

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Biochemie und Signaltransduktion

Direktor: Prof. Dr. med. Georg W. Mayr

Identifikation nukleärer und subnukleärer Lokalisationssignale in der humanen Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase (IP5K)

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Mario Johannes Kobras
aus Gießen

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am:

27. August 2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. med. GW Mayr

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in:

PD Dr. rer. nat. H.-J. Kreienkamp

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in:

Prof. Dr. rer. nat. W. Hampe

DANKSAGUNG	6
1. EINLEITUNG.....	8
1.1 Der Zellkern und seine Substrukturen	9
1.1.1 Der Nukleolus	10
1.1.2 Cajal Bodies	10
1.1.3 PML Bodies.....	10
1.1.4 Der Nukleäre Porenkomplex (NPC)	11
1.2 Zielsteuerungsdomänen von Proteinen im Zellkern	12
1.2.1 Kernlokalisierungssignale	13
1.2.2 Kernexportsignale	14
1.2.3 Nukleolus-Lokalisierungssignale (NoLS)	15
1.3 Der Inositolphosphat-Metabolismus	16
1.4.1 Nomenklatur der Inositolphosphate	17
1.4.2 Inositolhexakisphosphat	18
1.4.3 Inositolpyrophosphate	21
1.5 Die Enzyme des Inositolphosphatmetabolismus	22
1.5.1 Inositolphosphatphosphatasen (IPP)	22
1.5.2 Die Inositolphosphatkinasen (IPK)	22
1.5.2.1 Die PDKG-Kinasen	22
1.5.2.2 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase	23
1.5.2.3 Weitere Inositolphosphatkinasen	25
1.6 Zielsetzung der Arbeit	26
2. MATERIALIEN UND METHODEN.....	27
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien.....	27
2.1.2 Enzyme	27
2.1.3 Kits.....	27
2.1.4 Bakterienstamm XL1 blue	27
2.1.5 Zelllinien	27
2.1.5.1 NCI-H1299-Zellen (Homo sapiens)	27
2.1.5.2 HeLa-Zellen (Homo sapiens).....	28
2.1.6 Puffer und Lösungen	28
2.1.6.1 Puffer	28
2.1.6.2 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur	28
2.1.6.3 Medium für die Kultivierung von H1299-Zellen bzw. HeLa-Zellen	28
2.1.7 Oligonukleotide.....	29
2.1.7.1 Mutagenese-Primer für die Deletion Leucin reicher Regionen in der IP5K.....	29
2.1.7.2 Mutagenese-Primer zur Erzeugung von Einzelmutationen in Leucin reichen Sequenzen der IP5K.....	29
2.1.7.3 Mutagenese-Primer zum Einfügen der Sequenz L6 (433-FSVSVLDLDDL-442) in die Multiple Cloning Site von pEGFP-C1	30
2.1.7.4 Sequenzier-Primer für die IP5K	30
2.1.7.5 Sequenzier-Primer für die Multiple Cloning Site von pEGFP-C1	30
2.1.7.6 Mutagenese-Primer zur Deletion der Vertebraten-Inserts in der IP5K.....	30
2.1.7.7 Mutagenese-Primer zur Pseudo-Phosphorylierung bzw. -dephosphorylierung C-terminaler SP-Motive im Vertebrateninsert 1 (AS 202-297)	30
2.1.7.8 Mutagenese-Primer zur Untersuchung putativer nukleärer Lokalisationssignale in der IP5K.....	31
2.1.7.9 Mutagenese-Primer zur Untersuchung eines putativen Nukleoli-Lokalisationssignals	31

2.1.8 Vektoren.....	31
2.1.9 Software	32
2.1.10 Geräteliste.....	32
2.1.11 Verbrauchsmaterial.....	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1.1 QuikChange-Mutagenese zur Veränderung von DNA-Sequenzen	34
2.2.1.2 Agarosegel-Elektrophorese	35
2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen (MiniPrep).....	35
2.2.1.4 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA	35
2.2.1.5 Sequenzierung von DNA.....	35
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	36
2.2.2.1 Transformation von E.coli Bakterien mittels Hitzeschock.....	36
2.2.2.2 Wachstum und Lagerung der Bakterienstämme.....	36
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	36
2.2.3.1 Kontinuierliche Kultivierung von H1299- und HeLa-Zellen	36
2.2.3.2 Aussaat eukaryotischer Zellen in Kammerdeckgläsern.....	37
2.2.3.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	37
2.2.3.4 Fixierung und Kernfärbung eukaryotischer Zellen	37
2.2.4 Computergestützte Methoden	38
3. ERGEBNISSE.....	40
3.1 Untersuchung putativer nukleärer Exportsignale der IP5K.....	40
3.1.1 Putative nukleäre Exportsignale der IP5K	41
3.1.2 Die Deletion von Leucin reichen putativen NES in der IP5K führt zu einer Veränderung der intrazellulären Lokalisation der Kinase	42
3.1.3 Untersuchung ausgewählter Leucin reicher Sequenzen der IP5K mittels Substitutionsmutagenese	45
3.1.4 Logarithmische Auswertung der N/C- und Nu/N-Ratio der NES-Mutanten	48
3.1.5 Lokalisation überexprimierter EGFP/IP5K in menschlichen Zellen nach verschiedenen Expressionszeiten	50
3.1.6 Das Peptid L6 ist nicht hinreichend für den nukleären Export von EGFP.....	56
3.2 Deletion mehrerer Leucin reicher Sequenzen in der IP5K.....	58
3.2.1 Suche nach Zielsteuerungsdomänen für Nukleoli in den Leucin reichen Sequenzen der IP5K.....	60
3.3 Suche nach Zielsteuerungsdomänen für Nukleoli in der IP5K anhand eines Konsensus-Signals	64
3.4 Erweiterte Untersuchung des nicht-kanonischen Exportsignals der IP5K	65
3.4.1 Deletion der N-terminalen Vertebrateninsertion der IP5K.....	65
3.4.2 Untersuchung putativer Phosphorylierungsstellen innerhalb der N-terminalen Vertebrateninsertion der IP5K	65
3.4.3 Deletion der C-terminalen Vertebrateninsertion der IP5K	68
3.4.4 Deletion beider Vertebrateninsertionen in der IP5K	68
3.5 Weiterführende Untersuchungen des N-Terminus der IP5K auf NLS-Aktivität	70
4. DISKUSSION	73
4.1 Identifizierung des NLS und nukleolärer Retentionssignale der IP5K.....	73
4.2 Lage der untersuchten Leucin reichen Sequenzen innerhalb der 3D-Struktur der IP5K	76
4.3 Mögliche Gründe für eine Kompartimentierung von IP5K im Kern.....	79
4.4 Die Zielsteuerung der IP5K wird möglicherweise durch Phosphorylierung reguliert.....	80

5. ZUSAMMENFASSUNG	81
6. SUMMARY	82
7. LITERATURVERZEICHNIS	83
8. ANHANG	96
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
LEBENS LAUF	105
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	107

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Georg W. Mayr für die Überlassung der Themen dieser Arbeit und die freundliche und motivierende Unterstützung auf dem Weg zum Erfolg. Persönliche Gespräche und viel Spaß bei der Vorbereitung der Projekte habe ich genauso genossen wie die gemeinsame Vorbereitung der Zusatzqualifikation „Molekulare Medizin“ am UKE. Ich werde die Arbeit im Institut vermissen.

Weiterhin gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe, in der ich die letzten Jahre arbeiten durfte. Hierzu gehören Dr. Marcus Nalaskowski, Dr. Sabine Windhorst (und Ehemann), Susanne Giehler, Lydia Chang, cand. med. Rüdiger Meyer, Nicole Budano, Kerstin Harnack und Birgit Flügge.

Bei Frau Dr. Maria Brehm möchte ich mich besonders für die Vor-Ort- und „Über-See“-Betreuung bedanken. Mit lang anhaltender Geduld und viel Spaß an der Sache hat sie es trotz ihrer eigenen Promotion geschafft, immer wieder Zeit für meine Fragen zu haben.

Meiner Tante Dr. Jamilah Michel und ihren Kollegen, besonders Herrn Dr. Gregor Meiß und Arbeitsgruppe, möchte ich mich für ein wunderschönes Praktikum in Gießen danken, ohne dass ich wohl nie auf die Idee gekommen wäre, mich länger als drei Stunden am Stück ins Labor zu stellen.

Herrn Prof. Dr. Pingoud, dem Direktor des Instituts für Biochemie in Gießen, und Herrn Prof. Banhiamad, dem jetzigen Institutsleiter für Genetik in Jena, möchte ich ebenfalls einen besonderen Dank aussprechen, da ich ohne ihre Zustimmung nicht die Möglichkeit gehabt hätte, meine ersten Projekterfahrungen im Labor zu bekommen. Ohne diese wäre es wahrscheinlich sehr viel schwieriger gewesen, in meine Arbeit in Hamburg einzusteigen.

Meiner Patentante Prof. Dr. Jeannette Schmid danke ich recht herzlich für ihre Geduld, mir die Grundlagen der Statistik immer noch einmal mehr zu erklären.

Herr Dr. med. Dr. med. dent. Posukidis hat mich während meines Studiums immer wieder mit Anekdoten über sein eigenes Studium in Hamburg unterhalten und mich in allen Lebenslagen mit Weisheiten und vielen Büchern unterstützt. Dafür möchte ich ihm herzlich danken.

Frau Dr. med. Sabine Wedekind hat mich während der Examensvorbereitung und auch danach in der klinischen Medizin ausgebildet und mir während dieser Zeit immer wieder den richtigen Tritt gegeben, um bei der Dissertation am Ball zu bleiben. Dafür möchte ich sehr danken.

Meinen Großeltern möchte ich dafür danken, dass sie auch aus der weiten Ferne des Bundesgebietes an meinem Erfolg mitgeholfen haben. Ohne den einen oder anderen Schubser in die richtige Richtung wäre es vielleicht nie soweit gekommen.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich für die Zeit danken, in der sie immer an mich geglaubt haben und auch in schweren Zeiten für mich da waren.

Kerstin danke ich von ganzem Herzen für all die langen Monate im Klinischen Abschnitt und in der Examenszeit, in der sie meiner Abwesenheit und meinen ständig wechselnden Launen ausgesetzt war und es trotzdem mit mir ausgehalten hat.

1. Einleitung

Die Zellen des menschlichen Körpers leiten äußere Signale aus dem Extrazellulärraum in intrazellulären Kaskaden weiter, um eine physiologische Antwort zu erzeugen. Dabei wird auf einen äußeren Reiz, z. B. ein Hormon, ein intrazellulärer Signalweg aktiviert, der häufig mit Hilfe von sekundären Botenstoffen („second messengers“) zur Verarbeitung des Signales führt. Eine besonders wichtige Gruppe von sekundären Botenstoffen wird von den Inositolphosphaten gebildet. Das *myo*-Inositol-(1,4,5)-trisphosphat spielt zum Beispiel eine entscheidende Rolle als sekundärer Botenstoff bei der Kalziumhomöostase und der Kalzium abhängigen Signaltransduktion. Aber auch weitere Inositolphosphate haben einen wichtigen Stellenwert in vielfältigen, biologischen Prozessen (Suh et al., 2008, Berridge et al., 2000, Irvine et al., 2001).

Inositolphosphate sind zyklische Hexanhexole, die an ihren OH-Gruppen in zahlreichen Kombinationen phosphoryliert werden können. Hierdurch wird der Energiezustand des Moleküls verändert. Es existiert eine große Klasse von Inositol umsetzenden Kinasen, die die verschiedenen Phosphorylierungszustände erzeugen. Jedes entstehende Inositolphosphat hat, je nach Anzahl und Orientierung seiner Phosphatgruppen, eine andere Aufgabe und kann damit unterschiedliche Signalwege innerhalb der Zelle vermitteln.

Es wird seit einiger Zeit diskutiert, dass es einen eigenständigen Inositolstoffwechsel im Zellkern gibt (Monserate und York 2010). Deshalb wird in der Arbeitsgruppe von Prof. Mayr daran gearbeitet, ein möglichst vollständiges Bild über die Zielsteuerung der am Inositolstoffwechsel beteiligten Kinasen zu gewinnen.

Das Augenmerk der vorliegenden Studie liegt auf der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase (IP5K). Sie ist das Enzym, welches im Menschen das Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat (InsP₆) herstellt.

InsP₆ werden essentielle Rollen in wichtigen nukleären Prozessen wie dem Chromatinremodeling und dem „non-homologous end-joining“ von DNA-Doppelstrangbrüchen zugeschrieben (Byrum et al., 2004). Außerdem fungiert InsP₆ als strukturgebender Faktor von RNA editierenden Proteinen in der Hefe (Macbeth et al., 2005). Da InsP₆ als nicht frei-diffusibel gilt, und es vermutlich rasch Magnesiumkomplexe bildet (Torres et al., 2005), wird vermutet, dass InsP₆ dort synthetisiert werden muss, wo es als Ligand/Modulator gebraucht wird. Daher ist es für die Arbeitsgruppe von Prof. Mayr von größtem Interesse, die nukleäre und nukleoläre Zielsteuerung der IP5K aufzuklären. Damit könnten Hinweise auf den Mechanismus erhalten werden, durch den InsP₆ und die IP5K die angesprochenen nukleären Prozesse beeinflussen.

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnte das Kernexportsignal der IP5K auf den Aminosäurebereich 200-300, und das Kernimportsignal auf den Aminosäurebereich 1-180 eingegrenzt werden (Brehm et al., 2007). Welche einzelnen Aminosäuren innerhalb dieser Sequenzen aber essentiell für die Transportfunktionen sind, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, da beide Signale keine bekannte Konsensussequenz besitzen. Ebenso ist noch nicht bekannt, ob weitere Signale den nukleozytoplasmatischen Transport vermitteln können. Des Weiteren wurde in verschiedenen Experimenten beobachtet, dass die Kinase eine starke Affinität zu Nukleoli und zu neu synthetisierter mRNA besitzt. Auch hierfür ist bisher keine Erklärung gefunden worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb die subzellulären Zielsteuerungssignale der IP5K für den Kernimport und –export, sowie für Nukleoli näher zu charakterisieren.

1.1 Der Zellkern und seine Substrukturen

Der Kern einer Eukaryotenzelle ist die Speicherstätte der Erbinformation des Gesamtorganismus. Diese Information ist in der DNA der Chromosomen gespeichert. Die Chromosomen, die mikroskopisch nur während der Teilungsphase sichtbar sind, sind aber nicht die einzigen Strukturen des Kerns (O'Keefe et al., 1992). Tatsächlich kann man von nukleären Organellen sprechen. Im Gegensatz zu zytosolischen Organellen besitzen sie keine eigene Membran (Dawson et al., 2009). Wie die Abgrenzung gegenüber dem restlichen Kern funktioniert, ist bisher noch unklar (Handwerger et al., 2005, Muro et al., 2010). Das prominenteste Organell des Kerns ist zweifellos der Nukleolus, der schon vor über 200 Jahren im Lichtmikroskop entdeckt wurde. Weitere Beispiele sind die Cajal- und die PML-Körper (Garrison 1929, Deryusheva und Gall 2009).

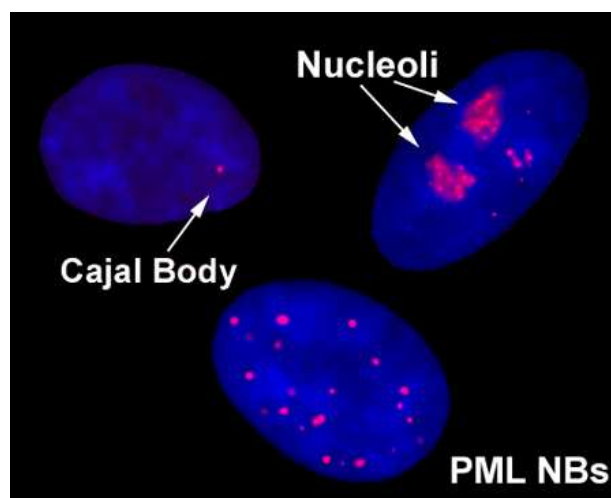


Abbildung 1-1: Darstellung ausgewählter subnukleärer Strukturen im Zellkern eukaryotischer Zellen (Dellaire und Bazett-Jones 2004).

1.1.1 Der Nukleolus

Der Nukleolus wurde schon sehr früh mit Hilfe des Lichtmikroskops als prominenter lichtdichter Fleck im Karyoplasma von eukaryotischen Zellen entdeckt. Heute weiß man, dass die Dichte eines Nukleolus doppelt so groß ist wie die Dichte des Zytoplasmas einer Zelle (Handwerger et al., 2005). Er besteht aus hochkondensiertem Chromatin, das auch während der Interphase nicht decondensiert wird. Im Nukleolus werden rRNAs, sowie kleine RNAs hergestellt und prozessiert und es erfolgt die Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten aus r-Proteinen und ribosomalen RNAs (Mélèse et al., 1995, Lam et al., 2005, Paushkin et al., 2004). Außerdem ist der Nukleolus an der DNA-Reparatur und der Zellzyklussteuerung beteiligt (van den Boom et al., 2004, Shou et al., 1999, 2001). Seit neuestem wird versucht, die Proteine des Nukleolus miteinander in Beziehung zu setzen, um sie den verschiedenen Aufgaben des Nukleolus zuzuordnen (Scott et al., 2011, Muro et al., 2010). Etwa 90% der Proteine des nukleolären Proteoms des Menschen, sind zu denen aus Hefe-Nukleoli homolog (Andersen et al., 2002, 2005, Leung et al., 2003).

Ein Nukleolus kann elektronenmikroskopisch in verschiedene Areale unterteilt werden. Diese heißen Fibrilläres Zentrum (FC), Dichtes Fibrilläres Zentrum (DFC) und Granuläre Komponenten (GC). Um einen Nukleolus herum befindet sich eine Hülle aus kondensiertem und offensichtlich für die Nukleoli essentiellm Chromatin. Dieses Chromatin durchbricht den Strukturkörper und reicht bis an das FC heran. Während der Mitose löst sich die Struktur des Nukleolus auf. Zum Ende der Telophase setzen sich die Nukleoli wieder zusammen. Die Gene für die nur im Nukleolus produzierten ribosomalen RNAs (rRNAs) befinden sich in als Repeats angeordneten Regionen, die als „Nukleoläre Organisationsregionen“ (NOR) bezeichnet werden. Sie befinden sich auf den akrozentrischen Chromosomen (Boisvert et al., 2007, Scheer et al., 1993).

1.1.2 Cajal Bodies

Cajal Bodies sind Substrukturen des Zellkerns von Eukaryoten, die vor mehr als 100 Jahren durch Ramon y Cayal entdeckt wurden (Garrison, 1929). Sie enthalten scaRNA, welche zu den small nuclear RNAs (snRNAs) gehört. Ihre Funktion liegt vermutlich im Recycling und der Herstellung spliceosomaler snRNPs. Sie katalysieren die Modifikation von snRNAs (Deryusha und Gall, 2009).

1.1.3 PML Bodies

PML Bodies sind subnukleäre Formationen, die nach dem „promyelocytic leukemia protein“ (PML) benannt wurden, welches ursprünglich bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie gefunden wurde. Dieses und viele andere Proteine, die mit Apoptose, DNA-Reparatur,

Ubiquitinierung, posttranslationaler Modifikation und diversen zellregulatorischen Aufgaben assoziiert sind, unterliegen offensichtlich einer Zielsteuerung zu diesen Strukturen. Die Struktur eines PML Körperchens wird durch SUMOylierung des PML Proteins aufrechterhalten (Sarkari et al., 2011, Ishov et al., 1999).

1.1.4 Der Nukleäre Porenkomplex (NPC)

Alle nukleären Organellen bestehen aus Proteinen, die ausnahmslos im Zytoplasma synthetisiert werden. Um in den Kern zu gelangen müssen sie den nukleären Kernporenkomplex passieren. Proteine, die die Größe von 50 kDa überschreiten, können nicht durch passive Diffusion durch die Kernporen gelangen, sondern müssen unter ATP-Verbrauch transportiert werden (Görlich und Kutay 1999). Für den Aufbau des NPC sind Reticulons und der Proteinkomplex Yop1/DP1 essentiell. Es handelt sich dabei um hoch konservierte Proteine. Es konnte gezeigt werden, dass Aminosäureaustausche bzw. – deletionen in einem Yop1/DP1-GFP-Fusionsprotein, das in *S. cerevisiae* exprimiert wird, zum Funktionsverlust des NPC führen. Grund dafür ist eine Akkumulation des hergestellten Proteinkomplexes. Import- und Exportvorgänge sind dann nicht länger möglich (Dawson et al., 2009). Das Protein Rtn4a scheint ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der NPC Formation zu spielen, da bei einer gezielten Deaktivierung des Proteins die de novo Formation empfindlich gestört wird (Dawson et al., 2009).

Damit der Porenkomplex als Ganzes funktionieren kann, müssen die innere und äußere Membran der Kerndoppelmembran verschmolzen werden. Diese stabile Fusion wird in Hefen u. a. durch die „Pore Outer Membrane“ Proteine Pom152, Pom34 und Ndc1 vermittelt (Wozniak et al., 1994). In Vertebraten werden unter anderem gp210, Pom121 (**Abbildung 1-2**) und Ndc1 (Greber et al., 1990) benötigt. Der nukleäre NLS-gesteuerte Import wird durch die Karyopherin Transporter Rezeptor (Kap Transporter Rezeptor) Familie vermittelt. Kap95 ist dabei eines der wichtigsten Regulatorproteine während des Aufbaus von NPC (Ryan et al., 2007). Dies gilt ebenso für das Protein Pom34 (Miao et al., 2006). Es kommt in Interphase-Zellen zum verstärkten GTPase-abhängigen Inserieren von Kap95 in die intakte Kernhülle, wodurch der Aufbaumechanismus offenbar ausgelöst wird (Ryan et al., 2007). Ran-GAP moduliert beim Aufbau auf bisher nicht vollständig geklärte Weise Karyopherine. Beim Fehlen dieses Vorgangs bleibt der NPC funktionslos.

Nucleoporine (Nups) sind hoch-konservierte Proteine, die die Struktur eines funktionellen NPC aufrechterhalten. Zusätzlich werden mit ihnen ringförmige Formationen gebildet, die die NPC in der Kernmembran verankern (Rout et al., 2000, Cronshaw et al., 2002, Vasu und Forbes 2001, Suntharalingam und Went 2003, Dasso 2002, Quimby und Dasso 2003,

Bischoff et al., 1995). Nups enthalten folgende Konsensusmotive (Aminosäuren im Einbuchstabencode notiert): GLFG oder FxFG. Diese sogenannten FG repeats vermitteln den Transport großer Moleküle durch die Kernporen (Terry et al., 2007).

Für den Export von mRNA durch die Kernporen werden zwei Substrukturen im NPC benötigt, der zytoplasmatische Ring mit seinen Filamenten (cytoplasmic ring and filaments) und die nukleäre Korbstruktur (nuclear basket) (**Abbildung 1-2**). Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion einer dieser Strukturen zur Inhibition des mRNA Transportes führt (Terry und Wente 2007).

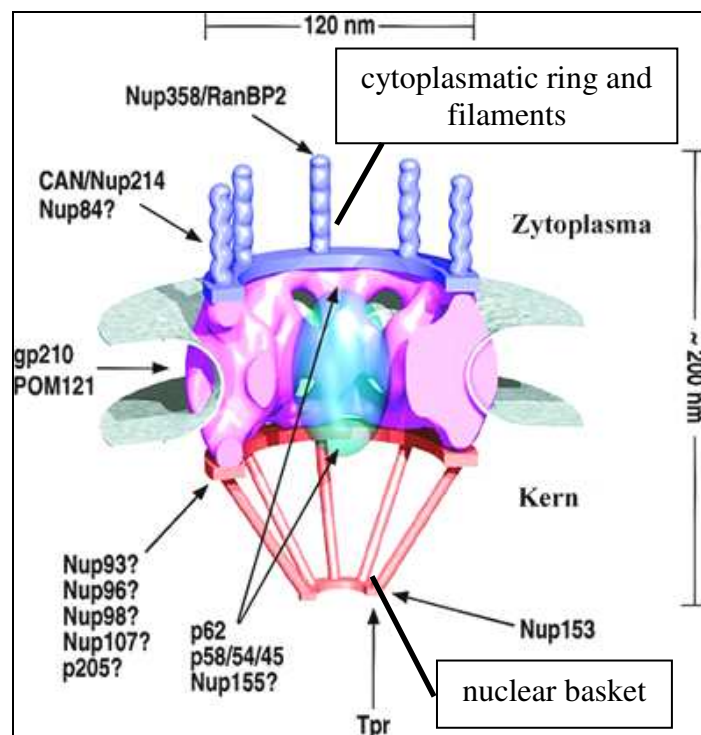


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes einer eukaryotischen Zelle (Nakielny und Dreyfuss 1999).

1.2 Zielsteuerungsdomänen von Proteinen im Zellkern

Die Kernhülle trennt die DNA vom Rest einer eukaryotischen Zelle. Bei der Expression eines Gens wird zunächst DNA zu RNA transkribiert und diese durch 5' und - 3'-Modifikation zur mRNA gespliced. Als nächstes wird die reife mRNA durch die Kernporen in das Zytoplasma zu den Ribosomen transportiert und dort translatiert. Fertige Proteine können auf drei verschiedene Arten zwischen Zytoplasma und Kern transportiert werden. Der Durchmesser eines Porenkanals beträgt etwa 10nm. Proteine, kleiner als 5kD, sind in der Lage durch die Poren frei und rasch zu diffundieren. Bis zu einer Größe von 50kD können die meisten Proteine nach wie vor diffundieren, benötigen aber erheblich mehr Zeit. Größere Proteine müssen aktiv transportiert werden. Es existieren in vielen Proteinen sogenannte

Kernlokalisationssequenzen (NLS) und/oder Kernexportsignale (NES), die von Transportproteinen gebunden werden können (Görlich und Kutay 1999). Beim Transport eines großen Moleküls durch die Kernporen stellen die FG-Domänen in den Nucleoporinen des NPC einen unverzichtbaren Teil des zu passierenden Porenkanals dar (Breeuwer und Goldfarb 1990, Zasloff 1983). Der Transport durch diesen Kanal benötigt Enthalpie. Lediglich das Dissoziieren der Fracht vom Transportprotein verbraucht offensichtlich Energie (Görlich und Kutay 1999).

Beispiele für Transportproteine (Carrier) sind die sogenannten Karyopherine, die je nach ihrer Transportrichtung als Exportine bzw. Importine bezeichnet werden. Sie interagieren stark mit dem NPC, wodurch der Translokationsvorgang ausgelöst wird. Karyopherin β ist in der Lage, ein zu transportierendes Protein mit passendem NLS direkt zu binden. Es kann außerdem an das Adapterprotein Karyopherin α und an RanGAP binden (**Abbildung 1-3**) (Görlich und Kutay 1999). Eine übergeordnete Kontrolle aller Importprozesse erfolgt häufig über eine posttranslationale Modifikation der teilnehmenden Proteine, z. B. durch Methylierung oder Phosphorylierung. Die Helicase A beispielsweise erfährt durch eine derartige Modifikation einen Import-Block (Burks et al., 2007, Hodge et al., 1999).

1.2.1 Kernlokalisierungssignale

Es existieren verschiedene kanonische Kernlokalisierungssignale (NLS), die den Kernimport von Proteinen vermitteln können. Das klassische am häufigsten verwendete monopartite NLS enthält drei bis vier basische Aminosäuren mit der Konsensussequenz (R/K)(R/K)(R/K)((R/K)/H/P) oder P-X(3)-(R/K)(R/K)(R/K)(X/R/K) (Görlich und Kutay 1999) (Standard-Einbuchstaben Prosite Motiv Notation). Bipartite NLS haben folgende Konsensussequenz: KRR-X(10-12)-KR (Fontes et al., 2000, 2003). Das NLS wird von einem Komplex aus Importin α und β gebunden (**Abbildung 1-3**; Importin α = gelb, Importin β = grün). Anschließend interagiert der ternäre Komplex mit den Kernporenkomplexen und wird in den Kern transportiert. Zwischen Kern und Zytoplasma herrscht ein RanGTP-Gradient der in Richtung Zytoplasma abfällt. Durch Bindung von RanGTP und CAS wird Importin zurück in das Zytoplasma transportiert, während das transportierte Protein im Kern verbleibt. Im Zytoplasma wird RanGTP durch das Enzym RanGAP1 zu RanGDP hydrolysiert, wodurch der Gradient an RanGTP aufrechterhalten bleibt. Die Importine werden wieder frei. RanGDP bildet im Zytoplasma einen Komplex mit dem Importin NTF2, der durch den Porenkomplex in den Kern relokalisiert. Dort wird RanGDP durch RanGEF re-phosphoryliert, welches am Chromatin lokalisiert ist (Terry et al., 2007). Hierdurch wird ebenfalls der Gradient an RanGTP aufrechterhalten (**Abbildung 1-3**; RanGTP = ockergelb).

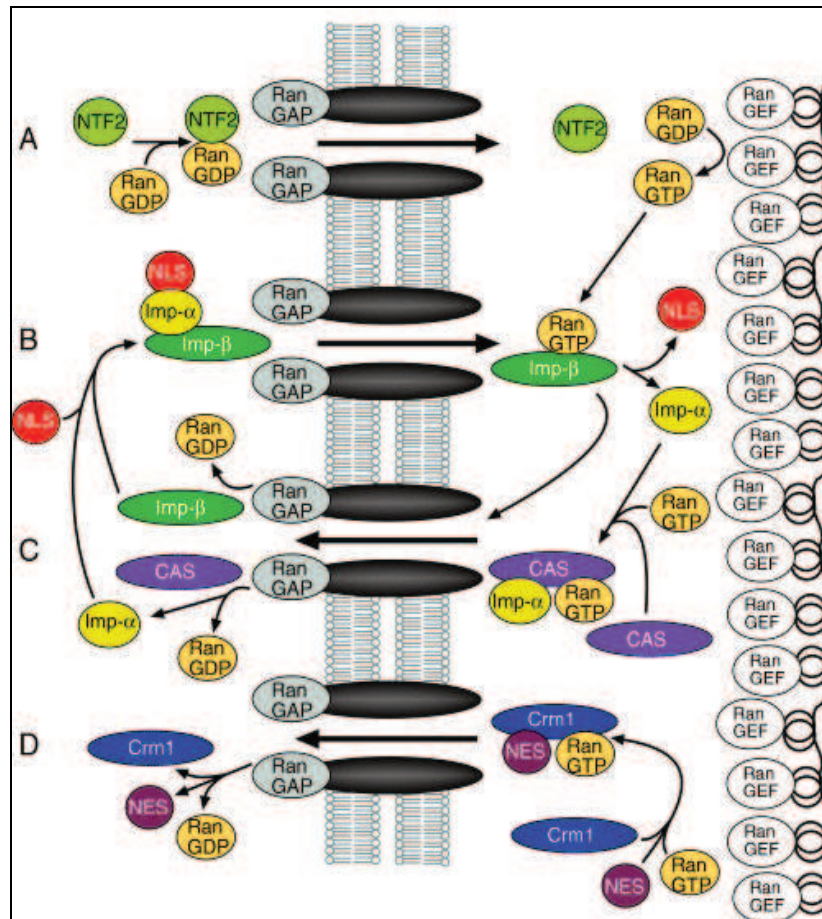


Abbildung 1-3: Überblick über die wichtigsten nukleären Import- und Exportmechanismen für Proteine in tierischen Zellen.

A: NTF2 (nuclear transport factor 2) vermittelter nukleärer Import von RanGDP. **B:** Nukleärer Import von NLS tragenden Frachtproteinen, mediert durch das Karyopherin-α/Importin-β1-Heterodimer (abgekürzt imp-α und imp-β). **C:** Nukleärer Export von Importin-β1 und Karyopherin-α. Letzterer benötigt CAS als Exportrezeptor. **D:** Nukleärer Export von NES tragenden Frachtproteinen, vermittelt durch Crm1. RanGAP liegt gebunden an der zytosolischen Seite des NPC vor, RanGEF ist am Chromatin lokalisiert (Pemberton und Paschal 2005).

1.2.2 Kernexportsignale

Große Komplexe wie mRNA/Proteinkomplexe, Ribosomen und verschiedene Einzel-Proteine müssen aktiv aus dem Kern heraus transportiert werden. Kernexportsignale (NES), die der Rev-Konsensussequenz aus HIV entsprechen, weisen viele Leucine auf und haben folgendes Motiv: L-X(2-3)-[LIVFM]-X(2-3)-L-X-[LI] (la Cour et al., 2003). Das NES wird im Kern von Exportinen erkannt und gebunden. Der Komplex bindet an RanGTP und wird nun von CAN/NUP214 (Crm1) erkannt, die gemeinsam an den Kernporenkomplex binden und schließlich aus dem Kern transportiert werden (Pemberton und Paschal 2005, **Abbildung 1-3**). Dieser Vorgang kann durch Inkubation mit Leptomycin B (LMB) blockiert werden (Kudo et al., 1998).

Der Export von mRNA erfolgt mittels des Exportproteins mNxf1/TAP, welches mit Ntf2, RanGTP und p15/NXT1 einen Transportkomplex bildet (Gruter et al., 1998, Irvine et al., 2004). Ein ähnlicher Vorgang findet in der Hefe zwischen dem Heterodimer yMtr2/yMex67 bzw. mNxt1/p15/yMex67 statt. yMex67, das wiederum ein Komplex aus den Proteinen Nxf1 und TAP ist, interagiert gemeinsam mit Mtr2 mit dem Kernporenkomplex (Rodriguez et al., 2004).

Das Tumorsuppressor Protein p53 pendelt zwischen Kern und Zytoplasma hin und her. Bei zellulärem Stress wird sein NES posttranslational modifiziert und dadurch maskiert. Das p53 verbleibt im Kern und bildet Tetramere. Hierdurch und eine poly-ADP-ribosylierung kann p53 nicht mehr mit Crm1 interagieren, wodurch zu einer Retention im Kern kommt (Fornerod et al., 1997, Kudo 1998).

1.2.3 Nukleolus-Lokalisationssignale (NoLS)

Viele Proteine, insbesondere die die an der Synthese von ribosomaler RNA beteiligt sind, unterliegen einer Zielsteuerung in den Nukleolus. Es konnten Signale identifiziert werden, die für die Lokalisation dieser Proteine im Nukleolus sorgen, ohne dabei direkten Einfluss auf ihren nukleären Import zu haben. Es wird dabei zwischen NoLS (Nucleolar Localization Signal) und NoRS (Nucleolar Retention Signal) unterschieden (Weber et al., 2000, Catez et al., 2002, Hiscox et al., 2002, Tsai und McCay 2005, Reed et al., 2006).

Eines der ältesten Beispiele ist das NoLS des Humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) (Vives et al., 1997, Rizos et al., 2000). Eine Splicevariante des antiapoptotischen Survivins, das Survivin-deltaEx3 (Song et al., 2005) besitzt ebenfalls ein eigenständiges NoLS.

Des Weiteren wurden in der Literatur NoDS^{H+} (nucleolar detention signal regulated by protons) beschrieben, die ihre Rückhaltefunktion im Nukleolus nur nach Bindung von Protonen ausüben können. NoDS^{H+} konnten in den folgenden Proteinen gefunden werden: im Apoptoseregulator cIAP2, im von-Hippel-Lindau Ubiquitinierungsfaktor VHL (Mekhail 2004, 2005, 2006), im Hitzeschockprotein HSC70 und im Transkriptionsregulator RNF8 (Mekhail et al., 2007).

Das Protein MDM2 ist ein Regulator des p53. Es besitzt ein kryptisches Lokalisationssignal für die Nukleoli, das nur in gestressten Zellen aktiv wird. Es hat die Aminosäuresequenz 466-KKLKKRKNK-473 (Lohrum et al., 2000).

Passend zu der Aussage von Andersen et al. in 2005, dass Nukleoli aktiv Proteine ein- und ausschleusen können, schlugen Mekhail und Mitarbeiter, drei Bedingungen für die Erfüllung eines Konsenssignals für die Nukleoluslokalisierung anhand des von-Hippel-Lindau Suppressor Proteins (VHL) vor (Mekhail, et al., 2007). Essentiell für ein funktionierendes

Signal ist erstens eine Region in der Proteinstruktur, die die Autoren als STAD (Subnuclear targeting arginine domain) bezeichnen. In VHL gibt es zwei solcher Domänen, nämlich 107-**RR**IHSY**R**-113 und 176-**RR**LDIV**R**-182. Daraus wurde das Konsensus-Motiv **RR(L/I)X₃R** abgeleitet. Auffällig an diesem Konsensus-Motiv sind die jeweils endständigen, positiv geladenen Arginine (R), die ein hydrophobes Leucin (L) bzw. Isoleucin (I) einschließen. Zweitens muss das nukleäre Protein sogenannte STHD Domänen (subnuclear targeting hydrophobic domain) besitzen. Diese bestehen aus kurzen Sequenzen wie: LWL, LLV, LFV, LQV. Drittens müssen sich die Domänen in Regionen befinden, die eine besonders hohe Wahrscheinlichkeit für strukturelle Unordnung aufweisen. Für die Prädiktion solcher Regionen kann beispielsweise das Programm DisEMBL verwendet werden (<http://dis.embl.de/>).

1.3 Der Inositolphosphat-Metabolismus

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der nukleären Zielsteuerung der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase (IP5K oder Ipk1), die im Menschen die Phosphorylierung von Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat zu Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat (InsP₆ oder „Phytat“) katalysiert. Deshalb wird nachfolgend der Inositolphosphat-Metabolismus erläutert.

Inositole sind Cyclohexanhexole mit der Formel C₆H₁₂O₆. Am häufigsten kommt in der Natur das *myo*-Inositol vor. Der Mensch kann Inositole aus Glukose über Inosose synthetisieren oder über die Nahrung aufnehmen. *myo*-Inositol kann auch über die Dephosphorylierung von *myo*-Inositolmonophosphaten hergestellt werden (Wong et al., 1987). In Nierenzellen und Neuronen wurde gefunden, dass die Inositolphosphate u. a. für die Aufrechterhaltung des intrazellulären osmotischen Drucks mit verantwortlich sind (Yamashita et al., 1999). Außerdem spielen *myo*-Inositolphosphate eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion als Vorläufer des Phosphatidyl-4,5-bisphosphates (PIP₂), welches essentiell für die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern ist. Aus *myo*-Inositolphosphat stellt die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) G-Protein-vermittelt PIP₂ her. Die Phospholipase C spaltet PIP₂ in InsP₃ und DAG (Diacylglycerol). Bindet InsP₃ an den InsP₃-Rezeptor im ER, so werden Ca²⁺-Ionen freigesetzt. Dieses Signal wird von Phosphatasen gestoppt, die das InsP₃ dephosphorylieren (Communi et al., 1997). Es gibt aber auch Kinasen, die InsP₃ zu höher phosphorylierten und pyrophosphorylierten InsPs umsetzen können (Shears 2004, Xia und Wang 2005) (**Abbildung 1-4**).

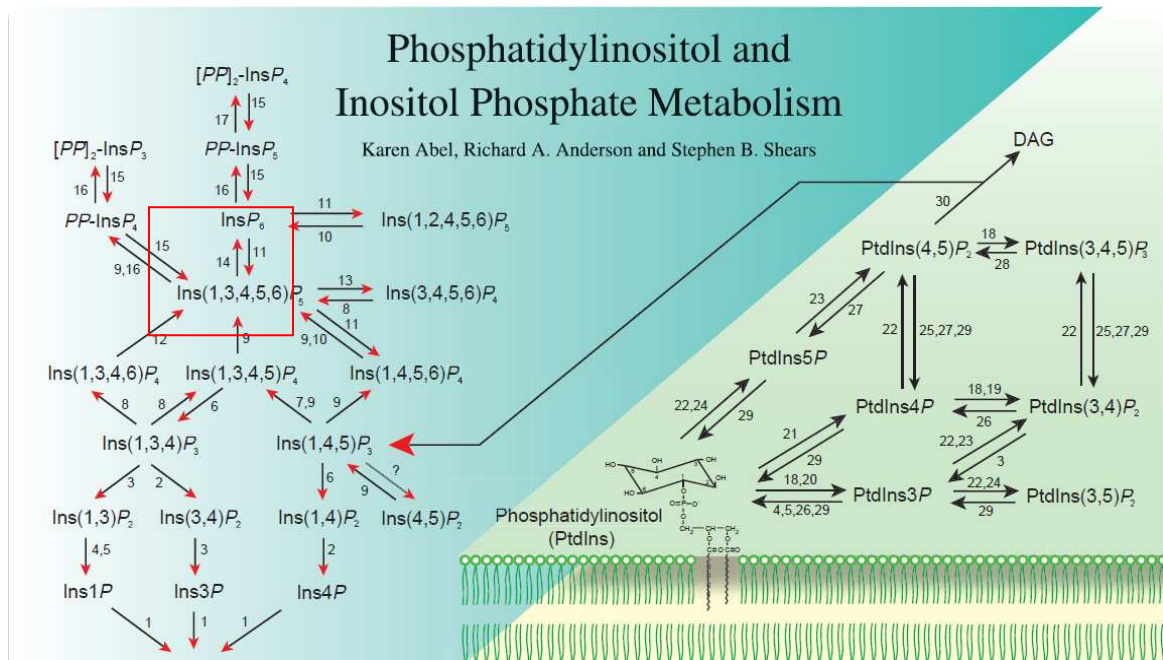


Abbildung 1-4: Übersicht über den Metabolismus der Phosphatidylinositole und Inositolphosphate.

Rot umrandet sind das Substrat (InsP5) und das Produkt (InsP6) der IP5K. **1.** Inositol Monophosphatase; **2.** Ins(1,4)P2/Ins(1,3,4)P3-1-Phosphatase; **3.** Ins(1,3,4)P3/Ins(3,4)P2/PtdIns(3,4)P2-4-Phosphatase; **4.** Ins(1,3)P2/PtdIns3P-3-Phosphatase Typ I; **5.** Ins(1,3)P2/PtdIns3P-3-Phosphatase Typ II; **6.** Ins(1,4,5)P3/Ins(1,3,4,5)P4-5-Phosphatase; **7.** Ins(1,4,5)P3-3-Kinase; **8.** Ins(1,3,4)P3/Ins(1,3,4,5)P4-1-Kinase; **9.** Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK); **10.** Ins(1,4,5,6)P4/Ins(1,2,4,5,6)P5-3-Kinase; **11.** Multiple Inositol Polyphosphatphosphatase; **12.** Ins(1,3,4,6)P4-5-Kinase; **13.** Ins(1,3,4,5,6)P5-1-Phosphatase; **14.** Ins(1,3,4,5,6)P5-2-Kinase oder InsP5-2K; **15.** Diphosphoinositol Polyphosphat Phosphohydrolase; **16.** Diphosphoinositol Polyphosphat Synthase (InsP6-Kinase); **17.** Bis-Diphosphoinositol Polyphosphat Synthase; **18.** Phosphoinositid-3-Kinase Typ I; **19.** Phosphoinositid-3-Kinase Typ II; **20.** Phosphoinositid-3-Kinase Typ III; **21.** PtdIns-4-Kinase; **22.** PtdInsP-Kinase Typ I; **23.** PtdInsP-Kinase Typ II; **24.** PtdInsP-Kinase Typ III; **25.** PtdIns(4,5)P2/PtdIns(3,4,5)P3-5-Phosphatase; **26.** PtdIns polyphosphat-3-Phosphatase; **27.** SHIP; **28.** PTEN (Phosphatase und Tensin homolog); **29.** Synaptojanin; **30.** Phospholipase C; PtdIns= Phosphatidylinositol (z. B. PtdIns(4,5)P2 – Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat); Ins= Inositol (z. B. Ins(1,3,4,5)P4– Inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphat); PP-IP5= Diphosphoinositolpentakisphosphat(InsP7), [PP]2-IP4= Bisdiphosphoinosiltetrakisphosphat (InsP8).

1.4.1 Nomenklatur der Inositolphosphate

Inositol wurde erstmals von Joseph Scherer aus Muskelgewebe isoliert (Kompanje et al., 2007, Scherer 1850,1851). Es existieren neun verschiedene Isomere, wobei das *myo*-Inositol dasjenige zu sein scheint, welches am ehesten für die Verwendung als Signalmolekül geeignet ist (Kersting et al., 2003). Bisher konnten 37 Inositolisomere in verschiedenen biologischen Systemen identifiziert werden (Irvine et al., 2005, York et al., 2006). Interessant ist, dass das *myo*-Inositol bereits bei Archaeabakterien vor 2 Milliarden Jahren synthetisiert und metabolisiert werden konnte (Michell, 2007).

