

Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

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