

Abstract

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.