Zur Nomenklatur: Am Inositolring befinden sich insgesamt sechs Hydroxylgruppen. Jede davon kann phosphoryliert werden. Es ergeben sich mathematisch 63 Isomer-

Kombinationsmöglichkeiten ($2^n - 1$, $n = 6$). Eine bildhafte Darstellung liefert Agranoffs Schildkröte (1978) (**Abbildung 1-5**). Die Schildkröte stellt *myo*-Inositol in der sogenannten Sesselkonformation dar. Das rechte Bein markiert die D1-Position. Die Nummerierung der C-Atome des Rings erfolgt gegen den Uhrzeigersinn.

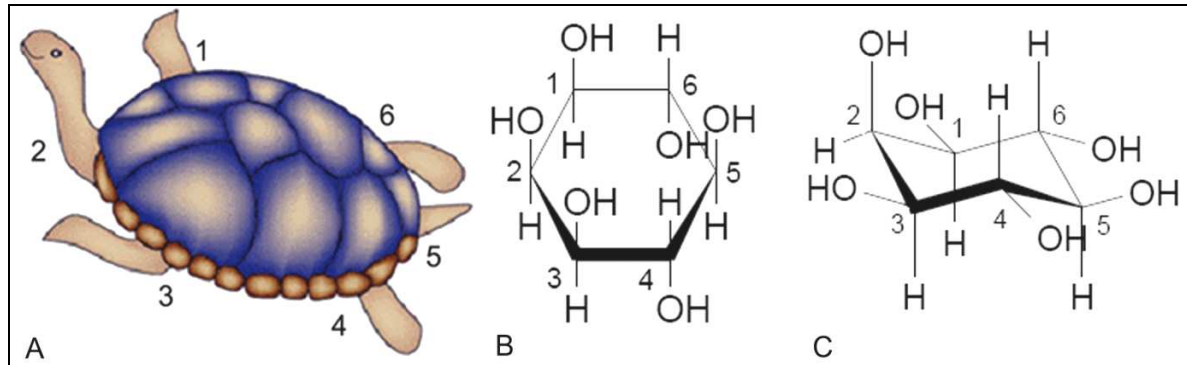


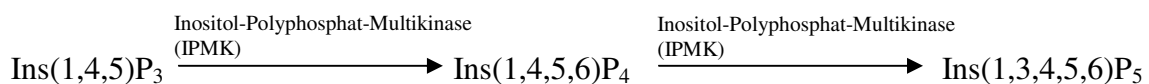
Abbildung 1-5: Drei Darstellungsmöglichkeiten für *myo*-Inositol.

A: Agranoffs Schildkröte stellt eine graphische Gedächtnishilfe bei der Nummerierung der InsPs dar. Das rechte Vorderbein markiert die D-1'-Position, von dort aus wird gegen den Uhrzeigersinn nummeriert (Agranoff, 1978). **B:** Strukturformel von *myo*-Inositol. **C** Strukturformel von *myo*-Inositol in der Sesselkonformation.

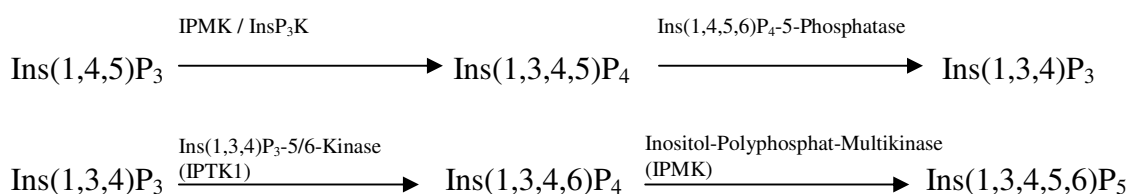
1.4.2 Inositolhexakisphosphat

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der Kinase, die aus InsP_5 InsP_6 herstellt, daher wird hier nur auf diese beiden Inositolphosphate näher eingegangen. In eukaryotischen Zellen liegt das Inositolpentakisphosphat (InsP_5) zu 95% als $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -Isomer vor. Es ist die direkte Vorstufe zum InsP_6 . Aus InsP_5 können viele weitere höher phosphorylierte Inositolphosphate hergestellt werden. Der Hauptsyntheseweg verläuft folgendermaßen (Fuji und York, 2005, Seeds et al., 2004):

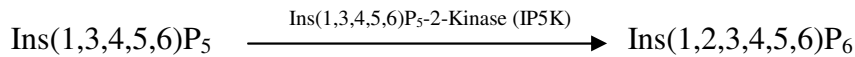
In der Hefe:



In Vertebraten:



Gemeinsame Endstrecke:



Im Menschen wird Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat (InsP₆ oder „Phytat“) somit aus Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat hergestellt. Hierfür verantwortlich ist die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase (IP5K oder Ipk1). Ursprünglich wurde InsP₆ als Phosphatspeicher in Pflanzen nachgewiesen (Ives et al., 2000, Raboy 1990, Drøbak 1992, Cosgrove 1963, Posternak und Posternak 1929).

In der Hefe konnte gezeigt werden, dass InsP₄, InsP₅ und InsP₆ an der Chromatinremodellierung beteiligt sind (Shen et al., 2003). InsP₆ inhibiert hierbei das Mobilisieren des Nukleosoms, in welchem es mit den Proteinen NURF, ISW2 und INO80 Komplexe bildet (Shen et al., 2003). In Vögeln senkt es die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, indem es an bestimmten Bindungsstellen als Ligand gebunden wird und hierdurch eine Konformationsänderung hervorruft (Knapp et al., 1999). Damit wird die Sauerstoffaffinität im Sinne des Bohr Effektes beeinflusst (Coates, 1975). Ähnliches wurde in dem arktischen Fisch *Anarhichas minor* entdeckt (Verde und Prisco, 2002). Eine Wirkung als Neurotransmitter wurde in Amphibien vermutet (Menniti et al., 1993).

InsP₅ und InsP₆ hemmen die InsP₄-3-phosphatase (Genname MINPP1) und die InsP₃/InsP₄-5-Phosphatase (Genname INPP5B) (Veiga et al., 2006, 2009, Höer und Oberdisse, 1991), was eine Produktion von InsP₅ und InsP₆ im Rahmen einer negativen Rückkopplung hemmt und damit ein Überangebot von höher phosphorylierten Inositolphosphaten vermeidet.

In den β -Pankreaszellen von Säugern wurde gezeigt, dass InsP₆ Serin/Threonin-Proteinphosphatasen inhibiert, wodurch es zu einer Aktivitätssteigerung von Kalziumkanälen kommt (Campbell et al, 1997, Speed et al., 1996). Durch die Fähigkeit, Kanäle zu beeinflussen, erhält InsP₆ auch eine Rolle in der neuronalen Informationsweiterleitung (Lu et al., 2002). Außerdem ist in Tiermodellen nachgewiesen worden, dass extrazelluläres InsP₆ eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum hat (Ferry et al., 2002).

InsP₆ spielt außerdem eine Rolle bei der Regulierung verschiedener biologischer Vorgänge als Co-Stimulator, indem es an Adaptorproteine bindet und diese in ihrer Funktion modifiziert. Auf diese Weise kann InsP₆ die Funktion von Clathrin in der Zelle stimulieren und die Vesikelbildung damit hemmen (Ye et al., 1995, Norris et al., 1995).

Es wurde gezeigt, dass InsP₆ spezifisch an die Ku Komponenten der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) bindet und so ihre Aktivität im NHEJ (non-homologous end-

joining) von DNA-Doppelstrangbrüchen steigert (Byrum et al., 2004). Das humane RNA editierende Enzym ADAR2 und das tRNA editierende ADAT1 in *S. cerevisiae* benötigen beide InsP_6 als strukturbildenden Cofaktor (Macbeth et al., 2005). In Pflanzen stellt InsP_6 einen wichtigen strukturbildenden Bestandteil des Auxinrezeptors dar. Auxine sind pflanzliche Wachstumshormone (Tan und Zheng 2008, Tan et. al 2007).

In Säugern und in Hefen ist InsP_6 essentiell für den mRNA Transport. Dabei wirkt InsP_6 als Co-Aktivator des Kernporenproteins Gle1, welches die ATP-abhängige DExD/H-Box-Helikase Dbp5 aktiviert (Miller et al., 2004). Seit neuestem wird postuliert, dass ein Mangel an InsP_6 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Demenz vom Alzheimer-Typ spielen könnte (Anekonda et al., 2011). Hier könnten sich neue therapeutische Ansätze ergeben. Es wurde nachgewiesen, dass erhöhte InsP_6 -Spiegel in Mäusehirnzellen einen verbesserten Oxidationsschutz gegen z. B. Sauerstoffradikale erzeugen. Durch zusätzliche Hochregulierung der Proteine SIRT1 und PAMPK/AMPK wird der Stoffwechsel der Mitochondrien stimuliert und der Abbau von Abfallstoffen beschleunigt. Hierdurch wird die Produktion von AP180 und A β Oligomeren reduziert, welche bei Vorliegen einer Alzheimer Demenz vermehrt in der Zelle zu finden sind. Insofern könnte InsP_6 die demenzielle Entwicklung verlangsamen (**Abbildung 1-5**).

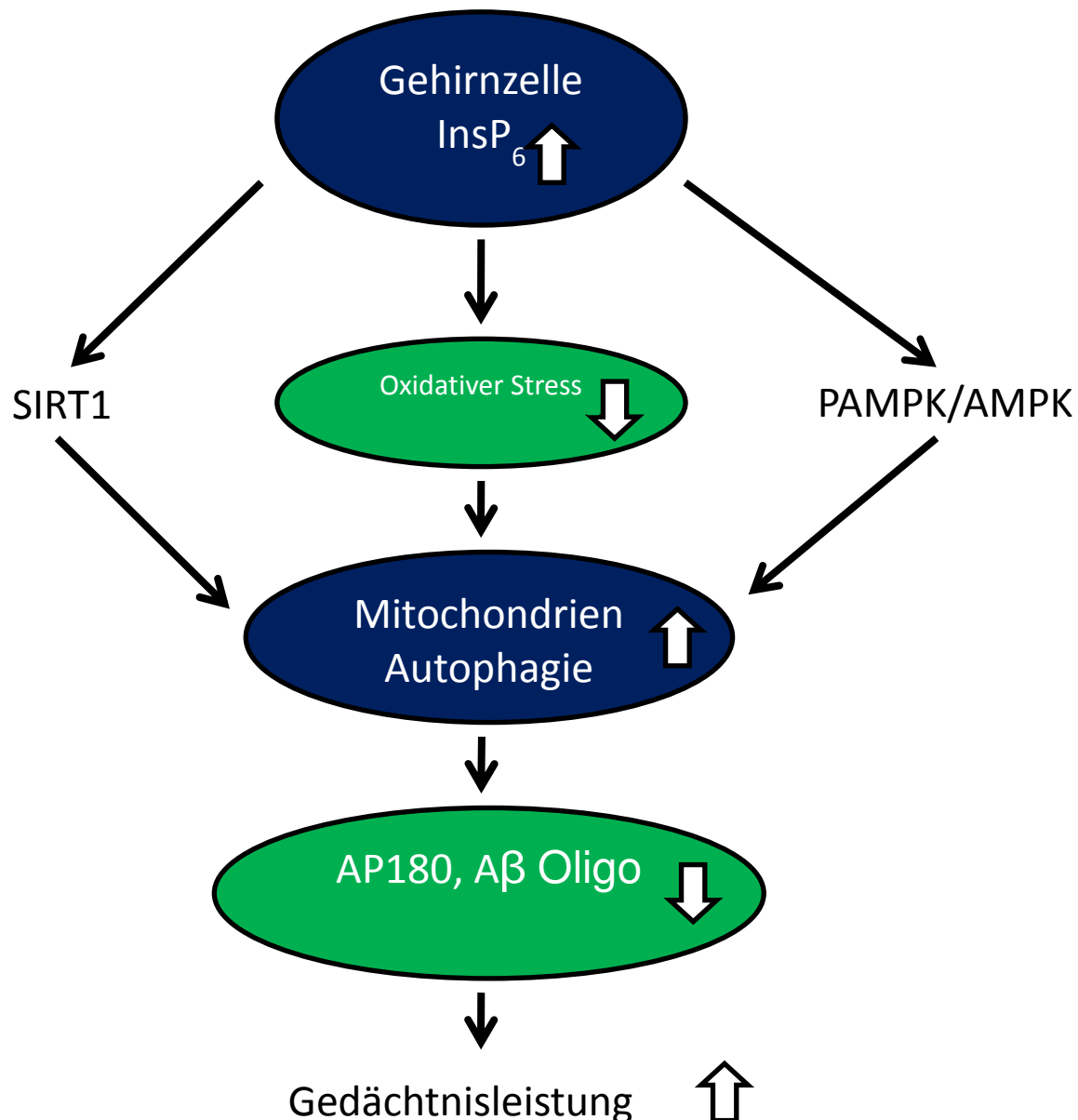


Abbildung 1-5: Wirkung von InsP₆ auf die Entwicklung der Alzheimer Demenz, modifiziert nach Anekonda et al., 2011

1.4.3 Inositolpyrophosphate

Die letzte Stufe im Metabolismus der Inositolphosphate stellen die Inositol-Pyrophosphate dar. Aus dem InsP₆ kann durch die InsP₆-Kinase InsP₇ hergestellt werden. Es liegt als PP-InsP₅ vor. Ebenso konnte InsP₈ ([PP]₂-InsP₄) nachgewiesen werden. Beide enthalten energiereiche Verbindungen ähnlich dem ADP. Dadurch könnte ihnen die Aufgabe der Energielieferung oder eines Phosphattransfers zukommen. In höheren Organismen ist die Konzentration jedoch sehr gering (Luo et al., 2003, Lin et al., 2008, Menniti et al., 1993, Saiardi et al., 1999).

In der Hefe konnte nachgewiesen werden, dass InsP₇ und InsP₈ möglicherweise an der Endozytose, der DNA-Reparatur und der Apoptose von Ovar-Karzinom-Zellen beteiligt sind (Mulugu et al., 2007, Chakraborty et al., 2011).

1.5 Die Enzyme des Inositolphosphatmetabolismus

1.5.1 Inositolphosphatphosphatasen (IPP)

Allgemein unterscheidet man drei Klassen der Inositolphosphatphosphatasen. Die D -Ins(1,4,5)P₃/ D -Ins(1,3,4,5)P₄ 5-Phosphatasen (Genname: MINPP) stellen einen frei diffusiblen Typ dar. Sie hydrolisieren wasserlösliches InsP₃ und InsP₄. Eine weitere Klasse von IPPs liegt membranständig vor. Die Enzyme dieser Klasse dephosphorylieren D -Ins(1,4,5)P₃, D -Ins(1,3,4,5)P₄, PtdIns(4,5)P₂ und Ptd(3,4,5)P₃ (Genname: INPP5B). Die dritte Klasse der IPPs stellen die SHIP und die SHIP2 dar (SHIP: SH2-domain-containing inositol phosphatase, Genname: INPP5D), welche Inositolpolyphosphate an der 5'-Position dephosphorylieren können (Majerus et al., 1999, Irvine et al., 2001, Shears 2004).

1.5.2 Die Inositolphosphatkinasen (IPK)

Inositolphosphate sind in nahezu allen Geweben vorhanden. Ihre Verteilung und das Auftreten der umsetzenden Enzyme variiert jedoch nach dem Bedarf des jeweiligen Gewebes. Drei Arten von IPKs können anhand von Sequenzähnlichkeiten voneinander unterschieden werden, die im Folgenden beschrieben werden. Es handelt sich um die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase (IP5K, Genname: IPPK), die Inositol-1,3,4-trisphosphat 5/6-Kinase/Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphat 1-Kinase (ITPK1, InsP₃-5/6-K/InsP₄-1-K) und drei Subfamilien der PDKG-Kinasen: die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP3K in drei Isoformen), die Inositolpolyphosphatmultikinase (IPMK) und die Inositolhexakisphosphatkinase (IP6K, drei Isoformen) (Saiardi 1999, Saiardi et al., 2000, 2001).

1.5.2.1 Die PDKG-Kinasen

Die IP3Ks, die IPMK und die IP6Ks gehören zu der Familie der PDKG-Kinasen. Sie werden deswegen so bezeichnet, weil sie im C-Terminus ein bestimmtes Aminosäurenmotiv (**P-C-[VI]-[ML]-D-X-K-[MI]-G**) enthalten. Dieses ist essentiell für die Positionierung des InsP-Substrates und des ATPs bei dem Phosphattransfer (Bertsch et al., 2000). Ein GFR-Motiv konnte 2004 in der Arbeitsgruppe von Prof. Mayr identifiziert werden (Deschermeier, 2004). Weitere Motive sind das SSSL-Motiv (Saiardi et al., 2000) (Katalyse) und das DFG/A-Motiv (ATP-Bindung). Die Zielsteuerungsdomänen liegen N-terminal (**Abbildung 1-6**, Nalaskowski und Mayr, 2004).

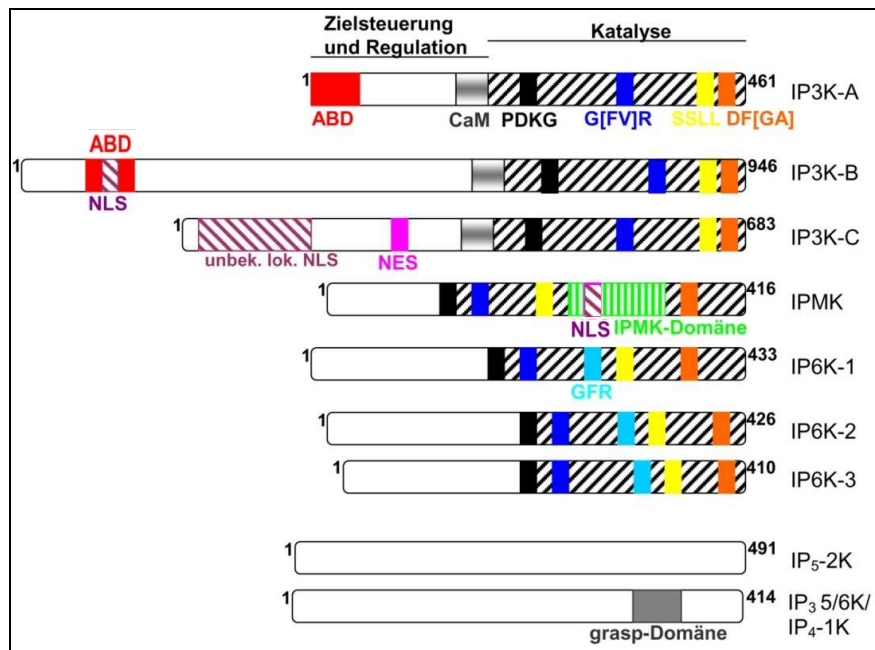


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung funktionaler Bereiche humaner Inositolphosphatkinasen (Brehm, 2006); ABD (rot): Aktinbindungsdomäne; CaM (grau): Calmodulinbindungsdomäne; PDKG-Motiv (schwarz): Substratausrichtung und Phosphattransfer; G[FV]R-Motiv (blau) und GFR-Motiv (türkis): InsP-Bindung; SSSL-Motiv (gelb): Katalyse; DF[GA]-Motiv (orange): ATP-Bindung; NLS (weinrot-weiß schraffiert): nukleäres Lokalisationssignal; NES (rosa): nukleäres Exportsignal, IPMK-Domäne (grün-weiß gestreift); Grasp-Domäne (dunkelgrau): ATP-Bindung. Die katalytischen Domänen sind durch eine schwarz-weiße Schraffierung markiert.

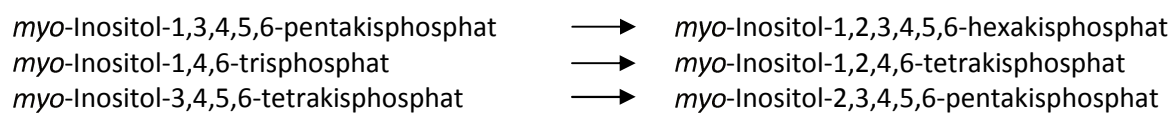
1.5.2.2 Die Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase

Das erste Enzym, das InsP_5 zu InsP_6 phosphoryliert, wurde in der Hefe entdeckt. Es trägt die Bezeichnung Ipk1 (Ongusaha et al., 1997 und 1998). In *Saccharomyces cerevisiae* und *S. pombe* wurde eine essentielle Rolle der Ipk1 für den mRNA-Export nachgewiesen (Alcázar-Román et al., 2006). So zeigen Mutanten von *S. pombe*, in denen das Enzym deaktiviert wird, natürlich eine stark verringerte Produktion von InsP_6 , außerdem ist aber auch ihr mRNA Export eingeschränkt. Die Überexpression der N-terminalen Domäne von Ipk1, die keine katalytische Aktivität besitzt, führte in Wildtypzellen ebenfalls zu einem gestörten mRNA-Export. Deshalb gehen die Autoren davon aus, dass die Rolle von Ipk1 im mRNA-Export auch eine nicht-katalytische Komponente besitzt. Das Gen *SpDbp5* scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Es kodiert für DEAD-box Helikase Dbp5, die durch Gle1 und InsP_6 aktiviert wird. Ähnliche Studien wurden in *S. pombe* mit der InsP_6 -Kinase Asp durchgeführt, um eine Rolle der höherphosphorylierten InsPs (InsP_7 und InsP_8) auszuschließen. Die Deletion nur von Asp hatte keinen Einfluss auf den mRNA-Export (Sarmah und Went 2006).

Der Knock-down der Ipk1 in Zebrafisch-Embryonen sorgt für eine signifikante Veränderung der Inositolphosphatspiegel. Zeitgleich konnten ein reduzierter Ca^{2+} -Spiegel und schwere Organfehlpositionierungen in den veränderten Tieren festgestellt werden. Die natürliche

Links-Rechts-Symmetrie war schwer gestört (Sarmah et al., 2005, Webb und Miller 2003, McGrath et al., 2003). Die Reduktion der Ipk1 ruft außerdem eine niedrigere Mobilität der Zilien im Kupffer'schen Vesikel von Zebrafisch-Embryonen hervor (Sarmah et al., 2007). Die Ipk1 aus dem Zebrafisch ist zu 57% identisch zum Isoenzym des Menschen.

In der Maispflanze fanden Sun et al., 2007 zwei Enzyme, die als IPK1A und IPK1B bezeichnet wurden. Während die IPK1B ausschließlich in den Wurzeln vorkommt, findet man die IPK1A in der Volllänge und als Splicevariante in nahezu allen Geweben der Pflanze. Die Substratspezifität der Mais-IPK1 ist vielfältig. Ihre Hauptfunktion liegt in der Metabolisierung des InsP_5 zu InsP_6 . Abgesehen davon ist sie dazu in der Lage, andere Inositolphosphate an der Stelle 2 zu phosphorylieren. Daraus ergeben sich folgende Wege:



Über die Sequenzähnlichkeiten zwischen Pilz-Ipk1 konnte die Arbeitsgruppe von York in 2002 das menschliche Homolog identifizieren; die IP5K. Sie hat eine Größe von 56kD und zeigt keine Ähnlichkeiten zu den anderen IPKs (York et al., 2002). Das Enzym wird überwiegend in Herz, Gehirn, Hoden und Plazenta exprimiert, ist aber ubiquitär in allen Geweben vorhanden. Mit einer Überexpression des Enzyms in Ratten konnte der InsP_6 -Spiegel erhöht werden, wogegen der InsP_5 -Spiegel rapide abgesenkt wurde (Verbsky und Fuji 2005). Im selben Jahr wurde der entgegengesetzte Effekt durch die Applikation von siRNA erzielt (Verbsky et al., 2005). Auch eine anti-apoptotische Wirkung wird der IP5K zugesprochen (Hawkins und Poyner 1993, Luther, 1995).

In Rattenzellen wurde für überexprimierte IP5K eine gleichmäßige Verteilung zwischen Zytoplasma und Kern beschrieben (Fuji und York et al., 2005). In menschlichen Zellen ist die IP5K vornehmlich im Kern lokalisiert. Besonders große Mengen der IP5K findet man in den Kernregionen, die nur schwach von DAPI angefärbt werden. Dadurch ließ sich nachweisen, dass sich das Enzym in den Nukleoli und im Euchromatin ansammelt (Brehm et al., 2007). Durch Überexpression von EGFP/*Hs*IP5K in menschlichen Zelllinien konnte eine Steigerung der InsP_6 -Produktion zu Lasten des $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -Vorrates hervorgerufen werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass das Enzym mit mRNA colokalisiert (Brehm et al., 2007). Aus diesem Grund wurde die Vermutung aufgestellt, dass die IP5K möglicherweise einen mRNA Exporter darstellt. Zellen, in denen Stress z. B. durch Inkubation mit Arsenit (Brehm et al., 2007) aufgebaut wurde, zeigten zytoplasmatische Granula, die das Protein in großen Mengen zusammen mit poly(A)RNA enthielten. Dies wurde durch eine Colokalisation mit den Proteinen PABP und TIAR bestätigt, die sich ebenfalls in solchen Stressgranula

befinden. Die Tatsache, dass die katalytisch inaktive Totmutante der IP5K nicht in diesen sogenannten „Stressgranula“ (SG) lokalisiert war, zeigt, dass ihre Lokalisation in SGs von der InsP₆-Produktion abhängt (Brehm et al., 2007).

1.5.2.3 Weitere Inositolphosphatkinasen

Die Inositolhexakisphosphat 5-Kinase *Kcs1* und eine weitere Inositolhexakisphosphat-Kinase stellen zusammen den größten Teil der Inositolpyrophosphate her (Padmanabhan et al., 2009, Luo et al., 2003, Saiardi et al., 2000). Viele Enzyme der Inositolphosphatkinasenkaskade besitzen die Fähigkeit nicht nur die Katalyse durchzuführen, die ihnen ihren Namen gibt, sondern im geringeren Maße auch andere Funktionen durchzuführen. Die Hefe-*Ipk1*, beispielsweise, kann außer der Phosphorylierung von InsP₅ zu InsP₆ auch die Phosphorylierung von InsP₃ in der 3-Position katalysieren (Seeds et al., 2005). Die Enzyme ITPK-A, ITPK-B und ITPK-C sowie die IPMK der Säuger verfügen ebenfalls über verschiedene Substratspezifitäten (Frederick et al., 2005, Seeds et al., 2005, Leymann et al., 2007). Die IPMK ist in Säugerzellen dazu fähig, verschiedene Inositolphosphate zu phosphorylieren (Leymann et al., 2007, Nalaskowski et al., 2004). Bisher schien sich die Funktion darauf zu beschränken. In neueren Studien scheint die IPMK im Säuger eine sehr große Rolle bei der Translation und damit für die Proliferation der Zelle zu spielen (Kim et al., 2011). Es konnte nachgewiesen werden, dass die IPMK in Säugerzellen eine Bindung mit dem Komplex mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin Complex 1) eingeht, welcher eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege reguliert. Der Komplex phosphoryliert zwei Schlüsselenzyme des Zellzyklus, die die Translation von Proteinen vermitteln. Diese sind 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1) und S6K1 (protein S6 kinase 1). Sobald die Bindung künstlich inhibiert wird, sind die Signalwege der Zelle durch den fehlenden Aufbau der Enzymkaskaden gestört. Somit scheint die IPMK als Co-Faktor für den Zellzyklus essentiell zu sein. Interessant ist hierbei, dass die Funktion der IPMK innerhalb dieses Komplexes unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität ist. Es wird daher postuliert, dass die IPMK als scaffolding Protein wirkt, das die Proteine des Komplexes an ihrem Wirkort zusammenbringt (Dennis et al., 2011).

Neueste Studien haben gezeigt, dass die IP6K2 in Säugerzellen den p53 induzierten Zelltod vermittelt (Chakraborty et al., 2011). Die erste menschliche IP6K wurde 2007 beschrieben (Fridy et al., 2007). Diese phosphoryliert Inositolphosphate an der Stelle 1 oder 3 (Lin et al., 2008). In der gesunden Zelle stellt das Enzym Pyrophosphate her, die Insulinresistenz und die Apoptose induzieren können. Die Casein Kinase 2 (CK2) phosphoryliert im Normalfall die IP6K2 und induziert sekundär ihre Ubiquitinierung und den nachfolgenden proteasomalen

Abbau. Durch diesen Vorgang wird die Apoptose reguliert. In Tumorzellen wird häufig eine Überexpression von CK2 beobachtet, wodurch die Funktion von IP6K2 extrem gehemmt wird (Chakraborty et al., 2011).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayr (durchgeführt von Dr. Maria Brehm, Tobias Schenk und Xuefei Zhou) wurde begonnen, den Zielsteuerungsmechanismus der Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphatkinase 2-Kinase (IP5K) zu untersuchen. Es wurde eingehend die Wirkung basischer Aminosäuren im N-terminalen Bereich (AS1-180) auf den Kernimport der IP5K charakterisiert. Hierbei wurden verschiedene Aminosäuren identifiziert, deren Mutation eine Verringerung des Kernimportes erzeugt. Eine eindeutige Zuordnung bestimmter Aminosäuren zu einer NLS-Funktion konnte jedoch nicht abgeschlossen werden, denn keine der untersuchten Mutationen führte zu einer kompletten Inhibition des Kernimportes. Auch ein putatives monopartites NLS im Bereich der Aminosäuren 41-43 erwies sich nicht als hinreichend für den Kernimport der IP5K. Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine Kombination von Mutationen basischer Aminosäuren zur Aufklärung des NLS im Protein beitragen könnte.

Dass die IP5K aktiv und exportinabhängig aus dem Kern exportiert wird, konnte bereits gezeigt werden (Brehm et al., 2007). Die NES-Aktivität der IP5K wurde dabei dem Aminosäurebereich 200-300 zugeschrieben, die Identifizierung der verantwortlichen Aminosäuren im Einzelnen stand aber noch aus. Da NES meist aus einer Anhäufung von Leucinen und leucinähnlichen Aminosäuren gebildet werden, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die IP5K solche Sequenzen enthält und, wenn ja, ob diese für den Kernexport der IP5K hinreichend und notwendig sind. Dabei sollte zusätzlich geprüft werden, ob die Lokalisation von IP5K-Mutanten über längere Zeiträume stabil bleibt.

Sowohl die endogene IP5K als auch das überexprimierte GFP/IP5K Fusionsprotein wurden in Nukleoli nachgewiesen (Brehm et al., 2007). Auch hier ist nicht bekannt, ob die IP5K mittels eines oder mehrerer Nukleoluslokalisierungssignale (NoLS) in den Nukleolus gelangt, oder ob sie über Interaktion mit nukleolären Proteinen über ein Retentionssignal im Nukleolus gehalten wird. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb *in silico* nach putativen NoLS gesucht, und in eukaryotischen Zellen untersucht werden, ob die Mutation solcher putativer Signale eine Verringerung der nukleolären Lokalisation der IP5K hervorrufen kann. Zusammengefasst bestand das Ziel dieser Arbeit also darin, die Identität und den funktionalen Kontext der Lokalisationssignale der IP5K aufzudecken.

2. Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien werden von folgenden Firmen bezogen:

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

2.1.2 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden kommerziell von MBI Fermentas (Heidelberg) erworben.

T4-DNA-Ligase	GIBCO BRL
Taq-DNA-Polymerase	GIBCO BRL
Pfu-DNA-Polymerase	Promega, USA

2.1.3 Kits

Big Dye Terminator Kit	Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland)
Nucleospin Plasmid DNA Purification Kit	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)

2.1.4 Bakterienstamm XL1 blue

Spezifikationen: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^q ZDM15 Tn10 (Tet^I)]; Bullock 1987; Stratagene (Amsterdam, Niederlande)

2.1.5 Zelllinien

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

Es handelt sich bei dieser Zelllinie um menschliche epitheliale Lungenkarzinomzellen, die zur Expression des Enzyms IP5K verwendet werden. In ihnen ist das p53 Gen homozygot deletiert. Die Kultur wächst adhärent auf dem Objektträger. Der Durchmesser einer Zelle liegt bei ca. 25 µm.

2.1.5.2 HeLa-Zellen (*Homo sapiens*)

HeLa Zellen (DSMZ No. ACC 57) sind menschliche epitheliale Cervixkarzinomzellen. Sie werden ebenfalls zur Expression verwendet.

2.1.6 Puffer und Lösungen

2.1.6.1 Puffer

***Pfu*-Puffer**

20mM Tris/HCl pH 8,8
10mM KCl
10mM (NH₄)₂SO₄
2mM MgSO₄
0,1% Triton X-100 (w/v)
100µg/ml BSA (w/v)), Stratagene

1xPBS-Puffer

140mM NaCl
3mM KCl
100mM Na₂HPO₄

1xTAE-Puffer

2M Tris-Acetat
1mM EDTA
pH 8,0 mit NaOH einstellen

2.1.6.2 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

LB Medium: (Luria Broth, GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland)

4g Bacto-Trypton
2g Hefeextrakt
4g NaCl
add 400ml ddH₂O
pH 7,2 mit NaOH einstellen
Autoklavieren, Lagerung bei 4°

Agarplatten: (Luria Broth Base/Select Agar, GIBCO BRL. Eggenstein, Deutschland)

4g Bacto-Trypton
2g Hefeextrakt
6g Bacto-Agar
0,5ml 4M NaCl
add 400ml ddH₂O
zufügen von 0,4ml Selektionsantibiotikum
Lagerung bei 4°

2.1.6.3 Medium für die Kultivierung von H1299-Zellen bzw. HeLa-Zellen

Dulbecco's MOD Eagle Medium (DMEM)
10% FCS
1% Penicillin-Streptomycin

2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Nukleotide werden von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Sie werden zur Herstellung von Plasmiden mit gezielt mutagenisierter DNA verwendet (vgl. QuikChangeMutagenese).

2.1.7.1 Mutagenese-Primer für die Deletion Leucin reicher Regionen in der IP5K

QuikChange-Mutagenese Region L1 - Δ82-90

MK001 5' - ggg agg tcg ttc agc tac cta aga tac aat ctg aaa gac c - 3'
MK002 5' - ggt ctt tca gat tgt atc tta ggt agc tga acg acc tcc c - 3'

QuikChange-Mutagenese Region L2 - Δ233-242

MK033 5' - ccc gtg gct gac tgg agc gag cct tcc aac ggc ctg gcc agt ggg - 3'
MK034 5' - ccc act ggc cag gcc gtt gga agg ctc gct cca gtc agc cac ggg - 3'

QuikChange-Mutagenese Region L3 - Δ261-270

MK035 5' - aca agg gct gtg atc agg gag agt ggc tcg gac aag ggc cgg - 3'
MK036 5' - ccg gcc ctt gtc cga gcc act ctc cct gat cac agc cct tgt - 3'

QuikChange-Mutagenese Region L4 - Δ327-335

MK003 5' - ttc tgt aca aaa ccc tcc agg aag gcc tct acc ctc tgt a - 3'
MK004 5' - tac aga ggg tag agg cct tcc tgg agg gtt ttg tac aga a - 3'

QuikChange-Mutagenese Region L5 - Δ369-376

MK005 5' - atg ggc ctt atg atg aag cat cca ctg agg atg acg gga c - 3'
MK006 5' - gtc ccg tca tcc tca gtg gat gct tca tca taa ggc cca t - 3'

QuikChange-Mutagenese Region L6 - Δ433-442

MK007 5' - cat cga ggt cca ggt ttg cca agc cct acg aga gca ttc c - 3'
MK008 5' - gga atg ctc tcg tag ggc ttg gca aac ctg gac ctc gat c - 3'

2.1.7.2 Mutagenese-Primer zur Erzeugung von Einzelmutationen in Leucin reichen

Sequenzen der IP5K

QuikChange-Mutagenese Region L2 - L233A/L237A/F240A/F242A

MK039 5' - gag ctt gca cac cac gcc aag ccg gcc gcc gcc cct tcc aac ggc ctg - 3'
MK040 5' - cag gcc gtt gga agg ggc ggc ggc ccg ctt ggc gtg gtg tgc aag ctc - 3'

QuikChange-Mutagenese Region L3 - L233A/L237A/F240A/F242A

MK058 5' - ggg agc tgg tgc acg cgg cca cac ggg cag cag caa gtg gct cgg aca ag - 3'
MK059 5' - ctt gtc cga gcc act tgc tgc tgc ccg tgt ggc cgc gtg cac cag ctc cc - 3'

QuikChange-Mutagenese Region L6 - V437A/L438A/L440A/L442A

MK037 5' - gtt tgc ctt ttc cgt gtc tgc ggc gga cgc tga cgc caa gcc cta cga g - 3'
MK038 5' - ctc gta ggg ctt ggc gtc agc gtc cgc cgc aga cac gga aaa ggc aaa c - 3'

2.1.7.3 Mutagenese-Primer zum Einfügen der Sequenz L6 (433-FSVSVLDL-442) in die Multiple Cloning Site von pEGFP-C1

MK049 5' - agt ccg gac tca gat ctc gat ttt ccg tgt ctg tgc tgg acc ttg acc tct aag gta ccg cgg gcc gat c - 3'
 MK050 5' - gat ccc ggg ccc gcg gta cct tag agg tca agg tcc agc aca gac acg gaa aat cga gat ctg agt ccg gac t - 3'

2.1.7.4 Sequenzier-Primer für die IP5K

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Bindungsstelle
MN117	agc tag cat gga aga ggg gaa gat gga	1-27
MN118	gag atc tga gac ctt gtg gag aac taa tg	1446-1474 (3'Oligonukleotid)
MN121	tct gtc gat act gca tgc ac	473-492
MN124	tgc aga tgt tgg acc tgc tg	980-999
MN125	ttg ttc tgt gcc tcc tgc ag	582-601 (3'Oligonukleotid)

2.1.7.5 Sequenzier-Primer für die Multiple Cloning Site von pEGFP-C1

MN008 5' - cat ggt cct gct gga gtt cgt g - 3'

2.1.7.6 Mutagenese-Primer zur Deletion der Vertebraten-Inserts in der IP5K

Deletion1: 5' - cac ttt gcc ttg aag agt ttg ctg / ttc agt agg agc ctt cgc tgc caa gg - 3'
 Deletion2: 5' - gca gat gtt gga cct gct gga caa / ggt gca gca gta ccg cg - 3'

2.1.7.7 Mutagenese-Primer zur Pseudo-Phosphorylierung bzw. -dephosphorylierung C-terminaler SP-Motive im Vertebrateninsert 1 (AS 202-297)

Mutagenese S271E/S273E

MK023 5' - tga tca cac ggg tgc tgc tgg agg gcg agg aca agg gcc ggg cag gca c - 3'
 MK024 5' - gtg cct gcc cgg ccc ttg tcc tgc ccc tcc agc agc acc cgt gtg atc a - 3'

Mutagenese S271A/S273A

MK031 5' - tga tca cac ggg tgc tgc tgg cag gcg cag aca agg gcc ggg cag gca c - 3'
 MK032 5' - gtg cct gcc cgg ccc ttg tct gcg cct gcc agc agc acc cgt gtg atc a - 3'

Mutagenese S282E

MK013 5' - ggc cgg gca ggc acc ctg gag ccg ggg ctc ggg cct cag gg - 3'
 MK014 5' - ccc tga ggc ccg agc ccc ggc tcc agg gtg cct gcc cgg cc - 3'

Mutagenese S282A

MK027 5' - ggc cgg gca ggc acc ctg gca ccg ggg ctc ggg cct cag gg - 3'
 MK028 5' - ccc tga ggc ccg agc ccc ggt gcc agg gtg cct gcc cgg cc - 3'

Mutagenese S296E

MK019 5' - gcc cgc gag tct gcg aag ccg agc ctt tca gta gga gcc ttc gct g - 3'
 MK020 5' - cag cga agg ctc cta ctg aaa ggc tgc gct tgc cag act cgc ggg c - 3'

Mutagenese S296A

MK029 5' - gcc cgc gag tct gcg aag ccg cac ctt tca gta gga gcc ttc gct g - 3'
MK030 5' - cag cga agg ctc cta ctg aaa ggt gcg gct tcg cag act cgc ggg c - 3'

Mutagenese F298E

MK041 5' - cga gtc tgc gaa gcc agc cct gag agt agg agc ctt cgc tgc - 3'
MK042 5' - gca gcg aag gct cct act ctc agg gct ggc ttc gca gac tcg - 3'

2.1.7.8 Mutagenese-Primer zur Untersuchung putativer nukleärer Lokalisationssignale in der IP5K

Mutagenese K173A/K175A

TS35 5' - ctc aag gta gca act ggg gcg tgg gcg cag atc agc aaa tac tgt - 3'
TS36 5' - aca gta ttt gct gat ctg cgc cca cgc ccc agt tgc tac ctt gag - 3'

Mutagenese K179A

TS37 5' - cag atc agc gcg tac tgt ccc - 3'
TS38 5' - ggg aca gta cgc gct gat ctg - 3'

Mutagenese K155A/K157A

MK09 5' - gat gtc acg tct gag atg gcg tct gcg gtc agt cga tac agc - 3'
MK10 5' - gct gta tcg act gac cgc aga cgc cat ctc aga cgt gac atc - 3'

Diese Primer wurden erstellt, um die genannten Mutationen einzufügen, ohne die bereits eingefügten Mutationen K173A/K175A/K179A zu zerstören (vgl. Ergebnisse Kapitel 3.5).

2.1.7.9 Mutagenese-Primer zur Untersuchung eines putativen Nukleoli-Lokalisationssignals

Mutagenese R120A/L121A/R124A

MK043 5' - tgc ctt cct aat tta acc gca gcc caa acc tac gcc ttt gca gag cac c - 3'
MK044 5' - ggt gct ctg caa agg cgt agg ttt ggg ctg cgg tta aat tag gaa ggc a - 3'

2.1.8 Vektoren

Als Vektor werden doppelsträngige DNA-Ringe bezeichnet. Auf einem solchen Ring können Erbinformationen wie in genomischer DNA hinterlegt werden. Die DNA-Sequenz der IP5K wurde von Dr. Marcus Nalaskowski in den Vektor pEGFP-C1 der Firma Clontech (Heidelberg, Deutschland) einkloniert (Brehm et al., 2007). Bei der transienten Expression des Enzyms in H1299- bzw. HeLa-Zellen entsteht ein Fusionsprotein mit EGFP (enhanced green fluorescence protein) aus der Qualle *Aequora Victoria*. Dadurch ist die Visualisierung der intrazellulären Lokalisation des Enzyms mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie möglich. Der Vektor enthält eine Kanamycin-Resistenz.

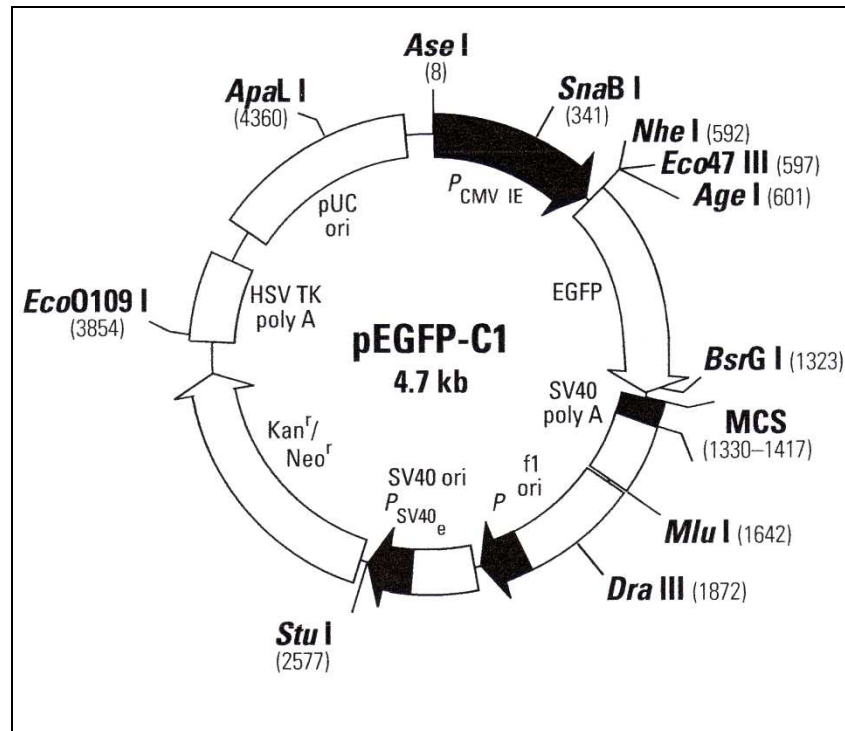


Abbildung 2-1: Der Vektor pEGFP-C1; aus dem BD Biosciences Clontech Datenblatt entnommen

2.1.9 Software

Kappa ImageBase Kappa

CoralPhotoPaint

BioEdit

Office 2007

ImageJ

PyMol

Kappa

Corel

Tom Hall

Microsoft

Wayne Rasband, NIH, USA

DeLano Scientific LLC

2.1.10 Geräteliste

Analysenwaage *BP 221S*

Autoklav *5075 ELV*

Brutschrank für Bakterienkultur

Duran Glasgeräte

Feinwaage *PM 480 Delta range*

Fluorezenzmikroskop *Axiovert 25 CFL*

Gelkammer für horizontale Elektrophorese

Heizblock *Thermomixer 5436*

Inkubator mit CO₂-Begasung für Zellkultur

Kamera *DX30*

Laborschüttler

Magnetrührer *MR 3001K*

Sartorius

Systec

Memmert

Schott, Brand

Mettler

Zeiss

MWG-Biotech

Eppendorf

Heraeus

Kappa

Gerhardt

Heidolph

Mischer <i>Vortex Genie 2</i>	Scientific Industries
Monitor	Panasonic
PCR-Maschinen: <i>Mastercycler Gradient / personal</i>	Eppendorf
Netzanschlussgerät <i>Gene Power Supply GPS 200/400</i>	Pharmacia
Netzanschlussgerät <i>Power Supply E835</i>	Consort
Netzanschlussgerät <i>Power Supply 2197 LKB</i>	Bromma
pH-Meter <i>pH526</i>	WTW
pH-Elektroden <i>SenTix mic</i> und <i>Sentix 41</i>	WTW
Photometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf
Pipette, <i>Model Reference</i> , 1 - 10 µl	Eppendorf
Pipette, <i>Model Reference</i> , 10 - 100 µl	Eppendorf
Pipette, <i>Model Reference</i> , 100 - 1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe <i>accu-jet</i>	Brand
Schüttelinkubator <i>Serie 25</i>	New Brunswick, Scientific Co. Ins. MDH
Sterile Werkbank <i>Microflow Biological Safety Cabinet</i>	Heraeus
Sterile Werkbank <i>HeraSafe</i>	Heraeus
Tischzentrifuge <i>Biofuge pico</i> und <i>Biofuge fresco</i>	Bachhofer
UV-Tisch (312nm)	Phase
Videodokumentationssystem, Kamera <i>VarioCam</i>	Sorvall
Zentrifuge <i>Sorvall RC 5C plus</i> mit <i>GSA-</i> und <i>SS-34</i> -Rotor	
2.1.11 Verbrauchsmaterial	
Kammerdeckgläser (2, 4 oder 8 Kammern)	Nalgen Nunc International
Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (steril), 25 cm ² und 75 cm ²	Greiner
Injektionskanüle 0,55/25 mm	Braun
Küvetten <i>Uvette 220</i> (50–2.000 µl)	Eppendorf
Pipetten (steril, 1, 2, 5, 10 und 25 ml)	Beckton Dickinson
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße aus Polypropylen (0,2; 0,5; 1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf
Probenröhrchen mit Schraubverschluss aus Polypropylen, Spitzboden (steril, 50 ml, <i>BlueMax</i>)	Greiner
Probenröhrchen mit Schraubverschluss aus Polypropylen, Spitzboden (steril, 15 ml, <i>BlueMax</i>)	Greiner

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 QuikChange-Mutagenese zur Veränderung von DNA-Sequenzen

Die QuikChange-Mutagenese ist eine abgewandelte Anwendung der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Sie wird angewendet, um die DNA-Sequenz auf Plasmiden gezielt zu verändern. In der Konsequenz ändert sich die Primärstruktur des exprimierten Proteins. Mit dieser Technik ist es möglich, einzelne oder mehrere Aminosäuren auszutauschen, zu deletieren oder einzufügen. Die eingesetzten Primer enthalten in ihrer Mitte die gewünschte Veränderung gegenüber dem Wildtyp. Die beiden Primer sind zueinander komplementär. Die eingefügte Veränderung bindet nicht vollständig an den Ursprungsstrang, so dass bei der Elongation die Mutation in den neuen Strang eingebaut wird. Der Ansatz wurde wie folgt angesetzt:

Menge	Komponente
50ng	Plasmid-DNA
10ng	Primer (5' oder 3')
125µM	dNTPs (40mM)
1 U	PfuUltra DNA Polymerase
2,5µl	10x Pfu-Puffer
Add 25µl	ddH ₂ O

Um die Effizienz der Methode zu steigern, wird pro Primer je ein einzelner Ansatz hergestellt. Zunächst werden im Thermocycler 10 präPCR-Amplifikationszyklen durchgeführt. Dafür wird folgendes Protokoll verwendet:

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

Anschließend werden die Ansätze vereinigt und nach Zugabe von 1U Polymerase weitere 18 Zyklen durchlaufen. Zur Verlaufskontrolle wird eine Probe genommen, um sie anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese zu untersuchen. Es wird 1U des Enzyms *DpnI* zu dem Ansatz gegeben und für 3h bei 37°C inkubiert. *DpnI* schneidet methylierte DNA. Das verwendete Plasmid, auf dem der Wildtyp der IP5K codiert ist, enthält im Gegensatz zu den neu synthetisierten Strängen Methylgruppen. Dadurch werden nur die Matrizenstränge geschnitten, und die erzeugte Enzymmutante bleibt in der Lösung erhalten. Von der verdauten Lösung wird ebenfalls eine Probe entnommen und für eine Agarosegel-Analyse aufbewahrt.

2.2.1.2 Agarosegel-Elektrophorese

In Agarosegelen ist es möglich, DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Zur Herstellung eines 1%-igen Gels werden 0,5g Agarose (SeaKem LE Agarose, BMA Rockland, ME USA) in 50ml 1xTAE aufgekocht bis die Lösung durchsichtig wird. Die Lösung wird mit 1µl Ethidiumbromid (2 mg/ml) versetzt und in eine Analysekommer zur Aushärtung gegossen. Durch einen eingesetzten Kamm werden Taschen erzeugt. Das fertige Gel wird mit 1xTAE überschichtet, die DNA-Proben aus Schritt 2.2.1.1 mit 6xDNA-Probenpuffer versetzt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Als Referenz wird eine 1kb DNA Leiter (GeneRuler™ Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Es wird eine Spannung von ca. 120V für 30min angelegt. Der Richtwert liegt bei 5V pro cm Elektrodenabstand). Zum Abschluss wird das Gel auf einem UV-Transilluminator (312nm, Bachofer, Reutlingen, Deutschland) fotografiert (Dokumentationssystem: VarioCam, Phase, Lübeck).

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen (MiniPrep)

Plasmid-DNA wird gemäß dem Protokoll des NucleoSpin Kits aus XL1 blue Bakterien extrahiert (Plasmid DNA Purification, Machery-Nagel, Düren, Deutschland). Die Plasmide wurden über eine Säulenmatrix gereinigt. Die verschiedenen Puffer, die in dem Protokoll verwendet werden, enthalten verschiedene Detergenzien, die die *E.colis* systematisch lysieren und die Plasmid-DNA aufreinigen. Ein wichtiger Aspekt ist dabei der Einsatz von NaOH und SDS. Im letzten Schritt wird die mehrfach gewaschene DNA von der Matrix-Säule mit 100µl ddH₂O eluiert.

2.2.1.4 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA

Die gereinigte Plasmid-DNA wird für die Quantifizierung im Verhältnis 1:20 verdünnt. 100µl der Lösung werden in eine Küvette überführt und bei 260nm im Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermessen. Eine optische Dichte von 1 spiegelt dabei einen Wert von 50µg DNA/ml wider. Bei einem Verhältnis $OD_{260/280} = 1,8$ bis 2,0 kann man von einer gut gereinigten DNA ausgehen.

2.2.1.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 2007). Die Didesoxyribonukleotide tragen verschiedene Farbmarker, so dass ein gemeinsamer Ansatz verwendet werden kann. Die verwendeten Reagenzien werden gemäß einem internen Protokoll eingesetzt. Dazu gehören 3µl des Big Dye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), 5µl Half-Term-Puffer (Genpak/Genetix, New Milton, UK), 500ng Plasmid-DNA und 15pmol des entsprechenden

Sequenzieroligonukleotides in einem Endvolumen von 20µl. Die fertigen Ansätze durchlaufen dann 25 Zyklen des folgenden PCR-Programmes im Wärmecycler.

Schritt	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Bezeichnung
1	10	96	Denaturierung
2	5	50	Hybridisierung
4	240	60	Elongation

Nach Beendigung der Reaktion wird die DNA mit 100%igen Ethanol gefällt und getrocknet. Anschließend werden die trockenen Ansätze einem hausinternen Labor zur Analyse übergeben.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Transformation von *E.coli* Bakterien mittels Hitzeschock

Die durch die QuikChange-Mutagenese hergestellten Plasmide werden mit dieser Methode in chemisch-kompetente XL1 blue *E.coli* Bakterien eingebracht. Dazu wird ein Aliquot von 100µl, das bei -80°C gelagert wurde, für 20min auf Eis aufgetaut. Im Anschluss daran werden 10-100ng Plasmid-DNA zu der Suspension gegeben. Der Ansatz wird für weitere 30min auf Eis inkubiert. Danach wird der Ansatz schnell für 60sec in einen Inkubator bei 42° überführt. Anschließend wird die Suspension für 2min zurück auf Eis gestellt. Es wird 1ml LB-Medium hinzugegeben und das Gefäß für eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird der Ansatz auf einer geeigneten Agarplatte ausplattiert. Der pEGFP-Vektor trägt eine Kanamycin-Resistenz.

2.2.2.2 Wachstum und Lagerung der Bakterienstämme

Der XL1 blue Stamm kann in Flüssig-LB-Medium unter Schütteln (220rpm) oder auf Agar-LB-Platten zum Wachstum über Nacht bei 37°C gebracht werden. Die Platten können, mit Parafilm verschlossen, bei 4°C für vier Wochen aufbewahrt werden. Eine längerfristige Lagerung ist ebenfalls möglich, wurde aber innerhalb dieser Arbeit nicht notwendig. Das Verfahren wird hier nicht beschrieben.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Für die zellbiologischen Arbeiten werden ausschließlich sterile oder autoklavierte Materialien verwendet. Als Arbeitsplattform dient eine S1-Werkbank.

2.2.3.1 Kontinuierliche Kultivierung von H1299- und HeLa-Zellen

H1299-oder HeLa-Zellen werden in Gewebekulturflaschen (75cm²) im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Nach jeweils 48h erreichen die Zellen vollständige Konfluenz und können passagiert werden. Dafür werden alle verwendeten Lösungen auf eine Temperatur von 37°C gebracht. Bevor die Zellen behandelt werden, wird unter dem Mikroskop ihr Wachstumszustand überprüft. Danach wird das alte Medium von der Kultur

gesaugt und der Zellrasen mit 10ml 1xPBS gewaschen. Anschließend werden 1-2ml Trypsin-EDTA (GIBCO ERL, Eggenstein, Deutschland) eingesetzt, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Dazu wird die Flasche für maximal 90sec in den Inkubationsschrank zurück gestellt. Mit frischem Medium wird das Flüssigkeitsvolumen auf 10ml aufgefüllt. 2ml der Suspension werden in eine neue Flasche gegeben und mit 15ml frischem Medium aufgefüllt. Die Suspension kann nach dieser Prozedur auch zur Aussaat in Kammerdeckgläschen verwendet werden.

2.2.3.2 Aussaat eukaryotischer Zellen in Kammerdeckgläschen

Aus der restlichen Zellsuspension aus 2.2.3.1 können weitere Verdünnungen für die Aussaat in Kammerdeckgläschen (2, 4, oder 8 Kammern, Nunc, Wiesbaden) hergestellt werden. Zu 1-2ml H1299-Zell-Suspension werden ca. 15ml frisches Vollmedium gegeben. Anschließend wird die neue Verdünnung gleichmäßig auf die Kammern verteilt. Es werden jeweils 2ml auf die Kammern eines Deckgläschens verteilt. Eine Transfektion mit FuGene 6 (Roche, Mannheim, Deutschland) kann sofort oder nach 24h Inkubation (37°C, 5% CO₂) erfolgen.

2.2.3.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Für Expressionsversuche in eukaryotischen Zellen (H1299) wird die entsprechende Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht. Dafür wird ein Ansatz hergestellt, der die DNA und ein Transfektionsreagenz enthält. Es werden 100µl OptiMEM (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland) auf 37°C vorgewärmt und in einem frischen 1,5ml-Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Zunächst werden 2,5µl FuGene 6 (Roche, Mannheim, Deutschland) in das Medium gegeben. Für eine optimale Verteilung des FuGene im Medium wird der Ansatz mit der Pipettenspitze verrührt. Bei einer Mischung auf dem Vortex würde das Reagenz an der Wand des Gefäßes hängen bleiben. Als nächstes wird 1µg der gewünschten DNA zu dem Ansatz gegeben. Auch diese wird mit der Pipettenspitze eingerührt. Anschließend wird der fertige Ansatz 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abschluss wird der Ansatz gleichmäßig auf die Kammern verteilt. Die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz erfolgt für 24h, 48h oder 72h bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.3.4 Fixierung und Kernfärbung eukaryotischer Zellen

Die Fixierung der Zellen in einem Kammerdeckgläschen erfolgt durch die Zugabe von Paraformaldehyd (3% (w/v) in PBS). Dieses knüpft kovalente Bindungen zwischen freien Aminogruppen benachbarter Proteine.

Nach der transienten Expression des gewünschten Proteins für 24h bzw. 48h oder 72h in den H1299-bzw. HeLa-Zellen wird das Medium abgesaugt. Die Zellen werden anschließend zweimal mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wird das Paraformaldehyd auf die Zellen

gegeben. Das Kammerdeckgläschen wird für 10min in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Danach wird erneut 2 mal mit 1xPBS gewaschen. Mit einer frisch angesetzten DAPI-Lösung (10µg/ml in PBS) kann der Kern angefärbt werden. DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid) ist ein AT-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff. Nach dem Interkalieren mit DNA fluoresziert es unter der Anregung mit UV-Licht (340nm) mit einer Wellenlänge von 490nm. Die Zellen werden erneut für 10min in den Brutschrank gestellt. Ein letztes Mal werden die Zellen mit PBS gewaschen und zum Schluss noch einmal für die Mikroskopie überschichtet. Eine Lagerung ohne Fluoreszenzverlust ist bei 4°C für mehrere Tage möglich.

2.2.4 Computergestützte Methoden

Zur Quantifizierung der Kernlokalisation des überexprimierten EGFP-Fusionsproteins werden mit dem Programm Photo-Paint (Corel Photo, Version 11) die Aufnahmen der EGFP-Fluoreszenz und die der DAPI-Färbung übereinander gelegt. Dadurch können die verschiedenen Zellkompartimente eindeutig voneinander unterschieden werden. Durch die Anwendung verschiedener Filter können mehrere überexprimierte Proteine in einer Zelle getrennt betrachtet werden und anschließend in Mischbildern ausgewertet werden.

Nachdem die Überexpression von Fluoreszenzproteinen in menschlichen Zelllinien vollzogen ist, können sie unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Das Programm ImageJ ist eine Java-basierte Freeware-Software, mit der Fluoreszenzintensitäten in ausgewählten Bereichen (ROI, „Region of interest“) gemessen werden können (Rasband 2006, Abramoff et al., 2004). Pro Zellkompartiment werden je drei Fluoreszenzwerte gemessen und jeweils der Mittelwert gebildet (**Abbildung 2-2**). Anschließend werden Quotienten gebildet, die das Fluoreszenzverhältnis zwischen den Kompartimenten beschreiben. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit als „Ratio“ bezeichnet. Der Mittelwert aus den Messwerten im Kern wird mit dem Buchstaben „N“, der aus den Messwerten in den Nukleoli mit „Nu“ und der aus den Messwerten aus dem Zytoplasma mit „C“ bezeichnet. Diese Mittelwerte werden zueinander ins Verhältnis gesetzt:

Die Nu/N-Ratio bezeichnet das Verhältnis der Fluoreszenzwerte von Nukleoli und Kern zueinander. Analog dazu bezeichnet die N/C-Ratio das Verhältnis der Fluoreszenzwerte zwischen Kern und Zytoplasma. Eine N/C-Ratio > 1 bedeutet eine größere Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma; eine N/C-Ratio < 1 bedeutet eine größere Fluoreszenz im Zytoplasma als im Kern.

$$\text{Nu/N-Ratio: } R_{Nu/N} = \frac{\sum \frac{I_{Nu}}{n}}{\sum \frac{I_N}{n}}$$

$$\text{N/C-Ratio: } R_{N/C} = \frac{\sum \frac{I_N}{n}}{\sum \frac{I_C}{n}}$$

$R_{N/C}$ = Kern-Zytoplasma-Ratio

I_N = Fluoreszenzintensität im Nukleus

n = Anzahl der Messungen

$R_{Nu/N}$ = Nukleolus-Kern-Ratio

I_C = Fluoreszenzintensität im Zytoplasma

A

B

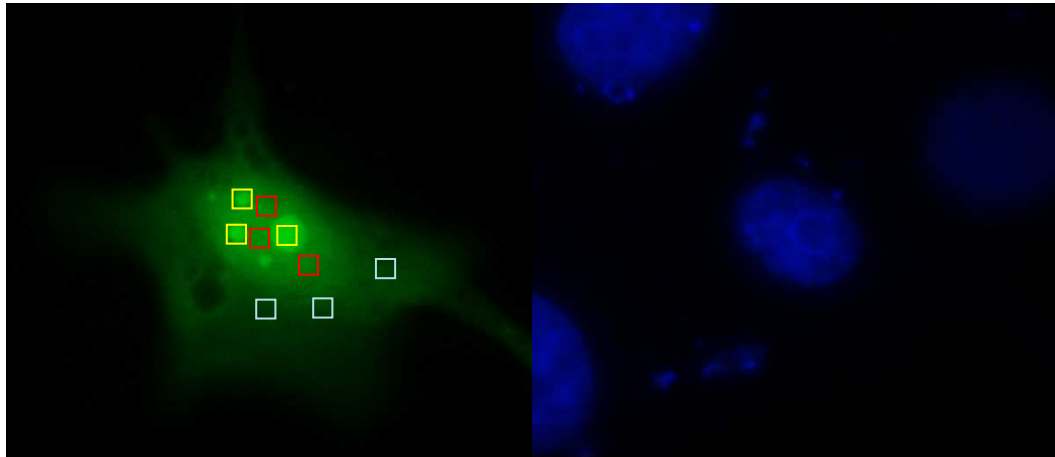


Abbildung 2-2: Darstellung einer H1299 Zelle im Fluoreszenzmikroskop, in der das Fusionsprotein EGFP/IP5K überexprimiert wurde; A: Aufnahme der Beispielizele durch einen grünen Farbfilter, Darstellung von EGFP; **B:** Aufnahme der selben Zelle durch einen blauen Farbfilter, Darstellung von DNA (Kern); gelbe Quadrate = Fluoreszenzwertmessung in den Nukleoli (Nu); rote Quadrate = Fluoreszenzwertmessung im Kern (N); weiße Quadrate = Fluoreszenzwertmessung im Zytoplasma (C).

Bei jedem Überexpressionsversuch werden 100 Zellen fotografiert und die Fluoreszenzwerte wie beschrieben gemessen. Die ermittelten Ratiowerte werden anschließend in einer Exceltabelle nach Größe sortiert und logarithmisch in einer Graphik aufgetragen. Hierdurch sind Verteilungsmaxima am ehesten zu beurteilen. Zur Signifikanzermittlung wird das Programm SigmaStat (Version 3.10, Systat Software, Inc.) verwendet. Hierzu werden die Ratiowerte der einzelnen Mutanten, die gemessen wurden, in einer separaten Datei zusammengestellt und statistisch nach einem parameterfreien Signifikanztest nach Kruskal-Wallis ausgewertet. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

Die intrazelluläre Zielsteuerung vieler Proteine wird durch bestimmte Peptidsequenzen vermittelt. Für einige dieser Zielsteuerungsdomänen konnten bereits Konsensussequenzen ermittelt werden. So existieren sogenannte nukleäre Lokalisationssignale (NLS), deren Konsensussequenz aus basischen Aminosäuren in bestimmter Abfolge bestehen (PKKKRKV in SV40, KRPAATKKAGQAKKKK in Nucleoplasmin) (Kalderon et al., 1984, Fontes et al., 2000, Fontes et al., 2003). Nukleäre Exportsignale (NES), enthalten häufig Leucine oder Leucin ähnliche Aminosäuren (la Cour et al., 2003). Ebenso wurde über nukleoläre Lokalisations- bzw. Retentionssignale berichtet, die über folgenden Konsensus verfügen: $[RR(I/L)X_{3r}]_{(n,n \geq 1)} + [L(\phi/N)(V/L)]_{(n,n \geq 1)}$ (Mekhail et al., 2007).

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Georg W. Mayr wurde bereits begonnen, die intrazelluläre Lokalisation der IP5K zu untersuchen. Sowohl die endogene IP5K als auch die als EGFP-Fusionsprotein überexprimierte Kinase befindet sich zum größten Teil im Kern, wo eine Anreicherung im Euchromatin und in Nukleoli zu beobachten ist (Brehm et al., 2007). Die IP5K muss somit aufgrund ihrer Größe über ein NLS verfügen. Dieses konnte auf den N-terminalen Bereich (AS 1-180) eingegrenzt werden. Da die Kinase sich nach LMB-Behandlung im Kern anreichert, muss sie außerdem über ein Exportin bindendes NES verfügen, das sich vermutlich im Aminosäurebereich 200-300 befindet, dessen Identität aber noch nicht eindeutig aufgeklärt werden konnte (Brehm et al., 2007). Welche Aminosäuren für die nukleoläre Lokalisation verantwortlich sind, ist noch vollständig unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, genauer zu charakterisieren, welche Aminosäuren an der Zielsteuerung der IP5K beteiligt sind, und zu untersuchen, ob die NES-Aktivität einer Feinregulierung durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung unterliegt.

Hierzu wurde durch QuikChange-Mutagenese eine Plasmid-Bibliothek von mutierten IP5K-Varianten hergestellt. Die nach Vektortransfektion exprimierten IP5K/GFP-Fusionsproteine wurden auf ihre intrazelluläre Zielsteuerung hin in H1299 und HeLa-Zellen untersucht.

3.1 Untersuchung putativer nukleärer Exportsignale der IP5K

Die IP5K besitzt vier putative Leucin reiche NES, die von Prof. Mayr mithilfe des Programmes NesBase (la Cour et al., 2003) prädictiert wurden. Durch intensive Suche konnten zwei weitere Peptidsequenzen gefunden werden, die ebenfalls dem Konsensus entsprechen, aber nicht von NesBase entdeckt wurden. Die zwei letztgenannten Sequenzen befinden sich innerhalb der Vertebratenpeptidinsertion (Aminosäuren 200-300), die von Dr. Maria Brehm im Rahmen ihrer naturwissenschaftlichen Doktorarbeit auf ihre NES-Aktivität hin untersucht

wurde (Brehm, 2006). In einer Versuchsreihe wurde dieses Peptid hier weitergehend untersucht, um die für die Exportaktivität verantwortlichen Aminosäuren zu identifizieren. Es existierte ein präliminäres Strukturmodell für die IP5K, das von Prof. Mayr erstellt wurde. Hierfür wurden zunächst Primärstrukturen verschiedener Proteine mit ähnlicher Aufgabe miteinander verglichen. Ausgehend von diesen Daten konnten Strukturvoraussagen erstellt und erste 3D-Modelle entwickelt werden. Als Vorlage wurde das Protein TAP gewählt, welches große Anteile an stark konservierten Aminosäuren enthält. Aufgrund dieser Tatsache konnten putative Domänen in einem dreidimensionalen Zusammenhang modelliert werden. Anhand des nachfolgend abgebildeten 3D-Strukturmodells wurde die mögliche Lage der Leucin reichen Sequenzen in 3D-Substrukturen des Enzyms prädiziert. TAP, als schwach homologes Protein, wurde gewählt, da es auch an dem Export von mRNA aus dem Zellkern beteiligt ist, und IP5K als essentiell für den mRNA-Export in Hefen beschrieben wurde (Rodriguez et al., 2004).



Abbildung 3-1: Putatives 3D-Modell der IP5K. Das Modell wurde von Prof. Mayr anhand der Peptidsequenz des Proteins TAP mit dem Programm PyMol modelliert. Blau = N-Terminus, rot = C-Terminus, magenta = Leucin reiche Regionen

3.1.1 Putative nukleäre Exportsignale der IP5K

Die putativen Leucin reichen NES, die mittels des Prädiktionsalgorithmus‘ NesBase ermittelt wurden, entsprechen dem Konsensussignal L-X(2-3)-L-X(2)-L-X-L (la Cour et al., 2003). Das L steht jeweils für ein Leucin bzw. eine Leucin ähnliche Aminosäure. Die betreffenden Sequenzen werden wie folgt in dieser Arbeit bezeichnet (Leucine und Leucin ähnliche Aminosäuren sind blau markiert):

L1: 81-	LEFVKQLCL	-90
L2: 233-	LAHHLKPFFF	-242
L3: 261-	LVHVITRVLL	-270
L4: 327-	VQMLDLLDI	-335
L5: 369-	FYQKLLDL	-376
L6: 433-	FSVSVLDLDL	-442

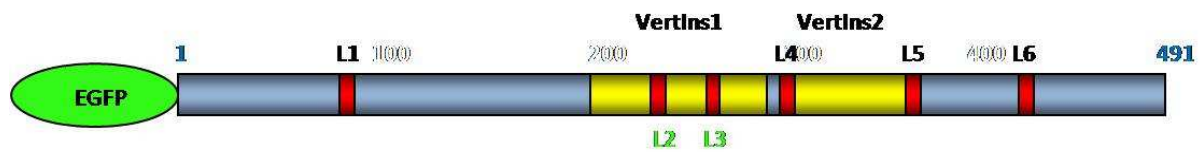


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Primärstruktur von EGFP/IP5K. VertIns1 (gelb): N-terminale Vertebrateninsertion = nicht-kanonisches NES, VertIns2 (gelb:) C-terminale Vertebrateninsertion, L1-6 (rot): Leucin reiche Regionen.

Die Deletionsmutanten, in denen die Sequenzen L1 bis L6 jeweils einzeln deletiert wurden, wurden mit $\Delta L[X]$ bezeichnet (X steht für die Nummer der Leucin reichen Region). Da bei den Substitutionsmutanten die Leucine bzw. Leucin ähnlichen Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden, erhielten sie die Bezeichnung: L[X]LA. „LA“ soll hierbei anzeigen, dass die Leucine gegen Alanin ausgetauscht wurden.

L2LA: 233- LAHHAKPAAA -242 = L237A/F240A/F241A/F242A
 L3LA: 261- LVHAATRAAA -270 = V264A/I265A/V268A/L269A/L270A
 L6LA: 433- FSVSAADADA -442 = V437A/L438A/L440A/L442A

3.1.2 Die Deletion von Leucin reichen putativen NES in der IP5K führt zu einer Veränderung der intrazellulären Lokalisation der Kinase

Die Basensequenz in dem für das Fusionsprotein EGFP/IP5K codierenden Plasmid wurde mittels QuikChange Mutagenese verändert. Die mutagenisierten Plasmide wurden in menschliche Zelllinien (H1299, HeLa) transfiziert und zur Überexpression gebracht. Unter dem Mikroskop wurde anschließend die Fluoreszenz des Fusionsproteins nach 48h Expressionszeit untersucht und quantifiziert. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit dem Programm ImageJ (vgl. Material und Methoden). Die Stärke der Fluoreszenz ist proportional zur Proteinmenge. Es wurden je drei Werte im Kern, im Zytoplasma und in den Nukleoli gemessen und jeweils die Durchschnittswerte (Nukleoli = Nu, Kern = N, Zytoplasma = C) gebildet. Diese Durchschnitte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Diese Verhältnisse werden als Nu/N-Ratio und N/C-Ratio bezeichnet.

Das Wildtyp-Enzym zeigt dabei die größte Fluoreszenz in den Nukleoli und im Kern der transfizierten Zellen (rote Pfeile, **Abbildung 3-3**). Proteine, die ein nukleäres Exportsignal (NES) besitzen, werden aktiv aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert. Sobald ein NES deaktiviert wird, verbleibt das Protein vollständig im Kern. Hierdurch steigt der Quotient N/C an.

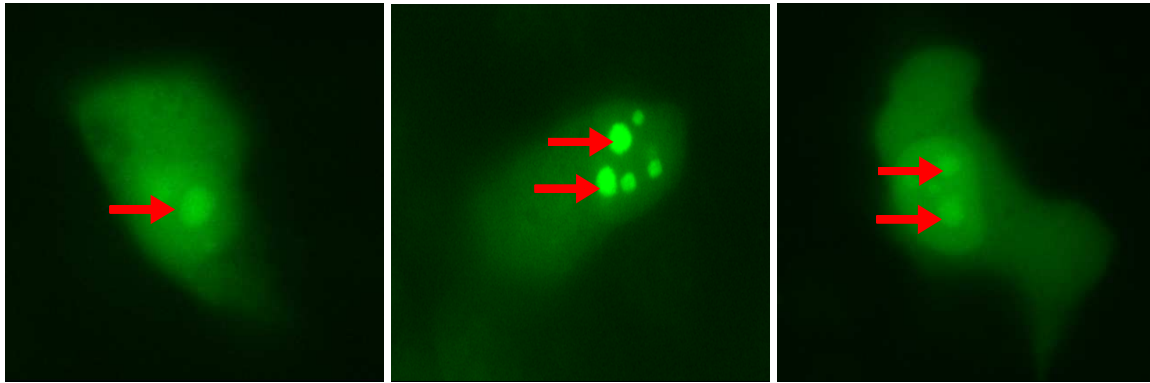


Abbildung 3-3: Intrazelluläre Lokalisation von überexprimierter Wildtyp-IP5K. EGFP/IP5K Fusionsprotein wurde für 48h in H1299 Zellen überexprimiert. Dargestellt sind drei Beispielszellen (N=100). Die Pfeile deuten auf die Anreicherung der IP5K in Nukleoli.

Durch QuikChange Mutagenese (QCM) wurden die putativen Leucin reichen NES der IP5K einzeln deletiert. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Abwandlung einer PCR (vgl. Material und Methoden). Es werden dabei jedoch Primer verwendet, die gegenüber der verwendeten Substrat-DNA Veränderungen in der Sequenz enthalten. Diese Veränderungen verbleiben in der Tochter-DNA. Durch Tausch, Deletion oder Insertion von Basen ist es möglich, die bei der Translation entstehende Aminosäuresequenz entsprechend zu verändern. Zur Trennung der Tochter-DNA von der Substrat-DNA wird der QCM-Ansatz mit dem Restriktionsenzym *DpnI* inkubiert, welches lediglich die methylierte Substrat-DNA schneidet. Zur Kontrolle dieses Arbeitsschrittes werden Proben aus dem Ansatz vor und nach Inkubation mit *DpnI* entnommen und mittels Agarosegelelektrophorese untersucht (**Abbildung 3-4**) (vgl. Material und Methoden).

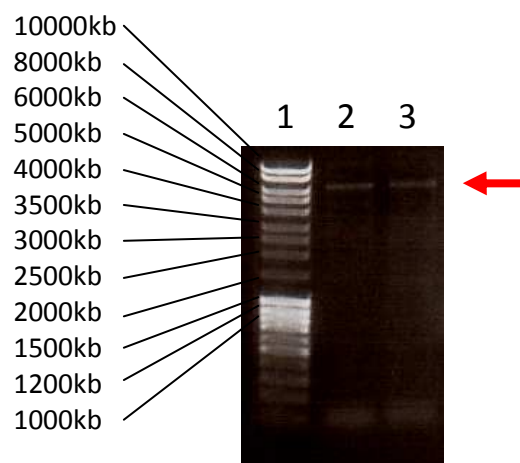


Abbildung 3-4: Repräsentative Agarosegelelektrophorese eines QCM-Ansatzes vor und nach *DpnI*-Verdau. Bahn 1: GeneRulerTM 1kb DNA Ladder der Firma Fermentas, die DNA-Fragmente mit fest definierten Größen (links) enthält. QuickChange Mutagenese Ansatz vor (Bahn 2) und nach *DpnI*-Verdau (Bahn 3). Das verwendete DNA-Plasmid enthält die Sequenzen für EGFP und *HsIP5K* und hat eine Gesamtlänge von etwa 6,5 kb (roter Pfeil).

Die Plasmide wurden anschließend in menschlichen Zellen zur Expression gebracht. Es zeigte sich bei der Expression der Deletionsmutanten nach 48h keine signifikante Zunahme der nukleären Lokalisation (**Abbildung 3-5**), was gegen die Existenz einer NES-Funktion der Leucin reichen Sequenzen der IP5K spricht. Überraschenderweise führten viele der Mutationen aber zu einer reduzierten nukleolären Lokalisation der Mutanten, was an der Abnahme der Fluoreszenz in den Nukleoli zu erkennen ist (vgl. **Abbildung 3-3** und **Abbildung 3-5**).

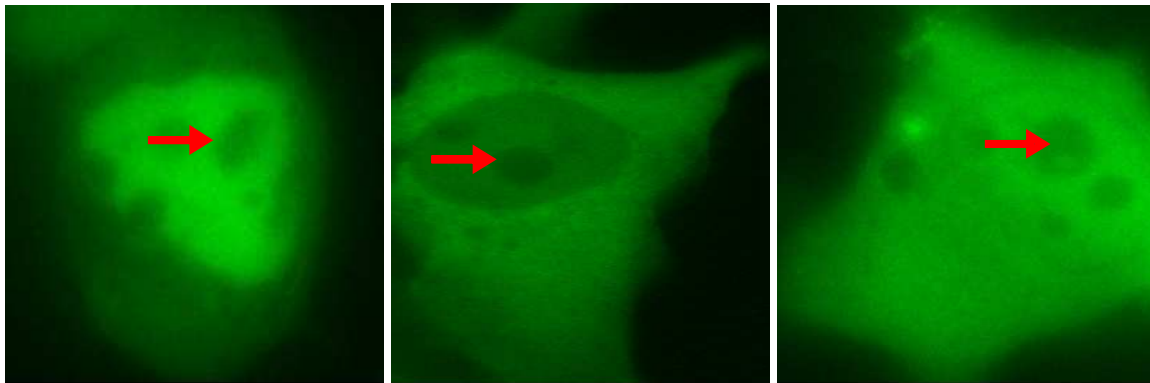


Abbildung 3-5: Intrazelluläre Lokalisation der IP5K Mutante $\Delta L2$ in H1299 Zellen. Die IP5K Mutante $\Delta L2$ ($\Delta 233-242$) wurde für 48h als EGFP-Fusionsprotein in H1299 Zellen überexprimiert. Dargestellt sind drei Beispielzellen (N=100). Die Pfeile deuten auf die Aussparung der Nukleoli durch IP5K $\Delta L2$.

Aufgrund dieses Befundes wurde die Nu/N Ratio der Deletionsmutanten bestimmt, um Hinweise für die Existenz von Zielsteuerungsdomänen innerhalb der IP5K zu finden, die das Protein in Nukleoli lokalisieren. In Tabelle 3-1 werden die Durchschnittswerte sowohl der Nu/N-Ratio als auch der N/C-Ratio der Deletionsmutanten denen des Wildtyps EGFP/IP5K gegenübergestellt. Es wurden jeweils 100 Zellen aus drei unabhängigen Versuchen fotografiert und ausgewertet. Die Deletion jeder einzelnen Leucin reichen Region verursacht eine signifikante Abnahme der Nu/N-Ratio sowie der N/C-Ratio. Das heißt, dass die jeweilige Mutante, im Vergleich zur Wildtyp-IP5K, weniger im Kern und in Nukleoli lokalisiert ist.

H1299	Nu/N	N/C
Wildtyp	$1,21 \pm 0,17$	$1,28 \pm 0,31$
$\Delta L1$	$0,85 \pm 0,11 *$	$0,90 \pm 0,28 *$
$\Delta L2$	$0,82 \pm 0,09 *$	$1,05 \pm 0,36 *$
$\Delta L3$	$0,81 \pm 0,09 *$	$1,09 \pm 0,37 *$
$\Delta L4$	$0,81 \pm 0,15 *$	$1,06 \pm 0,42 *$
$\Delta L5$	$0,79 \pm 0,31 *$	$0,92 \pm 0,31 *$
$\Delta L6$	$0,82 \pm 0,10 *$	$1,06 \pm 0,33 *$

Tabelle 3-1: Durchschnittswerte der Nu/N-Ratio und der N/C-Ratio von wildtyp IP5K und Deletionsmutanten. Wildtyp IP5K und die Deletionsmutanten: $\Delta L1 = \Delta 82-90$, $\Delta L2 = \Delta 233-242$, $\Delta L3 = \Delta 261-270$, $\Delta L4 = \Delta 327-335$, $\Delta L5 = \Delta 369-376$, $\Delta L6 = \Delta 433-442$ wurden 48h in H1299 Zellen überexprimiert und dann fotografiert. Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N- und N/C Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); N = 100; * = signifikant ($P < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

3.1.3 Untersuchung ausgewählter Leucin reicher Sequenzen der IP5K mittels Substitutionsmutagenese

Die Deletion einzelner Leucin reicher Peptidsequenzen aus der IP5K führte zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation der IP5K Mutanten. Die Fluoreszenz in den Nukleoli wurde durch die Mutation deutlich herabgesetzt, wodurch angenommen werden kann, dass die Proteinmenge von EGFP/IP5K in den Nukleoli abgenommen haben muss.

Die vollständige Deaktivierung eines funktionellen NES würde zu einer verstärkten Lokalisation des Proteins im Kern führen. Dies wurde bei der Deletion der einzelnen Leucin reichen Peptidsequenzen der IP5K nicht beobachtet. Eine solche Deletion ganzer Peptidsequenzen kann aber auch eine Veränderung der 3D-Struktur des Proteins hervorrufen, so dass überlegt wurde, dass der Eingriff in die Sequenz möglicherweise die Deaktivierung eines NES maskiert. Deswegen wurden drei Peptidsequenzen (L2, L3, L6) ausgewählt, die mittels A-Substitutionsmutagenese genauer untersucht werden sollten. Die Sequenzen L2 und L3 befinden sich beide in prädictierten α -Helices und stellen daher potentielle Bindungsstellen für Partnerproteine dar. Die Sequenz L6 wurde aufgrund des putativen 3-D-Modelles der IP5K (**Abbildung 3-1**) an der Oberfläche des Enzyms vermutet, weswegen auch diese als potentielle Bindungsdomäne infrage kam. Des Weiteren wurde nach Erhalt der N/C-Ratio und der Nu/N-Ratio (vgl. Abschnitt 3.1.2) rechnerisch eine Nu/C-Ratio in allen Deletionsmutanten errechnet. Diese beschreibt das Verhältnis Nukleolus zu Zytoplasma. Es stellte sich heraus, dass nach Deletion der Sequenzen L2, L3 bzw. L6 die Nu/C-Ratio deutlich weiter absank als bei allen anderen Deletionsmutanten (persönliche Mitteilung Prof. Mayr, **vgl. Kapitel 8**). Daher wurden mittels QuikChange Mutagenese gezielt ausgewählte Leucine oder Leucin ähnliche Aminosäuren in diesen Sequenzen gegen Alanin ausgetauscht. Anschließend wurden die hergestellten Plasmide in zwei verschiedenen menschlichen Zelllinien zur Expression gebracht. **Abbildung 3-6** zeigt exemplarisch jeweils zwei H1299-Zellen (links) und zwei HeLa-Zellen (rechts), die die angegebenen Mutanten oder Wildtyp IP5K als EGFP-Fusionsproteine für 48 Stunden überexprimierten.

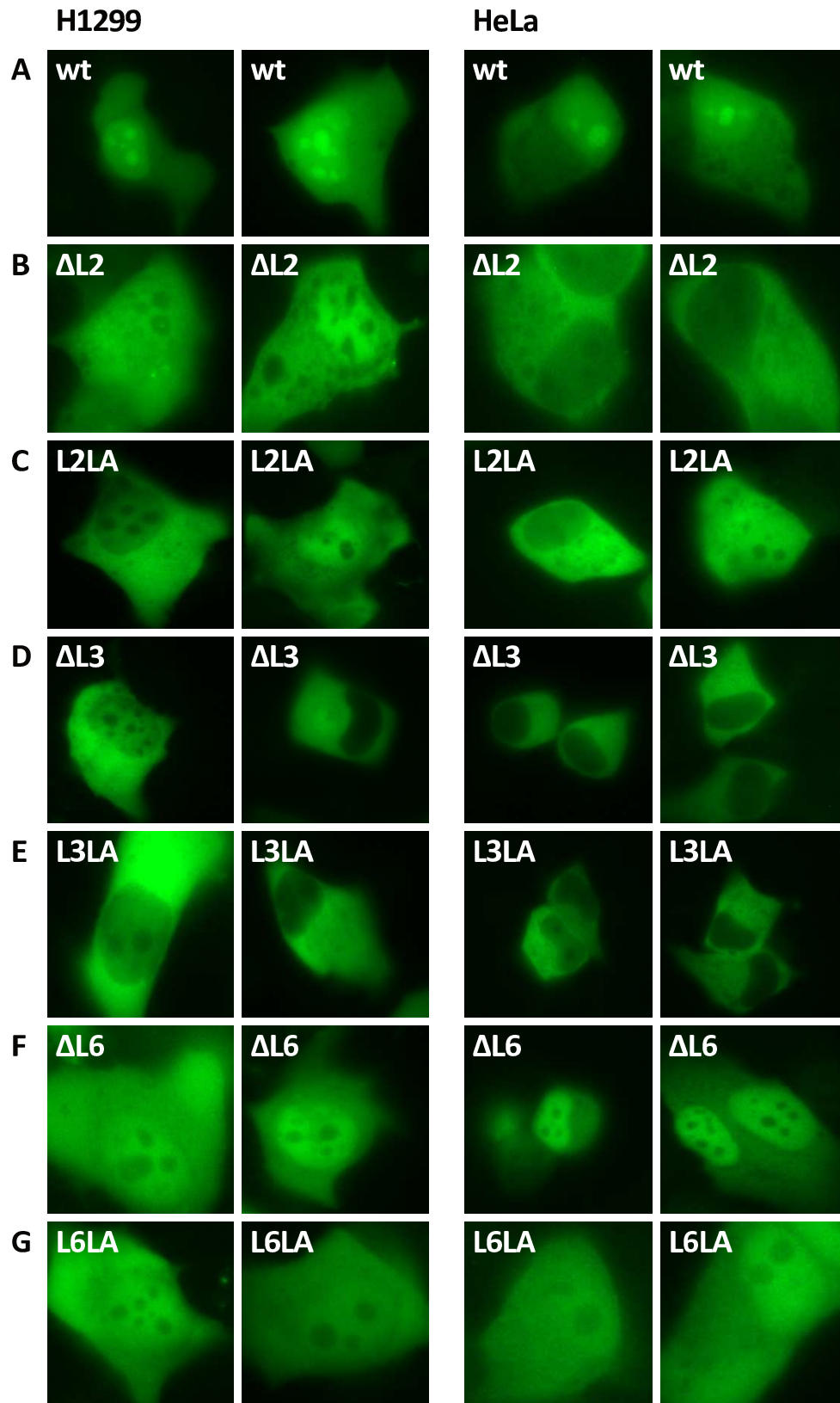
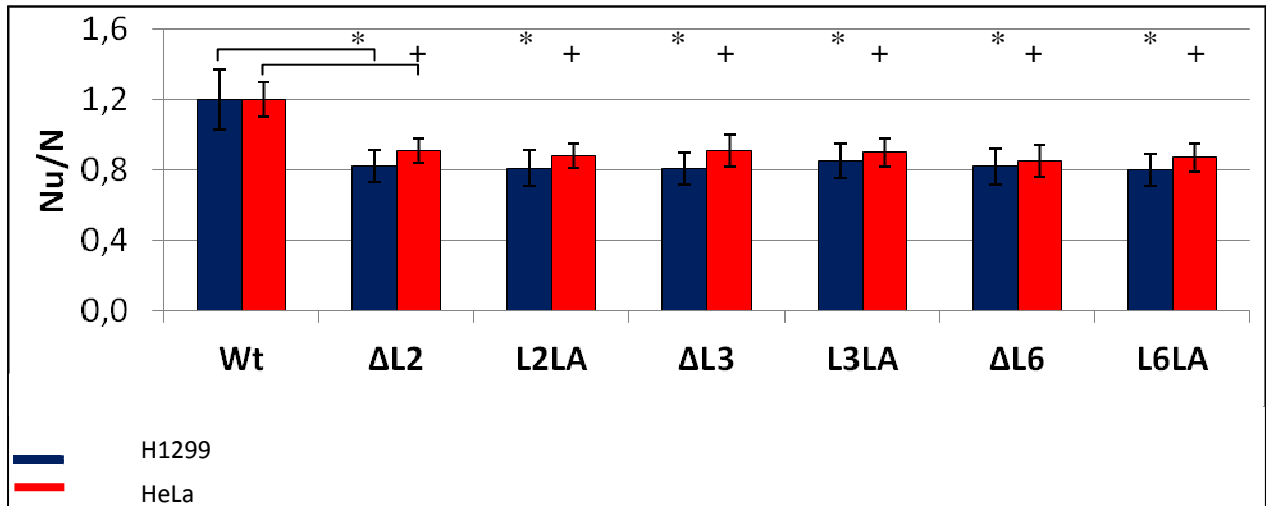


Abbildung 3-6: Intrazelluläre Lokalisation der überexprimierten Wildtyp-IP5K und verschiedener Enzymmutanten; Die IP5K/EGFP Fusionsproteine wurden für 48h in H1299 Zellen und in HeLa Zellen überexprimiert. Dargestellt sind jeweils zwei repräsentative Zellen (N=100). Wildtyp IP5K und die Mutanten: A = wt = Wildtyp, B = Δ L2 = IP5K Δ 233-242, C = L2LA = IP5K L237A/F240A/F241A/F242A, D = Δ L3 = IP5K Δ 261-270, E = L3LA = IP5K V264A/I265A/V268A/L269A/L270A, F = Δ L6 = Δ 433-442, G = L6LA = IP5K V437A/L438A/L440A/L442A wurden 48h in den Zellen überexprimiert und dann fotografiert. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die N/C- und Nu/N Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

Die Fluoreszenzintensitäten der Mutanten in Kern, Nukleoli und Zytoplasma wurden mit dem Programm ImageJ ausgewertet und zueinander ins Verhältnis gesetzt (Nu/N-Ratio = Verhältnis der EGFP-Fluoreszenzintensitäten zwischen Nukleoli und Kern; N/C-Ratio = Verhältnis der EGFP-Fluoreszenzintensitäten zwischen Kern und Zytoplasma). **Abbildung 3-7** stellt diese Ratiowerte des Wildtyps denen der Deletions- Substitutionsmutanten gegenüber.

A



B

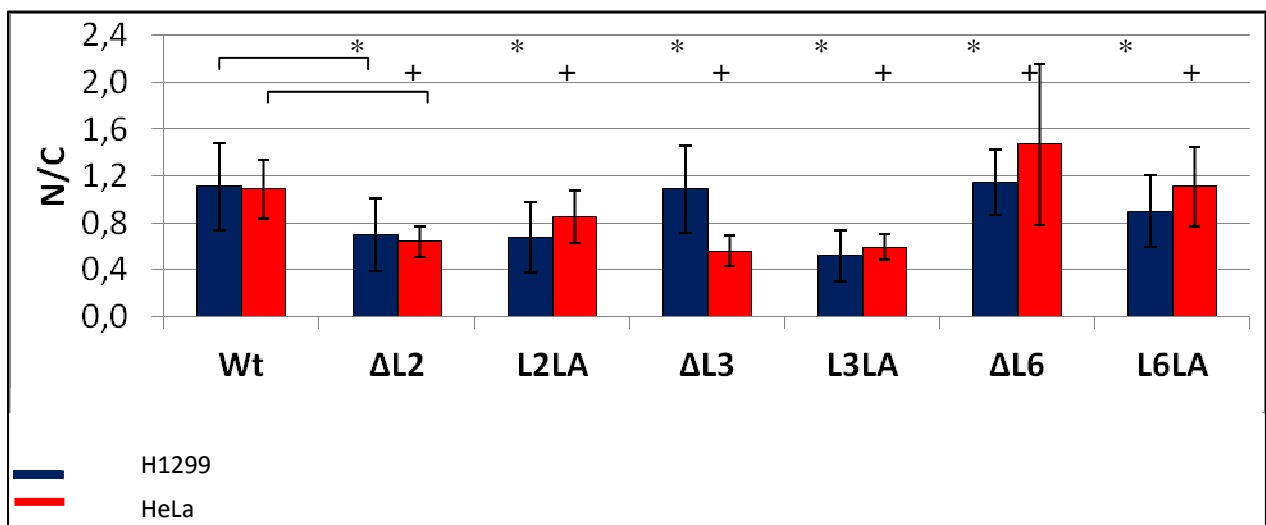


Abbildung 3-6: Durchschnittswerte der Nu/N-Ratio (A) und der N/C-Ratio (B) von wildtyp IP5K, Deletionsmutanten und Substitutionsmutanten.

Wildtyp IP5K und die Mutanten: ΔL2 = Δ233-242, L2LA = L237A/F240A/F241A/F242A, ΔL3 = Δ261-270, L3LA = V264A/I265A/V268A/L269A/L270A, ΔL6 = Δ433-442, L6LA = V437A/L438A/L440A/L442A wurden 48h in H1299 Zellen und in HeLa Zellen überexprimiert und dann fotografiert. Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die N/C- und Nu/N Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5). N=100; */+ = signifikant (P<0,05); n.s. = nicht signifikant

Die Einführung der Mutationen in die IP5K führte ausschließlich im Falle der Leucin reichen Region L6 zu einer Zunahme der Fluoreszenz im Kern und damit zu einem Anstieg der N/C-

Ratio nach 48 Stunden Expressionszeit in HeLa-Zellen. Eine signifikant niedrigere Fluoreszenzintensität in Nukleoli im Vergleich zur Wildtyp IP5K konnte für alle Mutanten nachgewiesen werden.

3.1.4 Logarithmische Auswertung der N/C- und Nu/N-Ratio der NES-Mutanten

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Nu/N-Ratio (EGFP-Fluoreszenzverhältnis zwischen Nukleoli und Kern) und die N/C-Ratio (EGFP-Fluoreszenzverhältnis zwischen Kern und Zytoplasma) jeweils nur als Durchschnittswerte von Messungen an jeweils 100 Zellen betrachtet. Um die Fluoreszenzverhältnisse aller Zellen eines Versuchs im Überblick betrachten zu können, wurden die Nu/N-Ratio und die N/C-Ratio nach ihrer Häufigkeit in einer Graphik aufgetragen. Zur Verdeutlichung von Häufigkeitsmaxima wurde eine logarithmische Ratio-Darstellung (= x-Achse in den Graphen) gewählt. In diesem Kapitel werden speziell die Daten zu den Versuchen an den Leucin reichen Sequenzen L2, L3 und L6 betrachtet. Die Graphiken zu den Sequenzen L1, L4 und L5 sind im Anhang zu ersehen (**siehe Kapitel 8**). Nach 48-stündiger Überexpression von EGFP/IP5K in H1299 Zellen betrug die Nu/N-Ratio im Durchschnitt $1,21 \pm 0,17$. Dies wurde dadurch erklärt, dass die Akkumulation des Fusionsproteins in den Nukleoli am stärksten war ($\text{Nu/N} > 1$). Das Verteilungsmaximum in der logarithmischen Darstellung in **Abbildung 3-8** entspricht diesem Ergebnis. In 33% der beobachteten Zellen, in denen Wildtyp IP5K exprimiert wurde, wurde eine Nu/N-Ratio von 1,2 gemessen. Dieses stellt auch das Verteilungsmaximum dar. Nach der Deletion und auch bei der gezielten Punktmutation der Sequenzen L2, L3 und L6 wurde eine starke Abnahme der Nu/N-Ratio gemessen. Auch in den hier nicht gezeigten Versuchen, bei denen die Sequenzen L1, L4 und L5 deletiert wurden, konnte dies gezeigt werden (**vgl. Anhang; Kapitel 8**). Grund hierfür war eine starke Abnahme der Fluoreszenz in den Nukleoli. Nach 48-stündiger Expression des Wildtyp-Fusionsproteins EGFP/IP5K in H1299-Zellen zeigte sich eine starke Lokalisation der Fluoreszenz im Kern und besonders in den Nukleoli. Bei der logarithmischen Darstellung zeigten sich zwei Verteilungsmaxima der N/C-Ratio bei 1,1 zu 18% und 1,5 zu 15%. Eine N/C-Ratio zwischen 1,1 und 1,5 wurde in 31% der beobachteten Zellen gemessen.

Die Deletion der Sequenzen L2, L3 und L6 erzeugten in Bezug auf die N/C-Ratio eine insgesamt inhomogene Verteilung. Man kann keine Regel erkennen, nach der sich die Lokalisation der IP5K in H1299 Zellen durch die Mutagenese verändert. Punktmutation der Sequenzen L2 und L3 führte zu einer verringerten N/C-Ratio in einem Großteil der Zellen, was möglicherweise auf einen reduzierten Kernimport dieser Mutanten zurückzuführen ist. Bei keiner der Mutanten wurde eine Zunahme der N/C-Ratio beobachtet, was darauf

schließen lässt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit keine der Sequenzen allein für den nukleären Export der IP5K verantwortlich ist.

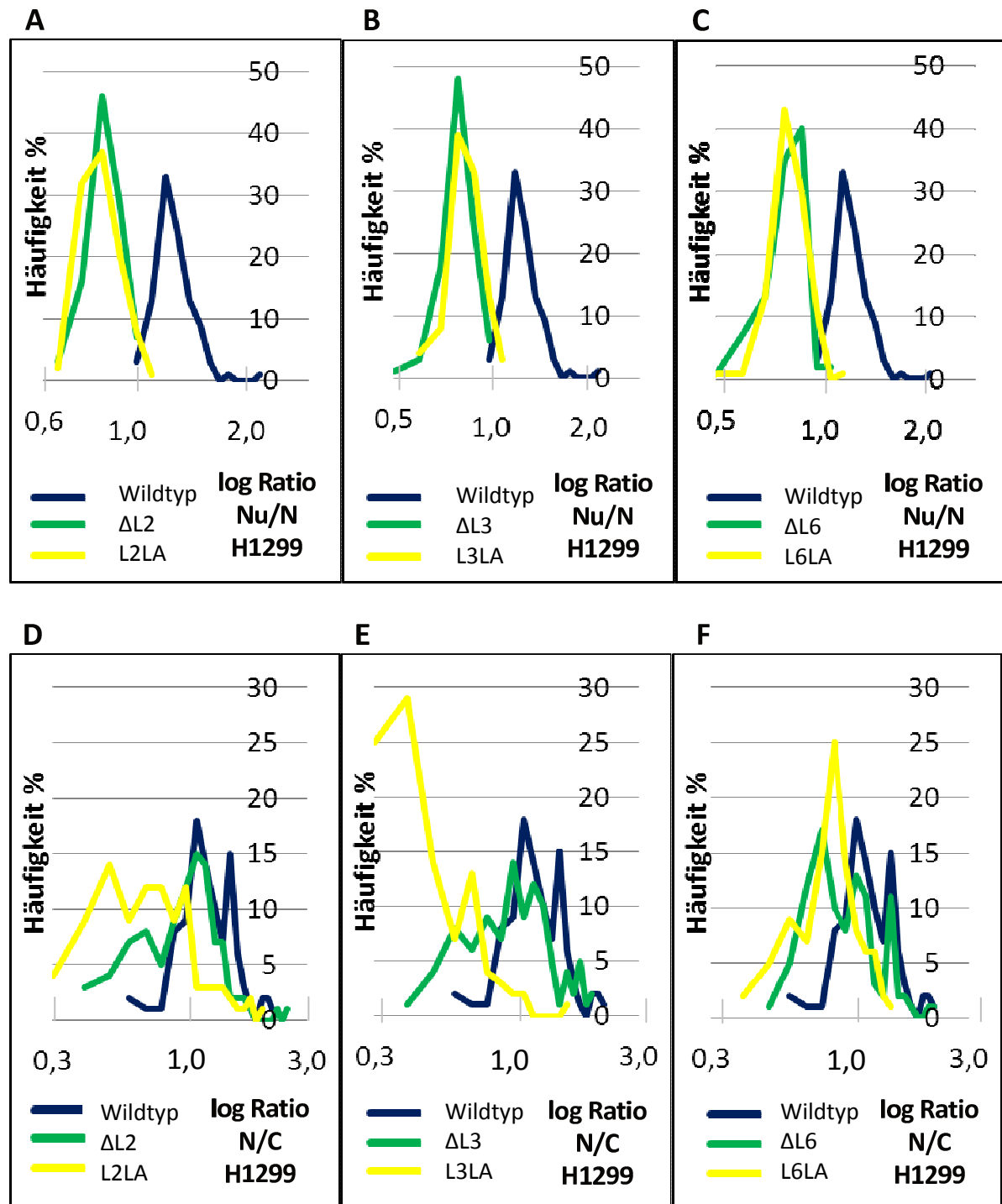


Abbildung 3-8: Häufigkeitsverteilung der Nu/N-Ratio und der N/C-Ratio der Fluoreszenzintensitäten von wildtyp IP5K im Vergleich zu denen ausgewählter Mutanten.

Wildtyp IP5K (blau), die Deletionsmutanten $\Delta L2 = \Delta 233-242$ (grün, A,D), $\Delta L3 = \Delta 261-270$ (grün, B,E), $\Delta L6 = \Delta 433-442$ (grün, C,F) und Substitutionsmutanten L2LA = L237A/F240A/F241A/F242A (gelb, A,D), L3LA = V264A/I265A/V268A/L269A/ L270A (gelb, B,E), L6LA = V437A/L438A/L440A/L442A (gelb, C,F) wurden 48h in H1299 Zellen überexprimiert und dann fotografiert (N = jeweils 100).

Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N-Ratio (A-C) und N/C-Ratio (D-F) für jede Zelle berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5). Anschließend wurden die Werte nach ihrer Größe sortiert und die Häufigkeit ihres Auftretens logarithmisch dargestellt.

3.1.5 Lokalisation überexprimierter EGFP/IP5K in menschlichen Zellen nach verschiedenen Expressionszeiten

Die gezielte Mutagenese eines Proteins kann zur Veränderung seiner 3D-Struktur führen. Hierdurch können Veränderungen der Lokalisation in der Zelle oder auch eine veränderte Kinetik der Enzymkatalyse stattfinden. Ebenso kann die Expressionsstärke beeinflusst sein, da das veränderte Protein möglicherweise verstärkt von der Zelle abgebaut oder von vornherein schlechter exprimiert wird.

Aus diesem Grund wurden in einer Versuchsreihe die Deletionsmutanten und Substitutionsmutanten aus den vorangegangenen Versuchen nach verschiedenen Expressionszeiten, und zusätzlich in HeLa Zellen, fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Wie zuvor schon erläutert nahm im Vergleich zum überexprimierten Wildtyp durch die Deletion jeweils einer Leucin reichen Sequenz die Fluoreszenz in den Nukleoli von H1299-Zellen signifikant ab. Hierdurch nahm entsprechend auch die Nu/N-Ratio ab. Die gemessene Nu/N-Ratio zu den gewählten Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden Expressionszeit) blieb sowohl nach Deletion, als auch nach Substitution einzelner Leucine oder Leucin ähnlicher Aminosäuren durch Alanin innerhalb der Sequenzen L2, L3 oder L6 (siehe **Abbildung 3-9A** bis **3-14A** für Details) im Durchschnitt annähernd konstant.

Die N/C-Ratio des überexprimierten Wildtyps hingegen zeigte einen Maximalwert nach 48 Stunden Expressionszeit. Danach fiel das Verhältnis bei 72 Stunden Expression wieder auf den 24-Stunden-Wert zurück. Die N/C-Ratio der Deletionsmutante $\Delta L2$ zeigte einen analogen Verlauf zur Wildtyp IP5K, lediglich auf einem niedrigeren Niveau (**Abbildung 3-9B**). Die Substitutionsmutante L2LA hatte nach 24 Stunden Expressionszeit in etwa die gleiche N/C-Ratio wie die Deletionsmutante ($\Delta L2$, **Abbildung 3-9B**). Es zeigte sich hier allerdings, dass die Ratio kontinuierlich zunahm und in Richtung der Wildtyp-Werte strebte.

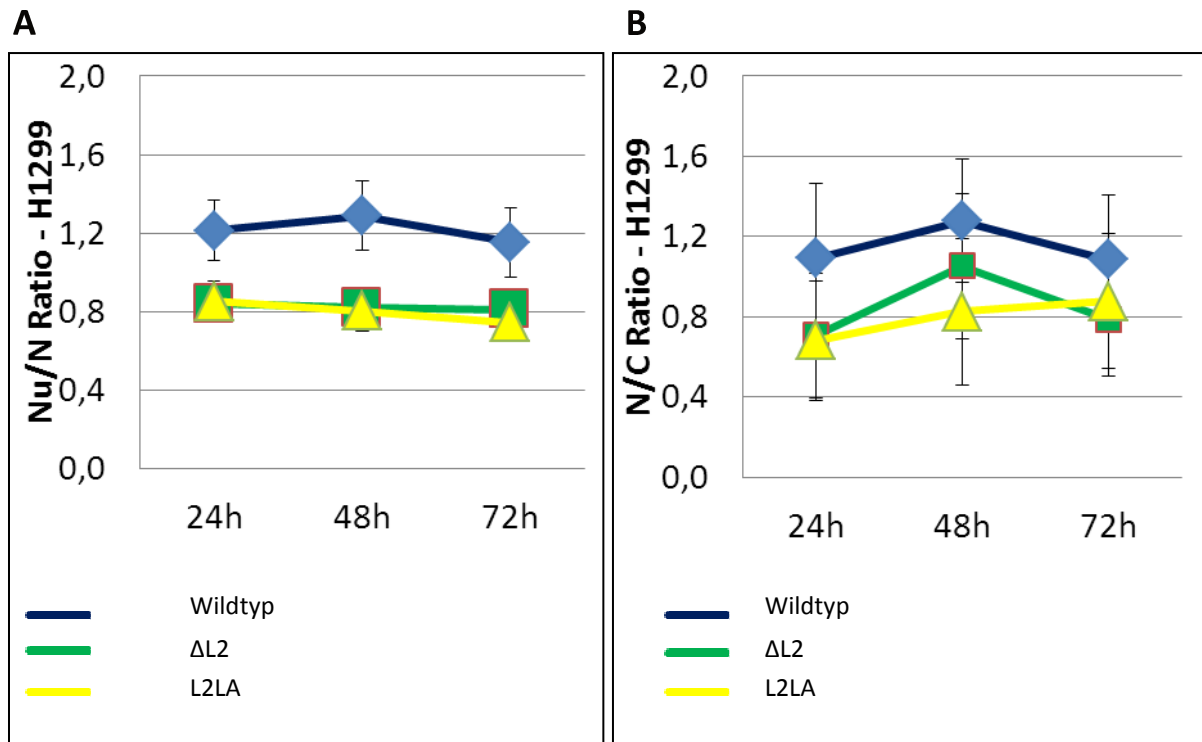


Abbildung 3-9: Darstellung der N/C-Ratio von wildtyp IP5K, sowie der Deletionsmutante $\Delta L2$ und der Substitutionsmutante L2LA nach verschiedenen Expressionszeiten in der menschlichen Zelllinie H1299. Wildtyp IP5K (blau) und die Enzymmutanten $\Delta L2 = \Delta 233-242$ (grün) und L2LA = L237A/F240A/F241A/F242A (gelb) wurden in H1299 Zellen für 24, 48 und 72h überexprimiert und dann fotografiert. N = 100. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und N/C-Ratio (B) berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

In HeLa Zellen stieg die Nu/N-Ratio der überexprimierten Wildtyp IP5K von 24 Stunden nach 72 Stunden Expressionszeit kontinuierlich an (**Abbildung 3-10A**). Zu jedem Zeitpunkt blieb die Nu/N-Ratio des Wildtyps größer 1. Daraus lässt sich folgern, dass die Akkumulation des Fusionsproteins in den Nukleoli größer war als in den anderen Bereichen des Kerns. Sowohl die Deletionsmutante $\Delta L2$ als auch die Substitutionsmutante L2LA zeigten durchgängig über alle Expressionszeiten hinweg einen Wert von etwa Nu/N = 0,9 (**Abbildung 3-10A**). Das bedeutet, dass die Fluoreszenzwerte des jeweiligen Fusionsproteins sich zwischen Nukleoli und Karyoplasma nahezu angleichen. Die N/C-Ratio der Mutante $\Delta L2$ in HeLa-Zellen zeigte einen leicht ansteigenden Trend im zeitlichen Verlauf. Von einem Wert von ca. 0,63 nach 24 Stunden stieg sie kontinuierlich auf etwa 0,69 nach 72 Stunden an. Die Mutante L2LA verhielt sich dazu gegensätzlich. Sie begann mit einem Wert von 0,76 nach 24 Stunden und endete bei einem Wert von 0,68 bei 72 Stunden (**Abbildung 3-10B**).

Insgesamt kann man sagen, dass sich die erzeugten Mutationen in der Sequenz L2 in beiden Zelllinien ähnlich auf die Lokalisation der Mutanten auswirken. In allen Fällen führen die Mutationen zu einer Abnahme der N/C und Nu/N-Ratio. Die N/C-Ratio der Wildtyp-IP5K nimmt in H1299 und HeLa-Zellen den gleichen Verlauf. Die Nu/N-Ratio allerdings nimmt in

HeLa-Zellen stärker zu als in H1299-Zellen, was auf eine stärkere Anreicherung der IP5K in Nukleoli von HeLa-Zellen schließen lässt.

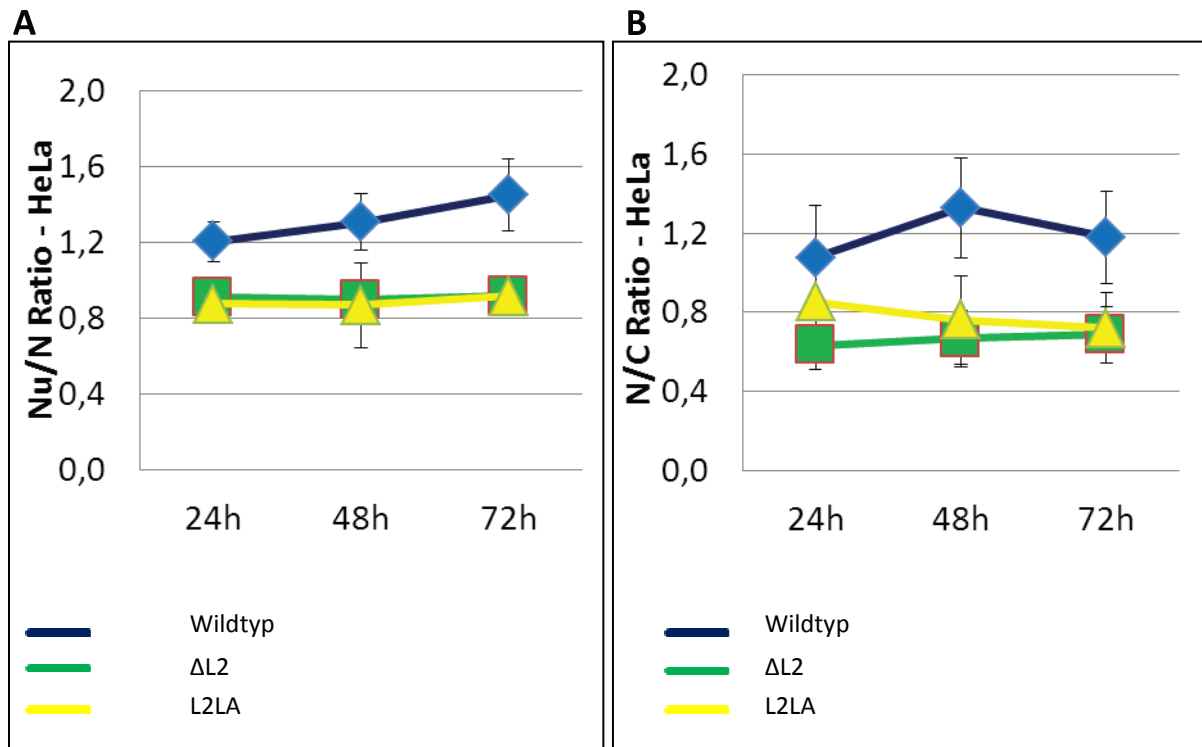


Abbildung 3-10: Darstellung der Nu/N-Ratio von wildtyp IP5K, sowie der Deletionsmutante $\Delta L2$ und der Substitutionsmutante L2LA und ausgewählten Enzymmutanten nach verschiedenen Expressionszeiten in der menschlichen Zelllinie HeLa. Wildtyp IP5K (blau) und die Enzymmutanten: $\Delta L2 = \Delta 233-242$ (grün), L2LA = L237A/F240A/F241A/F242A (gelb) wurden in HeLa Zellen für 24, 48 und 72h überexprimiert und dann fotografiert. N = 100. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und N/C-Ratio (B) berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

Die Nu/N-Ratio der Deletionsmutante $\Delta L3$ und der Substitutionsmutante L3LA nach Expression in H1299 Zellen zeigt zu allen Messzeitpunkten einen Wert von ca. 0,8 (**Abbildung 3-11A**). Dieser Wert liegt, wie auch bei den L2-Mutanten, signifikant niedriger als der des Wildtyps. Demnach sind auch die L3-Mutanten weniger in Nukleoli angereichert als das Wildtypenzym. Die N/C-Ratio der Mutante $\Delta L3$ zeigte einen ähnlichen Verlauf der Fluoreszenzwerte über die Zeit wie der Wildtyp, allerdings auf einem niedrigeren Niveau (**Abbildung 3-11B**). Die Substitutionsmutante L3LA zeigte im Vergleich zum Wildtyp einen spiegelbildlichen Verlauf (**Abbildung 3-11B**). Während der Wildtyp und die Deletionsmutante ein Maximum der N/C-Ratio bei einer Expressionszeit von 48 Stunden zeigten, entstand bei der Substitutionsmutante ein Minimum (**Abbildung 3-11B**).

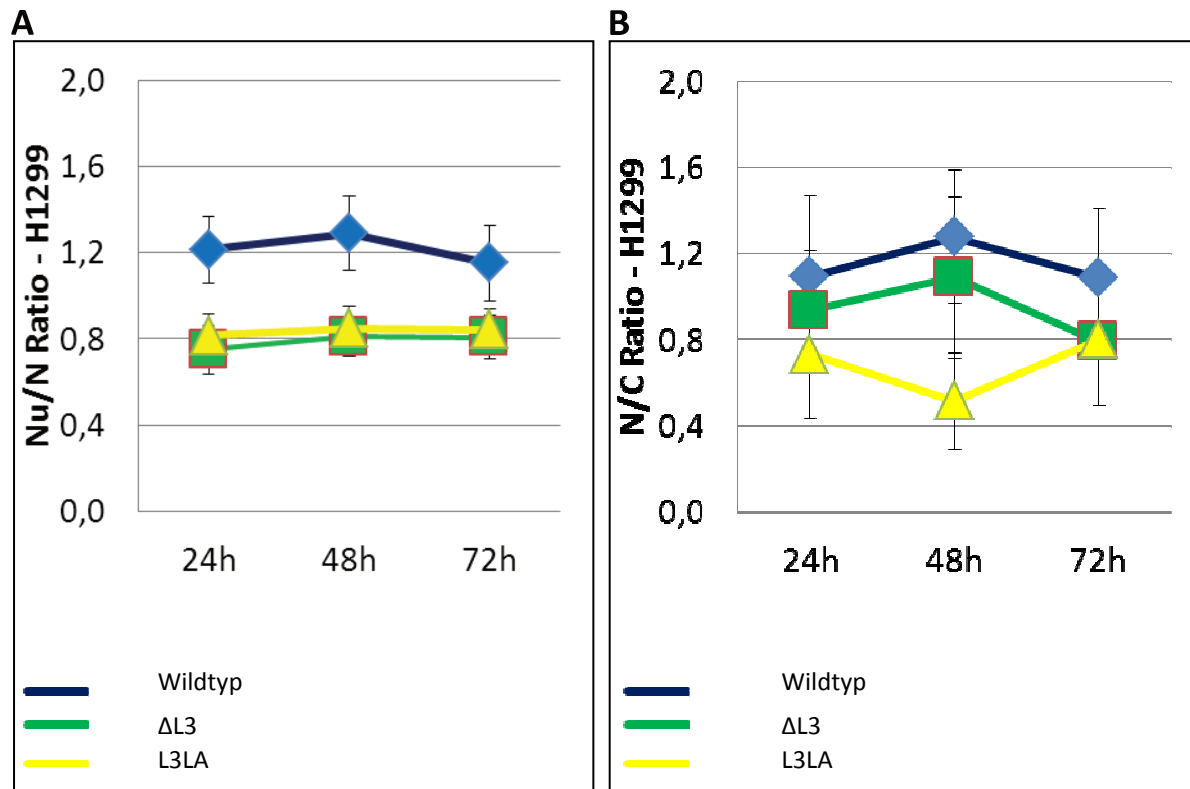


Abbildung 3-11: Darstellung der Nu/N-Ratio von wildtyp IP5K, sowie der Deletionsmutante $\Delta L3$ und der Substitutionsmutante L3LA nach verschiedenen Expressionszeiten in der menschlichen Zelllinie H1299. Wildtyp IP5K (blau) und die Enzymmutanten $\Delta L3 = \Delta 261-270$ (grün) und L3LA = V264A/I265A/V268A/L269A/L270A (gelb) wurden in H1299 Zellen für 24, 48 und 72h überexprimiert und dann fotografiert. N = 100. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und N/C-Ratio (B) berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

In HeLa Zellen zeigte die N/C-Ratio der beiden Mutanten einen spiegelbildlichen Verlauf im Vergleich zum Wildtyp bei insgesamt deutlich niedrigeren Werten (**Abbildung 3-12B**). Die Nu/N-Ratio beider Mutanten blieb durchgehend bei einem Wert von ca. 0,85. Hier zeigt sich kein Unterschied in der Lokalisation der Mutanten zwischen den beiden untersuchten Zelllinien (**Abbildung 3-12A**).

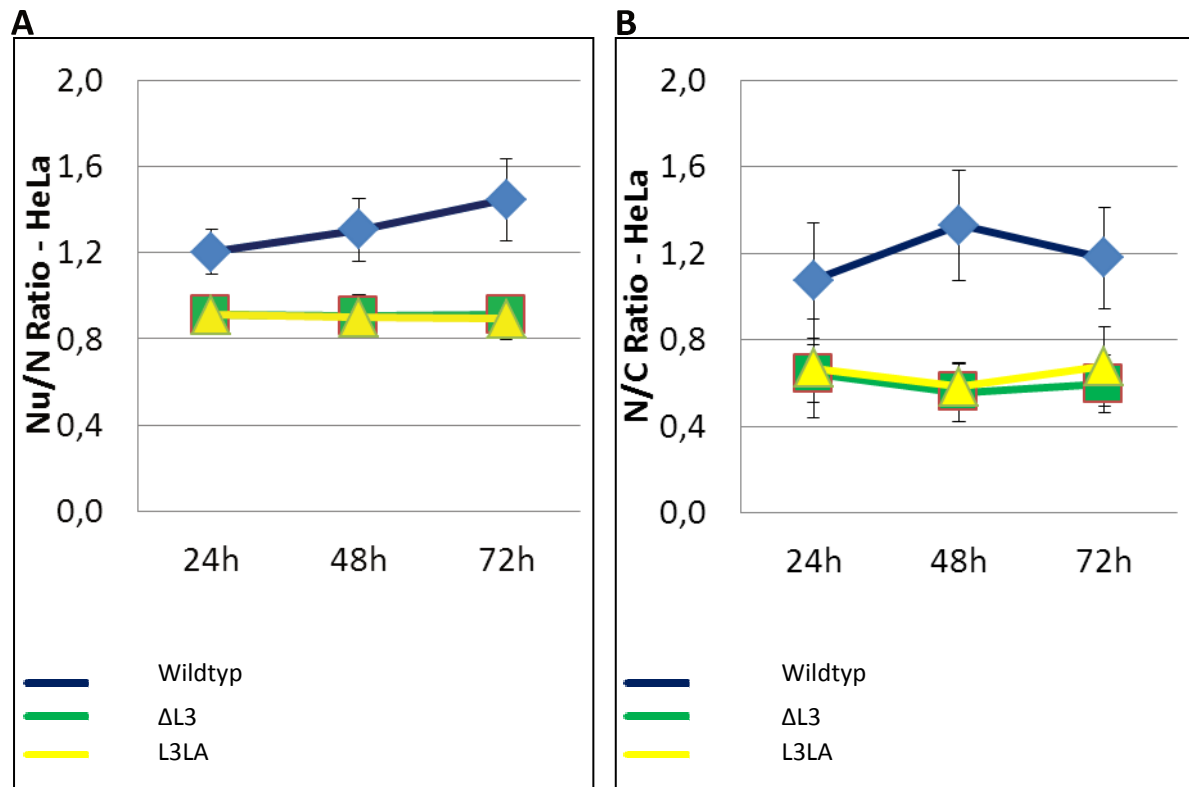


Abbildung 3-12: Darstellung der Nu/N-Ratio von Wildtyp IP5K, sowie der Deletionsmutante $\Delta L3$ und der Substitutionsmutante L3LA nach verschiedenen Expressionszeiten in der menschlichen Zelllinie HeLa. Wildtyp IP5K (blau) und die Enzymmutanten $\Delta L3 = \Delta 261-270$ (grün) und L3LA = V264A/I265A/V268A/L269A/L270A (gelb) wurden in HeLa Zellen für 24, 48 und 72h überexprimiert und dann fotografiert. N = 100. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und N/C-Ratio (B) berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

Die Leucin reiche Sequenz L6 liegt am weitesten C-terminal in der Aminosäurestruktur der IP5K. Die Nu/N-Ratio der Fluoreszenzwerte von EGFP/IP5K $\Delta L6$ (Deletionsmutante) und EGFP/IP5K V437A/L438A/L440A/L442A (Substitutionsmutante L6LA) lag zu allen Messzeitpunkten unter 1 (**Abbildung 3-13A**). Die Nukleoli wiesen eine signifikant erniedrigte Fluoreszenz gegenüber dem Wildtyp auf. Zu allen Messzeitpunkten veränderte sich die Nu/N-Ratio kaum und blieb bei einem Wert von ca. 0,8. Ebenso verhielt sich dies in HeLa Zellen (**Abbildung 3-14A**).

Die N/C-Ratio der Deletionsmutante $\Delta L6$ zeigte in H1299 Zellen einen niedrigeren Wert als der Wildtyp nach 24 Stunden Expressionszeit. Nach 72 Stunden glichen sich die Ratiowerte annähernd an (**Abbildung 3-13B**). Das lässt darauf schließen, dass sich nahezu eine Gleichverteilung des überexprimierten Fusionsproteins EGFP/IP5K zwischen Kern und Zytoplasma einstellt.

Die N/C-Ratio der Substitutionsmutante L6LA blieb im zeitlichen Verlauf annähernd auf ähnlichen Werten zwischen 0,8 und 0,9 (**Abbildung 3-13B**). Das bedeutet, dass diese Mutante weniger im Kern lokalisiert war als die Deletionsmutante und der Wildtyp der IP5K.

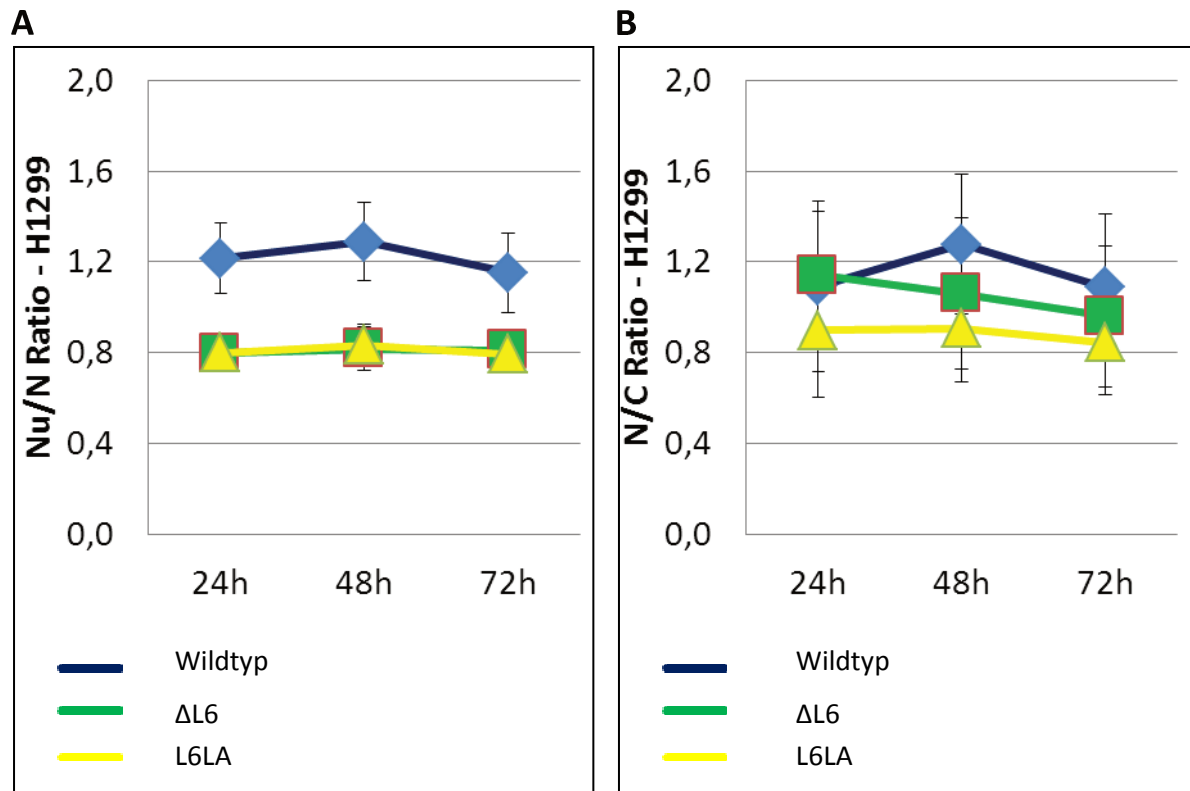


Abbildung 3-13: Darstellung der Nu/N-Ratio und der N/C-Ratio von wildtyp IP5K, sowie der Deletionsmutante $\Delta L6$ und der Substitutionsmutante L6LA nach verschiedenen Expressionszeiten in den menschlichen Zelllinie H1299. Wildtyp IP5K (blau) und die Enzymmutanten $\Delta L6 = \Delta 433-442$ (grün) und L6LA = V437A/L438A/L440A/L442A (gelb) wurden in H1299 Zellen für 24, 48 und 72h überexprimiert und dann fotografiert. N = 100; Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und N/C-Ratio (B) berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

Die Deletionsmutante EGFP/IP5K $\Delta L6$ zeigte in HeLa Zellen ein anderes Verhalten als alle anderen Mutanten. Nach 24 Stunden Expressionszeit wies diese Mutante eine N/C-Ratio auf, die signifikant höher war als der Wert des Wildtyp-Enzyms (**Abbildung 3-14B**). Diese Fluoreszenzzunahme im Kern gegenüber dem Zytoplasma wäre konform zu einer Deaktivierung eines NES. Nach 48 Stunden stieg die N/C-Ratio des Wildtyps an, während der Wert der Deletionsmutante absank. Nach 72 Stunden sank die N/C-Ratio des Wildtyps wieder ab, während der Wert der Deletionsmutante wieder anstieg und erneut signifikant über dem Wert des Wildtyps lag (**Abbildung 3-14B**). Der zeitliche Verlauf der N/C-Ratio der Substitutionsmutante verlief parallel zur Verlaufskurve der Deletionsmutante. Der Ausgangswert bei 24 Stunden ist dem des Wildtyps annähernd gleich. Der Verlauf der N/C-Ratio der Substitutionsmutante war parallel zu dem der Deletionsmutante auf niedrigerem Niveau (**Abbildung 3-14B**). Insgesamt könnte dieses Ergebnis darauf hinweisen, dass sich in der Sequenz L6 ein NES befindet, das in HeLa-Zellen funktional, in H1299 jedoch funktionslos ist. Oder es könnte sich um eine NLS-Funktion handeln, die erst durch die Deletion aktiv wird.

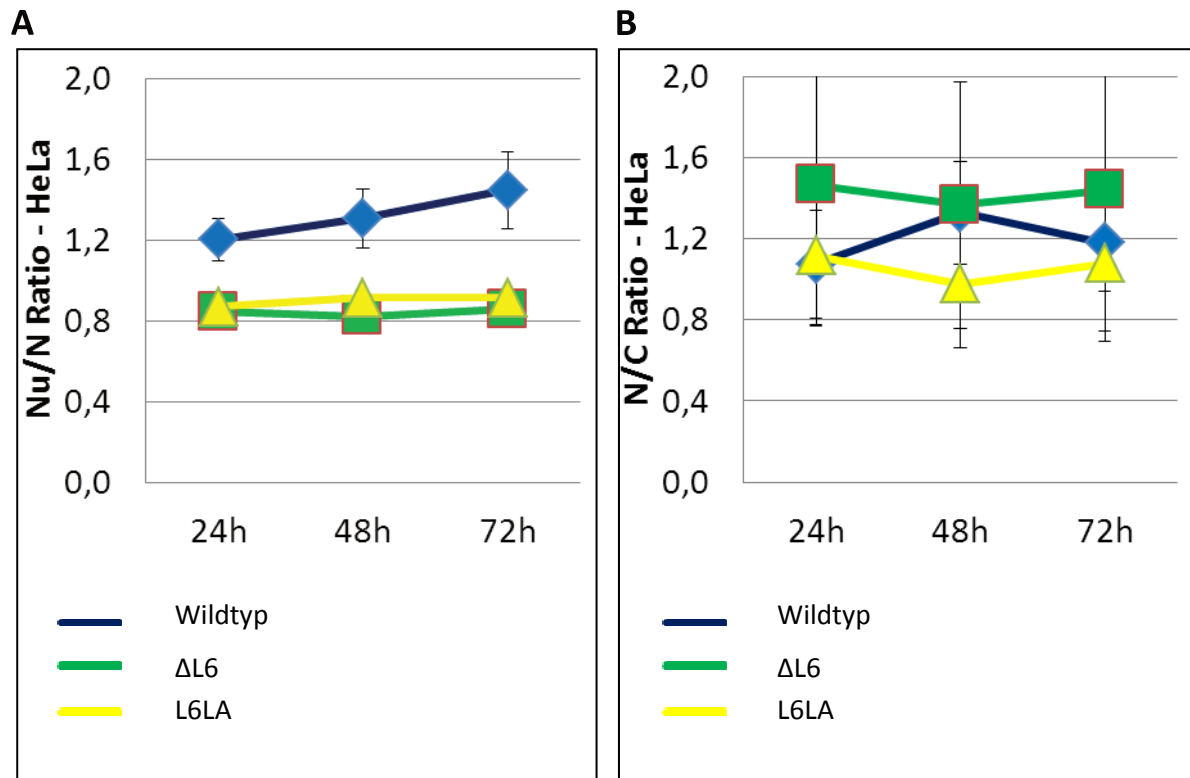


Abbildung 3-14: Darstellung der Nu/N-Ratio und der N/C-Ratio von wildtyp IP5K, sowie der Deletionsmutante Δ L6 und der Substitutionsmutante L6LA nach verschiedenen Expressionszeiten in den menschlichen Zelllinie HeLa. Wildtyp IP5K (blau) und die Enzymmutanten Δ L6 = Δ 433-442 (grün) und L6LA = V437A/L438A/L440A/L442A (gelb) wurden in HeLa Zellen 24, 48 und 72h überexprimiert und dann fotografiert. N = 100; Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und N/C-Ratio (B) berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

Es ließen sich aus den vorliegenden Daten z. B. aufgrund stark abnehmender Fluoreszenz im Laufe der Expressionszeit keine Hinweise für Fehlfaltungen von Mutanten ableiten.

