

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die *in vivo* Lokalisation des humanen Centaurin $\alpha$  zum Nachweis der Bindung an den second messenger PtdIns(3,4,5)P $_3$ . Da die humane Form des Centaurin $\alpha$  zu Beginn der Arbeit noch nicht bekannt war, stand an erster Stelle die Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$ .

Für die Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$  wurde durch Datenbanksuche mehrere humane ESTs identifiziert, die ein humanes Centaurin $\alpha$  kodieren könnten. Aus diesen ESTs wurde eine Konsensussequenz erstellt, die als Grundlage zur Konstruktion von Primern diente. Aus einer cDNA-Präparation von NT2 Zellen ließ sich durch PCR das humane Centaurin $\alpha$  klonieren. Durch eigene Versuche wurde die kodierende Sequenz bis auf 40 Basenpaare vor dem Stopcodon kloniert. Nach Veröffentlichung der vollständigen Sequenz in GeneBank (AJ006422) konnten auch die fehlende Sequenz kloniert werden.

Eine weitere Datenbanksuche lieferte eine humane ESTs-Sequenz, die für eine neue Isoform zu kodieren schien. Der EST Klon (I.M.A.G.E. Klon 685913) wurde bestellt und sequenziert. Er enthielt die komplette kodierende Sequenz eines zum Centaurin $\alpha$  homologen Proteins, das Centaurin $\alpha$  genannt wurde.

Weiterhin wurde das Centaurin $\alpha$ b der Ratte kloniert. Diese Form gleicht dem Centaurin $\alpha$  der anderen Spezies viel mehr als das ursprünglich publizierte Centaurin $\alpha$ a, dessen Klonierung sich nicht wiederholen liess. Dieses konnte auch in mehreren Kontrollversuchen nicht nachgewiesen werden. Es kann vermutet werden, dass es sich bei der nun klonierten Form um das eigentliche Centaurin $\alpha$  Homologe der Ratte handelt.

Zur Untersuchung der Gewebeexpression der Centaurine  $\alpha$  und  $\alpha$  wurde ein Northernblot durchgeführt. Dieser ergab für das Centaurin $\alpha$  eine bevorzugte Expression in Gehirn, Niere und Herz. Die mRNA des Centaurin $\alpha$  wird vor allem in Milz, Niere, Plazenta, Herz und Dünndarm gefunden.

Für die Expression der Fusionsproteine aus Centaurin und GFP wurden das Centaurin $\alpha$  und  $\alpha$  die Vektoren pEYFP-C1 und pEGFP-N1 kloniert. Da das Fusionskonstrukt aus Centaurin $\alpha$  mit C-terminalem GFP eine schwächere Membranlokalisation in Jurkat Zellen zeigte, wurden alle weitere Experimente mit Konstrukten durchgeführt, bei denen das GFP N-terminal an das Centaurin fusioniert wurde.

Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde durch quasikonfokale Mikroskopie in vier verschiedenen Zelllinien (Jurkat, NT2, PC12 und CHO) untersucht. Das Centaurin $\alpha$  zeigte sich nur bei Jurkat Zellen, im Einklang mit der bekannten hohen basalen PtdIns(3,4,5)P $^3$ -Konzentration, bevorzugt an der Plasmamembran lokalisiert. In NT2, PC12 und CHO Zellen dagegen ist Centaurin $\alpha$  gleichmäßig über Zytoplasma und Zellkern verteilt. Dabei ist bei NT2 Zellen der Zellkern etwas schwächer markiert als das Zytoplasma, während er bei PC12 und CHO Zellen stärker fluoresziert. Das Centaurin $\alpha$  findet sich bei allen untersuchten Zellen bevorzugt an der Plasmamembran, bis hin zu feinsten Membranausstülpungen und dendritenähnlichen Extensionen.

Nach Stimulation von PC12 Zellen mit EGF konnte eine reversible Translokation des zytosolischen Centaurin $\alpha$  an die Plasmamembran beobachtet werden. Diese war schon nach etwa 15 Sekunden zu erkennen und dauerte etwa 50 Minuten an. Die Translokation konnte durch PI 3-Kinase Inhibitoren Wortmannin verhindert werden. Daraus lässt sich schließen, dass Centaurin $\alpha$  *in vivo* an Produkte der PI 3-Kinase, wie PtdIns(3,4,5)P $^3$  oder PtdIns(3,4)P $^2$  bindet.

Bei dem Centaurin $\beta$  konnte nach Stimulation mit EGF keine weitere Translokation an die Plasmamembran beobachtet werden. Es blieb nach EGF Gabe hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert.