fusionsprotein in NRK52E Zellen.....	109
Abb. 4.5.1	Lokalisation der veränderten Aktin-Bindungsdomäne als EGFP-Fusionsprotein in NRK52E Zellen.....	112
Abb. 4.6.1.1	Vergleich von Aminosäuresequenz und putativer Sekundärstruktur der IP3K Isoformen im Bereich der IP3K A und B Aktin-Bindungsdomänen (<i>Rattus norvegicus</i>)....	113
Abb. 4.7.1	Schematische Darstellung putativer posttranslationaler Modifikation der IP3K B durch Calpaine	120
Abb. 4.7.2	Mögliche Phosphorylierungsstellen in der Nähe der putativen Aktin-Bindungsdomäne der IP3K B	121

Herrn Prof. Dr. G.W. Mayr danke ich für die interessante Themenstellung sowie seine große Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. U. Wienand danke ich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

Herrn Prof. A. Wegner danke ich für seine engagierte Betreuung und Hilfestellung während meiner Zeit in Bochum.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. U. Bertsch für die praktische und theoretische Hilfestellung sowie die Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit.

Gedankt sei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit im Labor und allen Spaß während der letzten drei Jahre. Insbesondere möchte ich dabei Marcus für das Korrekturlesen dieser Arbeit und seiner Geduld mit mir danken.

Meine besondere Dankbarkeit gilt meiner Mutter, meiner Schwester Sibylle, meinem Bruder Philipp und meinem Freund Philipp die mich in jeglicher Hinsicht unterstützen.

Diese Arbeit wurde finanziell durch ein Stipendium des Graduiertenkollegs 336 „Molekulare Endokrinologie und Molekularer Stoffwechsel“ gefördert.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Isabell Maria Schreiber

Geburtstag: 31.03.1974

Geburtsort: Witzenhausen

Schulbildung

08/1990 – 06/1993

Berufliche Schulen, Witzenhausen

Berufliches Gymnasium, Schwerpunkt: Wirtschaft/Verwaltung

Abschluss mit dem Abitur

Studium der Biologie

10/1993 – 07/1999

Studium der Biologie an der Georg-August Universität, Göttingen

Diplomarbeit: „Die Verwertung von Nitrat durch Gerste (*Hordeum vulgare* L.) -in Abhängigkeit von dem C/N-Verhältnis-“

Hauptfach: Botanik; Nebenfächer: Mikrobiologie, Bodenkunde

Abschluss des Biologiestudiums mit dem Diplom (sehr gut)

Promotion

10/1999 - 12/2002

Promotion im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Stipendiatin des Graduiertenkollegs 336 „Molekulare Endokrinologie und Molekularer Stoffwechsel

Anfertigung einer Dissertation am Institut für Med. Biochemie und Molekularbiologie in der Abteilung für zelluläre Signaltransduktion bei Prof. Dr. G.W. Mayr.

Thema: „Regulation und subzelluläre Verteilung der Isoform B von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase“

Abschluss mit *magna cum laude*

seit 10/2002

Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Med. Biochemie und Molekularbiologie;
Weiterbearbeitung des Promotionsthemas sowie Lehrtätigkeit (Studiengang Medizin)