3.1.6 Das Peptid L6 ist nicht hinreichend für den nukleären Export von EGFP

Nach dem putativen 3D-Modell der IP5K von Prof. Dr. Mayr, stellt die Sequenz des putativen Leucin reichen NES L6 eine putative α -Helix dar, die sich in nächster Nähe zu zwei weiteren α -Helices befindet. Bisher wurden mögliche Funktionen dieser Sequenz durch Deletion bzw. Punktmutation innerhalb des Vollängenproteins von EGFP/IP5K geprüft. Darin zeigte sich eine mögliche NES-Funktion nach Expression in HeLa-Zellen. Ebenso interessant war die Tatsache, dass nach Expression in H1299-Zellen die Enzymmutante in den meisten Zellen nicht mehr in den Nukleoli vorhanden war. Aus diesem Grund wurde die DNA-Sequenz von L6 mittels QuikChangeMutagenese in die Multiple Cloning Site des Vektors pEGFP-C1 eingefügt. Nach Überexpression in H1299 Zellen entstand das Fusionsprotein EGFP-L6. EGFP selbst besitzt weder ein NLS noch ein NES, es reichert sich aber vermutlich aufgrund passiver Diffusion im Kern an. Dieser Versuch sollte zeigen, ob die Peptidsequenz L6 allein

dazu in der Lage ist, den Export eines Proteins aus dem Kern zu vermitteln. Als Positivkontrolle wurde das NES (168-YPLMEEIGFLVLGMR-182) der *HsIPMK* und dessen flankierenden Bereiche als EGFP-Fusionsprotein für 48h überexprimiert. Das Konstrukt wurde von Rüdiger Meyer im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit hergestellt. Die Fusion des NES aus der *HsIPMK* (Positivkontrolle) mit EGFP führt zu einer deutlichen Abnahme der N/C-Ratio (gelb, **Abbildung 3-15**) gegenüber EGFP allein (blau, **Abbildung 3-15**). Durch das Peptid L6 konnte dieser Effekt nach Expression in H1299 Zellen nicht gezeigt werden (grün, **Abbildung 3-15**). Demnach ist die Sequenz L6 allein nicht in der Lage als NES zu fungieren.

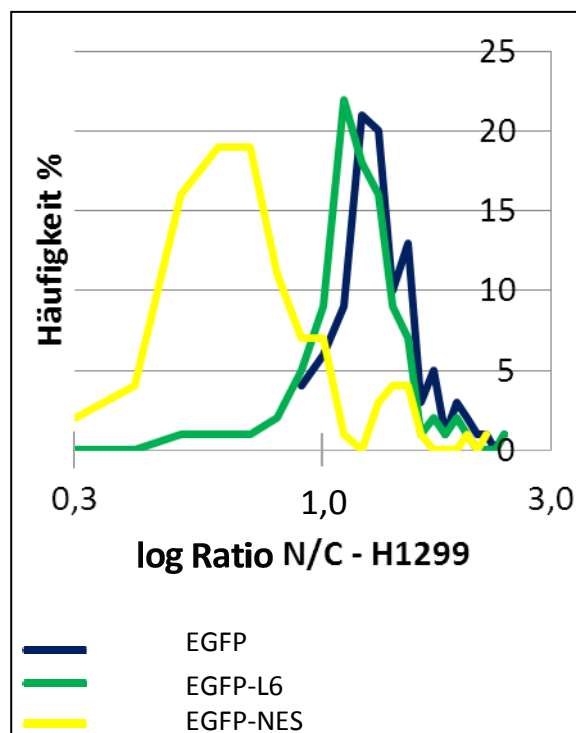


Abbildung 3-15: Logarithmische Häufigkeitsverteilung der gemessenen N/C-Ratio des Proteins EGFP allein oder als Fusionsprotein mit putativem NES L6 nach 48h Expression in H1299 Zellen. EGFP (blau) und die Konstrukte EGFP-L6 (grün) = EGFP-IP5K-FSVSVLDLDDL und EGFP-NES (gelb) = EGFP-IPMK-AS165-190 (Positivkontrolle) wurden für 48h in H1299-Zellen überexprimiert. Die Aminosäuresequenz 165-190 enthält das *HsIPMK*-NES sowie die flankierenden Aminosäuren. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die N/C-Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); N = 100.

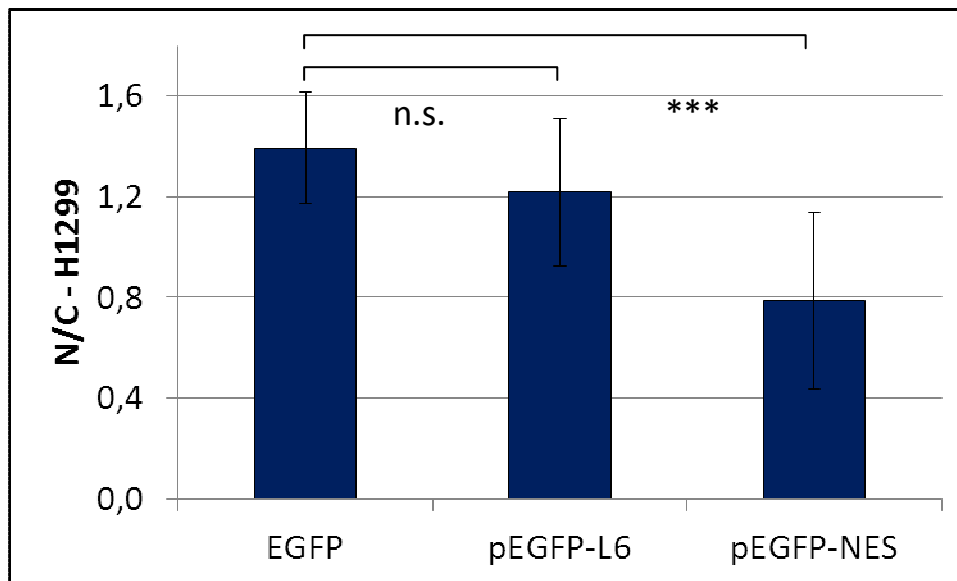


Abbildung 3-16: Darstellung der Mittelwerte der gemessenen N/C-Ratio des Proteins EGFP allein oder als Fusionsprotein mit putativen NES nach 48h Expression in H1299 Zellen. EGFP und die Konstrukte EGFP-L6 = EGFP-IP5K-FSVSVDLDL und EGFP-NES = EGFP-IPMK-AS165-190 (Positivkontrolle) wurden für 48h in H1299-Zellen überexprimiert. Die Aminosäuresequenz 165-190 enthält das *Hs*IPMK-NES sowie die flankierenden Aminosäuren. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die N/C-Ratio berechnet und die Mittelwerte als Säulendiagramm dargestellt (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); n.s. = nicht signifikant; *** = signifikant ($P \leq 0,001$); N = 100.

3.2 Deletion mehrerer Leucin reicher Sequenzen in der IP5K

Die Deletion einzelner Leucin reicher Sequenzen ergab keinen Hinweis auf die Existenz eines Exportin abhängigen NES. Um auszuschließen, dass eine putative NES Funktion möglicherweise von mehreren Leucin reichen Sequenzen gemeinsam abhängt, wurden mehrere Deletionen bzw. Substitutionen in einem Enzymkonstrukt durchgeführt. Zum Vergleich wurden zwei Dreifachmutanten (Mutanten B, C) und eine Vierfachmutante (Mutante A = $\Delta L1$, $\Delta L4$, $\Delta L5$, $\Delta L6 = \Delta 81-90, \Delta 327-335, \Delta 369-376, \Delta 433-442$) hergestellt und anschließend in H1299 Zellen zur Expression gebracht.

Die Nu/N-Ratio der Mutante A wies bei einer Expressionszeit von 24 Stunden einen niedrigeren Wert auf als der Vergleichswert des Wildtyps. Die Nukleoli zeigten eine vergleichbar niedrige Fluoreszenz wie bei der Expression von Konstrukten mit jeweils einer einzelnen Deletion. Nach 48 Stunden konnte ein Anstieg der Nu/N-Ratio auf ein vergleichbares Niveau zum Wildtyp beobachtet werden. Nach 72 Stunden fiel die Nu/N-Ratio wieder ab und erreichte insgesamt das niedrigste Niveau (**Abbildung 3-17A**). Insgesamt war die Expressionsstärke der Vierfachmutante gegenüber dem Wildtyp deutlich geringer und nahm über die Zeit immer mehr ab. Es konnten außerdem viele Zellen beobachtet werden, in denen die N/C-Ratio deutlich größer bzw. deutlich kleiner waren als im Wildtyp (**Abbildung 3-17B**). In vielen Zellen, in denen die Mutante A überexprimiert wurde, war die Fluoreszenz

insgesamt deutlich niedriger ausgeprägt. Im Kern waren die Nukleoli zwar per Auge noch gut abgrenzbar, bei der Berechnung jedoch ergab sich aufgrund nahezu gleicher Fluoreszenz in Nukleoli und restlichem Kern eine Nu/N-Ratio von 1. Diese Ratio entstand, obwohl in Kern und Nukleoli kaum Fusionsprotein akkumulierte. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass bei dieser Mutante eine starke Störung der Tertiärstruktur vorlag.

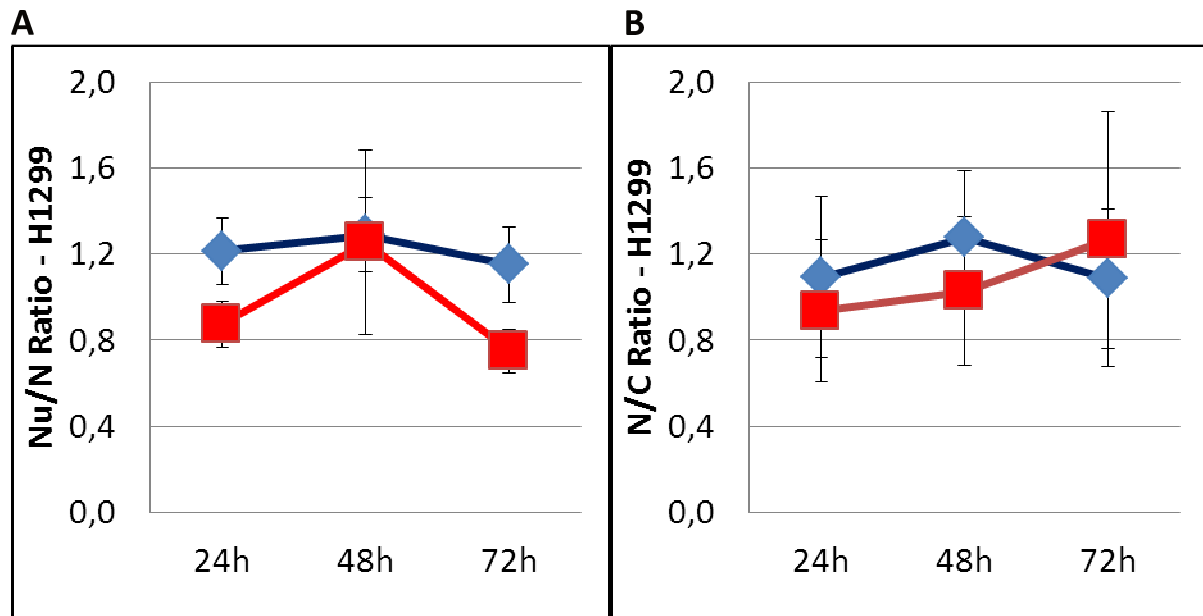


Abbildung 3-17: Darstellung der Nu/N-Ratio und der N/C-Ratio von wildtyp IP5K und der Mehrfachdeletionsmutante A nach verschiedenen Expressionszeiten in der menschlichen Zelllinie H1299. Wildtyp IP5K (blau) und die Mutante A (rot) = $\Delta L1$, $\Delta L4$, $\Delta L5$, $\Delta L6$ ($\Delta 81-90, \Delta 327-335, \Delta 369-376, \Delta 433-442$) wurden in H1299 Zellen für 24, 48 und 72h überexprimiert und dann fotografiert. N = 100. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und N/C-Ratio (B) berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

In der vierfachen Deletionsmutante (Mutante A) wurden vier Leucin reiche Sequenzen deletiert (L1, L4, L5, L6). Nach einer Expressionszeit von 48 Stunden zeigte sich eine vergleichbare durchschnittliche Nu/N-Ratio der beobachteten Zellen (**Abbildung 3-18A**) mit der des Wildtyps. Bei der logarithmischen Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Nu/N-Ratio in allen Zellen zeigte sich allerdings ein interessantes Phänomen. Die durchschnittliche Nu/N-Ratio des Wildtyps lag bei $1,21 \pm 0,15$ mit einem Häufigkeitsmaximum von ca. 30% um den Wert 1,2 (**Abbildung 3-18A**) (vgl. **Statistik in Kapitel 8**). Die Nu/N-Ratio der Mutante A hatte einen Durchschnittswert von $1,25 \pm 0,43$. Hier zeigte sich allerdings kein klares Verteilungsmaximum. Vielmehr zeigte sich eine Verbreiterung des Spektrums der Zellen, in denen die Fluoreszenz entweder in den Nukleoli oder im restlichen Kern überwog. Dadurch kamen Nu/N-Ratios zustande, die deutlich <1 bzw. >1 waren (**Abbildung 3-18A**). Daraus resultierte ein vergleichbarer Mittelwert der Nu/N-Ratio zustande, obwohl die Verteilung insgesamt ein ganz anderes Bild zeigte.

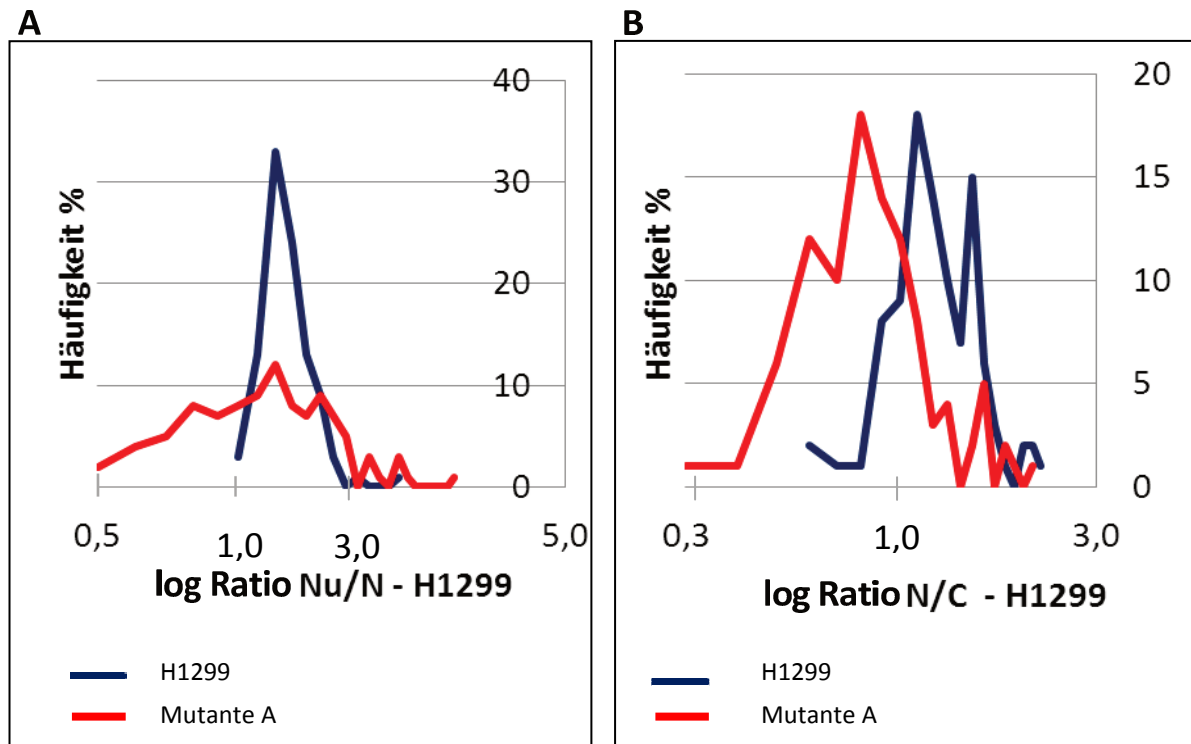


Abbildung 3-18: Logarithmische Häufigkeitsverteilung der gemessenen Nu/N-Ratio bzw. N/C von wildtyp IP5K und der Mutante A nach 48h Expression in der menschlichen Zelllinie H1299.

Wildtyp (blau) und die Mutante A (rot): $\Delta L1$, $\Delta L4$, $\Delta L5$, $\Delta L6$ ($\Delta 81-90 / \Delta 327-335 / \Delta 369-376 / \Delta 433-442$) wurden für 48h in der menschlichen Zelllinie H1299 überexprimiert. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und Nu/N Ratio (A) und die N/C-Ratio (B) berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); N = 100.

Die Deaktivierung eines nukleären Exportsignals durch Deletion bzw. Punktmutation würde den Effekt hervorrufen, dass das beobachtete Protein mehr im Kern als im Zytoplasma lokalisiert ist. Die Deletion der einzelnen putativen Leucin reichen Sequenzen L1 bis L6 konnte bisher nicht den Beweis erbringen, dass dort eine Exportfunktion liegt. Durch Kombination mehrerer Deletionen bzw. Punktmutationen in einem Konstrukt mit anschließender Expression in humanen Zelllinien konnte ebenfalls kein NES nachgewiesen werden.

Die Mutante A ($\Delta L1$, $\Delta L4$, $\Delta L5$, $\Delta L6$) zeigte nach Expression keinen Hinweis für die Existenz einer NES Funktion. Stattdessen konnte aber auch hier eine signifikant erniedrigte Fluoreszenz in den Nukleoli festgestellt werden, so dass die Untersuchung der Leucin reichen Regionen hinsichtlich ihrer Bedeutung für die nukleoläre Lokalisation fortgesetzt wurde.

3.2.1 Suche nach Zielsteuerungsdomänen für Nukleoli in den Leucin reichen Sequenzen der IP5K

Einzelne Deletionen der Leucin reichen Peptidsequenzen bzw. Punktmutationen innerhalb dieser Sequenzen führten in den oben beschriebenen Versuchen nicht zum Beweis der Existenz eines Karyopherin abhängigen NES. Es konnte in vielen Versuchen jedoch

festgestellt werden, dass eine Modifikation innerhalb dieser Leucin reichen Sequenzen mit anschließender Expression in menschlichen Zelllinien eine starke Verringerung der Fluoreszenz (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.2.5) in den Nukleoli hervorrief. Damit kann angenommen werden, dass das mutierte Fusionsprotein dort in geringerem Ausmaß vorhanden war. Hierbei kam die Hypothese auf, dass es sich bei den Leucin reichen Sequenzen um Signaldomänen handeln könnte, die die Lokalisation von IP5K in die Nukleoli vermitteln.

Zunächst sollte getestet werden, ob die Kombination mehrerer Mutationen in der Aminosäuresequenz eine Verstärkung des gesehenen Effektes der Fluoreszenzaussparung in den Nukleoli bewirken konnte.

Die Deletion von vier putativen NES (L1, L4, L5, L6 = Mutante A) sollte ein erster Schritt in diese Richtung sein. Diese vier Leucin reichen Sequenzen liegen außerhalb der Vertebrateninsertion, die von Maria Brehm als nicht-kanonisches NES charakterisiert wurde (Brehm et al., 2007). Da die Aminosäuresequenz der IP5K durch die Deletionen allerdings stark verkürzt wurde und strukturelle Veränderungen des resultierenden Gesamtproteins in Erwägung gezogen werden mussten, wurden weitere Konstrukte hergestellt, in denen die Mutationen gezielter und weniger invasiv gestaltet wurden. Es wurden die Mutanten B = Δ L2, Δ L3, L6LA bzw. C = L2LA, L3LA, L6LA jeweils als Dreifachkombination hergestellt. Welche Mutationen sich hinter den Bezeichnungen verbergen, wurde bereits mehrfach in den Kapiteln zuvor erläutert. Daher wird im Folgenden darauf verzichtet.

Es wurde bei der folgenden Versuchsreihe nach dem gleichen Schema verfahren wie in den Experimenten zuvor und die Nu/N-Ratio und N/C-Ratio bestimmt (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.2.5). Anhand der nachfolgenden Abbildung (**Abbildung 3-19**) kann man erkennen, dass nach Kombination mehrerer Deletionen bzw. Punktmutationen in den putativen NES keine signifikante Veränderung des zuvor bei den Einzeldelationen beobachteten Fluoreszenzverlustes in den Nukleoli gezeigt werden konnte. Die Kombination mehrerer Manipulationen in einem Konstrukt konnte also keine Verstärkung des bei Deletion einzelner Sequenzen gesehenen Effektes hervorrufen. Die Nu/N-Ratio der Mutante A weicht nicht signifikant vom Wert des Wildtyps ab, was darauf hinweist, dass essentielle Funktionen für die nukleoläre Akkumulation vielleicht in den nicht deletierten Leucin reichen Segmenten L2 und L3 in einem gewissen strukturellen Kontext lokalisiert sind.

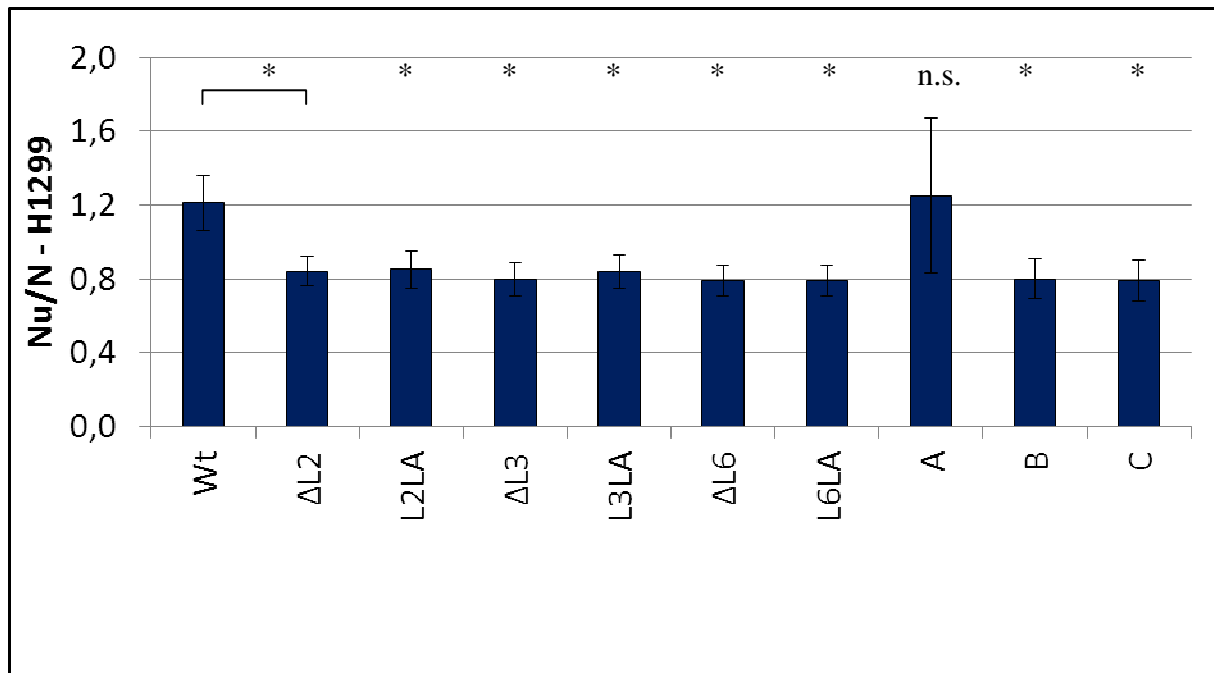
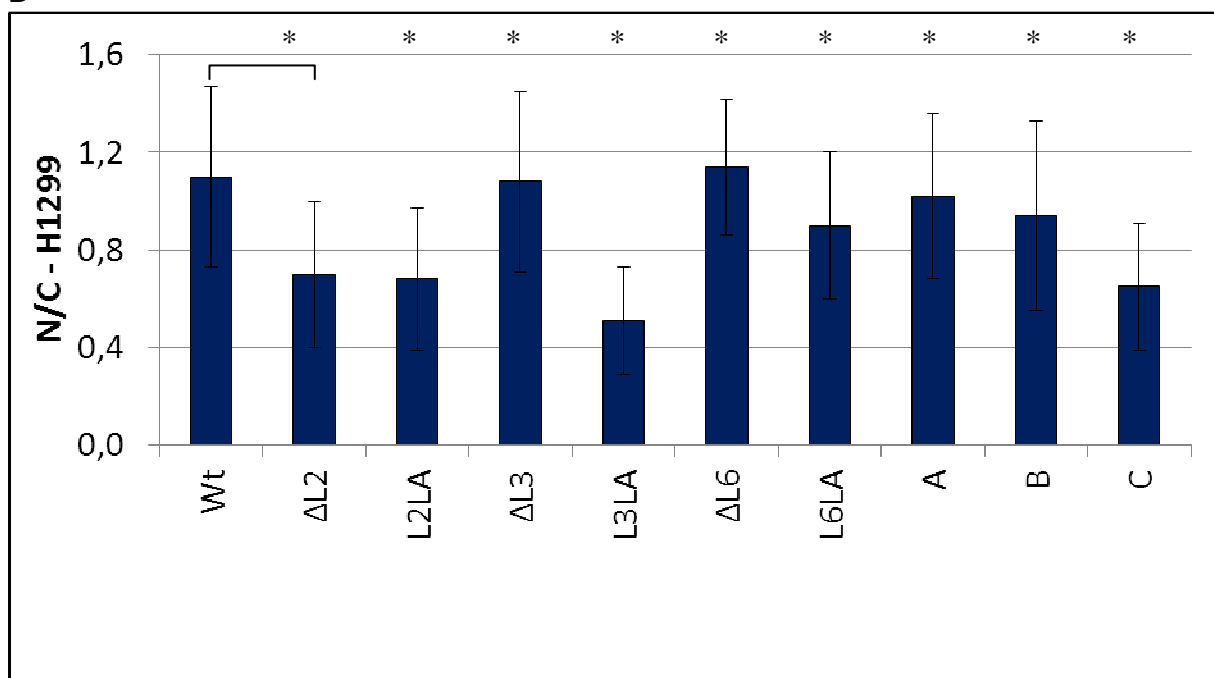
A**B**

Abbildung 3-19: Durchschnittswerte der Nu/N-Ratio bzw. N/C-Ratio von wildtyp IP5K und ausgewählten Enzymmutanten nach Expression in der menschlichen Zelllinie H1299.

Wildtyp IP5K und die Enzymmutanten: $\Delta L2 = \Delta 233-242$, $L2LA = L237A/F240A/F241A/F242A$, $\Delta L3 = \Delta 261-270$, $L3LA = V264A/I265A/V268A/L269A/L270A$, $\Delta L6 = \Delta 433-442$, $L6LA = V437A/L438A/L440A/L442A$, $A = \Delta L1/\Delta L4/\Delta L5/\Delta L6$, $B = \Delta L2/\Delta L3/L6LA$, $C = L2LA, L3LA, L6LA$ wurden 48h in H1299 Zellen überexprimiert und dann fotografiert. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und die N/C-Ratio (B) berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5). N=100; * = signifikant, n.s. = nicht signifikant

Die Enzymmutanten B und C zeigen nach einer Expressionszeit von 24 Stunden gegenüber dem Wildtyp eine signifikante Abnahme der Nu/N-Ratio. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Einzelmutanten. Die N/C-Ratio der Mutanten B und C zeigen ein inhomogenes Bild der Verteilung in den verschiedenen Zellkompartimenten. Während die Mutante B gegenüber dem Wildtyp kaum eine Veränderung der Lokalisation zeigt, findet sich bei der Mutante C eine starke Abnahme der N/C-Ratio in über 80% der Zellen. Dies ist in **Abbildung 3-20** an der Linksverschiebung der grünen Kurve zu sehen.

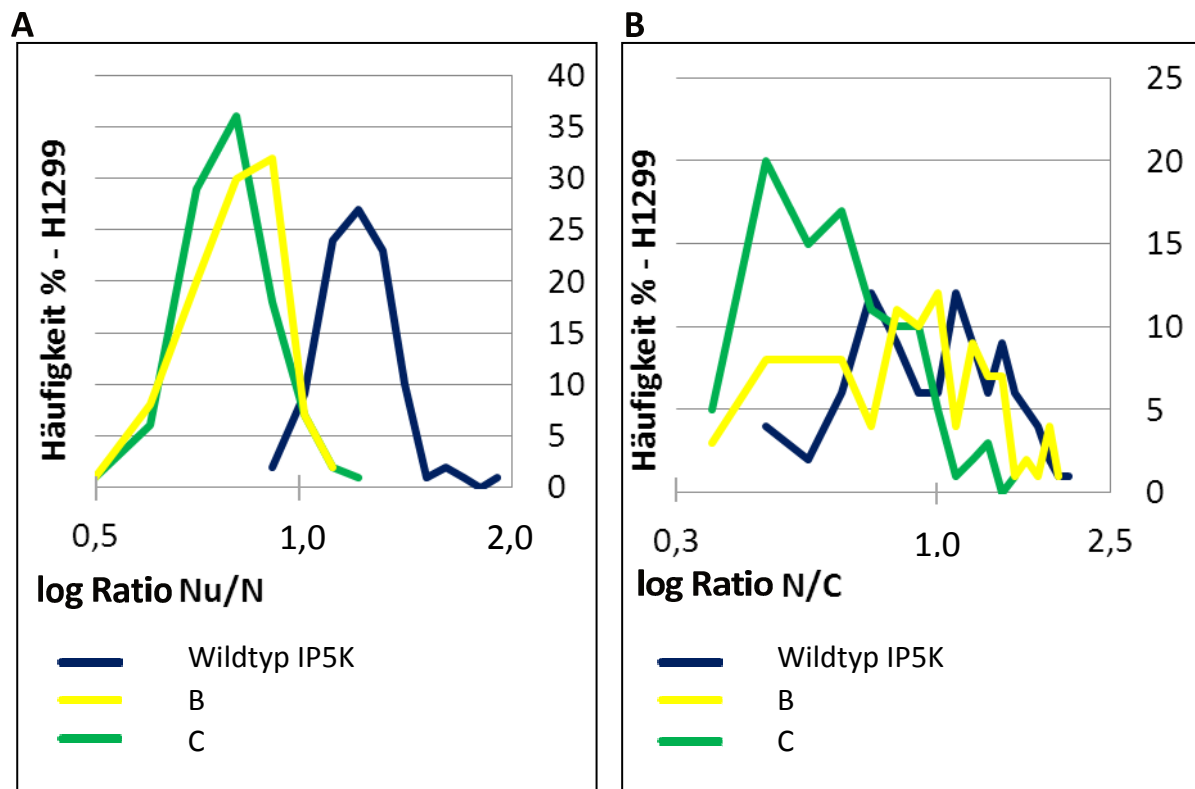


Abbildung 3-20: Logarithmische Häufigkeitsverteilung der gemessenen Nu/N-Ratio bzw. N/C-Ratio von wildtyp IP5K und der Mutanten B und C nach 24h Expression in H1299 Zellen.

Wildtyp (blau) und die Mutanten B (gelb) = $\Delta L2$ $\Delta L3$ L6LA ($\Delta 233-242$, $\Delta 261-270$, V437A/L438A/L440A/L442A) und C (grün) = L2LA L3LA L6LA (L237A/F240A/F241A/F242A, V264A/I265A/V268A/L269A/L270A, V437A/L438A/L440A/L442A) wurden für 24h in der menschlichen Zelllinie H1299 überexprimiert; N = 100. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und die N/C-Ratio (B) berechnet und logarithmisch aufgetragen (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

3.3 Suche nach Zielsteuerungsdomänen für Nukleoli in der IP5K anhand eines Konsensus-Signals

Mekhail et al. beschreiben in ihrer Arbeit von 2007 ein Konsensus-Signal für ein Lokalisations- bzw. Retentionssignal für Nukleoli in eukaryotischen Zellen. Es ist folgendermaßen aufgebaut: $[RR(I/L)X_3R](n, n > 99)[L(N)(V/L)](n, n > 1)$. Vereinfacht bedeutet dies ein Motiv nach dem Schema $RRLX_3R$ und ein zweites nach dem Schema LXL oder LXV . Die Autoren verlangen den Leucin reichen Teil LXL in mindestens $n = 100$ Aminosäuren Abstand. Die IP5K besitzt eine R reiche Sequenz, die diesem Konsensus zu 80% entspricht. Lediglich ein N-terminales R fehlt. Aufgrund der Tatsache, dass das Enzym sechs Leucin reiche Sequenzen enthält, die das von Mekhail geforderte zweite Motiv LXL enthalten, wurde die Mutation $R120A/L121A/R125A$ hergestellt, die sich im Peptid zwischen der Leucin reichen Sequenz L1 (81-LEFVKQLCL-90) und L2 (233-LAHHLKPFFF-242) befindet (Ergebnisse in Abbildung 3-21).

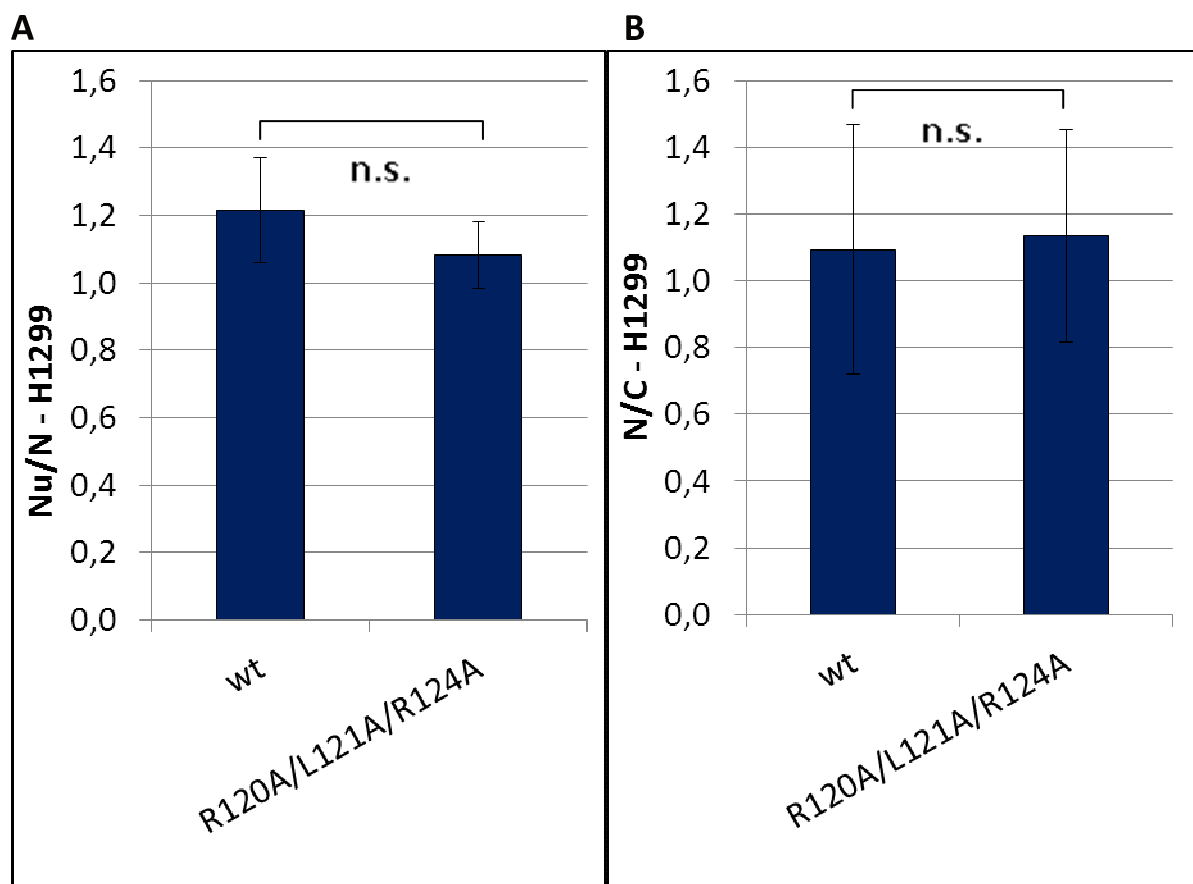


Abbildung 3-21: Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Nu/N-Ratio bzw. N/C-Ratio von wildtyp IP5K und einer Enzymmutante mit deaktiviertem putativen NoLS-Konsensus-Signal nach 24h Expression in der menschlichen Zelllinie H1299. Wildtyp IP5K und die Mutante $R120A/L121A/R125A$ wurden in H1299 Zellen zur Expression gebracht. Nach 24h wurde die EGFP-Fluoreszenzintensität in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt, die Nu/N-Ratio (A) und die N/C-Ratio (B) berechnet und die Mittelwerte als Balkendiagramm dargestellt (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); n.s. = nicht signifikant; N = 100.

Weder die gemessene Nu/N-Ratio noch die N/C-Ratio zeigten eine signifikante Veränderung gegenüber dem Wildtyp, so dass die Existenz einer Zielsteuerungdomäne nach dem Schema des vorgeschlagenen Konsensus in der IP5K nicht nachgewiesen werden konnte.

3.4 Erweiterte Untersuchung des nicht-kanonischen Exportsignals der IP5K

Das menschliche Isoenzym der IP5K enthält wie andere Vertebratenvarianten zwei Peptidsequenzen innerhalb der Primärstruktur, die bei Nicht-Vertebraten nicht existieren. Maria Brehm hat im Rahmen ihrer Dissertation diese Vertebrateninsertionen der IP5K bereits untersucht und dabei ein nicht-kanonisches NES (Brehm et al., 2007) entdeckt. Ihre Versuche wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt und erweitert.

3.4.1 Deletion der N-terminalen Vertebrateninsertion der IP5K

Die Deletion der N-terminalen Vertebrateninsertion ($\Delta 202-297$) rief eine verstärkte Lokalisation des Fusionsproteins im Kern hervor. In 35% der Zellen konnte eine N/C-Ratio $> 4,0$ gemessen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von Brehm und bestätigt das Vorhandensein eines nicht-kanonischen NES. In allen beobachteten Zellen zeigte sich, wie in vielen Versuchen vorher, dass die Nukleoli nach Einfügen einer Mutation keine Fluoreszenz mehr zeigen, abgesehen von kleinen Bereichen, die in **Abbildung 3-22** mit roten Pfeilen markiert sind.

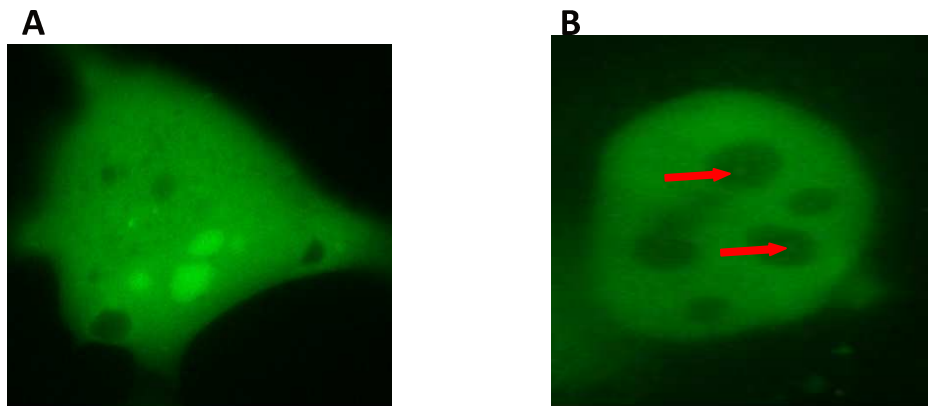


Abbildung 3-22: Intrazelluläre Lokalisation von EGFP/IP5K und der Mutante EGFP/IP5K $\Delta 202-297$ in H1299 Zellen. Wildtyp IP5K (A) und die Mutante EGFP/IP5K $\Delta 202-297$ wurden 24h in H1299-Zellen überexprimiert. Gezeigt ist je eine repräsentative Zelle. Die Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte nukleoläre Lokalisation. Nur einige punktförmige Anlagerungen waren noch zu beobachten (rote Pfeile).

3.4.2 Untersuchung putativer Phosphorylierungsstellen innerhalb der N-terminalen Vertebrateninsertion der IP5K

Innerhalb des nicht-kanonischen nukleären Exportsignals der IP5K existieren mehrere SP-Motive, die putative Phosphorylierungsstellen darstellen. Es sollte untersucht werden, ob das nicht-kanonische NES einer Steuerung durch Phosphorylierung an diesen Motiven in Aminosäureposition 271-SGS-273, 282-SP-283 und 296-SP-297 unterliegt. Hierzu wurden

Pseudophosphorylierungen bzw. –dephosphorylierungen durch Mutation des Serins (S) zu Glutamat (E) bzw. Alanin (A) erzeugt. Hier ergaben sich die nachfolgenden Beobachtungen. Nach Mutation und Expression der IP5K-Mutante S271A, S273A in H1299 Zellen zeigte sich eine signifikante Abnahme der N/C-Ratio (**Abbildung 3-23**), während die Mutation S271E, S273E keine signifikante Änderung zeigte (**Abbildung 3-23**). Eine Verkleinerung der N/C-Ratio bedeutet eine Verlagerung des Proteins in das Zytoplasma. Daraus ergibt sich ein Hinweis, dass die Pseudodephosphorylierung dieses SP-Motivs den Kernexport begünstigen könnte.

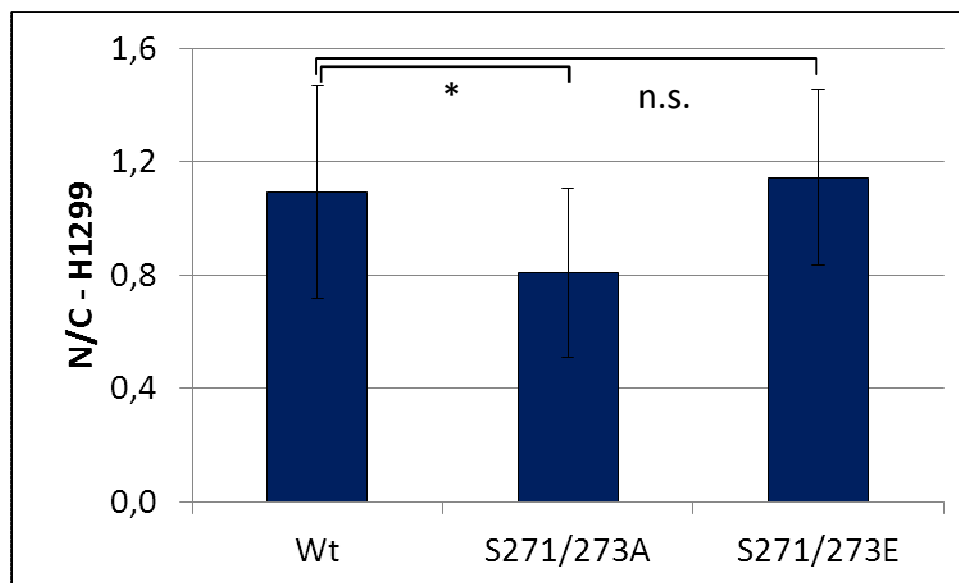


Abbildung 3-23: Darstellung der Mittelwerte der gemessenen N/C-Ratio von wildtyp IP5K und der angegebenen Mutanten nach 24h Expression in der menschlichen Zelllinie H1299. Wildtyp und die Enzymmutanten IP5K S271A/S273A und S271E/272E wurden in H1299 Zellen zur Expression gebracht; die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern und Zytoplasma bestimmt und die N/C-Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); N = 100; * = signifikant ($P < 0,05$); n.s. = nicht signifikant

Die Mutante S282A unterschied sich in Bezug auf die Lokalisation nicht signifikant vom Wildtyp (**Abbildung 3-24**). Rechnerisch ergab sich eine Signifikanz bei der Mutante S282E in der Einzelgegenüberstellung mit dem Wildtyp im Auswertungsprogramm SigmaStat (vgl. Material und Methoden). Die Zahlendifferenz zwischen den Durchschnittswerten ist allerdings so gering, dass eine Signifikanz nicht sicher gegeben ist. Daher kann bisher nicht die Aussage getroffen werden, ob das SP-Motiv an dieser Stelle eine Regulierungstelle für das nicht-kanonische NES darstellt.

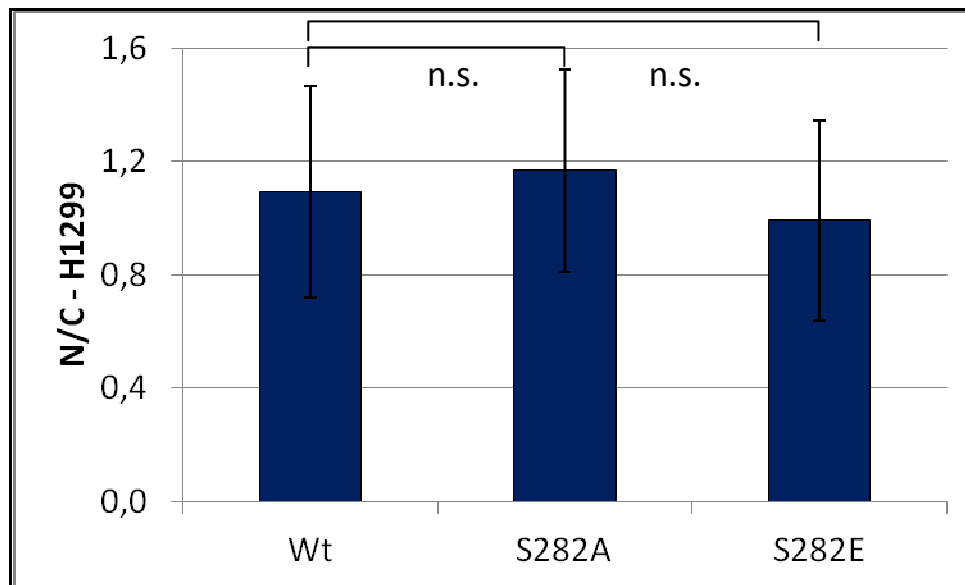


Abbildung 3-24: Darstellung der Mittelwerte der gemessenen N/C-Ratio von wildtyp IP5K und der angegebenen Mutanten nach 24 stündiger Expression in der menschlichen Zelllinie H12999. Wildtyp IP5K und die Enzymmutanten IP5K-S282A und -S282E wurden in H1299 Zellen zur Expression gebracht. Nach 24h wurde die EGFP-Fluoreszenzintensität mittels ImageJ in Kern und Zytoplasma bestimmt und die N/C-Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); N = 100; * = signifikant ($P < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

Sowohl die Mutante S296A als auch die Mutante S296E zeigten eine signifikante Abnahme der N/C-Ratio im Vergleich zum Wildtyp (**Abbildung 3-25**). Da vermutet wurde, dass hier eine andere Form der Regulierung durch Phosphorylierung vorliegen könnte, wurde die Mutante F298E ebenfalls untersucht. Saure Reste hinter einem SP-Motiv können Phosphorylierung am S eines SP-Clusters manchmal „genetisch“ nachahmen. (persönliche Mitteilung von Prof. Mayr). In diesem Fall zeigte der Austausch des Phenylalanins gegen Glutamat keine signifikante Änderung der N/C-Ratio (**Abbildung 3-25**).

Da in diesem Bereich des Enzyms verschiedene Mutationen zu einer Begünstigung des Kernexports führen, bedarf es nachfolgender Untersuchungen des Motivs und seiner umliegenden Strukturen.

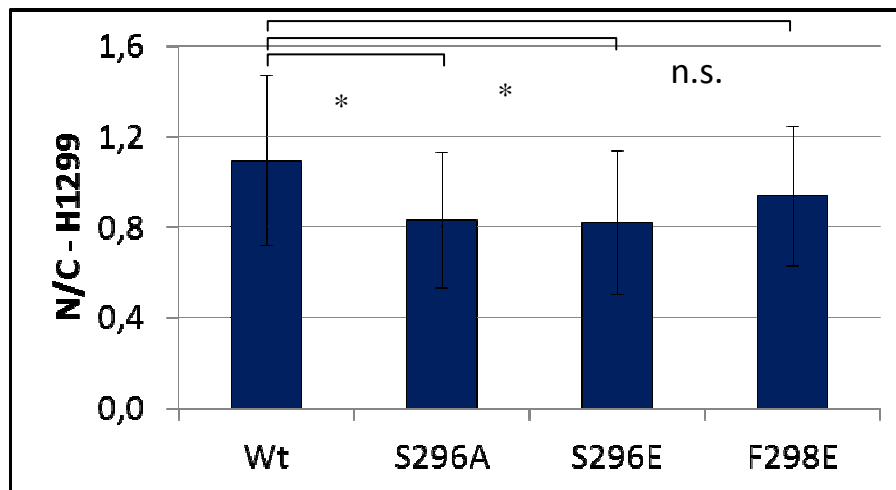


Abbildung 3-25: Darstellung der Mittelwerte der gemessenen N/C-Ratio von wildtyp IP5K und der 24 Stunden in der menschlichen Zelllinie H12999 exprimierten Mutanten. Wildtyp und die Enzymmutanten IP5K S296A, S296E und F298E wurden in H1299 Zellen zur Expression gebracht. Nach 24h wurde die EGFP-Fluoreszenzintensität mittels ImageJ in Kern und Zytoplasma bestimmt und die N/C-Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); N = 100; * = signifikant ($P < 0,05$); n. s. = nicht signifikant.

3.4.3 Deletion der C-terminalen Vertebrateninsertion der IP5K

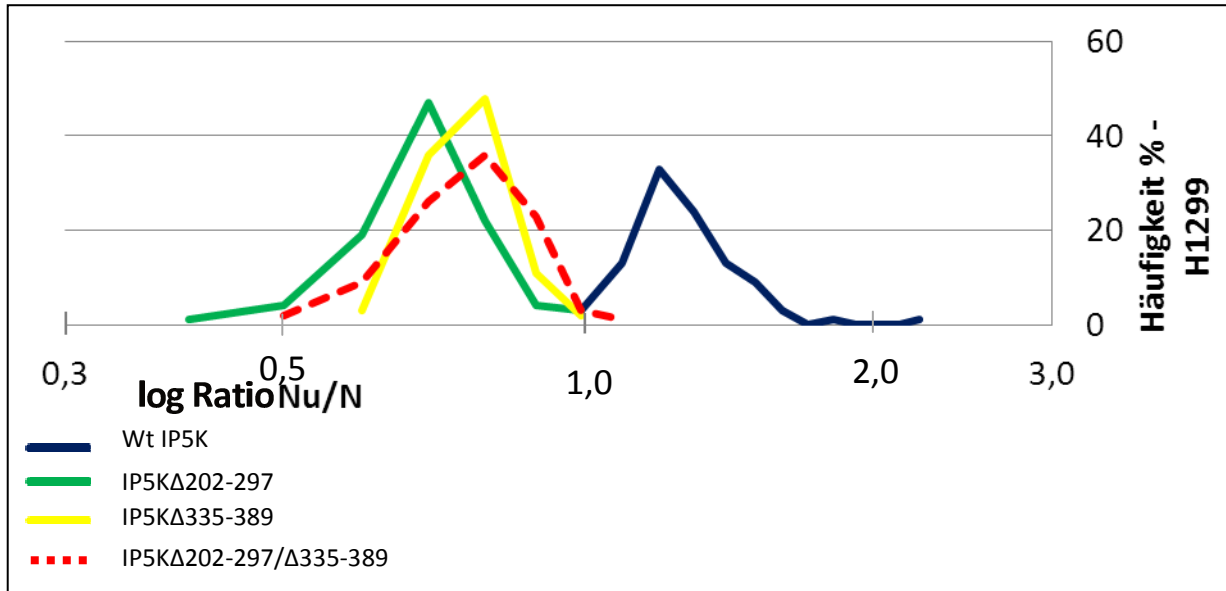
Analog zur Deletion der N-terminalen Vertebrateninsertion wurde die C-terminale (AS335-389, siehe Kapitel 3.4.1) ebenfalls deletiert und die Mutante zur Expression gebracht. Es sollte geprüft werden, ob sich das Verhalten des Enzyms ändert. Die Deletion der C-terminalen Vertebrateninsertion ruft ebenfalls eine veränderte Lokalisation des Enzyms hervor. Die Nu/N-Ratio nimmt signifikant ab (**Abbildung 3-26**), so dass die Nukleoli nur schwach bis gar nicht durch das Fusionsprotein angefärbt werden. Die N/C-Ratio nimmt im Vergleich zum Wildtyp ab (**Abbildung 3-26**). Das heißt, dass sich das Enzym vermehrt im Zytoplasma befindet (vgl. **Abbildung 3-26**; IP5K Δ 335-389 = gelb).

3.4.4 Deletion beider Vertebrateninsertionen in der IP5K

Die N-terminale Insertion (AS202-297) wurde wie oben beschrieben von Maria Brehm als nicht-kanonisches NES identifiziert. Im folgenden Versuch wurden beide Insertionssequenzen (AS202-297/335-389) aus der IP5K vollständig durch zweimalige QuikChangeMutagenese deletiert. Dadurch entstand eine Mutante von der Länge einer Nicht-Vertebraten-Variante des Enzyms. Es sollten in dieser Arbeit Daten zum Verhalten des menschlichen Enzyms gesammelt werden, sobald die Insertionen nicht mehr vorhanden sind. Dies sollte eine erste Datengrundlage für vergleichende Überexpressions- und Lokalisationsstudien zwischen Vertebraten-IP5K und Nicht-Vertebraten-IP5K werden. Die kombinierte Deletion beider Sequenzen hob die deaktivierte NES-Funktion auf, die nach alleiniger Deletion der N-terminalen Insertion beobachtet werden konnte (vgl. Kapitel 3.4.1). Es konnte in keiner Zelle nach einer Expressionszeit von 48 Stunden eine vollständige Lokalisation des Proteins im

Kern dokumentiert werden. Die N/C-Ratio der Doppeldeletionsmutante lag höher als nach Deletion jeweils nur einer Insertion aber niedriger als die N/C-Ratio des Wildtyps. Die Nu/N-Ratio nahm in allen drei Deletionsmutanten signifikant ab (**Abbildung 3-26**).

A



B

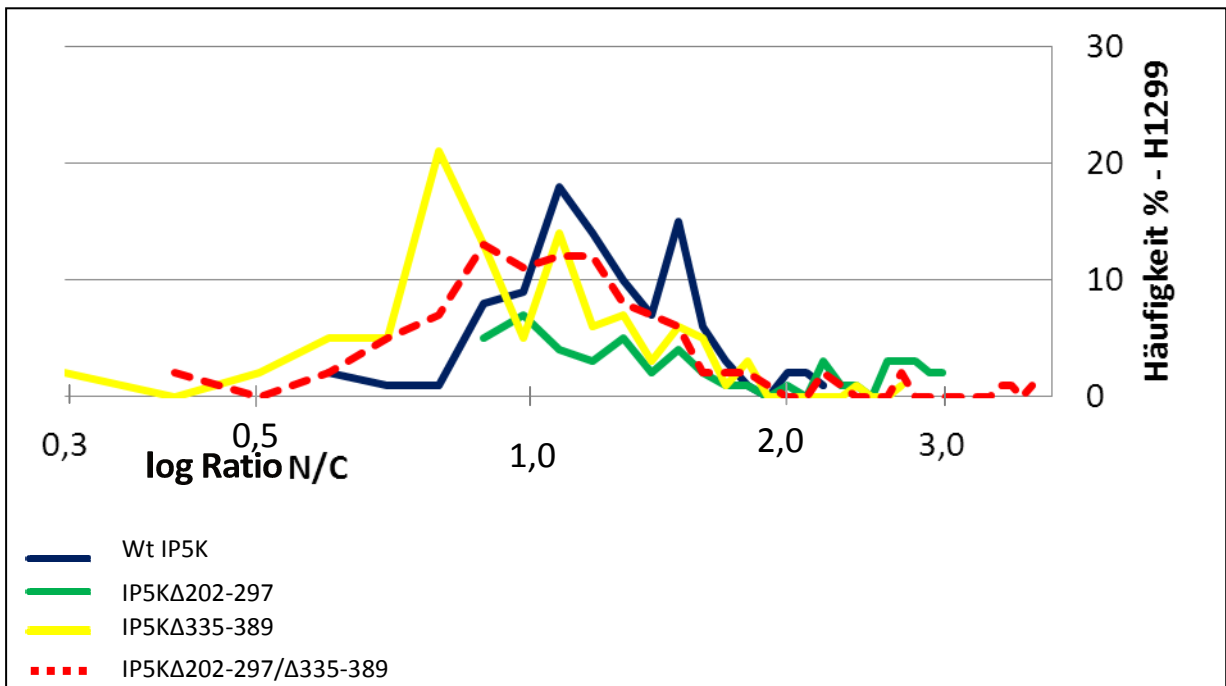


Abbildung 3-26: Logarithmische Häufigkeitsverteilung der gemessenen Nu/N-Ratio bzw. N/C-Ratio von wildtyp IP5K und Mutanten, bei denen die Vertebrateninsertionen entfernt wurden. Wildtyp IP5K (blau) und die Enzymmutanten IP5KΔ202-297 (= IP5K nach Deletion der N-terminalen Vertebrateninsertion (grün)), IP5KΔ335-389 (= IP5K nach Deletion der C-terminalen Vertebrateninsertion (gelb)) und IP5KΔ202-297/Δ335-389 (= IP5K nach Deletion der N-terminalen und C-terminalen Vertebrateninsertion (rot gestrichelt)) wurden für 48h in der menschlichen Zelllinie H1299 überexprimiert; N = 100. Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N Ratio (A) und die N/C-Ratio (B) berechnet und logarithmisch aufgetragen (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5).

3.5 Weiterführende Untersuchungen des N-Terminus der IP5K auf NLS-Aktivität

In den Diplomarbeiten von Tobias Schenk und Xuefei Zhou sind putative nukleäre Lokalisationssignale (NLS) der IP5K bereits eingehend untersucht worden. Es wurden verschiedene Mutationen erzeugt, mit denen eindeutig gezeigt werden konnte, dass das Enzym einer Zielsteuerung in den Kern unterliegt. Aufgrund der Tatsache, dass die Auswertungsmethode, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorhergehenden Arbeiten nicht verwendet wurde, wurden ausgewählte Mutanten erneut in H1299-Zellen exprimiert und mit ImageJ ausgewertet. In diesem Zuge wurden außerdem Mutationen in einer Enzymmutante kombiniert, die jede für sich eine verstärkte Lokalisation des Enzyms außerhalb des Kerns verursachten, im Sinne eines deaktivierten NLS.

Die Deaktivierung eines funktionalen NLS in einem Protein hat zur Folge, dass es nach Überexpression nicht mehr in den Kern einer Zelle transportiert werden kann. Bei der Untersuchung der Lokalisation von Fusionsproteinen, die EGFP enthalten, kommt durch dieses Phänomen eine starke Abnahme der Fluoreszenz im Kern (N) und eine Zunahme im Zytoplasma (C) zustande. Hierdurch sinkt entsprechend die N/C-Ratio.

Es wurden hier Transfektionsreihen aus den Vorgängerarbeiten der Arbeitsgruppe wiederholt und erweitert. So z. B. wurde die Mutante mit zerstörtem putativen Zinkfingermotiv (Schenk, 2004) erneut exprimiert und einer Auswertung mit ImageJ unterzogen. Die hergestellten Mutationen wurden in den Arbeiten (Schenk 2004, Zhou 2005) als HC=TS3=H152/H156/C159/C162→A, XZ1=K155/157→A und XZ2=K173/175/179→A bezeichnet und durch QuikChange Mutagenese hergestellt. Die in dieser Arbeit betrachteten Konstrukte sind die folgenden:

WT	140-KCGFIPFSSDVT	HEMKHKVCRYCMHQHLKVATGKWKQISKY	-180
HC	140-KCGFIPFSSDVT	AEMKAKVARYAMHQHLKVATGKWKQISKY	-180
XZ1	140-KCGFIPFSSDVT	HEMAHA VCRYCMHQHLKVATGKWKQISKY	-180
XZ2	140-KCGFIPFSSDVT	HEMKHKVCRYCMHQHLKVATGAWAQISAY	-180
MK1NLS	140-KCGFIPFSSDVT	AEMKAKVARYAMHQHLKVATGAWAQISAY	-180
MK2NLS	140-KCGFIPFSSDVT	AEMAAA VARYAMHQHLKVATGAWAQISAY	-180

Das putative Zinkfinger-Motiv wurde hier gelb unterlegt.

Die durchschnittlichen N/C-Ratios der in H1299-Zellen für 24 Stunden exprimierten Enzymmutanten sind in der **Abbildung 3-27** gezeigt.

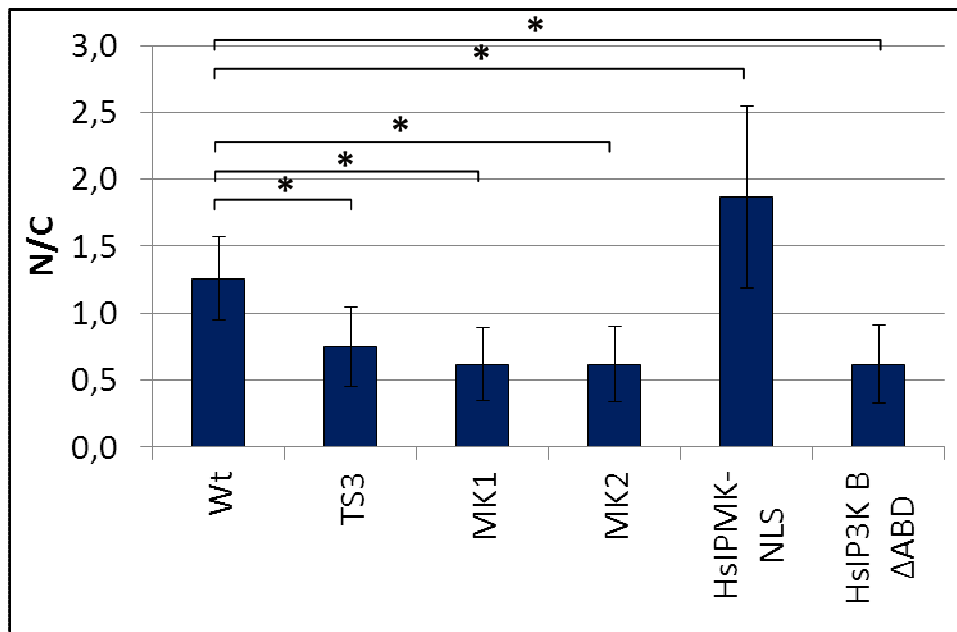


Abbildung 3-27: Durchschnittswerte der N/C-Ratio von wildtyp IP5K und ausgewählten Enzymmutanten, an denen verschiedene NLS-Domänen überprüft wurden.

Wildtyp IP5K (wt) und die Enzymmutanten TS3 = H152/H156/C159/C162 → A; MK1 = H152/H156/C159/C162/K155/157 → A; MK2 = H152/H156/C159/C162/K155/157/K173/175/179 → A; sowie die Konstrukte *HsIPMK-NLS* (= EGFP, an das das isolierte NLS der *HsIPMK* angehängt wurde), und *HsIP3K B ΔABD*, welches ein Fusionsprotein aus EGFP und *HsIP3K* mit deletierter Aktinbindungsdomäne darstellt. Die Aufnahmen von *HsIPMK-NLS* wurden von Yuan-Na Lin aufgenommen und im Rahmen der vorliegenden Arbeit erneut unabhängig ausgewertet. Der ermittelte N/C-Wert von *HsIP3K ΔABD* entstammt der naturwissenschaftlichen Diplomarbeit von Olga Ernst. Alle diese Proteine wurden 24h in H1299 Zellen überexprimiert und dann fotografiert. Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, und Zytoplasma bestimmt und die N/C-Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); N = 100, * = signifikant (p<0,05).

Die N/C-Ratio der Mutante TS3, in der ein putativer Zinkfinger der IP5K durch gezielte Punktmutation zerstört wurde (Schenk, 2004), zeigte eine signifikante Abnahme gegenüber dem Wildtyp. Dies ist durch die verminderte Fluoreszenz im Kern der untersuchten Zellen bedingt. In vielen Zellen konnte beobachtet werden, dass eine Fluoreszenz im Kern trotz Mutation immer noch vorhanden war. Dadurch ergab sich, dass die Lokalisationsfunktion nicht allein durch den Zinkfinger vermittelt werden kann. Die Mutationen XZ1 und XZ2, die Xuefei Zhou in ihrer Diplomarbeit untersucht hat (Zhou, 2005), wurden zusätzlich in das Konstrukt eingefügt. Zhou konnte zeigen, dass diese Mutationen ebenfalls eine Fluoreszenzminderung im Kern der transfizierten Zellen hervorriefen und konstatierte, dass in 80% der Zellen ein Fluoreszenzverlust im Kern und damit eine deaktivierte NLS-Funktion vorliegt (Zhou, 2005). In den restlichen Zellen war jedoch Fluoreszenz im Kern vorhanden, so dass davon ausgegangen wurde, dass auch diese beiden Mutanten die Lokalisation von IP5K in den Kern nicht allein vermitteln können. Aus diesem Grund wurden die Mutationen aus

den Konstrukten TS3 und XZ1 in der Mutante MK1 zusammengefasst. Die Mutante MK2 wurde durch Ergänzung der Mutationen des Konstrukts XZ2 hergestellt.

Als Positivkontrolle EGFP verwendet, an dessen Aminosäuresequenz die Sequenz des NLS aus der *HsIPMK* angehängt wurde (AS320-330 = RHRKIYTKKHH). Dieses Konstrukt wurde von Marcus Nalaskowski freundlicherweise zur Verfügung gestellt, nachdem es sich in Vorversuchen der Arbeitsgruppe als funktionell bewährte.

Als Negativkontrolle mit vollständig deaktivierter NLS-Aktivität wurde eine Deletionsmutante der *HsIP3K-B* verwendet, in der die Aktinbindungsdomäne deaktiviert wurde (*HsIP3K ΔABD*). Auch diese Mutante lag in der Arbeitsgruppe bereits vor. Innerhalb dieser Aktinbindungsdomäne ist eine NLS-Domäne vorhanden, welche durch die Deletion deaktiviert wurde. Außer diesem NLS konnte in der *HsIP3K-B* keine weiteren Steuerungsdomänen identifiziert werden, die den Transport des Enzyms in den Kern der Zelle vermitteln. Die verwendeten Zellen wurden für die vorliegende Arbeit erneut mittels ImageJ quantifiziert. Es ergab sich nach der hier angewandten Methode, die von Olga Ernst als valide für den Nachweis eines NLS dargestellt wurde, dass die Mutanten MK1 und MK2 den gleichen Wert wie die Negativprobe Mutante *HsIP3K ΔABD* erzeugen (Ernst, 2007). Somit ist von der vollständigen Deaktivierung des Kernimports in MK1 und MK2 auszugehen. Es muss hier erwähnt werden, dass die Aufnahmen nicht mit einem Konfokalmikroskop durchgeführt wurden. Deshalb wird Streufluoreszenz ober- und unterhalb des Kernes mit gemessen, wodurch die N/C-Ratio nicht unter 0,62 sinkt, auch wenn kein Protein im Kern vorhanden ist. Die vollständige Statistik ist dem **Kapitel 8** zu entnehmen.

4. Diskussion

4.1 Identifizierung des NLS und nukleolärer Retentionssignale der IP5K

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine genauere Charakterisierung der Zielsteuerungsdomänen der IP5K durchzuführen und dabei die Aminosäuren oder Peptidsegmente zu bestimmen, die den Kernim- und export, sowie die nukleoläre Lokalisation vermitteln.

Seit etlichen Jahren wurde in der Arbeitsgruppe von G. Mayr an einem umfassenden Bild der Kernlokalisierung der IP5K gearbeitet. Die Bestimmung der Zielsteuerungsdomänen der IP5K gestaltet sich aber schwierig, da dieses Enzym keinerlei Sequenzhomologien zu anderen IP-Kinasen aufweist, geschweige denn signifikante Homologien zu anderen Proteinen. Ebenso gibt es entweder keine Aminosäuresequenzen innerhalb der IP5K, die bekannten Konsensussequenzen für Lokalisationssignale entsprechen, oder untersuchte putative Konsensussequenzen stellten sich als nicht hinreichend für eine Zielsteuerung heraus. So wurde beispielsweise ein putatives monopartites NLS (⁴¹RKK⁴³) im N-Terminus der IP5K, im Rahmen der Diplomarbeit von Tobias Schenk auf seine NLS-Aktivität untersucht (Schenk, 2004). Die Daten zeigten aber, dass dieses Motiv nur geringe NLS-Aktivität besitzt.

Mekhail et al. beschrieben in ihrer Arbeit von 2007 ein Konsensus-Motiv für ein nukleoläres Lokalisationssignal (NoLS). Voraussetzung für die Funktionalität sollte ein Motiv RRLxxxL und ein Motiv LxL sein. Da die IP5K das letztere Motiv mehrfach aufweist, wurde das dem Konsensus ähnlichste Motiv (120-RLQTYR-125) im Detail untersucht. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit innerhalb dieser Sequenz durchgeführten Mutagenesestudien zeigten aber, dass hier keine Zielsteuerungsaktivität für Nukleoli vorliegt. Es mussten daher zur Aufklärung der nukleären und intranukleären Zielsteuerung der IP5K umfangreiche Mutagenesestudien durchgeführt werden. In der Veröffentlichung „Intracellular localization of human Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-Kinase“ (Brehm et al., 2007), an der der Autor der vorliegenden Arbeit, sowie die Diplomanden Zhou und Schenk beteiligt waren, wurde durch Kombination mehrerer Mutationen im N-terminalen Bereich der IP5K bewiesen, dass deren NLS-Aktivität von basischen Aminosäuren im Sequenzabschnitt 1-180 vermittelt wird. Der Austausch der Aminosäuren K155, K157, K173, K175 und K179 zu Alanin führte in 80% der untersuchten Zellen zu einem Kernausschluss, und die N/C-Ratio dieser Mutanten wurde im Nachhinein, in der hier vorgelegten Arbeit, auf 0,75 bestimmt. Durch zusätzliche Mutationen konnte nun eine Mutante erzeugt werden, die eine N/C Ratio von 0,62 aufwies. Dieser Wert wurde in vorangegangenen Arbeiten als zu erreichender Wert für ein vollständig deaktiviertes NLS bzw. ein nicht-nukleares Protein - in nicht-konfokaler 2D-Mikroskopie

analysiert – bestimmt (Ernst, 2007), so dass die Lokalisierung der nukleären Importfunktion als aufgeklärt gelten kann. Die für den Kernimport essentiellen Aminosäuren liegen im Abschnitt 152-179 und sind im Folgenden rot markiert:

152-**HEMKHKVCRYC**-162 und 172-**KWKQISK**-179.

Es wurde noch nicht gezeigt, ob der Aminosäurebereich 152-179 ausreicht, um ein zytoplasmatisches Protein in den Kern zu importieren. Es ist aber möglich, dass ein derartiger Versuchsansatz nicht geeignet ist, um diese Beweisführung abzuschließen, denn im regulären Fall bestehen NLS aus kleinen Clustern basischer Aminosäuren (Görlich und Kutay 1999). Es gibt außerdem einige Proteine die ein saures NLS enthalten (Mo, Wang und Beck 2000). Die Aminosäuren, die bei Mutation zu einer zytoplasmatischen Form der IP5K führen, sind aber basische Aminosäuren in Kombination mit Cysteinen und Histidinen. Ein solches NLS ist bisher nicht beschrieben worden. Die Cysteine und Histidine könnten eine sogenannte Zinkfinger-Struktur darstellen, aber auch hier wird keine bekannte Konsensussequenz für Zinkfinger befolgt. Maria Brehm aus der Arbeitsgruppe Mayr erstellte mithilfe der Kristallstruktur der IP5K aus *Arabidopsis thaliana* (Gonzalez et al., 2010) über den WURST-Server (Torda et al., 2004) ein neues 3D-Modell des menschlichen Enzyms. Das putative Zinkfinger-Motiv befindet sich in diesem Modell an der Außenseite des Proteins. Zinkfingerdomänen stellen häufig DNA-, RNA- oder Proteinbindungsdomänen dar. Es wäre also möglich, dass die IP5K nicht über ein eigenständiges importinabhängiges NLS verfügt, sondern über ein „Huckepack“-System in den Kern gelangt. In diesem Falle würde die IP5K gebunden an ein NLS-tragendes Protein in den Kern gebracht werden. Denkbar wäre auch, dass eine schwache NLS-Aktivität der basischen Aminosäuren einen Eintritt in den Kern ermöglicht, dann aber eine Retention der IP5K an DNA oder RNA über den Zinkfinger stattfindet.

Sehr ähnlich verhält es sich mit der nukleären Exportaktivität der IP5K. Es gibt vier Aminosäureabschnitte, die der beschriebenen Konsensussequenz für Leucin reiche NES folgen (la Cour et al., 2003) und zwei weitere, die eine ähnliche Struktur aufweisen. In der Veröffentlichung Brehm et al., 2007 wurde eine starke NES-Aktivität innerhalb einer Vertebrateninsertion (Aminosäureabschnitt 200-300) beschrieben, es konnten aber bisher nicht die verantwortlichen Aminosäuren oder –segmente im Einzelnen identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Leucin reichen Motive der IP5K, von denen zwei innerhalb dieser Vertebrateninsertion liegen, eingehend untersucht. Die Motive wurden entweder vollständig deletiert, oder es wurden die Leucine und Leucin ähnlichen Aminosäuren gegen Alanine ausgetauscht. Bei einer Inaktivierung eines NES würde man

erwarten, dass sich die Mutante vollständig im Kern anreichert, da der Kernimport noch funktionieren sollte, der Kernexport aber inhibiert wird. Für keine der Leucin reichen Sequenzen der IP5K wurde ein derartiger Effekt in H1299-Zellen beobachtet. Auch Kombinationsmutanten, in denen mehrere der Sequenzen deletiert wurden, zeigten keine signifikant erhöhte N/C-Ratio. Die Leucin reichen Sequenzen der IP5K fungieren damit nicht als eigenständige NES. Wie schon in Brehm et al., 2007 gezeigt, wird aber der nukleäre Export der IP5K durch Leptomycin, einem Exportin hemmendem Antibiotikum, inhibiert. Das heißt, die IP5K wird Exportin abhängig aus dem Kern transportiert. Normalerweise vermitteln Leucin reiche NES die Bindung an Exportin und führen so zur Ausschleusung des NES tragenden Proteins. Da aber keines der putativen NES innerhalb der IP5K tatsächlich NES-Aktivität zeigt, wird die IP5K vermutlich an ein NES-tragendes Protein gebunden, welches seinerseits einem Exportin abhängigem Export unterliegt.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten sprechen dafür, dass die Leucin reichen Motive der IP5K nicht NES, sondern nukleäre bzw. nukleoläre Retentionssignale darstellen. Retentionssignale sind Aminosäuremotive, mit deren Hilfe ein Protein an ein anderes Protein gebunden wird. Durch diese Interaktion wird Ersteres an einem bestimmten Ort in der Zelle festgehalten. Die Inaktivierung eines solchen Retentionssignales würde somit zu einer verringerten Lokalisation an diesem Ort führen. Für alle hier untersuchten Mutanten wurde eine stark verringerte Nu/N-Ratio und eine verminderte N/C-Ratio gemessen (vgl. Ergebnisse). Das heißt, die Mutanten reichern sich nicht wie der Wildtyp in Nukleoli an, sondern sparen die Nukleoli sogar aus und zeigen zudem eine geringere Kernlokalisierung. Damit ist davon auszugehen, dass die untersuchten Leucin reichen Sequenzen der IP5K Retentionssignale für Nukleoli darstellen. In dem von Maria Brehm erstellten 3D-Modell liegen die Leucin reichen Sequenzen L1 bis L5 an der Außenseite der IP5K (vgl. Modell in Kapitel 8) und könnten durch ihre Lage durchaus Bindungsstellen darstellen (persönliche Mitteilung Dr. Maria Brehm).

Die Deletion der Leucin reichen Sequenz L6 (AS 433-**FSVS****VLDL****DL**-442) führte nur in HeLa-Zellen dazu, dass sich die Mutante im Zellkern anreicherte, was ein Hinweis darauf war, dass dieses Motiv in diesem Zelltyp am Kernexport der IP5K beteiligt ist. Es könnte sich dabei um eine rudimentäre NES-Funktion handeln, die sich nicht in allen Zellenarten durchsetzt. Eine andere Theorie ist, dass umliegende Aminosäuren durch die Deletion der gesamten Sequenz L6 ein neues nukleäres Lokalisationssignal simulieren (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Mayr). Dieses konnte in einer Versuchsreihe des Autors der Dissertation bisher nicht bewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Denkbar ist auch ein

Vorhandensein unterschiedlicher Karyopherine in verschiedenen Zelllinien (Cook et al., 2007), die entsprechend unterschiedliche Affinitäten zu den exprimierten Proteinen zeigen. Erstmals wurde im Rahmen dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe eine Lokalisationsstudie durchgeführt, bei der Expressionszeiten von 24, 48 bzw. 72 Stunden eingesetzt wurden. Ziel war es hierbei, herauszufinden, ob die gezeigten Resultate, die durch Deletion und Substitution von Aminosäuren in der IP5K erzeugt wurden, zeitlich begrenzt sind. Für eine Expressionszeit von 24 Stunden wurde gezeigt, dass die IP5K das Maximum an Expression erreicht hat (Brehm, 2006). Die Zeitpunkte 48 bzw. 72 Stunden wurden zunächst gewählt, um festzustellen wie lang eine Proteinexpression durchgeführt werden kann. Da in ersten Versuchen Wildtyp IP5K zu allen drei Messzeitpunkten eine stabile Expression in H1299 und HeLa Zellen zeigte, wurde eine entsprechende Messreihe mit ausgewählten Mutanten durchgeführt. Kleinere Veränderungen in der Aminosäuresequenz führten nicht zu einer Einschränkung der Expression, wodurch mehrere Ergebnisse der vorliegenden Lokalisationsstudien untermauert werden konnten. Die Mutanten wurden offensichtlich nicht abgebaut. Bei größeren Deletionen hingegen (Mutante A, vgl. **Ergebnisteil**), bestand der Verdacht, dass das Enzym mit der Zeit von der Zelle modifiziert bzw. abgebaut wurde, da sich die Lokalisation in Kern und Zytoplasma diffus veränderte. Grund hierfür könnte sein, dass die Zellen, die denen die IP5K als EGFP-Fusionsprotein exprimiert wurde, das „defekte“ Protein abbauen und die Fluoreszenz des EGFP zurückbleibt. Dieses bedürfte weiterer Überprüfung in nachfolgenden Studien.

4.2 Lage der untersuchten Leucin reichen Sequenzen innerhalb der 3D-Struktur der IP5K

In die vor kurzem aufgeklärte 3D-Struktur der IP5K aus *Arabidopsis thaliani* (AtIP5K; Gonzalez et al., 2010) wurden *in silico* mit der Software PyMol die in dieser Arbeit untersuchten homologen Sequenzen der Leucin reichen Motive der humanen IP5K farblich markiert (**Abbildung 4-1**). Das Motiv L6 wurde magentafarben markiert und wie deutlich zu erkennen ist, liegt dieses Motiv im Inneren des Proteins. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass das Motiv L6 die Bindung von IP5K an Proteinbindungspartner vermittelt, denn dazu müsste es an der Oberfläche der 3D-Struktur liegen. L6 ist in der AtIP5K (Bezeichnung: Motiv IV, **Abbildung 4-1, 4-2**) dagegen offensichtlich mit verantwortlich für die Bindung von ATP als Co-Substrat für die Herstellung von InsP₆. Ob die Substratbindung für die nukleoläre Lokalisation der IP5K in HeLa-Zellen essentiell ist, bleibt eine vorerst offene Frage. Aus welchem Grund sich nach Expression der Mutante HsIP5K ΔL6 in HeLa Zellen das Bild eines deaktivierten putativen NES zeigt, bleibt daher auch weiterhin unklar. Es

werden aber derzeit Studien in der Arbeitsgruppe von Mayr durchgeführt, in denen die Aminosäuren der humanen IP5K identifiziert werden, die für die katalytische Aktivität verantwortlich sind. Bisher lassen diese neuen Daten vermuten, dass in der humanen IP5K die Aminosäuren an homologer Position für die Katalyse wichtig sind wie in der *At*IP5K (persönliche Mitteilung Dr. Maria A. Brehm). Nach Abschluss dieser Studien kann dann untersucht werden, ob die katalytische Aktivität der IP5K auch Einfluss auf ihre Lokalisation hat.

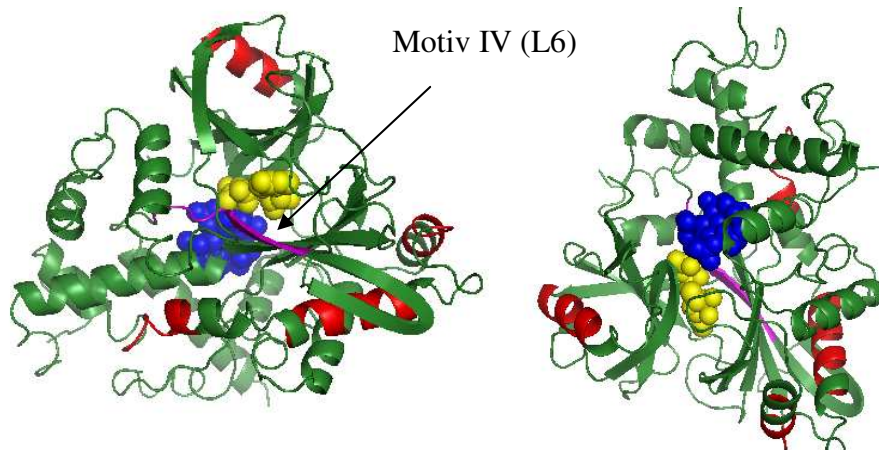


Abbildung 4-1: Kristall-Strukturmodell der *At*IP5K, modifiziert nach Gonzalez et al., 2010

Mit dem Programm PyMol wurde das Strukturmodell aus verschiedenen Blickwinkeln dargestellt. Die homologen Aminosäuren der in der *Hs*IP5K untersuchten Leucin reichen Sequenzen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind rot in der Struktur der *At*IP5K dargestellt. Die Sequenz L6 der *Hs*IP5K findet sich in einem Motiv der funktionellen Domäne der *At*IP5K wieder, die hier in magenta dargestellt wird (Motiv IV). ADP ist gelb und InsP_5 ist in blau dargestellt.

Dazu wäre die Messung von InsP_6 in Zytoplasma, Kern und Nukleoli sinnvoll. Hierzu müssten die InsP_6 -Mengen in den drei Zellkompartimenten voneinander getrennt betrachtet werden. Methoden zur getrennten Isolierung sind bereits beschrieben worden und könnten hier zur Anwendung kommen (Andersen et al., 2002, Andersen et al 2005, Boisvert 2007). Diese Untersuchung war nicht Bestandteil dieser Arbeit. Möglicherweise ergeben sich hieraus in Zukunft weitere Hinweise für die Aufgaben von InsP_6 in der menschlichen Zelle.

Zeitgleich zur vorliegenden Arbeit wurde für die IP5K eine scaffolding Funktion identifiziert (persönliche Mitteilung Dr. Maria A. Brehm). Scaffolding Proteine binden mehrere Proteinkomponenten eines makromolekularen Komplexes und bringen sie so an ihren Wirkort und vermitteln die nötige Nähe für die Interaktion der beteiligten Proteine (Vondriska et al., 2004). Die hier identifizierten Retentionssignale sind hervorragende Kandidaten für Interaktionsdomänen mit diesen Komplexproteinen. Derzeit wird in der AG Mayr mittels GST-pull-down Experimenten untersucht, ob die Mutation der Motive L1-6 zu einer verminderten Interaktion der IP5K mit den Komplexproteinen führt. Wie in **Abbildung 4-1** zu sehen, liegen die Sequenzen L1-L5 alle an der Oberfläche der IP5K und könnten daher

ideal die Bindung an Komplexpartner vermitteln. Das anhand des Kristalls der *AtIP5K* erstellte Modell der *HsIP5K* zeigt ein ähnliches Bild (persönliche Mitteilung von Dr. Maria Brehm, vgl. **Kapitel 8**). Die Identifikation der Leucin reichen Regionen der IP5K als mögliche Retentionssignale in der vorliegenden Arbeit, ist somit die Grundlage zur Identifikation von Bindungsdomänen der IP5K. Als weiterer Anhaltspunkt für die Identifikation speziell für nukleoläre Lokalisationssignale kann in diesem Zusammenhang die Nu/C-Ratio errechnet werden, die bereits in der Einleitung erwähnt wurde. Die initiale Berechnung dieses Wertes als Produkt aus Nu/N-Ratio und N/C-Ratio zeigte eine starke Abnahme, nachdem gezielt putative nukleoläre Retentionssignale mittels QuikChange Mutagenese verändert und anschließend in Zelllinien exprimiert wurden (persönliche Mitteilung Prof. Mayr). Dieses Ergebnis spräche für die Deaktivierung eines solchen Signals. Im Anhang (vgl. **Kapitel 8**) wurde die N/C-Ratio für alle Mutanten berechnet, die im Zusammenhang mit der Lokalisation der IP5K in die Nukleoli stehen.

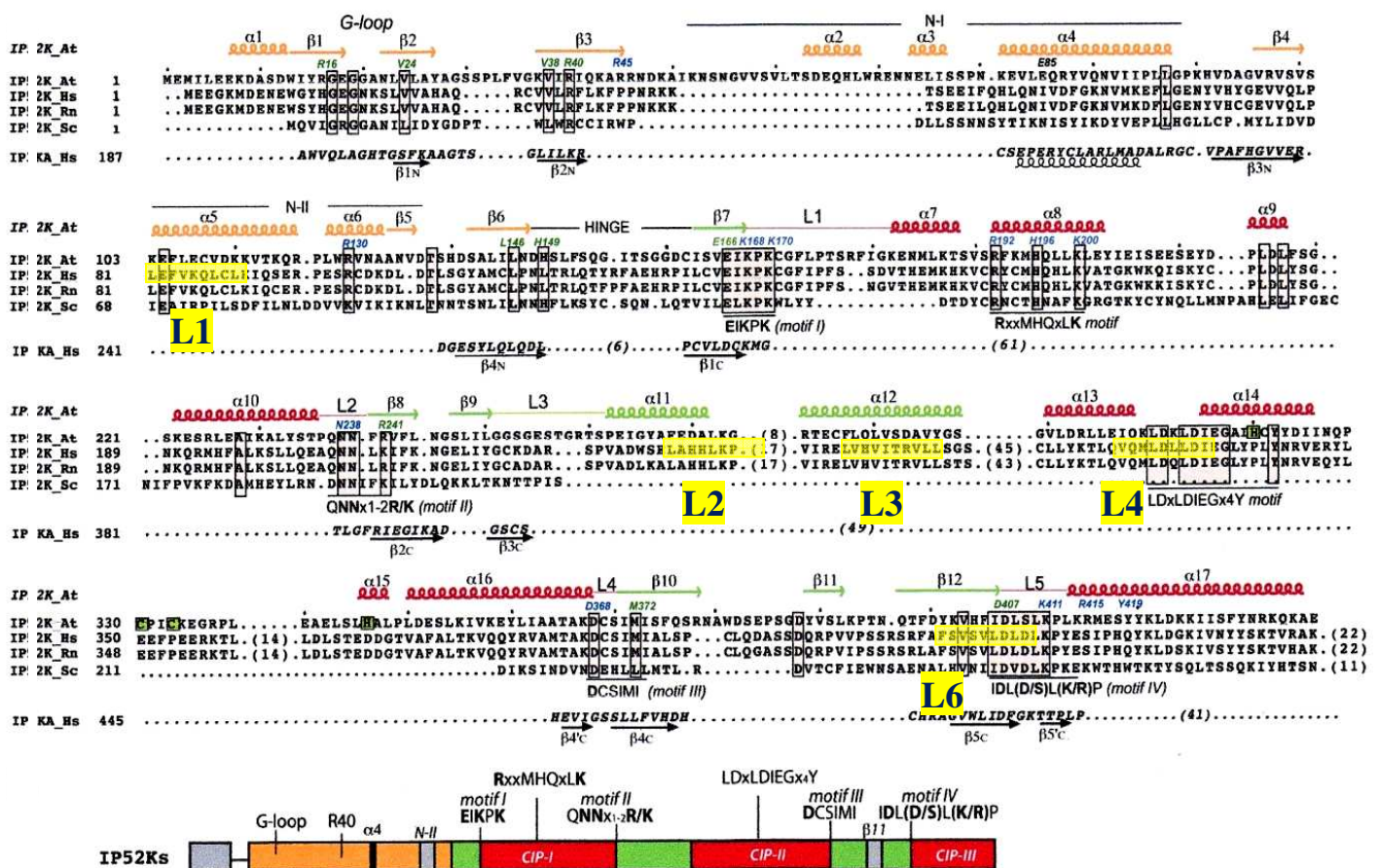


Abbildung 4-2: Allignierung verschiedener IP5 Kinasen; In dieser Graphik (modifiziert nach Gonzalez et al., 2010) wurden unter anderem die *AtIP5K* und die *HsIP5K* alligniert. Es fällt eine große Sequenzähnlichkeit auf. In gelb wurden die Sequenzen L1: 81-LEFVKQLCL-90, L2: 233-LAHHLPKFF-242, L3: 261-LVHVITRVLL-270, L4: 327-VQMLDLDDI-335, L5: 369-FYQKLLDL-376, L6: 433-FSVSVLDLDL-442 markiert, die in der vorliegenden Arbeit in der *HsIP5K* untersucht worden sind. L5 ist in dieser Graphik nicht mit abgebildet. Auffällig ist die Übereinstimmung der Sequenz L6 (vorliegende Arbeit) mit dem Motiv IV (Gonzalez et al., 2010). Auch sie Sequenz L4 stimmt mit einem von Gonzalez beschriebenen funktionellen Motiven überein.

4.3 Mögliche Gründe für eine Kompartimentierung von IP5K im Kern

Es wurde in Zellen, die unter Stress stehen, beobachtet, dass sie nukleoläre „Caps“ bilden. In diesen Caps konnte die IP5K vermehrt nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Dr. Maria Brehm). Ein ähnliches Phänomen findet außerhalb des Kerns statt. Hier bilden sich Stressgranula, in denen ebenfalls IP5K vermehrt vorhanden ist. In diesen nukleolären Caps findet man auch Isoformen von PML Protein (Condemine et al., 2007). Sobald eine Form von Stress auf die Zelle ausgeübt wird, lokalisieren bestimmte PML Isoformen an nukleoläre Komponenten („Caps“). Es scheint so zu sein, dass verschiedenste Proteine bei zellulärem Stress sowohl im Kern als auch außerhalb des Zellkerns aktiv gegen die Noxe geschützt werden, indem neue abgeschlossene Kompartimente gebildet werden. Dort werden die Proteine solange in Komplexen gelagert bis der Stress auslösende Faktor nicht mehr existent ist. Die IP5K könnte hierbei eine große Rolle spielen, da sie den Hauptfaktor der InsP₆-Herstellung darstellt. Autoren verschiedener Arbeiten, in denen die IP5 Kinasen anderer Organismen untersucht wurden, beschreiben Aufgaben von InsP₆ in DNA Reparatur oder Chromatin Remodeling (Luther, 1995, Shen et al., 2003). Deshalb könnte eine Kompartimentalisierung der IP5K essentiell dafür sein, InsP₆ genau dort herzustellen, wo es benötigt wird. Das Enzym könnte also aus Gründen der Effektivität direkt in den Caps festgehalten werden.

Bisher wurde vermutet, dass die IP5K indirekt am mRNA-Export beteiligt ist (Bolger et al., 2008). Außerdem wurde die IP5K in Assoziation mit mRNA in induzierten Stressgranula beobachtet (Brehm et al., 2007). Daraus erwuchs die Idee, dass die IP5K direkt mRNA bindet und aus dem Kern heraus transportiert. In Anbetracht des vorher Gesagten ist es allerdings auch durchaus möglich, dass es das Produkt der IP5K – InsP₆ – ist, auf den es beim Export der mRNA ankommt. Diese Überlegung deckt sich mit den Aussagen von York et al., 1999 und Miller et al., 2004, die besagten, dass InsP₆ in Hefe den mRNA-Exportkomplex bestehend aus Gle1 und Dbp5 reguliert. Denkbar wären in diesem Zusammenhang auch, dass bestimmte mRNAs oder RNP Komplexe weitere Reifungsschritte durchlaufen, die bisher unbekannt sind und eine bestimmte Menge an InsP₆ erfordern.

Das InsP₆ ist scheinbar in sehr vielen Bereichen für das Überleben eines Organismus und den Stoffwechsel der einzelnen Zelle wichtig. Dies könnte eine Erklärung sein, weswegen die IP5K sowohl eine starke Affinität zum Zellkern und speziell zu den Nukleoli hat als auch dafür, dass die IP5K durch Caps und Granula in der gestressten Zelle geschützt wird.

4.4 Die Zielsteuerung der IP5K wird möglicherweise durch Phosphorylierung reguliert

Es ist für viele Proteine bekannt, dass ihre Zielsteuerung durch posttranslationale Modifikationen reguliert wird. Häufig wird diese Regulation durch Phosphorylierungen bewerkstelligt. Deshalb wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählte putative Phosphorylierungsdomänen auf Funktionalität überprüft. Hierzu wurden Pseudophosphorylierungs- bzw. dephosphorylierungsmutanten hergestellt. Es sollte gezeigt werden, ob das Pendeln der IP5K zwischen Kern und Zytoplasma durch Phosphorylierung feinreguliert wird. Daher lag das Hauptaugenmerk bei der Suche nach putativen Domänen innerhalb der Sequenz der Peptidinsertion, die die NES-Aktivität des Enzyms enthält (Brehm et al., 2007). Die Aminosäuresequenz der IP5K wurde mit der Online Software Scansite 2.0 auf Erkennungsmotive verschiedener Proteinkinasen überprüft (Obenauer et al., 2003), wobei drei mögliche Phosphorylierungsstellen im Bereich AS 200-300 prädiiziert wurden; nämlich T280, S282 und S271/S273 (**Abbildung 4-3**). Bei einer niedrigen Erkennungsschwelle wurden auch außerhalb der Insertion diverse mögliche Phosphorylierungsstellen gefunden, die in einem weiteren Projekt beschrieben werden müssen.

Es wurden in dieser Arbeit u. a. die Aminosäuren 282/283 untersucht. Es ergaben sich bei der Mutagenese von S282A und S282E leichte Verschiebungen der intrazellulären Lokalisation der IP5K, die nicht sicher signifikant waren. Die Tatsache, dass bei einem Suchlauf mit mittlerer Sensitivität jeder der S/T-Reste in dem Motiv 280-TLSP-283 eine putative Phosphorylierungsstelle darstellte, sollte Grund für eine Erweiterung der Versuche an dieser Stelle des Proteins sein. Die Pseudodephosphorylierungsmutante S271/271A zeigte eine signifikant verringerte Kernlokalisation der IP5K. Dafür kann es zwei mögliche Erklärungen geben: Entweder verringert eine Dephosphorylierung den Kernimport der IP5K, oder sie steigert den Kernexport. Letzteres ist wahrscheinlicher, da diese Phosphorylierungsstelle im Bereich der NES-Aktivität der IP5K liegt. In zukünftigen Arbeiten könnte untersucht werden, ob die IP5K tatsächlich an dieser Stelle einer Phosphorylierung unterliegt und welche Proteinkinase dafür verantwortlich ist. Dazu könnten Peptidabschnitte der IP5K bakteriell exprimiert und in vitro Phosphorylierungsassays unterzogen werden. Wenn die Proteinkinase dann bekannt ist, könnte sie inhibiert oder überexprimiert werden, und man könnte untersuchen, ob durch diese Expressionsänderung die Lokalisation der IP5K beeinflusst würde.

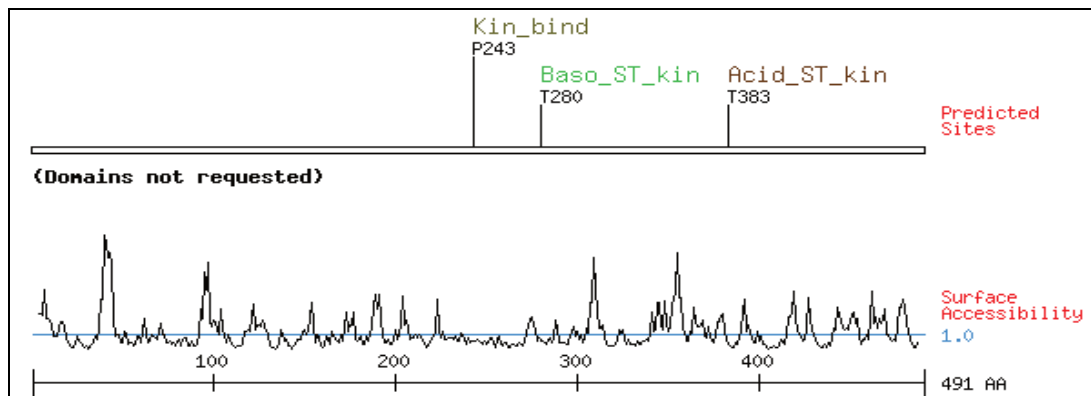


Abbildung 4-3: Putative Phosphorylierungsdomänen der IP5K mit niedrig eingestelltem Erkennungsfiler: Mit dem Programm ScanSite 2.0 (Obenauer et al., 2003) wurde hier die Aminosäuresequenz der IP5K mit sehr spezifisch eingestelltem Erkennungsfiler auf putative Phosphorylierungsstellen hin untersucht. Es ergeben sich hier nur drei putative Bindungsstellen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die nukleären und subnukleären Zielsteuerungseigenschaften der menschlichen Inositolpentakisphosphat 2-Kinase (IP5K) genauer beschrieben. Dieses Enzym ist nach derzeitigem Kenntnisstand das einzige Protein der menschlichen Zelle, das Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat unter ATP-Verbrauch zu Inositolhexakisphosphat (InsP₆) umsetzt. Die Wichtigkeit, die IP5K für das Überleben eines Organismus' darstellt, wird dadurch deutlich, dass IP5K knock-out Mäuse schon embryonal letal sind (Verbsky et al., 2005). In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Mayr wurde in groß angelegten Untersuchungsreihen die Lokalisation der IP5K in der menschlichen Zelle charakterisiert (Brehm et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden die vorliegenden Daten durch verschiedene neue Erkenntnisse ergänzt. Es wurde umfassend nach neuen Leucin reichen Karyopherin abhängigen Signalen gesucht, die den Proteinexport aus dem Kern vermitteln könnten. Von den sechs prädierten putativen Signalen konnte nur für eines (AS 433-442) eine mögliche Aktivität als nukleäres Exportsignal in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. In diesem Zuge wurde auch untersucht, ob eine Feinregulierung des Kernexportes durch Phosphorylierung stattfindet. So wird IP5K anscheinend vermehrt aus dem Kern exportiert, wenn die Phosphorylierungsstellen S271A und S273A in unphosphoryliertem Zustand vorliegen. Phosphorylierung könnte dies entsprechend hemmen. Die fünf weiteren Leucin reichen Regionen hatten hingegen Einfluss auf die nukleoläre Lokalisation der IP5K. Mutation aller dieser Domänen, sowohl Deletion als auch Substitution der Leucine durch Alanine, führte zu einer stark verminderten Lokalisation in Nukleoli. Kürzlich wurde die 3D-Struktur der *At*IP5K veröffentlicht (Gonzalez et al., 2010) und die homologen humanen Aminosäureabschnitte der fünf untersuchten Domänen liegen alle auf der Oberfläche des Proteins. Aktuelle Studien, die auf der vorliegenden Arbeit beruhen,

lieferten bereits Hinweise, dass es sich hierbei um Interaktionsdomänen für nukleoläre Proteine handelt. Diese Motive sind damit für eine nukleoläre Retention der IP5K mitverantwortlich sind. Die nukleären Lokalisationssignale der IP5K (NLS) waren schon vor Beginn der vorliegenden Arbeit ein viel bearbeitetes Thema in der Arbeitsgruppe Mayr, konnten aber damals noch nicht abschließend charakterisiert werden. In dieser Arbeit wurden auch etliche Ergebnisse aus Projekten vorhergehender Arbeiten weiter experimentell verifiziert, so dass die nukleäre Importfunktion der IP5K nun eindeutig aufgeklärt werden konnte. Die für den Kernimport essentiellen AS sind 152-[HEMKHKVCRYC](#)-162 und 172-[KWKQISK](#)-179.

6. Summary

In this work nuclear and subnuclear targeting features of human inositol pentakisphosphate-kinase (IP5K) were described in more detail. Human IP5K is currently the only known enzyme capable of converting inositol-1,3,4,5,6-pentakis-phosphate to inositolhexakisphosphate (InsP₆) in human cells. The importance of IP5K for the organism's survival is illustrated by the fact that knock-out mice are embryonic lethal (Verbsky et al., 2005). The intracellular localization of IP5K was intensively investigated by Prof. Mayr's group (Brehm et al., 2007). In this work new aspects were discovered. To characterize the nuclear export signal of IP5K leucine rich regions were investigated for a potential NES function. One of the six leucine rich sequences (aa. 433-442) shows a possible nuclear export activity in HeLa cells. Also phosphorylation sites for fine regulation were part of the investigation. Nuclear export of IP5K seems to be increased when amino acids S271 and S273 are not phosphorylated. Phosphorylation therefore could prevent nuclear export. All of the other five leucine rich sequences seem to be very important for nucleolar localization of IP5K, since their deletion leads to exclusion of the mutants from nucleoli. In the recently described 3D-structure of IP5K from *Arabidopsis thaliana* all homologous human domains were located on the external side of the protein (Gonzalez et al., 2010). New studies based on the work at hand indicate that those sites actually interact with nucleolar proteins. Therefore those sequences mediate nucleolar retention of IP5K.

Nuclear localization signals of IP5K (NLS) were in the focus of Prof. Mayr's laboratory before. In former studies NLS activity could not finally be characterized. Here different formerly performed projects were experimentally verified. The nuclear import signal of IP5K was completely characterized. The essential amino acids are indicated in blue: 152-[HEMKHKVCRYC](#)-162 and 172-[KWKQISK](#)-179.

7. Literaturverzeichnis

- Abel, K, R A Anderson, und S B Shears. „Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism“. *Journal of Cell Science* 114, Nr. 12 (Juni 2001): 2207-2208.
- Abramoff, Magelhaes P.J, und Ram S.J. „Image processing with Images.Biophotonics International 11(2004) 36-42“, 2004.
- Abreu, Emanuel F M, und Francisco J L Aragão. „Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress“. *Annals of Botany* 99, Nr. 2 (Februar 2007): 285-292.
- Aitchison, J D, und M P Rout. „The road to ribosomes. Filling potholes in the export pathway“. *The Journal of Cell Biology* 151, Nr. 5 (November 27, 2000): F23-26.
- Alcázar-Román, Abel R, Elizabeth J Tran, Shuangli Guo, und Susan R Went. „Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export“. *Nature Cell Biology* 8, Nr. 7 (Juli 2006): 711-716.
- Alcázar-Román, Abel R., und Susan R. Went. „Inositol polyphosphates: a new frontier for regulating gene expression“. *Chromosoma* 117, Nr. 1 (Oktober 2007): 1-13.
- Alhassnan, Z, M Rashed, O Aldirbashi, Z Patay, Z Rahbeeni, und K Abuamero. „Hyperornithinemia–hyperammonemia–homocitrullinuria syndrome with stroke-like imaging presentation: Clinical, biochemical and molecular analysis“. *Journal of the Neurological Sciences* 264, Nr. 1-2 (Januar 2008): 187-194.
- Andersen, Jens S, Yun W Lam, Anthony K L Leung, Shao-En Ong, Carol E Lyon, Angus I Lamond, und Matthias Mann. „Nucleolar proteome dynamics“. *Nature* 433, Nr. 7021 (Januar 6, 2005): 77-83.
- Andersen, Jens S, Carol E Lyon, Archa H Fox, Anthony K L Leung, Yun Wah Lam, Hanno Steen, Matthias Mann, und Angus I Lamond. „Directed proteomic analysis of the human nucleolus“. *Current Biology: CB* 12, Nr. 1 (Januar 8, 2002): 1-11.
- Anekonda, Thimmappa S, Teri L Wadsworth, Robert Sabin, Kate Frahler, Christopher Harris, Babett Petriko, Martina Ralle, Randy Woltjer, und Joseph F Quinn. „Phytic acid as a potential treatment for alzheimer’s pathology: evidence from animal and in vitro models“. *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 23, Nr. 1 (Januar 1, 2011): 21-35.
- Berridge, M J, P Lipp, und M D Bootman. „The versatility and universality of calcium signalling“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1, Nr. 1 (Oktober 2000): 11-21.
- Bischoff, F R, und H Ponstingl. „Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1“. *Nature* 354, Nr. 6348 (November 7, 1991): 80-82.
- Boisvert, F M, M J Hendzel, und D P Bazett-Jones. „Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA“. *The Journal of Cell Biology* 148, Nr. 2 (Januar 24, 2000): 283-292.
- Boisvert, François-Michel, Silvana van Koningsbruggen, Joaquín Navascués, und Angus I Lamond. „The multifunctional nucleolus“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8, Nr. 7 (Juli 2007): 574-585.
- Bolger, Timothy A, Andrew W Folkmann, Elizabeth J Tran, und Susan R Went. „The mRNA export factor Gle1 and inositol hexakisphosphate regulate distinct stages of translation“. *Cell* 134, Nr. 4 (August 22, 2008): 624-633.
- van den Boom, V. „DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery“. *The Journal of Cell Biology* 166, Nr. 1 (Juli 2004): 27-36.
- Breeuwer, M., & Goldfarb, D. S. (1990). Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell*, 60(6), 999-1008.
- Brehm, M. 2006. Aufklärung neuer Funktionen von Inositolphosphatkinasen durch zelluläre Lokalisationsstudien. *Universität Hamburg, Fachbereich Chemie*.

- Brehm, Maria A, Tobias M H Schenk, Xuefei Zhou, Werner Fanick, Hongying Lin, Sabine Windhorst, Marcus M Nalaskowski, Mario Kobras, Stephen B Shears, and Georg W Mayr. „Intracellular localization of human Ins(1,3,4,5,6)P5 2-kinase“. *The Biochemical Journal* 408, Nr. 3 (Dezember 15, 2007): 335-345.
- Burks, Lynnette M, Jinhu Yin, und Sharon E Plon. „Nuclear import and retention domains in the amino terminus of RECQL4“. *Gene* 391, Nr. 1-2 (April 15, 2007): 26-38.
- Byrum, Jennifer, Stephen Jordan, Stephen T Safrany, und William Rodgers. „Visualization of inositol phosphate-dependent mobility of Ku: depletion of the DNA-PK cofactor InsP6 inhibits Ku mobility“. *Nucleic Acids Research* 32, Nr. 9 (2004): 2776-2784.
- Camacho, José A, Natalia Rioseco-Camacho, Dario Andrade, John Porter, und Jin Kong. „Cloning and characterization of human ORNT2: a second mitochondrial ornithine transporter that can rescue a defective ORNT1 in patients with the hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome, a urea cycle disorder“. *Molecular Genetics and Metabolism* 79, Nr. 4 (August 2003): 257-271.
- Campbell, J. K., Gurung, R., Romero, S., Speed, C. J., Andrews, R. K., Berndt, M. C., & Mitchell, C. A. (1997). Activation of the 43 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase by 14-3-3zeta. *Biochemistry*, 36(49), 15363-15370. doi:10.1021/bi9708085
- Catez, F., M. Erard, N. Schaerer-Uthurralt, K. Kindbeiter, J.-J. Madjar, und J.-J. Diaz. „Unique Motif for Nucleolar Retention and Nuclear Export Regulated by Phosphorylation“. *Molecular and Cellular Biology* 22, Nr. 4 (Februar 2002): 1126-1139.
- Chakraborty, Anutosh, J Kent Werner, Michael A Koldobskiy, Asif K Mustafa, Krishna R Juluri, Joseph Pietropaoli, Adele M Snowman, und Solomon H Snyder. „Casein kinase-2 mediates cell survival through phosphorylation and degradation of inositol hexakisphosphate kinase-2“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, Nr. 6 (Februar 8, 2011): 2205-2209.
- Clusmann, Hans, Thomas Kral, Ulrike Gleissner, Robert Sassen, Horst Urbach, Ingmar Blümcke, Jacek Bogucki, und Johannes Schramm. „Analysis of different types of resection for pediatric patients with temporal lobe epilepsy“. *Neurosurgery* 54, Nr. 4 (April 2004): 847-859; discussion 859-860.
- Coady, Michael J, Bernadette Wallendorff, Dominique G Gagnon, und Jean-Yves Lapointe. „Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter“. *The Journal of Biological Chemistry* 277, Nr. 38 (September 20, 2002): 35219-35224.
- Coates, M L. „Hemoglobin function in the vertebrates: an evolutionary model“. *Journal of Molecular Evolution* 6, Nr. 4 (Dezember 29, 1975): 285-307.
- Communi, D, V Vanweyenbergh, und C Erneux. „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“. *The EMBO Journal* 16, Nr. 8 (April 15, 1997): 1943-1952.
- Condemine, Wilfried, Yuki Takahashi, Morgane Le Bras, und Hugues de Thé. „A nucleolar targeting signal in PML-I addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells“. *Journal of Cell Science* 120, Nr. 18 (September 15, 2007): 3219-3227.
- Cook, Atlanta, Fulvia Bono, Martin Jinek, und Elena Conti. „Structural biology of nucleocytoplasmic transport“. *Annual Review of Biochemistry* 76 (2007): 647-671.
- COSGROVE, D. J. (1963). THE ISOLATION OF MYOINOSITOL PENTAPHOSPHATES FROM HYDROLYSATES OF PHYTIC ACID. *The Biochemical Journal*, 89, 172-175.
- la Cour, Tanja, Ramneek Gupta, Kristoffer Rapacki, Karen Skriver, Flemming M Poulsen, und Søren Brunak. „NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals“. *Nucleic Acids Research* 31, Nr. 1 (Januar 1, 2003): 393-396.
- Cronshaw, Janet M, Andrew N Krutchinsky, Wenzhu Zhang, Brian T Chait, und Michael J Matunis. „Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex“. *The Journal of Cell Biology* 158, Nr. 5 (September 2, 2002): 915-927.

- Dang, C V, und W M Lee. „Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins“. *The Journal of Biological Chemistry* 264, Nr. 30 (Oktober 25, 1989): 18019-18023.
- Daniels, Matthew J, Alexander Marson, und Ashok R Venkitaraman. „PML bodies control the nuclear dynamics and function of the CHFR mitotic checkpoint protein“. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, Nr. 11 (Oktober 2004): 1114-1121.
- Dasso, Mary. „The Ran GTPase: theme and variations“. *Current Biology: CB* 12, Nr. 14 (Juli 23, 2002): R502-508.
- Dawson, T Renee, Michelle D Lazarus, Martin W Hetzer, und Susan R Wenthe. „ER membrane-bending proteins are necessary for de novo nuclear pore formation“. *The Journal of Cell Biology* 184, Nr. 5 (März 9, 2009): 659-675.
- Dellaire, Graham, und David P Bazett-Jones. „PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress“. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 26, Nr. 9 (September 2004): 963-977.
- Dennis, Michael D, Jamie I Baum, Scot R Kimball, und Leonard S Jefferson. „Mechanisms involved in the coordinate regulation of the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) by insulin and amino acids“. *The Journal of Biological Chemistry* (Januar 14, 2011). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21239491>.
- Deryusheva, Svetlana, und Joseph G Gall. „Small Cajal Body-Specific RNAs (scaRNAs) of Drosophila Function in the Absence of Cajal Bodies“. *Molecular Biology of the Cell* (Oktober 21, 2009). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846657>.
- Diaz, J J, M D Dodon, N Schaerer-Uthurralt, D Simonin, K Kindbeiter, L Gazzolo, und J J Madjar. „Post-transcriptional transactivation of human retroviral envelope glycoprotein expression by herpes simplex virus Us11 protein“. *Nature* 379, Nr. 6562 (Januar 18, 1996): 273-277.
- Dossani, Zain Y, Christine S Weirich, Jan P Erzberger, James M Berger, und Karsten Weis. „Structure of the C-terminus of the mRNA export factor Dbp5 reveals the interaction surface for the ATPase activator Gle1“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, Nr. 38 (September 22, 2009): 16251-16256.
- Emmott, Edward, und Julian A Hiscox. „Nucleolar targeting: the hub of the matter“. *EMBO Reports* 10, Nr. 3 (März 2009): 231-238.
- Ernst, O. Leptomycin B-abhängiger Kernexport der humanen Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B. *Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Zentrum für Experimentelle Medizin Institut für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion*. Technische Universität Hamburg -Harburg, Hamburg.
- Ferry, Sandra, Miho Matsuda, Hiroki Yoshida, und Masato Hirata. „Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFkappaB-mediated cell survival pathway“. *Carcinogenesis* 23, Nr. 12 (Dezember 2002): 2031-2041.
- Fliegert, R, A Gasser, und A H Guse. „Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers“. *Biochemical Society Transactions* 35, Nr. 1 (Februar 2007): 109-114.
- Fontes, M R, T Teh, und B Kobe. „Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha“. *Journal of Molecular Biology* 297, Nr. 5 (April 14, 2000): 1183-1194.
- Fontes, Marcos R M, Trazel Teh, David Jans, Ross I Brinkworth, und Bostjan Kobe. „Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha“. *The Journal of Biological Chemistry* 278, Nr. 30 (Juli 25, 2003): 27981-27987.
- Fornerod, M, M Ohno, M Yoshida, und I W Mattaj. „CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals“. *Cell* 90, Nr. 6 (September 19, 1997): 1051-1060.

- Frederick, Joshua P, Deidre Mattiske, Jessica A Wofford, Louis C Megosh, Li Yin Drake, Shean-Tai Chiou, Brigid L M Hogan, and John D York. „An essential role for an inositol polyphosphate multikinase, Ipk2, in mouse embryogenesis and second messenger production“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, Nr. 24 (Juni 14, 2005): 8454-8459.
- Fridy, P. C., J. C. Otto, D. E. Dollins, and J. D. York. „Cloning and Characterization of Two Human VIP1-like Inositol Hexakisphosphate and Diphosphoinositol Pentakisphosphate Kinases“. *Journal of Biological Chemistry* 282, Nr. 42 (August 2007): 30754-30762.
- Fujii, Makoto, and John D York. „A role for rat inositol polyphosphate kinases rIPK2 and rIPK1 in inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate production in rat-1 cells“. *The Journal of Biological Chemistry* 280, Nr. 2 (Januar 14, 2005): 1156-1164.
- Garrison, F H. „Ramón y Cajal“. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 5, Nr. 6 (Juni 1929): 482-508.
- González, Beatriz, Jose Ignacio Baños-Sanz, Maider Villate, Charles Alistair Brearley, and Julia Sanz-Aparicio. „Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase is a distant IPK member with a singular inositide binding site for axial 2-OH recognition“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, Nr. 21 (Mai 25, 2010): 9608-9613.
- Görlich, D, und U Kutay. „Transport between the cell nucleus and the cytoplasm“. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15 (1999): 607-660.
- Greber, U F, A Senior, und L Gerace. „A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane-spanning polypeptide with a large luminal domain and a small cytoplasmic tail“. *The EMBO Journal* 9, Nr. 5 (Mai 1990): 1495-1502.
- Grüter, P, C Tabernero, C von Kobbe, C Schmitt, C Saavedra, A Bachi, M Wilm, B K Felber, und E Izaurralde. „TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus“. *Molecular Cell* 1, Nr. 5 (April 1998): 649-659.
- Guan, Guimin, Peihua Dai, und Ishaiahu Shechter. „cDNA cloning and gene expression analysis of human myo-inositol 1-phosphate synthase“. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417, Nr. 2 (September 15, 2003): 251-259.
- Guse, Andreas H. „Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR)“. *The FEBS Journal* 272, Nr. 18 (September 2005): 4590-4597.
- Hanakahi, Les A, und Stephen C West. „Specific interaction of IP6 with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK“. *The EMBO Journal* 21, Nr. 8 (April 15, 2002): 2038-2044.
- Handwerker, Korie E, Jason A Cordero, und Joseph G Gall. „Cajal bodies, nucleoli, and speckles in the *Xenopus* oocyte nucleus have a low-density, sponge-like structure“. *Molecular Biology of the Cell* 16, Nr. 1 (Januar 2005): 202-211.
- Hawkins, P T, D R Poyner, T R Jackson, A J Letcher, D A Lander, und R F Irvine. „Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate“. *The Biochemical Journal* 294 (Pt 3) (September 15, 1993): 929-934.
- Hirdes, Wiebke, Nora Napp, Iris Wulfsen, Michaela Schweizer, Jürgen R Schwarz, und Christiane K Bauer. „Erg K⁺ currents modulate excitability in mouse mitral/tufted neurons“. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 459, Nr. 1 (November 2009): 55-70.
- Hiscox, J A. „The nucleolus--a gateway to viral infection?“ *Archives of Virology* 147, Nr. 6 (Juni 2002): 1077-1089.
- Hodge, C A, H V Colot, P Stafford, und C N Cole. „Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells“. *The EMBO Journal* 18, Nr. 20 (Oktober 15, 1999): 5778-5788.

- Höer, A, und E Oberdisse. „Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate are inhibitors of the soluble inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate 3-phosphatase and the inositol 1,4,5-trisphosphate/1,3,4,5-tetrakisphosphate 5-phosphatase from pig brain“. *The Biochemical Journal* 278 (Pt 1) (August 15, 1991): 219-224.
- Hoy, M. „Inositol hexakisphosphate promotes dynamin I- mediated endocytosis“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, Nr. 10 (Mai 2002): 6773-6777.
- Irvine, R F, und M J Schell. „Back in the water: the return of the inositol phosphates“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2, Nr. 5 (Mai 2001): 327-338.
- Irvine, Robin F. „20 years of Ins(1,4,5)P₃, and 40 years before“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4, Nr. 7 (Juli 2003): 586-590.
- Irvine. „Inositide evolution - towards turtle domination?“ *The Journal of Physiology* 566, Nr. 2 (Juli 15, 2005): 295-300.
- Ishov, A M, A G Sotnikov, D Negorev, O V Vladimirova, N Neff, T Kamitani, E T Yeh, J F Strauss, und G G Maul. „PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1“. *The Journal of Cell Biology* 147, Nr. 2 (Oktober 18, 1999): 221-234.
- Ives, E B, J Nichols, S R Went, und J D York. „Biochemical and functional characterization of inositol 1,3,4,5, 6-pentakisphosphate 2-kinases“. *The Journal of Biological Chemistry* 275, Nr. 47 (November 24, 2000): 36575-36583.
- Johnson, F B, R A Marciniak, und L Guarente. „Telomeres, the nucleolus and aging“. *Current Opinion in Cell Biology* 10, Nr. 3 (Juni 1998): 332-338.
- Ju, Shulin, Galit Shaltiel, Alon Shamir, Galila Agam, und Miriam L Greenberg. „Human 1-D-myo-inositol-3-phosphate synthase is functional in yeast“. *The Journal of Biological Chemistry* 279, Nr. 21 (Mai 21, 2004): 21759-21765.
- Kalderon, D, B L Roberts, W D Richardson, und A E Smith. „A short amino acid sequence able to specify nuclear location“. *Cell* 39, Nr. 3 Pt 2 (Dezember 1984): 499-509.
- Kendirgi, Frederic, Dianne M Barry, Eric R Griffis, Maureen A Powers, und Susan R Went. „An essential role for hGle1 nucleocytoplasmic shuttling in mRNA export“. *The Journal of Cell Biology* 160, Nr. 7 (März 31, 2003): 1029-1040.
- Kendirgi, Frederic, Deborah J Rexer, Abel R Alcázar-Román, Halina M Onishko, und Susan R Went. „Interaction between the shuttling mRNA export factor Gle1 and the nucleoporin hCG1: a conserved mechanism in the export of Hsp70 mRNA“. *Molecular Biology of the Cell* 16, Nr. 9 (September 2005): 4304-4315.
- Kersting, Michael C, Michele Boyette, Joseph H Massey, und Phillip E Ryals. „Identification of the inositol isomers present in Tetrahymena“. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 50, Nr. 3 (Juni 2003): 164-168.
- Kim, Seyun, Sangwon F Kim, David Maag, Micah J Maxwell, Adam C Resnick, Krishna R Juluri, Anutosh Chakraborty, u. a. „Amino Acid Signaling to mTOR Mediated by Inositol Polyphosphate Multikinase“. *Cell Metabolism* 13, Nr. 2 (Februar 2, 2011): 215-221.
- Knapp, J. E., Oliveira, M. A., Xie, Q., Ernst, S. R., Riggs, A. F., & Hackert, M. L. (1999). The structural and functional analysis of the hemoglobin D component from chicken. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(10), 6411-6420.
- Koch-Nolte, Friedrich, Friedrich Haag, Andreas H Guse, Frances Lund, und Mathias Ziegler. „Emerging roles of NAD⁺ and its metabolites in cell signaling“. *Science Signaling* 2, Nr. 57 (2009): mr1.
- Köhler, S, S Ullrich, U Richter, und U Schumacher. „E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung“. *British Journal of Cancer* 102, Nr. 3 (Februar 2, 2010): 602-609.
- Koya, D, und G L King. „Protein kinase C activation and the development of diabetic complications“. *Diabetes* 47, Nr. 6 (Juni 1998): 859-866.

- Kral, A, J-H Schröder, R Klinke, und A K Engel. „Absence of cross-modal reorganization in the primary auditory cortex of congenitally deaf cats“. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation Cérébrale* 153, Nr. 4 (Dezember 2003): 605-613.
- Kudo, N, B Wolff, T Sekimoto, E P Schreiner, Y Yoneda, M Yanagida, S Horinouchi, und M Yoshida. „Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1“. *Experimental Cell Research* 242, Nr. 2 (August 1, 1998): 540-547.
- Kuge, O, C Dascher, L Orci, T Rowe, M Amherdt, H Plutner, M Ravazzola, G Tanigawa, J E Rothman, und W E Balch. „Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments“. *The Journal of Cell Biology* 125, Nr. 1 (April 1994): 51-65.
- Kompanje, E. J. O., Jansen, T. C., Hoven, B., & Bakker, J. (2007). The first demonstration of lactic acid in human blood in shock by Johann Joseph Scherer (1814–1869) in January 1843. *Intensive Care Medicine*, 33(11), 1967-1971.
- Kuwayama, K., K. Matsuzaki, Y. Mizobuchi, H. Mure, K. T. Kitazato, T. Kageji, M. Nakao, und S. Nagahiro. „Promyelocytic leukemia protein induces apoptosis due to caspase-8 activation via the repression of NF B activation in glioblastoma“. *Neuro-Oncology* 11, Nr. 2 (August 2008): 132-141.
- Lam, Yun Wah, Laura Trinkle-Mulcahy, und Angus I Lamond. „The nucleolus“. *Journal of Cell Science* 118, Nr. 7 (April 1, 2005): 1335-1337.
- Lee, Jin-Won, und John D Helmann. „The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation“. *Nature* 440, Nr. 7082 (März 16, 2006): 363-367.
- Leung, Anthony K L, Jens S Andersen, Matthias Mann, und Angus I Lamond. „Bioinformatic analysis of the nucleolus“. *The Biochemical Journal* 376, Nr. 3 (Dezember 15, 2003): 553-569.
- Leung, Anthony K L, und Angus I Lamond. „The dynamics of the nucleolus“. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 13, Nr. 1 (2003): 39-54.
- Lewis, J D, und D Tollervey. „Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus“. *Science (New York, N.Y.)* 288, Nr. 5470 (Mai 26, 2000): 1385-1389.
- Leyman, Alexandre, Valérie Pouillon, Alionka Bostan, Stéphane Schurmans, Christophe Erneux, und Xavier Pesesse. „The absence of expression of the three isoenzymes of the inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase does not prevent the formation of inositol pentakisphosphate and hexakisphosphate in mouse embryonic fibroblasts“. *Cellular Signalling* 19, Nr. 7 (Juli 2007): 1497-1504.
- Lin, H., P. C. Fridy, A. A. Ribeiro, J. H. Choi, D. K. Barma, G. Vogel, J. R. Falck, S. B. Shears, J. D. York, und G. W. Mayr. „Structural Analysis and Detection of Biological Inositol Pyrophosphates Reveal That the Family of VIP/Diphosphoinositol Pentakisphosphate Kinases Are 1/3-Kinases“. *Journal of Biological Chemistry* 284, Nr. 3 (November 2008): 1863-1872.
- Linding, Rune, Lars Juhl Jensen, Francesca Diella, Peer Bork, Toby J Gibson, und Robert B Russell. „Protein disorder prediction: implications for structural proteomics“. *Structure (London, England: 1993)* 11, Nr. 11 (November 2003): 1453-1459.
- Liu, J L, L F Lee, Y Ye, Z Qian, und H J Kung. „Nucleolar and nuclear localization properties of a herpesvirus bZIP oncoprotein, MEQ“. *Journal of Virology* 71, Nr. 4 (April 1997): 3188-3196.
- Lo, Y-H, C-C Wu, H-M Shih, und M-Z Lai. „Selective activation of NFAT by promyelocytic leukemia protein“. *Oncogene* 27, Nr. 27 (Juni 19, 2008): 3821-3830.
- Lohrum, M A, M Ashcroft, M H Kubbutat, und K H Vousden. „Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2“. *Nature Cell Biology* 2, Nr. 3 (März 2000): 179-181.
- Van Lookeren Campagne, M M, C Erneux, R Van Eijk, und P J Van Haastert. „Two dephosphorylation pathways of inositol 1,4,5-trisphosphate in homogenates of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum“. *The Biochemical Journal* 254, Nr. 2 (September 1, 1988): 343-350.

- Lu, Y.-J., He, Y., & Sui, S.-fang. (2002). Inositol hexakisphosphate (InsP6) can weaken the Ca(2+)-dependent membrane binding of C2AB domain of synaptotagmin I. *FEBS Letters*, 527(1-3), 22-26.
- Luo, Hongbo R, Yi Elaine Huang, Jianmeng C Chen, Adolfo Saiardi, Miho Iijima, Keqiang Ye, Yunfei Huang, Eiichiro Nagata, Peter Devreotes, und Solomon H Snyder. „Inositol pyrophosphates mediate chemotaxis in Dictyostelium via pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P3 interactions“. *Cell* 114, Nr. 5 (September 5, 2003): 559-572.
- Luther, Claudia. „Einfluß von Inositolhexakisphosphat auf Kernsubstrukturen“, 1995. Fakultät für Biologie. Ruhr-Universität Bochum, Bochum.
- Macbeth, Mark R, Heidi L Schubert, Andrew P Vandemark, Arunth T Lingam, Christopher P Hill, und Brenda L Bass. „Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing“. *Science (New York, N.Y.)* 309, Nr. 5740 (September 2, 2005): 1534-1539.
- Majerus, P W, M V Kisseleva, und F A Norris. „The role of phosphatases in inositol signaling reactions“. *The Journal of Biological Chemistry* 274, Nr. 16 (April 16, 1999): 10669-10672.
- Mayr, G W. „Inositol 1,4-bisphosphate is an allosteric activator of muscle-type 6-phosphofructo-1-kinase“. *The Biochemical Journal* 259, Nr. 2 (April 15, 1989): 463-470.
- McConnell, F M, L R Stephens, und S B Shears. „Multiple isomers of inositol pentakisphosphate in Epstein-Barr-virus-transformed (T5-1) B-lymphocytes. Identification of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate, D-inositol 1,2,4,5,6-pentakisphosphate and L-inositol 1,2,4,5,6-pentakisphosphate“. *The Biochemical Journal* 280 (Pt 2) (Dezember 1, 1991): 323-329.
- McGrath, James, Stefan Somlo, Svetlana Makova, Xin Tian, und Martina Brueckner. „Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse“. *Cell* 114, Nr. 1 (Juli 11, 2003): 61-73.
- Mekhail, Karim, Lakshman Gunaratnam, Marie-Eve Bonicalzi, und Stephen Lee. „HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL“. *Nature Cell Biology* 6, Nr. 7 (Juni 2004): 642-647.
- Mekhail, Karim, Mireille Khacho, Amanda Carrigan, Robert R J Hache, Lakshman Gunaratnam, und Stephen Lee. „Regulation of ubiquitin ligase dynamics by the nucleolus“. *The Journal of Cell Biology* 170, Nr. 5 (August 29, 2005): 733-744.
- Mekhail, Karim, Luis Rivero-Lopez, Ahmad Al-Masri, Caroline Brandon, Mireille Khacho, und Stephen Lee. „Identification of a common subnuclear localization signal“. *Molecular Biology of the Cell* 18, Nr. 10 (Oktober 2007): 3966-3977.
- Mekhail, Karim, Luis Rivero-Lopez, Mireille Khacho, und Stephen Lee. „Restriction of rRNA synthesis by VHL maintains energy equilibrium under hypoxia“. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 5, Nr. 20 (Oktober 2006): 2401-2413.
- Mélèse, T., & Xue, Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(3), 319-324.
- Menniti, F S, R N Miller, J W Putney, und S B Shears. „Turnover of inositol polyphosphate pyrophosphates in pancreatoma cells“. *The Journal of Biological Chemistry* 268, Nr. 6 (Februar 25, 1993): 3850-3856.
- Menniti, F S, K G Oliver, J W Putney, und S B Shears. „Inositol phosphates and cell signaling: new views of InsP5 and InsP6“. *Trends in Biochemical Sciences* 18, Nr. 2 (Februar 1993): 53-56.
- Mewe, Marco, Iris Wulfsen, Anna M E Schuster, Ralf Middendorff, Günter Glassmeier, Jürgen R Schwarz, und Christiane K Bauer. „Erg K⁺ channels modulate contractile activity in the bovine epididymal duct“. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294, Nr. 3 (März 2008): R895-904.
- Miao, Mi, Kathryn J Ryan, und Susan R Wentz. „The integral membrane protein Pom34p functionally links nucleoporin subcomplexes“. *Genetics* 172, Nr. 3 (März 2006): 1441-1457.
- Michell, Robert H. „Evolution of the diverse biological roles of inositols“. *Biochemical Society Symposium*, Nr. 74 (2007): 223-246.

- Milkereit, P, O Gadal, A Podtelejnikov, S Trumtel, N Gas, E Petfalski, D Tollervey, M Mann, E Hurt, und H Tschochner. „Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins“. *Cell* 105, Nr. 4 (Mai 18, 2001): 499-509.
- Miller, Aimee L, Mythili Suntharalingam, Sylvia L Johnson, Anjon Audhya, Scott D Emr, und Susan R Wenthe. „Cytoplasmic inositol hexakisphosphate production is sufficient for mediating the Gle1-mRNA export pathway“. *The Journal of Biological Chemistry* 279, Nr. 49 (Dezember 3, 2004): 51022-51032.
- Mo, Y Y, C Wang, und W T Beck. „A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I“. *The Journal of Biological Chemistry* 275, Nr. 52 (Dezember 29, 2000): 41107-41113.
- Monecke, Thomas, Thomas Güttler, Piotr Neumann, Achim Dickmanns, Dirk Görlich, und Ralf Ficner. „Crystal structure of the nuclear export receptor CRM1 in complex with Snurportin1 and RanGTP“. *Science (New York, N.Y.)* 324, Nr. 5930 (Mai 22, 2009): 1087-1091.
- Monseratte, Jessica P, und John D York. „Inositol phosphate synthesis and the nuclear processes they affect“. *Current Opinion in Cell Biology* 22, Nr. 3 (Juni 2010): 365-373.
- Mulugu, Sashidhar, Wenli Bai, Peter C Fridy, Robert J Bastidas, James C Otto, D Eric Dollins, Timothy A Haystead, Anthony A Ribeiro, und John D York. „A conserved family of enzymes that phosphorylate inositol hexakisphosphate“. *Science (New York, N.Y.)* 316, Nr. 5821 (April 6, 2007): 106-109.
- Muro, Eleonora, Jeannine Gébrane-Younis, Aude Jobart-Malfait, Emilie Louvet, Pascal Roussel, und Danièle Hernandez-Verdun. „The traffic of proteins between nucleolar organizer regions and prenucleolar bodies governs the assembly of the nucleolus at exit of mitosis“. *Nucleus (Austin, Tex.)* 1, Nr. 2 (2010): 202-211.
- Murphy, R, und S R Wenthe. „An RNA-export mediator with an essential nuclear export signal“. *Nature* 383, Nr. 6598 (September 26, 1996): 357-360.
- Nalaskowski, Marcus M, und Georg W Mayr. „The families of kinases removing the Ca²⁺-releasing second messenger Ins(1,4,5)P₃“. *Current Molecular Medicine* 4, Nr. 3 (Mai 2004): 277-290.
- Nie, Yongzhan, Qingchuan Zhao, Yingjun Su, und Jing-Hua Yang. „Subcellular distribution of ADAR1 isoforms is synergistically determined by three nuclear discrimination signals and a regulatory motif“. *The Journal of Biological Chemistry* 279, Nr. 13 (März 26, 2004): 13249-13255.
- Norris, F A, E Ungewickell, und P W Majerus. „Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro“. *The Journal of Biological Chemistry* 270, Nr. 1 (Januar 6, 1995): 214-217.
- O’Keefe, R T, S C Henderson, und D L Spector. „Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences“. *The Journal of Cell Biology* 116, Nr. 5 (März 1992): 1095-1110.
- Obenauer, John C, Lewis C Cantley, und Michael B Yaffe. „Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs“. *Nucleic Acids Research* 31, Nr. 13 (Juli 1, 2003): 3635-3641.
- Odom, A R, A Stahlberg, S R Wenthe, und J D York. „A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control“. *Science (New York, N.Y.)* 287, Nr. 5460 (März 17, 2000): 2026-2029.
- Olson, M O, M Dundr, und A Szebeni. „The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities“. *Trends in Cell Biology* 10, Nr. 5 (Mai 2000): 189-196.
- Oram, John F. „HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23, Nr. 5 (Mai 1, 2003): 720-727.

- Oram, John F, Gertrud Wolfbauer, Chongren Tang, W Sean Davidson, and John J Albers. „An amphipathic helical region of the N-terminal barrel of phospholipid transfer protein is critical for ABCA1-dependent cholesterol efflux“. *The Journal of Biological Chemistry* 283, Nr. 17 (April 25, 2008): 11541-11549.
- Padmanabhan, Usha, D Eric Dollins, Peter C Fridy, John D York, and C Peter Downes. „Characterization of a selective inhibitor of inositol hexakisphosphate kinases: use in defining biological roles and metabolic relationships of inositol pyrophosphates“. *The Journal of Biological Chemistry* 284, Nr. 16 (April 17, 2009): 10571-10582.
- Paushkin, Sergey V, Meenal Patel, Bansri S Furia, Stuart W Peltz, and Christopher R Trotta. „Identification of a Human Endonuclease Complex Reveals a Link between tRNA Splicing and Pre-mRNA 3' End Formation“. *Cell* 117, Nr. 3 (April 2004): 311-321.
- Pederson, T. „The plurifunctional nucleolus“. *Nucleic Acids Research* 26, Nr. 17 (September 1, 1998): 3871-3876.
- Pederson, Thoru. „„Compact‘ nuclear domains: Reconsidering the nucleolus“. *Nucleus (Austin, Tex.)* 1, Nr. 5 (2010): 444-445.
- Pemberton, Lucy F, and Bryce M Paschal. „Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export“. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 6, Nr. 3 (März 2005): 187-198.
- Pendaries, Caroline, Hélène Tronchère, Monique Plantavid, and Bernard Payrastre. „Phosphoinositide signaling disorders in human diseases“. *FEBS Letters* 546, Nr. 1 (Juli 3, 2003): 25-31.
- Pierre, G, A Macdonald, G Gray, C Hendriksz, M A Preece, and A Chakrapani. „Prospective treatment in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency“. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30, Nr. 5 (Oktober 2007): 815.
- Prange-Kiel, J, and G M Rune. „Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus“. *Neuroscience* 138, Nr. 3 (2006): 765-772.
- Posternak, S. & Posternak, T. (1929). *Helv. chim. acta*, 12, 1165.
- Pyper, J M, J E Clements, and M C Zink. „The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication“. *Journal of Virology* 72, Nr. 9 (September 1998): 7697-7702.
- Quimby, B Booth, and Mary Dasso. „The small GTPase Ran: interpreting the signs“. *Current Opinion in Cell Biology* 15, Nr. 3 (Juni 2003): 338-344.
- Radenberg, T, P Scholz, G Bergmann, and G W Mayr. „The quantitative spectrum of inositol phosphate metabolites in avian erythrocytes, analysed by proton n.m.r. and h.p.l.c. with direct isomer detection“. *The Biochemical Journal* 264, Nr. 2 (Dezember 1, 1989): 323-333.
- Ramírez-Valle, Francisco, Michelle L Badura, Steve Braunstein, Manisha Narasimhan, and Robert J Schneider. „Mitotic raptor promotes mTORC1 activity, G(2)/M cell cycle progression, and internal ribosome entry site-mediated mRNA translation“. *Molecular and Cellular Biology* 30, Nr. 13 (Juli 2010): 3151-3164.
- Rao, M R K Subba, Gita Kumari, D Balasundaram, R Sankaranarayanan, and S Mahalingam. „A novel lysine-rich domain and GTP binding motifs regulate the nucleolar retention of human guanine nucleotide binding protein, GNL3L“. *Journal of Molecular Biology* 364, Nr. 4 (Dezember 8, 2006): 637-654.
- Rasband W. „Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland USA. Available from: <http://rsb.info.nih.gov/ij/> (1997-2006)“, 2006.
- Raska, Ivan, Peter J Shaw, and Dusan Cmarko. „New insights into nucleolar architecture and activity“. *International Review of Cytology* 255 (2006): 177-235.
- Raska et al., „Structure and function of the nucleolus in the spotlight“. *Current Opinion in Cell Biology* 18, Nr. 3 (Juni 2006): 325-334.
- Raya, Angel, Yasuhiko Kawakami, Concepción Rodríguez-Esteban, Marta Ibañez, Diego Rasskin-Gutman, Joaquín Rodríguez-León, Dirk Büscher, José A Feijó, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. „Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination“. *Nature* 427, Nr. 6970 (Januar 8, 2004): 121-128.

- Reed, Mark L, Brian K Dove, Richard M Jackson, Rebecca Collins, Gavin Brooks, and Julian A Hiscox. „Delineation and modelling of a nucleolar retention signal in the coronavirus nucleocapsid protein“. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7, Nr. 7 (Juli 2006): 833-848.
- Rizos, H, A P Darmanian, G J Mann, and R F Kefford. „Two arginine rich domains in the p14ARF tumour suppressor mediate nucleolar localization“. *Oncogene* 19, Nr. 26 (Juni 15, 2000): 2978-2985.
- Rodriguez, Manuel S, Catherine Dargemont, and Françoise Stutz. „Nuclear export of RNA“. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 96, Nr. 8 (Oktober 2004): 639-655.
- Rossi, J J. „Ribozymes in the nucleolus“. *Science (New York, N.Y.)* 285, Nr. 5434 (September 10, 1999): 1685.
- Rout, M P, J D Aitchison, A Suprpto, K Hjertaas, Y Zhao, and B T Chait. „The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism“. *The Journal of Cell Biology* 148, Nr. 4 (Februar 21, 2000): 635-651.
- Rout, M P, und J D Aitchison. „Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange“. *Essays in Biochemistry* 36 (2000): 75-88.
- Ryan, Kathryn J, Yingna Zhou, und Susan R Wentte. „The karyopherin Kap95 regulates nuclear pore complex assembly into intact nuclear envelopes in vivo“. *Molecular Biology of the Cell* 18, Nr. 3 (März 2007): 886-898.
- Saiardi, A, J J Caffrey, S H Snyder, und S B Shears. „Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*“. *FEBS Letters* 468, Nr. 1 (Februar 18, 2000): 28-32.
- Saiardi et al., „The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis“. *The Journal of Biological Chemistry* 275, Nr. 32 (August 11, 2000): 24686-24692.
- Saiardi, A, H Erdjument-Bromage, A M Snowman, P Tempst, und S H Snyder. „Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases“. *Current Biology: CB* 9, Nr. 22 (November 18, 1999): 1323-1326.
- Saiardi, A, E Nagata, H R Luo, A M Snowman, und S H Snyder. „Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase“. *The Journal of Biological Chemistry* 276, Nr. 42 (Oktober 19, 2001): 39179-39185.
- Sammels, Eva, Benoit Devogelaere, Djalila Mekahli, Geert Bultynck, Ludwig Missiaen, Jan B Parys, und Humbert De Smedt. „Unraveling the role of polycystin-2/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interaction in Ca signaling“. *Communicative & Integrative Biology* 3, Nr. 6 (November 2010): 530-532.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison, C. A., u. a. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, 265(5596), 687-695.
- Sarkari, Feroz, Xueqi Wang, Tin Nguyen, und Lori Frappier. „The Herpesvirus Associated Ubiquitin Specific Protease, USP7, Is a Negative Regulator of PML Proteins and PML Nuclear Bodies“. *PloS One* 6, Nr. 1 (2011): e16598.
- Sarmah, B., und S. R. Wentte. „Dual Functions for the *Schizosaccharomyces pombe* Inositol Kinase Ipk1 in Nuclear mRNA Export and Polarized Cell Growth“. *Eukaryotic Cell* 8, Nr. 2 (Dezember 2008): 134-146.
- Sarmah, Bhaskarjyoti, Andrew J. Latimer, Bruce Appel, und Susan R. Wentte. „Inositol Polyphosphates Regulate Zebrafish Left-Right Asymmetry“. *Developmental Cell* 9, Nr. 1 (Juli 2005): 133-145.
- Sarmah, Bhaskarjyoti, Virginia P Winfrey, Gary E Olson, Bruce Appel, und Susan R Wentte. „A role for the inositol kinase Ipk1 in ciliary beating and length maintenance“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, Nr. 50 (Dezember 11, 2007): 19843-19848.

- Sato, K. „COPII Coat Assembly and Selective Export from the Endoplasmic Reticulum“. *Journal of Biochemistry* 136, Nr. 6 (Dezember 2004): 755-760.
- Scheer, U, und R Hock. „Structure and function of the nucleolus“. *Current Opinion in Cell Biology* 11, Nr. 3 (Juni 1999): 385-390.
- Schenk, T. 2004. Charakterisierung der nukleären Lokalisation von humaner Inositol-(1,3,4,5,6)-pentakisphosphat 2-Kinase (HsInsP5-2K). Universität Hamburg.
- Scott, Michelle S, François-Michel Boisvert, Angus I Lamond, und Geoffrey J Barton. „PNAC: a protein nucleolar association classifier“. *BMC Genomics* 12 (2011): 74.
- Scott, Michelle S, François-Michel Boisvert, Mark D McDowall, Angus I Lamond, und Geoffrey J Barton. „Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences“. *Nucleic Acids Research* 38, Nr. 21 (November 1, 2010): 7388-7399.
- Seeds, Andrew M, Robert J Bastidas, und John D York. „Molecular definition of a novel inositol polyphosphate metabolic pathway initiated by inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*“. *The Journal of Biological Chemistry* 280, Nr. 30 (Juli 29, 2005): 27654-27661.
- Seeds, Andrew M, Joshua C Sandquist, Eric P Spana, und John D York. „A molecular basis for inositol polyphosphate synthesis in *Drosophila melanogaster*“. *The Journal of Biological Chemistry* 279, Nr. 45 (November 5, 2004): 47222-47232.
- Shears, Stephen B. „How versatile are inositol phosphate kinases?“ *The Biochemical Journal* 377, Nr. 2 (Januar 15, 2004): 265-280.
- Shen, Xuetong, Hua Xiao, Ryan Ranallo, Wei-Hua Wu, und Carl Wu. „Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates“. *Science (New York, N.Y.)* 299, Nr. 5603 (Januar 3, 2003): 112-114.
- Shou, W, K M Sakamoto, J Keener, K W Morimoto, E E Traverso, R Azzam, G J Hoppe, u. a. „Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit“. *Molecular Cell* 8, Nr. 1 (Juli 2001): 45-55.
- Shou, W, J H Seol, A Shevchenko, C Baskerville, D Moazed, Z W Chen, J Jang, A Shevchenko, H Charbonneau, und R J Deshaies. „Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex“. *Cell* 97, Nr. 2 (April 16, 1999): 233-244.
- Siomi, H, H Shida, S H Nam, T Nosaka, M Maki, und M Hatanaka. „Sequence requirements for nucleolar localization of human T cell leukemia virus type I pX protein, which regulates viral RNA processing“. *Cell* 55, Nr. 2 (Oktober 21, 1988): 197-209.
- Song, Zhiyin, und Mian Wu. „Identification of a novel nucleolar localization signal and a degradation signal in Survivin-deltaEx3: a potential link between nucleolus and protein degradation“. *Oncogene* 24, Nr. 16 (April 14, 2005): 2723-2734.
- Speed, C. J., Little, P. J., Hayman, J. A., & Mitchell, C. A. (1996). Underexpression of the 43 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase is associated with cellular transformation. *The EMBO Journal*, 15(18), 4852-4861.
- Van der Straten, A, A Herzog, P Jacobs, T Cabezon, und A Bollen. „Molecular cloning of human haptoglobin cDNA: evidence for a single mRNA coding for alpha 2 and beta chains“. *The EMBO Journal* 2, Nr. 6 (1983): 1003-1007.
- Strawn, Lisa A, Tianxiang Shen, Nataliya Shulga, David S Goldfarb, und Susan R Wentz. „Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport“. *Nature Cell Biology* 6, Nr. 3 (März 2004): 197-206.
- Suh, Pann-Ghill, Jae-Il Park, Lucia Manzoli, Lucio Cocco, Joanna C Peak, Matilda Katan, Kiyoko Fukami, Tohru Kataoka, Sanguk Yun, und Sung Ho Ryu. „Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes“. *BMB Reports* 41, Nr. 6 (Juni 30, 2008): 415-434.

- Sun, Yuejin, Mark Thompson, Gaofeng Lin, Holly Butler, Zhifang Gao, Scott Thornburgh, Kerrm Yau, Doug A Smith, und Vipula K Shukla. „Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase from maize: molecular and biochemical characterization“. *Plant Physiology* 144, Nr. 3 (Juli 2007): 1278-1291.
- Suntharalingam, Mythili, Abel R Alcázar-Román, und Susan R Wentle. „Nuclear export of the yeast mRNA-binding protein Nab2 is linked to a direct interaction with Gfd1 and to Gle1 function“. *The Journal of Biological Chemistry* 279, Nr. 34 (August 20, 2004): 35384-35391.
- Suntharalingam, Mythili, und Susan R Wentle. „Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function“. *Developmental Cell* 4, Nr. 6 (Juni 2003): 775-789.
- Suzuki, Makoto, Kunihiko Tanaka, Mio Kuwano, und Kaoru T Yoshida. „Expression pattern of inositol phosphate-related enzymes in rice (*Oryza sativa* L.): implications for the phytic acid biosynthetic pathway“. *Gene* 405, Nr. 1-2 (Dezember 15, 2007): 55-64.
- Tan, X., und N. Zheng. „Hormone signaling through protein destruction: a lesson from plants“. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 296, Nr. 2 (Oktober 2008): E223-E227.
- Tan, Xu, Luz Irina A Calderon-Villalobos, Michal Sharon, Changxue Zheng, Carol V Robinson, Mark Estelle, und Ning Zheng. „Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase“. *Nature* 446, Nr. 7136 (April 5, 2007): 640-645.
- Taylor, Paul D, Christopher P Toseland, Teresa K Attwood, und Darren R Flower. „TATPred: a Bayesian method for the identification of twin arginine translocation pathway signal sequences“. *Bioinformatics* 1, Nr. 5 (2006): 184-187.
- Terry, L. J., E. B. Shows, und S. R. Wentle. „Crossing the Nuclear Envelope: Hierarchical Regulation of Nucleocytoplasmic Transport“. *Science* 318, Nr. 5855 (November 2007): 1412-1416.
- Terry, L. J., und S. R. Wentle. „Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex“. *The Journal of Cell Biology* 178, Nr. 7 (September 2007): 1121-1132.
- Torda, A. E., Procter, J. B., & Huber, T. (2004). Wurst: a protein threading server with a structural scoring function, sequence profiles and optimized substitution matrices. *Nucleic Acids Research*, 32, W532-W535. doi:10.1093/nar/gkh35
- Torres, Julia, Sixto Domínguez, M Fernanda Cerdá, Gonzalo Obal, Alfredo Mederos, Robin F Irvine, Alvaro Díaz, und Carlos Kremer. „Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions“. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, Nr. 3 (März 2005): 828-840.
- Tsai, Robert Y L, und Ronald D G McKay. „A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin“. *The Journal of Cell Biology* 168, Nr. 2 (Januar 17, 2005): 179-184.
- Tuteja, R., & Tuteja, N. (1998). Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33(6), 407-436.
- Uldry, M, M Ibberson, J D Horisberger, J Y Chatton, B M Riederer, und B Thorens. „Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain“. *The EMBO Journal* 20, Nr. 16 (August 15, 2001): 4467-4477.
- Vasu, S K, und D J Forbes. „Nuclear pores and nuclear assembly“. *Current Opinion in Cell Biology* 13, Nr. 3 (Juni 2001): 363-375.
- Veiga, Nicolás, Julia Torres, Sixto Domínguez, Alfredo Mederos, Robin F Irvine, Alvaro Díaz, und Carlos Kremer. „The behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of magnesium(II) and calcium(II): protein-free soluble InsP6 is limited to 49 microM under cytosolic/nuclear conditions“. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100, Nr. 11 (November 2006): 1800-1810.

- Veiga, Nicolás, Julia Torres, Himali Y Godage, Andrew M Riley, Sixto Domínguez, Barry V L Potter, Alvaro Díaz, und Carlos Kremer. „The behaviour of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate in the presence of the major biological metal cations“. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 14, Nr. 7 (September 2009): 1001-1013.
- Verbsky, John W, Shao-Chun Chang, Monita P Wilson, Yasuhiro Mochizuki, und Philip W Majerus. „The pathway for the production of inositol hexakisphosphate in human cells“. *The Journal of Biological Chemistry* 280, Nr. 3 (Januar 21, 2005): 1911-1920.
- Verbsky, John W, Monita P Wilson, Marina V Kisseleva, Philip W Majerus, und Susan R Wentz. „The synthesis of inositol hexakisphosphate. Characterization of human inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase“. *The Journal of Biological Chemistry* 277, Nr. 35 (August 30, 2002): 31857-31862.
- Verbsky, John, Kory Lavine, und Philip W Majerus. „Disruption of the mouse inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene, associated lethality, and tissue distribution of 2-kinase expression“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, Nr. 24 (Juni 14, 2005): 8448-8453.
- Verde, C. „The Functionally Distinct Hemoglobins of the Arctic Spotted Wolffish *Anarhichas minor*“. *Journal of Biological Chemistry* 277, Nr. 39 (Juli 2002): 36312-36320.
- Vivès, E, P Brodin, und B Lebleu. „A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus“. *The Journal of Biological Chemistry* 272, Nr. 25 (Juni 20, 1997): 16010-16017.
- Vondriska, Thomas M, Jason M Pass, und Peipei Ping. „Scaffold proteins and assembly of multiprotein signaling complexes“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37, Nr. 2 (August 2004): 391-397.
- Walz, D A, V Y Wu, R de Lamo, H Dene, und L E McCoy. „Primary structure of human platelet factor 4“. *Thrombosis Research* 11, Nr. 6 (Dezember 1977): 893-898.
- Webb, Sarah E, und Andrew L Miller. „Calcium signalling during embryonic development“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4, Nr. 7 (Juli 2003): 539-551.
- Weber, J D, M L Kuo, B Bothner, E L DiGiammarino, R W Kriwacki, M F Roussel, und C J Sherr. „Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex“. *Molecular and Cellular Biology* 20, Nr. 7 (April 2000): 2517-2528.
- Wilson, Monita P, Christopher Hugge, Malgorzata Bielinska, Peter Nicholas, Philip W Majerus, und David B Wilson. „Neural tube defects in mice with reduced levels of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, Nr. 24 (Juni 16, 2009): 9831-9835.
- Wong, Y H, S J Kalmbach, B K Hartman, und W R Sherman. „Immunohistochemical staining and enzyme activity measurements show myo-inositol-1-phosphate synthase to be localized in the vasculature of brain“. *Journal of Neurochemistry* 48, Nr. 5 (Mai 1987): 1434-1442.
- Wozniak, R W, G Blobel, und M P Rout. „POM152 is an integral protein of the pore membrane domain of the yeast nuclear envelope“. *The Journal of Cell Biology* 125, Nr. 1 (April 1994): 31-42.
- Xia, Hui Jun, und Guang Yang. „Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases: functions and regulations“. *Cell Research* 15, Nr. 2 (Februar 2005): 83-91.
- Yamashita, T, A Yamauchi, A Miyai, M Taniguchi, T Yoshimine, und M Tohyama. „Neuroprotective role of Na⁺/myo-inositol cotransporter against veratridine cytotoxicity“. *Journal of Neurochemistry* 72, Nr. 5 (Mai 1999): 1864-1870.
- Yang, Ling, Jeff M Reece, Jaesoon Cho, Carl D Bortner, und Stephen B Shears. „The nucleolus exhibits an osmotically regulated gatekeeping activity that controls the spatial dynamics and functions of nucleolin“. *The Journal of Biological Chemistry* 283, Nr. 17 (April 25, 2008): 11823-11831.

- Ye, W, N Ali, M E Bembenek, S B Shears, und E M Lafer. „Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3“. *The Journal of Biological Chemistry* 270, Nr. 4 (Januar 27, 1995): 1564-1568.
- York, J D, A R Odom, R Murphy, E B Ives, und S R Went. „A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export“. *Science (New York, N.Y.)* 285, Nr. 5424 (Juli 2, 1999): 96-100.
- Zhai, W, und L Comai. „A kinase activity associated with simian virus 40 large T antigen phosphorylates upstream binding factor (UBF) and promotes formation of a stable initiation complex between UBF and SL1“. *Molecular and Cellular Biology* 19, Nr. 4 (April 1999): 2791-2802.
- Zasloff, M. (1983). tRNA transport from the nucleus in a eukaryotic cell: carrier-mediated translocation process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(21), 6436-6440.
- Zhou, X. 2005. Expressions- und Reinigungsstrategien sowie funktionelle Charakterisierung der menschlichen Inositol(1,3,4,5,6)-pentakisphosphat 2-Kinase (IP5-2K). *Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Zentrum für Experimentelle Medizin Institut für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion. Technische Universität Hamburg -Harburg, Hamburg.*

8. Anhang

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden noch weitere Deletionsversuche an der IP5K durchgeführt, die im Kapitel 3 nicht erwähnt werden, da sie zur Findung von funktionellen Domänen als weniger zielführend eingestuft wurden. Dennoch sollen die gewonnenen Daten hier kurz zusammengefasst werden. Die Versuchsanordnung entspricht der aus Kapitel 3.

Nach 48-stündiger Überexpression von IP5K/EGFP in H1299 Zellen betrug die Nu/N-Ratio im Durchschnitt $1,21 \pm 0,17$ (**Abbildung 8-1**, N=100). Dies wurde dadurch erklärt, dass die Fluoreszenz in den Nukleoli im Verhältnis zu Kern und Zytoplasma am stärksten war. In 33% der beobachteten Zellen, in denen der Wildtyp exprimiert wurde, wurde eine Nu/N-Ratio von 1,2 gemessen (blau, **Abbildung 8-1A-C**). Dieses stellt das Verteilungsmaximum dar. Alle weiteren Zellen wiesen eine Gauß'sche Verteilung um das Maximum auf. Nach Expression der Enzymmutante EGFP/IP5K Δ L1 (Δ 81-90) wurde eine verringerte Fluoreszenz in den Nukleoli gemessen. Dadurch nahm die Nu/N-Ratio signifikant auf $0,85 \pm 0,11$ ab. Das Verteilungsmaximum von L1 lag daher bei 0,8 (**Abbildung 8-1A**, N = 100, $p < 0,05$).

Nach Expression des Wildtyp-Fusionsproteins EGFP/IP5K für 48 Stunden in H1299-Zellen zeigte sich eine starke Lokalisation der Fluoreszenz im Kern und in den Nukleoli. Es ergab sich eine N/C-Ratio von $1,28 \pm 0,31$ (**Abbildung 8-1D**). Bei der Darstellung in der logarithmischen Graphik zeigten sich zwei Verteilungsmaxima bei 1,1 zu 18% und 1,5 zu 15%. Eine N/C-Ratio zwischen 1,1 und 1,5 wurde in 31% der beobachteten Zellen gemessen (vgl. **Kapitel 3, Ergebnisse** und **Kapitel 4, Diskussion**). Die Deletion der Peptidsequenz L1

(Δ81-90) führte zu einer, gegenüber dem Wildtyp, verringerten Kernlokalisation der Mutante. Dadurch kam es zu einer Abnahme der N/C-Ratio mit einem Verteilungsmaximum bei 0,8 in 15% der Zellen (**Abbildung 8-1D**).

Durch die Deaktivierung eines putativen nukleären Exportsignals (NES) eines Proteins würde man nach Expression in eukaryotischen Zellen eine Zunahme der N/C-Ratio erwarten, da sich eine vermehrte Fluoreszenz im Kern einstellen würde (vgl. **Kapitel 3, Ergebnisse**). Durch die Deletion des putativen Leucin reichen NES L1 in der IP5K wurde dies nicht beobachtet. Es handelt sich daher mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um ein NES. Bei der Betrachtung der weiteren Ergebnisse wird auf eine erneute Erläuterung der Verteilungskurve des Wildtyps verzichtet.

Die Mutante EGFP/IP5KΔL4 zeigte eine vergleichbare Veränderung der Nu/N-Ratio wie alle Deletionsmutanten, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden. Sie liegt bei durchschnittlich $0,81 \pm 0,15$ (**Abbildung 8-1B**, N=100, $p < 0,05$). Die N/C-Ratio der Deletionsmutante EGFP/IP5KΔL4 ist durchschnittlich signifikant kleiner als die des Wildtyps. 8% der beobachteten Zellen zeigten nach Expression der Mutante in H1299-Zellen für 48 Stunden eine N/C-Ratio von 1,2. 12% lagen bei 0,6. 51% der beobachteten Zellen wiesen eine N/C-Ratio zwischen 0,6 und 1,2 auf (**Abbildung 8-1E**). Die durchschnittliche N/C-Ratio lag bei $1,06 \pm 0,42$ (N=100, $p < 0,05$). Nach Deletion der Leucin reichen Sequenz L5 sank die Nu/N-Ratio nach Expression in H1299-Zellen signifikant ab. Das Verteilungsmaximum der Enzymmutante EGFP/IP5KΔL5 lag bei der Nu/N-Ratio 0,8 mit 50% der beobachteten Zellen (**Abbildung 8-1C**). Die N/C-Ratio der Mutante EGFP/IP5KΔL5 zeigte eine große Streuung. 73% der beobachteten Zellen wiesen Werte von 0,6 bis 1,1 auf, wobei der Durchschnitt bei $0,92 \pm 0,31$ lag (**Abbildung 8-1F**, N=100, $p < 0,05$). Insgesamt scheint keine der Sequenzen L1, L4 oder L5 allein den nukleären Export zu vermitteln. Dennoch scheint auch in diesen Sequenzen eine nukleoläre Retentionsfunktion zu liegen (vgl. **Kapitel 3, Ergebnisse** und **Kapitel 5, Zusammenfassung**).

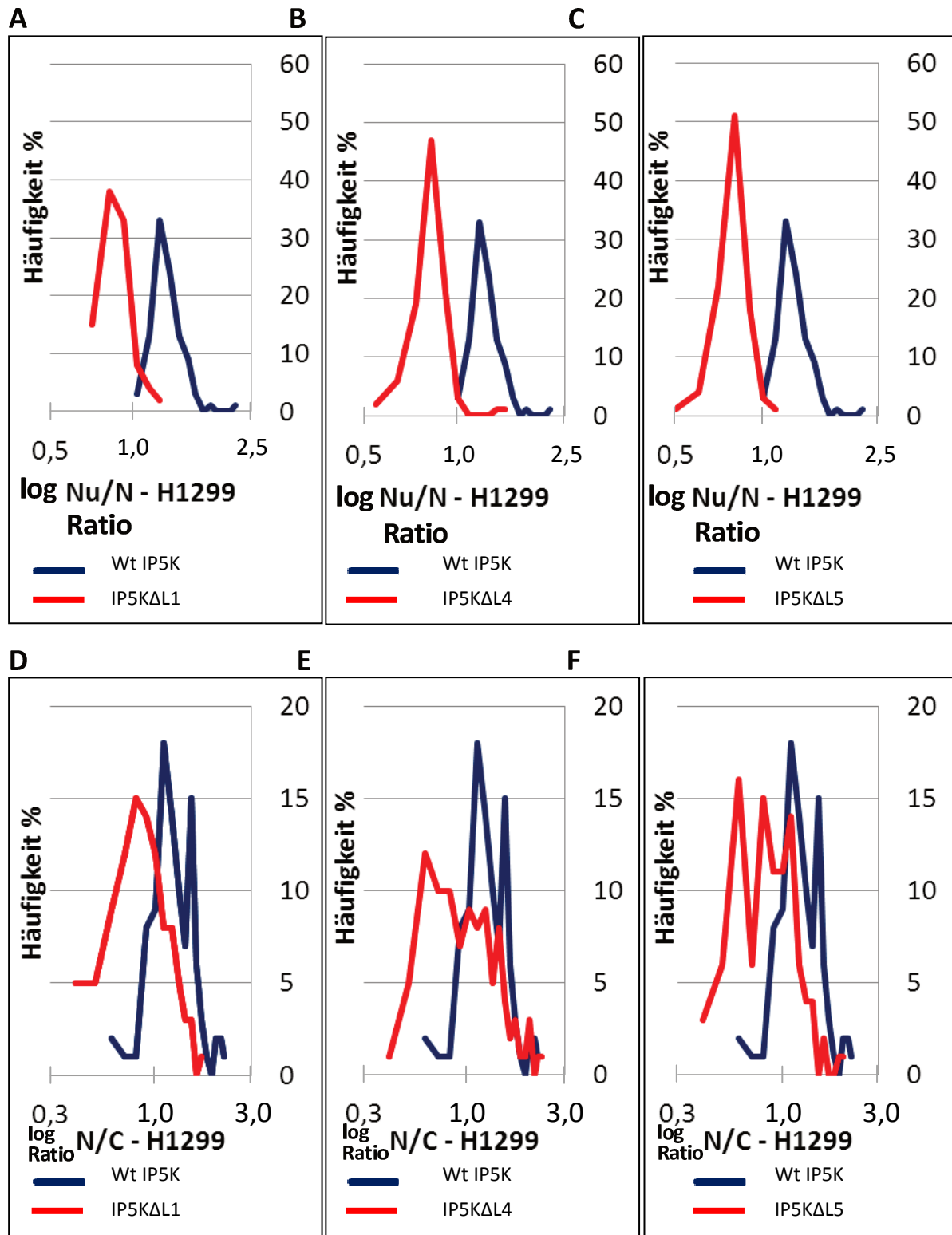


Abbildung 8-1: Häufigkeitsverteilung der Nu/N-Ratio bzw. der N/C-Ratio von wildtyp IP5K und Deletionsmutanten in H1299 Zellen. Wildtyp IP5K (blau) und die Enzymmutanten, die hier rot dargestellt werden, wurden 48h in H1299 Zellen exprimiert. Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die Nu/N-Ratio (A-C) bzw. N/C-Ratio (D-F) für jede Zelle berechnet. Anschließend wurden die Werte nach ihrer Größe sortiert und die Häufigkeit ihres Auftretens logarithmisch dargestellt (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5). Δ L1 = Δ 82-90, L1 = 81-LEFVKQLCL-90. Δ L4 = Δ 327-335, L4 = 327-VQMLDLLDI-335. Δ L5 = Δ 369-376, L5 = 369-FYQKLLDL-376; N = jeweils 100.

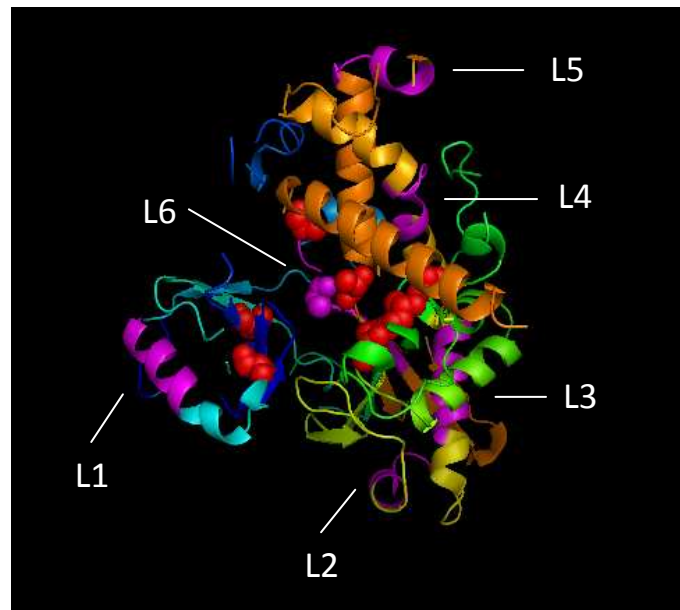


Abbildung 8-2: Neues putatives 3D-Modell der IP5K. Das Modell wurde von Dr. Maria Brehm anhand der Kristallstruktur der IP5K aus *Arabidopsis thaliana* (Gonzalez et al., 2010) mit dem Programm PyMol modelliert. Blau = N-Terminus, rot = C-Terminus, magenta = Leucin reiche Regionen mit L1: 81-LEFVKQLCL-90; L2: 233-LAHHLKPFF-242; L3: 261-LVHVITRVLL-270; L4: 327-VQMLDLDI-335; L5: 369-FYQKLLDL-376; L6: 433-FSVSVLDL-442; L1-L5 liegen an der Außenseite des Moleküls, L6 liegt im Inneren.

HeLa	Nu/N	N/C	Nu/C
Wt	1,20 ± 0,10	1,09 ± 0,25	1,73
ΔL2	0,91 ± 0,07 *	0,64 ± 0,13 *	0,60
L2LA	0,88 ± 0,07 *	0,85 ± 0,22 *	0,66
ΔL3	0,91 ± 0,09 *	0,56 ± 0,13 *	0,50
L3LA	0,90 ± 0,08 *	0,59 ± 0,11 *	0,53
ΔL6	0,85 ± 0,09 *	1,47 ± 0,69 *	1,12
L6LA	0,87 ± 0,08 *	1,11 ± 0,34 *	0,89

Tabelle 8-1: Durchschnittswerte der N/C-Ratio und der Nu/N-Ratio von wildtyp IP5K, Deletionsmutanten und Substitutionsmutanten nach Expression in HeLa Zellen.

Wildtyp IP5K und die Deletionsmutanten: ΔL2 = Δ233-242, L2LA = L237A/F240A/F241A/F242A, ΔL3 = Δ261-270, L3LA = V264A/I265A/V268A/L269A/L270A, ΔL6 = Δ433-442 = V437A/L438A/L440A/L442A wurden 48h in HeLa Zellen überexprimiert und dann fotografiert. Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die N/C- und Nu/N Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5), Die Nu/C-Ratio ist das Produkt aus N/C-Ratio und Nu/N-Ratio; N = jeweils 100, * = signifikant (p<0,05).

	Nu/N	N/C	Nu/C
Wildtyp	1,21 ± 0,17	1,28 ± 0,31	1,33
ΔL1	0,85 ± 0,11 *	0,90 ± 0,28 *	0,77
ΔL2	0,82 ± 0,09 *	1,05 ± 0,36 *	0,87
L2LA	0,80 ± 0,10 *	0,83 ± 0,36 *	0,66
ΔL3	0,81 ± 0,09 *	1,09 ± 0,37 *	0,88
L3LA	0,85 ± 0,10 *	0,52 ± 0,22 *	0,43
ΔL4	0,81 ± 0,15 *	1,06 ± 0,42 *	0,86
ΔL5	0,79 ± 0,31 *	0,92 ± 0,31 *	0,72
ΔL6	0,82 ± 0,10 *	1,06 ± 0,33 *	0,87
L6LA	0,80 ± 0,09 *	0,90 ± 0,31 *	0,76
Mutante A	1,25 ± 0,43 (n.s.)	1,03 ± 0,35 *	1,29
Mutante B	0,801 ± 0,11 *	0,95 ± 0,39 *	0,76
Mutante C	0,80 ± 0,12 *	0,66 ± 0,26 *	0,52

Tabelle 8-2: Durchschnittswerte der N/C-Ratio und der Nu/N-Ratio sowie der Nu/C-Ratio von wildtyp IP5K und Deletions- und Substitutionsmutanten nach Expression in H1299 Zellen. Wildtyp IP5K und die Enzymmutanten: ΔL1 = Δ81-90, ΔL2 = Δ233-242, L2LA = L237A/F240A/F241A/F242A, ΔL3 = Δ261-270; L3LA = V264A/I265A/V268A/L269A/L270A; ΔL4 = Δ327-335, ΔL5 = Δ369-376, ΔL6 = Δ433-442, L6LA = V437A/L438A/L440A/L442A, sowie die Kombinationsmutanten A = ΔL1, ΔL4, ΔL5, ΔL6 = Δ81-90,Δ233-242,Δ261-270,Δ327-335,Δ369-376; B = ΔL2 ΔL3 L6LA = Δ233-242, Δ261-270, V437A/L438A/L440A/L442A); C = L2LA L3LA L6LA = L237A/F240A/F241A/F242A, V264A/I265A/V268A/L269A/L270A, V437A/L438A/L440A/L442A, wurden 48h in H1299 Zellen überexprimiert und dann fotografiert. Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die N/C- und Nu/N Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5). Die Nu/C-Ratio stellt das Produkt aus N/C-Ratio und Nu/N-Ratio dar (N=jeweils 100), * = signifikant (p<0,05), n.s.= nicht signifikant.

	Nu/N	N/C
Wildtyp	1,21 ± 0,17	1,28 ± 0,31
S271/273A	1,08 ± 0,15 *	0,81 ± 0,30 *
S271/273E	1,05 ± 0,12 *	1,14 ± 0,31 *
S282A	1,19 ± 0,12 *	1,17 ± 0,36 *
S282E	1,16 ± 0,12 *	0,99 ± 0,35 *
S296A	0,92 ± 0,11 *	0,82 ± 0,30 *
S296E	0,88 ± 0,08 *	0,82 ± 0,31 *
F298E	0,83 ± 0,12 *	0,94 ± 0,31 *
delVert1	0,71 ± 0,10 *	3,48 ± 2,38 *
delVert2	0,77 ± 0,07 *	1,08 ± 0,39 *
delVert1,2	0,78 ± 0,11 *	1,26 ± 0,59 *

Tabelle 8-3: Durchschnittswerte der N/C-Ratio und der Nu/N-Ratio von wildtyp IP5K und ausgewählten Enzymmutanten. Wildtyp IP5K und die Enzymmutanten: Pseudophosphorylierungsmutanten S271/273A, S271/273E, S282A, S282E, S296A, S296E, F298E sowie die Deletionsmutanten ohne Vertebrateninsertion delVert1 = Δ202-297, delVert2 = Δ335-389, delVert1,2 = Δ202-297/ Δ335-389 wurden 24h in H1299 Zellen überexprimiert und dann fotografiert. Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die N/C- und Nu/N Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); N=jeweils 100, * = signifikant (p<0,05), n.s.= nicht signifikant

N/C	H1299
Wt	1,28 ± 0,31
TS3	0,75 ± 0,30 *
MK1	0,62 ± 0,27 *
MK2	0,62 ± 0,28 *
HsIPMK-NLS (+-Probe)	1,87 ± 0,68 *(Fotos von Y. Lin)
HsIP3K B ΔABD (--Probe)	0,62 ± 0,29 * (Wert von O. Ernst)

Tabelle 8-4: Durchschnittswerte der N/C-Ratio von wildtyp IP5K und ausgewählten Enzymmutanten, an denen verschiedene NLS-Domänen nach Expression in H1299 Zellen überprüft wurden. Wildtyp IP5K (wt) und die Enzymmutanten: TS3 = H152/H156/C159/C162 → A; MK1 = H152/H156/C159/C162/K155/157 → A; MK2 = H152/H156/C159/C162/K155/157/K173/175/179 → A; sowie die Konstrukte HsIPMK-NLS = EGFP, an das das isolierte NLS der HsIPMK angehängt wurde, und HsIP3K B ΔABD, welches ein Fusionsprotein aus EGFP und HsIPMK mit deletierter Aktinbindungsdomäne darstellt. Alle diese Proteine wurden 24h in H1299 Zellen überexprimiert und dann fotografiert. Die EGFP-Fluoreszenzintensität wurde mittels ImageJ in Kern, Zytoplasma und Nukleoli bestimmt und die N/C- und Nu/N-Ratio berechnet (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.5); N = 100, * = signifikant (p<0,05)

Abkürzungsverzeichnis

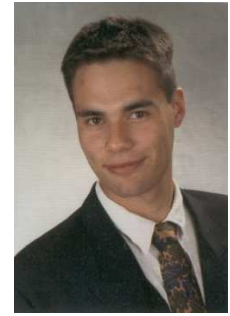
3D	3-dimensional
A	Adenosin
Aa	amino acid
ABD	Aktinbindungsdomäne
ABP	Aktin bindendes Protein
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalziumionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DAG	Diazylglyzerol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

Ins(1,4,5)P ₃	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat
Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
InsP	Inositolphosphat
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat
InsP ₆	Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat
IP3K	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
IP3K-A	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform A
IP3K-B	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform B
IP3K-C	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase Isoform C
IP5K	Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat 2-Kinase
IP6K	Inositolhexakisphosphatkinase
IPMK	Inositolphosphatmultikinase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
m	Meter
M	molar
μ	mikro
MCS	multiple cloning site
MDa	Megadalton
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano
NES	Kernexportsignal (nuclear export signal)
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end-joining)
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization sequence)
NPC	Kernporenkomplex (nuclear pore complex)
nM	nanomolar
PABP	poly(A) bindendes Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pdt	Phosphatidyl-

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

Lebenslauf

Persönliches



Name: Mario Kobras, geb. 23.08.1981 in Gießen

Familienstand: verheiratet

Adresse: Rosengarten 3, 22880 Wedel
(0 41 03) 8 03 02 76

Familie: Ehefrau Kerstin Kobras,
geb. Scheele,
Medizinische Fachangestellte
Mutter Mariam Kobras,
geb. Roushdy,
Schriftstellerin
Vater Karlheinz Kobras,
Dipl.-Physiker,
Lehrer an der Theodor-Storm-Schule Wedel und Dozent
an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften in
Hamburg (HAW)
Bruder Louis Kobras
Schüler

Berufliche Laufbahn

Seit dem 1. Juli 2010 Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin am
Regioklinikum Wedel,
Stationäre Versorgung, Notaufnahme,
Funktionsdiagnostik
Chefarzt Dr. med. Christian Grau

Ärztliche Fortbildungen

Mai 2011 Abdomen-Sonographie-Grundkurs DEGUM
Prof. Dr. med. Herbay, Herzogin-Elisabeth-Krankenhaus,
Braunschweig
Mai 2011 Grundlagen Manchester Triage System in der Zentralen
Notaufnahme

Schulische Laufbahn

Sommer bis Winter 1988: Goethe-Grundschule, Gießen
Winter 1988 bis 1992: Albert-Schweitzer-Grundschule, Wedel
1992 bis 2002: Johann-Rist-Gymnasium, Wedel, Abitur (1,7)

Studium

WS 2003/2004	Aufnahme des Studiums der Medizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)
März 2006	Absolvieren des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung nach der ÄAppO von 2002
März 2007	Verleihung der „Zusatzqualifikation – Grundlagen der Molekularen und Experimentellen Medizin“ durch das Prodekanat für Lehre des Fachbereichs Medizin
Juni 2010	Absolvieren des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung nach der ÄAppO von 2002 und Approbation

Famulaturen

Juli/August 2007	Pädiatrie Gemeinschaftspraxis Rosengarten, Dres. med. Klaus Nissen, Georg Alfers, Alexander Konietzky, Rosengarten 5, 22880 Wedel
Januar 2008	Orthopädie Dr. med. Joachim Decker Bahnhofstraße 36a, 22880 Wedel
August/Sept 08	Klinische Orthopädie/Unfallchirurgie Facharztambulanz Hamburg (Michaelis), Dr. med. Ralf Theermann Martinistraße 78, 20251 Hamburg

Praktisches Jahr

1. Tertial	Innere Medizin – Regio Klinik Wedel in der Abteilung Innere Medizin/Rheumatologie/Immunologie, Chefarzt: Dr. med. Keihan Ahmadi-Simab
2. Tertial	Chirurgie – Asklepios Klinikum Hamburg-Altona in den Abteilungen: Gefäß- und Thoraxchirurgie Chefarzt: Prof. Dr. med. Helmut Kortmann Unfallchirurgie Chefarzt: Prof. Dr. med. Jürgen Volker Wening Allgemeine Chirurgie Chefarzt: Prof. Dr. med. Wolfgang Schwenk
3. Tertial	Wahlfach Anästhesie und Intensivmedizin – Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Chefarzt: Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz

Veröffentlichung

Brehm MA, Schenk TM, Zhou X, Fanick , Lin H, Windhorst S, Nalaskowski MM, **Kobras M**, Shears SB, Mayr GW. Intracellular localization of human Ins(1,3,4,5,6)P5 2-Kinase, Biochem J. 2007 Dec 15;408(3):335-45

Wedel, 30. November 2011

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: