

Institut für Biochemie und Molekularbiologie I:
Zelluläre Signaltransduktion
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Multifunktionelle Proteine
im Inositolphosphat-Metabolismus**

Dissertation

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

vorgelegt von
Marcus M. Nalaskowski

Hamburg 2003

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Georg W. Mayr angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Marquardt
2. Gutachter: Prof. Dr. G.W. Mayr

Tag der Disputation: 19.12.2003

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Prinzipien der zellulären Signaltransduktion	1
1.1.1 Phosphatidylinositole und Inositolphosphate in der zellulären Signaltransduktion.....	1
1.1.2 Die Rolle von Inositolphosphaten im zellulären Calcium-Haushalt.....	3
1.2 Inositolphosphat-Kinasen als zentrale Enzyme des Inositolphosphat-Stoffwechsels	4
1.2.1 Familie der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinasen.....	5
1.2.2 Inositolphosphat-Multikinasen.....	7
1.3 Nukleozytoplasmatischer Transport	12
1.3.1 Nukleärer Import	13
1.3.2 Nukleärer Export	15
1.3.3 Nukleozytoplasmatisches Shuttling.....	17
1.4 Zielsetzung	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Material	20
2.1.1 Bakterienstämme	20
2.1.2 Zelllinien.....	20
2.1.2.1 NRK 52E-Zellen	20
2.1.2.2 PC12-Zellen	20
2.1.3 Enzyme.....	20
2.1.4 Chemikalien.....	21
2.1.5 DNA-Molekulargewichtsstandard.....	21
2.1.6 Kits.....	21
2.1.7 Plasmide.....	21
2.1.8 Medien für eukaryotische Zellkultur	21
2.1.9 Oligonukleotide.....	22
2.2 Methoden	27
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	27
2.2.1.1 Mikrobiologische Arbeitstechniken	27
2.2.1.2 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> Kulturen.....	27
2.2.1.3 Herstellung transformationskompetenter Zellen	28
2.2.1.4 Transformation von <i>E. coli</i> nach [Hanahan D 1983].....	29
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA („Mini-Präparation“)	30
2.2.2.2 DNA-Fällung mit Ethanol	31

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA	31
2.2.2.4 DNA-Sequenzierung	32
2.2.2.5 Analytische und präparative Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	33
2.2.2.6 Analytische und präparative Auftrennung von DNA in Agarosegelen	33
2.2.2.7 Elution von DNA aus Agarosegelen	34
2.2.2.8 A-Tailing von PCR-Produkten	34
2.2.2.9 Ligation von Doppelstrang-DNA-Fragmenten.....	35
2.2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion mit Plasmid-DNA als Template	36
2.2.2.11 QuikChange-Mutagenese	37
2.2.2.12 Erweiterte QuikChange-Mutagenese [Wang et al., 1999].....	39
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	40
2.2.3.1 Zellbiologische Arbeitstechniken.....	40
2.2.3.2 Kontinuierliche Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	40
2.2.3.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen und Fluoreszenzmikroskopie.....	41
3 ERGEBNISSE.....	43
3.1 Zielsteuerung und <i>in vivo</i> Lokalisation der humanen Inositolphosphat Multikinase (HsIPMK).....	43
3.1.1 Klonierung einer für die humane Inositolphosphat Multikinase kodierenden cDNA	43
3.1.2 Vektoren zur eukaryotischen Expression von GFP-Fusionsproteinen der HsIPMK.....	47
3.1.2.1 Vektor für die eukaryotische Expression eines HsIPMK-Fusionsproteins mit GFP-Tag am N-Terminus	47
3.1.2.2 Vektor für die eukaryotische Expression eines HsIPMK-Fusionsproteins mit GFP-Tag am C-Terminus	50
3.1.3 Vektoren zur eukaryotischen Expression von GFP-Fusionsproteinderivaten der HsIPMK.....	53
3.1.3.1 Vektoren für die eukaryotische Expression von Fragmenten der HsIPMK mit GFP-Tag.....	54
3.1.3.2 Vektoren für die eukaryotische Expression von Deletionsmutanten der HsIPMK mit GFP-Tag	56
3.1.3.3 Vektoren für die eukaryotische Expression von Substitutionsmutanten der HsIPMK mit GFP-Tag	57
3.1.4 <i>in vivo</i> Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Volllängen HsIPMK	59
3.1.5 <i>in vivo</i> Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen von Fragmenten und Mutanten der HsIPMK	63
3.1.5.1 <i>in vivo</i> Lokalisation von Fragmenten der HsIPMK mit GFP-Tag.....	63
3.1.5.2 <i>in vivo</i> Lokalisation von Deletionsmutanten der HsIPMK mit GFP-Tag.....	65
3.1.5.3 <i>in vivo</i> Lokalisation von Substitutionsmutanten der HsIPMK mit GFP-Tag	66
3.2 Nukleozytoplasmatischen Shuttling und <i>in vivo</i> Lokalisation der Inositol (1,4,5,-)trisphosphat 3-Kinase C (IP3K-C) aus Mensch und Ratte.....	68
3.2.1 Analyse der für die Inositol (1,4,5,-)trisphosphat 3-Kinase C kodierenden cDNAs aus Mensch und Ratte	68
3.2.2 Vektoren zur eukaryotischen Expression von GFP-Fusionsproteinen der IP3K-C aus Mensch und Ratte.....	72
3.2.2.1 Vektoren für die eukaryotische Expression von Fusionsproteinen der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit N-terminalem GFP-Tag	72
3.2.2.2 Vektoren für die eukaryotische Expression von Fusionsproteinen der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit C-terminalem GFP-Tag.....	74

3.2.3 Vektoren zur eukaryotischen Expression von GFP-Fusionsproteinderivaten der IP3K-C aus Mensch und Ratte	76
3.2.3.1 Vektoren für die eukaryotische Expression der N-terminalen Domäne der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit GFP-Tag	77
3.2.3.2 Vektoren für die eukaryotische Expression von Deletionsmutanten, von Substitutionsmutanten und von einem kurzen Fragment der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit GFP-Tag	79
3.2.4 Nukleozytoplasmatisches Shuttling der IP3K-C aus Mensch und Ratte..	80
3.2.4.1 <i>in vivo</i> Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Vollängen IP3K-C aus Mensch und Ratte	81
3.2.4.2 <i>in vivo</i> Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Vollängen IP3K-C aus Mensch und Ratte bei Behandlung mit dem Exportinhibitor Leptomycin B	84
3.2.4.3 <i>in vivo</i> Lokalisation der N-terminalen Domäne der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit GFP-Tag ...	84
3.2.4.4 <i>in vivo</i> Lokalisation von Deletions- und Substitutionsmutanten der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit GFP-Tag.....	88
 4 DISKUSSION	91
 4.1 Das multifunktionale Hefeprotein ArgRIII und homologe Proteine in Tieren und Pflanzen.....	91
4.1.1 Inositolphosphat Multikinasen aus Tieren und Pflanzen sind zum Hefeprotein ArgRIII homologe Proteine	91
4.1.1.1 Expressionsmuster der Inositolphosphat Multikinase in verschiedenen Geweben von Ratte und Mensch.....	93
4.1.1.2 Enzymatische Aktivitäten der Inositolphosphat Multikinase aus Ratte und Mensch	94
4.1.2 Die nukleäre Zielsteuerung der humanen Inositolphosphat Multikinase .	97
 4.2 Funktional divergente Isoformen der Inositol (1,4,5)-triphosphat 3-Kinase in Tieren	101
4.2.1 Isoformen der Inositol (1,4,5)-triphosphat 3-Kinase in Vertebraten und Invertebraten	101
4.2.1.1 Expressionsmuster von Isoformen der Inositol (1,4,5)-triphosphat 3-Kinase in verschiedenen Geweben von Ratte und Mensch.....	102
4.2.1.2 Regulation der enzymatischen Aktivitäten von Isoformen der Inositol (1,4,5)-triphosphat 3-Kinase in Ratte und Mensch.....	104
4.2.2. Intrazelluläre Lokalisation und Zielsteuerung von Isoformen der Inositol (1,4,5)-triphosphat 3-Kinase	105
 5 ZUSAMMENFASSUNG	109
 6 LITERATUR.....	111
 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	120
 8 WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN	122
 9 DANKSAGUNG	123

1 Einleitung

1.1 Prinzipien der zellulären Signaltransduktion

Zur Koordination ihrer zellulären Aktivitäten benötigen vielzellige Organismen Signalübertragungssysteme. Die Signalübertragung erfolgt überwiegend über chemische Botenstoffe [Knippers, 2001; Michal, 1999]. Die einzelne Zelle steht nun vor der Aufgabe, die aus dem extrazellulären Bereich kommenden chemischen Botenstoffe zu erkennen und ihre Information ins Zellinnere zu den entsprechenden Effektorproteinen weiterzuleiten. In den allermeisten Fällen wird der chemische Botenstoff (z.B. Neurotransmitter, Hormone, Wachstumsfaktoren) durch Bindung an spezifische Transmembran-Rezeptorproteine erkannt. Eine Ausnahme stellen die intrazellulären Rezeptoren für Steroide, Thyroide und Retinsäure dar. Die extrazelluläre Bindung der Botenstoffe führt vermittelt durch den Transmembran-Bereich zu einer sterischen Umorientierung des intrazellulären Anteils des Rezeptors. Der Rezeptor aktiviert nun direkt oder über einen Transducer (z.B. heterotrimere G-Proteine) einen primären Effektor (z.B. Adenylat-Cyclase, Phospholipase C), welcher die Freisetzung eines sekundären Botenstoffs (Ca^{2+} , cAMP, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$) im Inneren der Zelle bewirkt. Durch diesen Mechanismus wird die aus dem extrazellulären Bereich kommende Information über die Plasmamembran in das Innere der Zelle übertragen, wobei die verschiedenen Schritte eine Modifikation oder Integration von Signalen ermöglichen. Der sekundäre Botenstoff aktiviert im Inneren der Zelle einen sekundären Effektor, der das durch den chemischen Botenstoff aus dem extrazellulären Bereich vermittelte Signal in eine zelluläre Antwort umsetzt.

1.1.1 Phosphatidylinositole und Inositolphosphate in der zellulären Signaltransduktion

Die Stimulierung von Zelloberflächenrezeptoren durch eine Vielzahl von Neurotransmittern, Hormonen und Wachstumsfaktoren führt zur Bildung des sekundären Botenstoffs $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und zur damit verbundenen Ca^{2+} -Freisetzung ins Zytoplasma. Eine bedeutende Rolle des freien Ca^{2+} in der Zelle wurde für die unterschiedlichsten zellulären Prozesse beschrieben, wie z.B. Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Muskelkontraktion, Sekretion und sensorischer Perzeption [Berridge, 1993; Abel et al., 2001; Berridge & Irvine 1989; Shears 1998; Michal, 1999].

Verschiedene chemische Botenstoffe können auf den intrazellulären Stoffwechsel der Phosphatidylinositole und Inositolphosphate einwirken (siehe Abbildung 1). Neurotransmitter (Adrenalin, Glutamat) und Hormone (Oxytocin, Vasopressin, Melatonin) binden hierbei an

Einleitung

Transmembran-Rezeptorproteine und bewirken über heterotrimere G-Proteine die Aktivierung von β -Isoformen der Phospholipase C. Diese Rezeptorproteine besitzen sieben Membran-durchspannende Helices und sind an ihrer zytosolischen Seite an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt. Die Bindung des Botenstoffs aktiviert eine Guanylnukleotid-Austausch-Faktor (GEF) Aktivität des Rezeptors, wodurch das durch die α -Untereinheit des G-Proteins gebundene Molekül GDP gegen ein Molekül GTP ausgetauscht wird. Dieser Austausch führt zum Zerfall des G-Proteins in α - und β/γ -Untereinheit. Diese binden an unterschiedliche β -Isoformen der Phospholipase C und führen zu deren Aktivierung. Die Phospholipase C besitzt eine GTPase-aktivierende-Protein (GAP) Aktivität und beschleunigt die Hydrolyse des GTP zu GDP durch die α -Untereinheit des G-Proteins. Die GDP-tragende, inaktive α -Untereinheit löst sich von der Phospholipase C und bildet mit den anderen Untereinheiten ein erneut aktivierbares, heterotrimeres G-Protein.

Im Gegensatz zur eben beschriebenen Form der Signaltransduktion binden Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF) an Rezeptortyrosinkinasen. Die Bindung des Botenstoffes führt zu einer Homodimerisierung der Rezeptoren, die eine Erhöhung der Kinaseaktivität durch Transphosphorylierung verursacht. Diese aktivierte Rezeptortyrosinkinase kann nun γ -Isoformen der Phospholipase C über deren SH2-Domänen (*src*-Homologie Region 2)

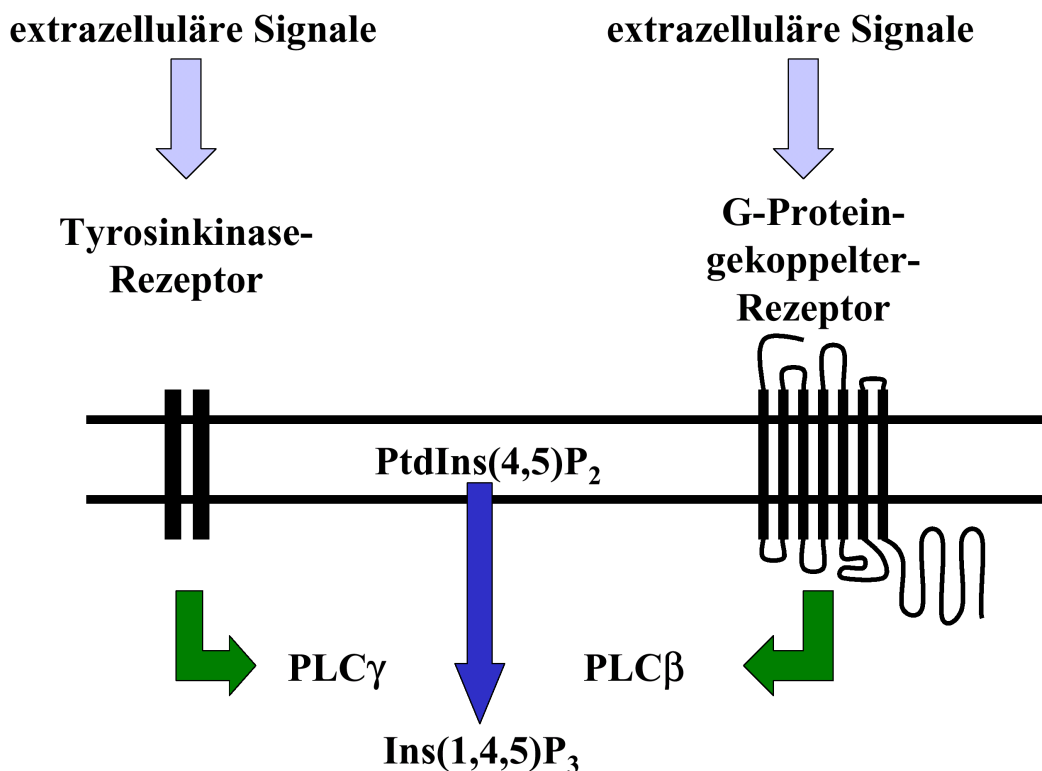


Abbildung 1: Intrazelluläre Bildung des Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffs $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

Extrazelluläre Signale bewirken entweder über an heterotrimere G-Proteine gekoppelte Rezeptoren oder über Transmembranrezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinaseaktivität die Aktivierung von PLC-Isoformen. Die hydrolytische Spaltung des Membranphospholipids $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ führt zur Bildung der Botenstoffe Diacylglycerol und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

binden und deren Aktivität durch Phosphorylierung stimulieren. Die aktivierte Phospholipase C spaltet das sich im inneren Blatt der Plasmamembran befindende Phosphatidylinositol $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ zu membranständigem Diacylglycerol und zu wasserlöslichem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Die intrazelluläre Calciumkonzentration kann durch die Bindung des sekundären Botenstoffs $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ an intrazelluläre, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -spezifische Ca^{2+} -Kanäle beeinflusst werden.

1.1.2 Die Rolle von Inositolphosphaten im zellulären Calcium-Haushalt

Calciumionen spielen in Säugetieren bei der Regulation von vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle [Clapham 1995; Michal, 1999]. Die Ca^{2+} -Konzentration ist im Zytoplasma aller eukaryotischen Zellen sehr gering (ca. 10^{-7} M), während sie extrazellulär und im glatten endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum (ER bzw. SR) über 10^{-3} M beträgt. Dieser Gradient wird durch einen $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ -Antiportmechanismus in der Zellmembran, wie auch durch Ca^{2+} -transportierende ATPasen in der Zellmembran und in der ER/SR-Membran von Nerven- und Muskelzellen aufrechterhalten. Es wurden zwei Isotypen von Ca^{2+} -Kanälen in der ER/SR-Membran von verschiedenen tierischen Organen beschrieben, die sich nach der Bindung der entsprechenden Signalmoleküle öffnen und Ca^{2+} in das Zytoplasma einströmen lassen. Dies sind neben den $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor- Ca^{2+} -Kanälen ($\text{IP}_3\text{R-Ca}^{2+}$ -Kanäle) die Ryanodinrezeptor- Ca^{2+} -Kanäle (RyR- Ca^{2+} -Kanäle). Die $\text{IP}_3\text{R-Ca}^{2+}$ -Kanäle befinden sich in der Membran des ER/SR und öffnen sich nach Bindung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ [Yoshida & Imai, 1997]. In Säugetieren sind drei Isotypen von $\text{IP}_3\text{R-Ca}^{2+}$ -Kanälen bekannt, die als Typ 1, Typ 2 und Typ 3 bezeichnet werden. Vom Typ 1 sind außerdem zwei unterschiedliche Spleißvarianten beschrieben worden. Die Untereinheiten der Kanäle sind glykosilierte Proteine mit Molekulargewichten zwischen 220-260 kDa und können in drei funktionelle Domänen gegliedert werden. Die N-terminale Domäne dient der Ligandenbindung, die mittlere Domäne hat modulatorische Funktionen und die C-terminale Domäne bildet den Ca^{2+} -Kanal aus. Die N-terminale und die mittlere Domäne liegen beide im Zytoplasma. Die C-terminale Domäne bildet acht Membran-durchspannende Subdomänen aus. Die mittlere Domäne dient der Übermittlung des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Bindungssignals von der N-terminalen Bindungsdomäne zur C-terminalen Ca^{2+} -Kanal-Domäne. Außerdem besitzt sie putative Bindungsstellen für verschiedene Modulatoren (z.B. für ATP, Ca^{2+} , Calmodulin) und putative Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen. Die Bindung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ bewirkt eine Öffnung des Kanals. Calciumionen strömen nun ihrem intrazellulären Gradienten folgend ins Zytoplasma ein.

1.2 Inositolphosphat-Kinasen als zentrale Enzyme des Inositolphosphat-Stoffwechsels

Der Stoffwechsel der Inositolphosphate ist unmittelbar mit dem Stoffwechsel der Phosphatidylinositole verbunden [Abel et al., 2001] (siehe Abbildung 2). Die Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ durch die Aktivität einer Phospholipase C führt zur Bildung der sekundären Botenstoffe Diacylglycerol und Ins(1,4,5)P₃. Außerdem ist das durch Dephosphorylierung des Ins(1,4,5)P₃ [Drayer et al., 1996] gebildete *myo*-Inositol Ausgangssubstrat für die erneute Bildung von Phosphatidylinositol, aus dem durch Phosphorylierungsreaktionen u.a. PtdIns(4,5)P₂ gebildet werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei zentrale Enzyme des Inositolphosphat-Stoffwechsels untersucht, nämlich eine Inositol (1,4,5)-triphosphat 3-Kinase und eine Inositolphosphat Multikinase.

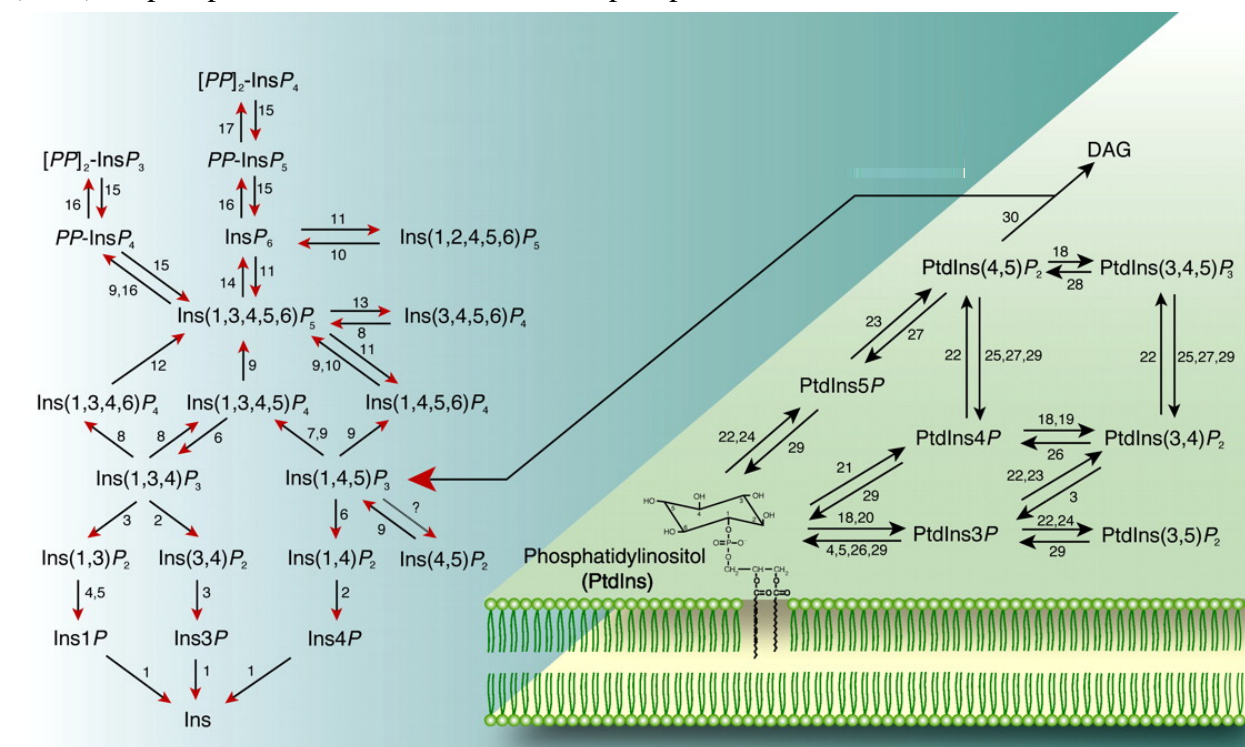


Abbildung 2: Stoffwechsel der Inositolphosphate und Phosphatidylinositole

Das sich im inneren Blatt der Plasmamembran befindende Phosphatidylinositol (PtdIns) und seine an unterschiedlichen Positionen phosphorylierten Derivate werden durch spezifische Kinasen und Phosphatasen ineinander umgewandelt. Das PtdIns(4,5)P₂ kann darüber hinaus durch die Aktivität einer Phospholipase C in Diacylglycerol und Ins(1,4,5)P₃ gespalten werden. Diacylglycerol verbleibt in der Plasmamembran, während der Ca²⁺-freisetzende, sekundäre Botenstoff Ins(1,4,5)P₃ wasserlöslich und folglich im Zytoplasma frei diffusibel ist. Das Ins(1,4,5)P₃ ist Ausgangssubstrat für ein Vielzahl von Inositolphosphaten, die durch spezifische Kinasen und Phosphatasen erzeugt werden. Durch eine vollständige Dephosphorylierung können die Inositolphosphate zum *myo*-Inositol abgebaut werden. Die Phosphorylierung führt bis hin zum vollständig phosphorylierten InsP₆ und darüber hinaus zu Pyrophosphatgruppen-tragenden Inositolphosphaten. (modifiziert nach [Abel et al., 2001])

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; 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; 29 Synaptojanin; 30 Phospholipase C;

1.2.1 Familie der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinasen

Die Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinasen (IP3K) katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe vom ATP auf die 3'-Hydroxylgruppe des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Durch diese Umsetzung wird der Ca^{2+} -freisetzende, sekundäre Botenstoff entfernt. Gleichzeitig wird der putative, sekundäre Botenstoff $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ gebildet [Cullen et al., 1990; Niinobe et al., 1994] und ein wichtiger Stoffwechselweg zu den höherphosphorylierten Inositolphosphaten eröffnet [Irvine & Schell, 2001; Fukuda & Mikoshiba, 1997]. Die Familie der IP3Ks hat drei bekannte Mitglieder, die nach der zeitlichen Reihenfolge ihrer Charakterisierung als Isoform A, B und C bezeichnet werden. Alle drei Isoformen katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe vom ATP auf die 3'-Hydroxylgruppe des sekundären Botenstoffes Inositol (1,4,5)-trisphosphat. Die Isoformen A und B sind schon seit längerem bekannt [Dewaste et al., 2000; Bertsch et al., 1999; Choi et al., 1990; D'Santos et al., 1994]. Vor kurzem wurden Vollängen-cDNAs aus Mensch und Ratte kloniert, die für die vorher unbekannte Isoform C kodieren. Die Vollängen-Form der IP3K-C aus Ratte wurde erstmalig von den Arbeitsgruppen von Prof. Schmale und Prof. Mayr identifiziert [Nalaskowski et al., 2003]. Eine Analyse der Nukleotidsequenz der neuartigen Isoform zeigte eine 62%-ige Ähnlichkeit zur Isoform A und eine 65%-ige Ähnlichkeit zur Isoform B der Ratte. Die cDNA kodiert für ein hypothetisches Protein von 678 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 74,5 kDa. Die vermutete Rolle des ersten Methionin-Restes als Start-Methionin wurde durch zwei „Im-Raster-Stoppkodons“ bestätigt. Die Vollängen-cDNA hat eine 5'-untranslatierte Region von 353bp und eine 3'-untranslatierte Region von 1146bp mit dem Polyadenylierungssignal AATAAA 18 Nukleotide upstream vom Poly-A-Schwanz. Die humane IP3K-C wurde von Prof. Erneux erstmalig beschrieben [Dewaste et al., 2000]. Es handelt sich um ein 683-Aminosäuren-Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 75,2 kDa. Aufgrund von Berichten über eine IP3K mit einem enzymatischem Verhalten, das von dem der zu diesem Zeitpunkt bereits bekannten Isoformen abwich [Takazawa et al., 1995], war das Vorhandensein einer dritten Isoform schon seit längerem vermutet worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die C-Isoform aus Mensch und Ratte eingehend untersucht.

Die Enzyme gliedern sich in drei funktionelle Bereiche (siehe Abbildung 3). Der C-terminale Bereich besitzt enzymatische Aktivität und wird deshalb auch als katalytische Domäne bezeichnet [Bertsch et al., 2000]. Die Ca^{2+} /Calmodulin Bindungsdomäne schließt N-terminal an die katalytische Domäne an. Beide Bereiche sind in ihrer Funktion und Sequenz zwischen den Isoformen stark konserviert [Dewaste et al., 2000]. Die N-terminale Domäne hingegen

ist bei jeder Isoform unterschiedlich und hat höchstwahrscheinlich Funktionen in der Regulation und Zielsteuerung. Bei der A-Isoform konnte eine Aktin-bindende Domäne im äußersten N-Terminus identifiziert werden [Schell et al., 2001]. Die unterschiedliche Länge des N-terminalen Bereichs ist ursächlich für die sehr divergenten Molekulargewichte der drei Isoformen. Beim Menschen ist die A-Isoform 51 kD, die B-Isoform 102 kD und die C-Isoform 75 kD groß. Die drei Isoformen unterscheiden sich auch in ihrer Sensitivität für Ca^{2+} /Calmodulin, in ihrem Expressionsmuster und ihrer intrazellulären Lokalisation. Durch Ca^{2+} /Calmodulin wird die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit der A-Isoform um das 2- bis 3-fache und die der B-Isoform um das 20-fache erhöht. Die humane C-Isoform wird in ihrer Aktivität durch Ca^{2+} /Calmodulin nicht beeinflusst, aber durch Ca^{2+} allein gehemmt [Dewaste et al., 2000]. Die Expression der drei Isoformen wurde auf Ebene der mRNA mittels Northernblot-Studien untersucht. Die A-Isoform wird spezifisch in Hoden und Gehirn exprimiert [VanWeyenberg et al., 1995]. Die beiden anderen Isoformen wurden beinahe ubiquitär nachgewiesen. Die B-Isoform wurde in Geweben von Lunge, Thymus, Hoden, Gehirn und Herz, jedoch nicht von Milz, Leber, Niere und Darm gefunden [VanWeyenberg et al., 1995, Dewaste et al., 2002]. Die Expression der C-Isoform wurde in Pankreas, Niere, Skelettmuskel, Leber, Lunge, Placenta, Gehirn und Herz gezeigt [Dewaste et al., 2000]. Die A-Isoform wird durch eine N-terminale Aktin-Bindungsdomäne an F-Aktin in dendritischen Dornen von Nervenzellen zielgesteuert [Schell et al., 2001], während die B-Isoform zytosolisch und an die erweiterte ER-Membran gebunden vorliegt [Soriano et al., 1997]. Das Lokalisationsverhalten der C-Isoform wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

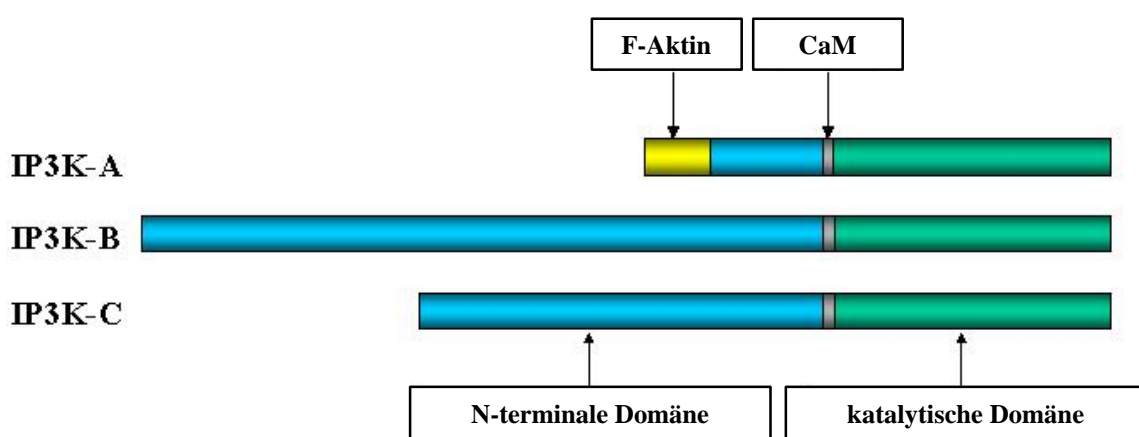


Abbildung 3: Modularer Aufbau der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase Isoformen

Die drei bekannten Isoformen der IP3K (genannt A,B,C) bestehen aus jeweils drei funktionalen Einheiten. Die C-terminal gelegene katalytische Domäne (grün) und die N-terminal an sie anschließende Ca^{2+} /Calmodulin-Bindungsdomäne (grau) sind zwischen den Isoformen hoch konserviert. Die N-terminalen Domänen (gelb/blau) der drei Isoformen unterscheiden sich deutlich in Länge und Aminosäuresequenz und haben wahrscheinlich Aufgaben in der Regulation und Zielsteuerung. Im äußersten N-terminal gelegenen Bereich der A-Isoform wurde eine F-Aktin-Bindungsdomäne (gelb) charakterisiert.

1.2.2 Inositolphosphat-Multikinasen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine humane Inositolphosphat Multikinasen beschrieben und charakterisiert. Das homologe Hefeprotein ArgRIII ist schon seit längerem bekannt und seine drei unterschiedlichen Funktionen sind gut untersucht. Es ist eine Inositolphosphat Multikinasen, deren Bedeutung für den Inositolphosphat-Stoffwechsel der Hefezelle *in vitro* und *in vivo* demonstriert wurde. Außerdem ist es ein Transkriptionsregulator im Arginin-Metabolismus und steuert die metabolische Antwort auf das Vorhandensein der freien Aminosäure Arginin im Nährmedium. Darüber hinausgehend ist ArgRIII ein wichtiger Faktor beim mRNA-Export aus dem Kern der Hefezelle [Shears, 2000]. Die Identifizierung und Charakterisierung eines ArgRIII-homologen Proteins aus Mensch wird in dieser Arbeit beschrieben.

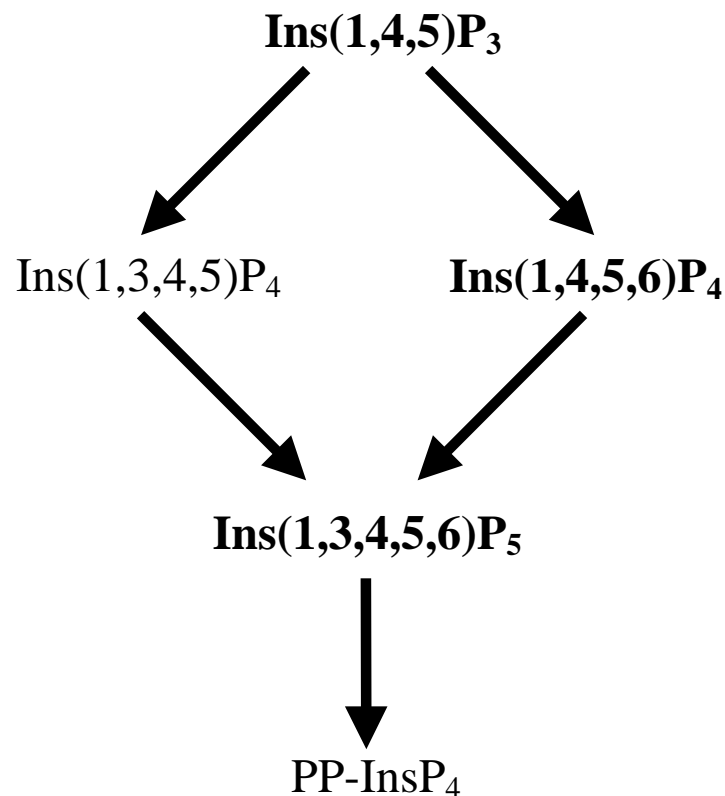


Abbildung 4: Inositolphosphat Multikinasen Aktivitäten von ArgRIII *in vitro*

Das Hefeprotein ArgRIII wurde bakteriell exprimiert und seine enzymatischen Aktivitäten wurden *in vitro* untersucht. Die Hauptaktivitäten sind eine Ins(1,4,5)P₃ 6-Kinase- und eine Ins(1,4,5,6)P₄ 3-Kinase-Aktivität, die Ins(1,4,5)P₃ über Ins(1,4,5,6)P₄ zum Ins(1,3,4,5,6)P₅ umsetzen (Substrate und Produkte sind im Schema durch Fettdruck hervorgehoben). Daneben konnte auch eine Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase- und eine Ins(1,3,4,5)P₄ 6-Kinase-Aktivität beobachtet werden. Dieser Reaktionsweg unterscheidet sich von dem eben beschriebenen nur durch das InsP₄-Isomer Ins(1,3,4,5)P₄ als Zwischenprodukt. Die Ins(1,3,4,5)P₄ 6-Kinase-Aktivität ist wie die Umsetzung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ durch ArgRIII zur einem Inositolphosphat mit einer Pyrophosphat-Gruppe (PP-InsP₄) nicht gesichert. [Saiardi et al., 1999; Odom et al., 2000; Zhang et al., 2001]

Die Inositolphosphat-Multikinase-Aktivität von ArgRIII wurde ursprünglich *in vitro* an bakteriell exprimiertem Enzym charakterisiert (siehe Abbildung 4) [Saiardi et al., 1999; Odom et al., 2000; Zhang et al., 2001]. Offensichtlich katalysiert ArgRIII die Übertragung von einem Phosphatrest des ATP auf unterschiedliche Hydroxylgruppen von verschiedenen Inositolphosphat-Isomeren. ArgRIII ist zudem in der Lage den sekundären Botenstoff $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ an Position 3 oder Position 6 zu phosphorylieren, wobei das Produkt der Phosphorylierung an Position 6 in höheren Konzentrationen vorliegt. Die beiden entstehenden InsP_4 -Isomere ($\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$) sind ebenfalls Substrate für ArgRIII und werden weiter zum $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ umgesetzt. Außerdem wurde auch eine Umsetzung des InsP_5 -Isomers zu dem pyrophosphorylierten Inositolphosphat PP-InsP_4 beschrieben.

Diese Daten wurden ergänzt durch *in vivo* Untersuchungen der Inositolphosphat-Profile von Wildtyp- und ArgRIII-Deletions-Stämmen der Bäckerhefe (siehe Abbildung 5) [Saiardi et al., 2000]. Der Deletionsstamm zeigt eine stark erhöhte Konzentration von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und von einem InsP_2 -Isomer. Offensichtlich spielt ArgRIII *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und sein Fehlen führt zu einer starken Anreicherung des Metaboliten. Der Konzentrationserhöhung wirkt die Hefezelle anscheinend durch eine verstärkte Dephosphorylierung entgegen, die zur Bildung des beobachteten InsP_2 -Isomers führt. Die Konzentrationen der *in vitro* durch ArgRIII gebildeten InsP_4 -Isomere zeigen bei den *in vivo* Untersuchungen ein uneinheitliches Bild. Das Isomer $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ konnte nur im Wildtyp-, jedoch nicht im Deletionsstamm nachgewiesen werden. Offensichtlich kann dieses Isomer in der Hefezelle nur ArgRIII-abhängig gebildet werden. Im Gegensatz dazu wird das Isomer $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ nur im Deletionsstamm gefunden, aber nicht in der Wildtyp-Hefe. Ganz eindeutig wird dieses InsP_4 -Isomer in der Hefezelle durch einen ArgRIII-unabhängigen Stoffwechselweg gebildet. Ein ähnlich überraschender Effekt ist die deutliche Erhöhung der Konzentration von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ im Deletionsstamm. Dieses Isomer wird in der Hefezelle offensichtlich ArgRIII-unabhängig gebildet, obwohl *in vitro* die Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ durch ArgRIII zu diesem Isomer beobachtet wurde. Im Deletionsstamm ist außerdem die Konzentration von InsP_6 stark und von zwei pyrophosphorylierten Inositolphosphat-Isomeren deutlich erniedrigt. Offensichtlich eröffnet die enzymatische Aktivität von ArgRIII wichtige Stoffwechselwege zum vollständig phosphorylierten InsP_6 und zu verschiedenen Inositolphosphat-Isomeren, die Pyrophosphat-Gruppen tragen. Die beschriebenen *in vitro* Untersuchungen demonstrieren mindestens vier Inositolphosphat-Kinaseaktivitäten von ArgRIII. Aufgrund von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase-, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 6-Kinase-, $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ 6-Kinase- und $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ 3-Kinase-Aktivität trägt

ArgRIII die Bezeichnung Multikinase zurecht. Die Studien zum Inositolphosphat-Profil des Deletionsstamms zeigen die *in vivo* Bedeutung von ArgRIII für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der verschiedenen Inositolphosphate Isomere in der Hefezelle.

Vier im Zellkern lokalisierte Proteine (ArgRI, ArgRII, ArgRIII, Mcm1) sind an der Steuerung des Arginin-Stoffwechsels in der Hefezelle beteiligt (siehe Abbildung 6) [El Bakkoury et al., 2000]. Die Transkriptionsfaktoren ArgRI, ArgRII und Mcm1 wechselwirken miteinander und bilden zusammen den ArgR/Mcm1-Transkriptionskomplex. ArgRIII ist kein unmittelbarer Bestandteil des Komplexes, sondern wechselwirkt als Transkriptionsregulator mit ArgRI und Mcm1 und verhindert dadurch deren proteolytischen Abbau. So wird der Komplex stabilisiert und kann seine regulative Rolle in der Transkriptionskontrolle ausüben [El Bakkoury et al., 2000]. Bei ausreichender Versorgung der Hefezelle mit freiem Arginin durch das Nährmedium gelangt dieses nach der Aufnahme in das Zellinnere aufgrund seiner niedermolekularen Größe durch passive Diffusion über den Kernporenkomplex in den Zellkern. ArgRII ist ein Bestandteil des nukleären ArgR/Mcm1-Komplexes und hat u.a. die Funktion eines Arginin-Sensors [Amar et al., 2000]. In Anwesenheit von Arginin bindet dieses an ArgRII und verursacht eine sterische Umorientierung des Transkriptionskomplexes. Dieser wird in die Lage versetzt, bestimmte DNA-Motive (Arg-Boxen) in den Promotoren von Genen zu binden, die eine wichtige Funktion im Arginin-Metabolismus der Hefezelle

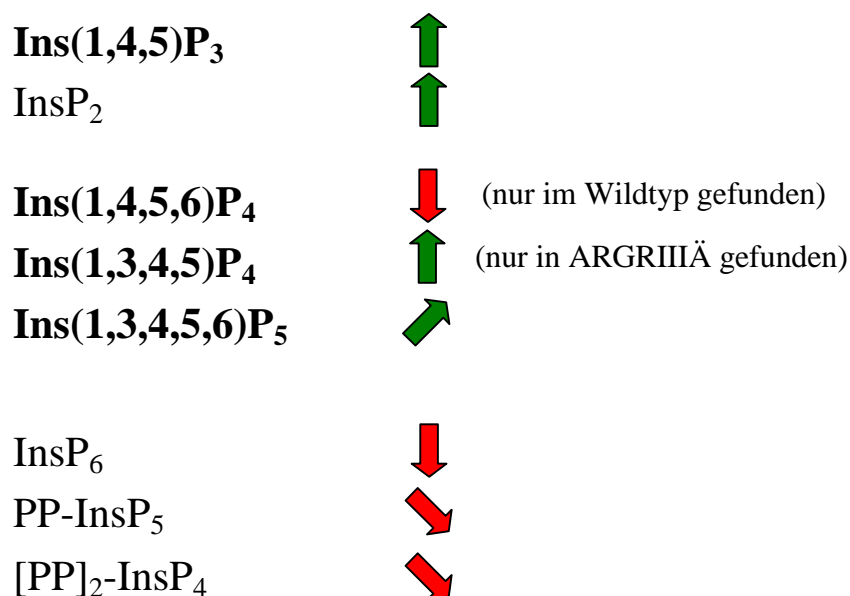


Abbildung 5: Inositolphosphat Multikinase Aktivitäten von ArgRIII *in vivo*

Das Inositolphosphat Profil eines ArgRIII-Deletionsstamms der Bäckerhefe wurde mit dem eines Wildtyp-Stamms verglichen. Deutliche bzw. starke Veränderung (Anstieg: grün; Abfall: rot) der Konzentration von verschiedenen Inositolphosphaten im Deletionsstamm sind mit entsprechenden Pfeilen dargestellt. Die bei den *in vitro* Studien gefundenen Substrate und Produkte von ArgRIII sind durch Fettdruck hervorgehoben. [Saiardi et al., 2000]

haben. Durch diese Interaktion wird die Expression von katabolen Genen induziert und die von anabolen Genen reprimiert [El Bakkoury et al., 2000]. Der Transkriptionsregulator ArgRIII stabilisiert somit einen Komplex von Transkriptionsfaktoren, der maßgeblich die metabolische Antwort auf das Vorhandensein von freiem Arginin im Nährmedium steuert.

Eine weitere wichtige Funktion von ArgRIII ist die Regulation des nukleären mRNA Exports [Saiardi et al., 2000; York et al., 1999]. Die im Zellkern gebildete mRNA wird aktiv über den Kernporenkomplex ins Zytoplasma transportiert, um dort an den Ribosomen translatiert zu werden. Bei Untersuchungen der intrazellulären mRNA-Verteilung zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp- und ArgRIII-Deletionshefen [Saiardi et al., 2000]. Bei dem Wildtyp-Stamm ist die mRNA gleichmäßig zwischen Zellkern und Zytoplasma verteilt. Die mRNA wurde offensichtlich nach ihrer Bildung im Zellkern wie vorgesehen ins Zytoplasma transportiert. Im Deletionsstamm ist die mRNA hingegen fast ausschließlich im Zellkern zu finden. Der nukleäre mRNA Export wird offensichtlich gestört durch das Fehlen von ArgRIII. York et al. konnten zeigen, dass ArgRIII zu einem nukleären Inositolphosphat-Stoffwechselweg der Hefe gehört [York et al., 1999]. Nukleäres PtdIns(4,5)P₂ wird durch eine

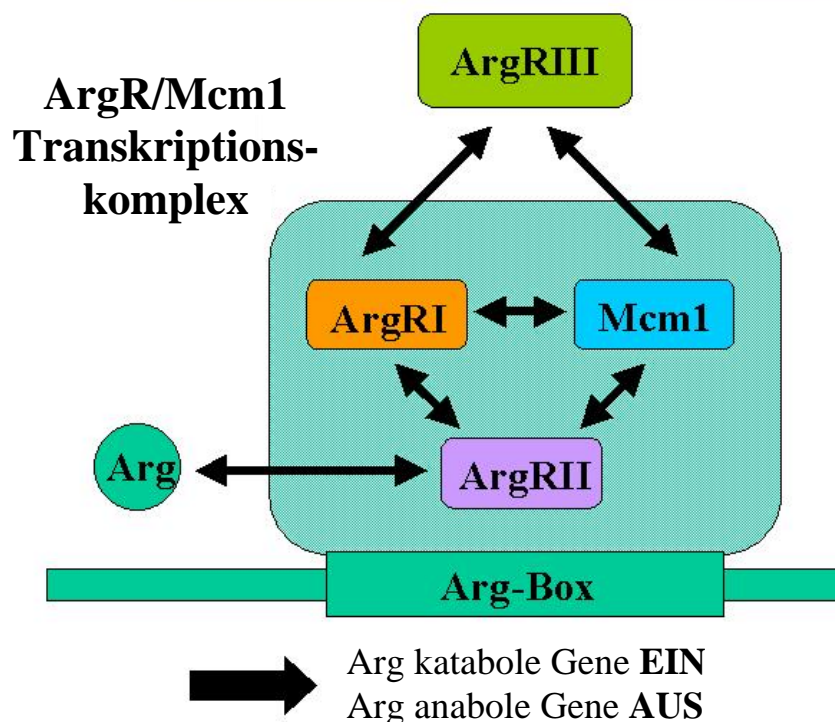


Abbildung 6: ArgRIII als Transkriptionsregulator im Arginin-Metabolismus

Die schematische Zusammenfassung zeigt die Veränderungen der Transkriptionsprozesse im Kern der Hefe, die zu einer metabolischen Antwort auf die Anwesenheit der freien Aminosäure Arginin führen. Die drei Transkriptionsfaktoren ArgRI, ArgRII und Mcm1 bilden den Transkriptionskomplex ArgR/Mcm1. ArgRII ist der Argininsensor des Komplexes und führt nach Bindung von Arginin zu einer sterischen Umorientierung und ermöglicht so die Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen (Arg-Boxen) in den Promotoren von Genen, die für Enzyme des Arginin-Stoffwechsels codieren. Nur in Anwesenheit des Transkriptionsregulators ArgRIII ist dieser Transkriptionskomplex stabil, weil seine Bestandteile ArgRI und Mcm1 durch direkte Interaktion mit ArgRIII vor Abbauprozessen geschützt werden. [El Bakkoury et al., 2000; Amar et al., 2000]

Einleitung

kernständige Phospholipase C gespalten. Das hierbei entstehende $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wird im Kern durch ArgRIII zum $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ und dann durch eine am Kernporenkomplex lokalisierte $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ 2-Kinase zu InsP_6 umgesetzt. Eine Störung an einer beliebigen Stelle von diesem Stoffwechselweg führt zu einem verminderten mRNA-Export. Offensichtlich ist die Bildung von InsP_6 oder eines davon abgeleiteten Metaboliten notwendig für einen effizienten Export der mRNA aus dem Kern. In diesem für den nukleären mRNA Export notwendigen Stoffwechselweg ist ArgRIII offensichtlich ein wichtiger Faktor.

1.3 Nukleozytoplasmatischer Transport

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die C-Isoform der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase einem nukleozytoplasmatischen Shuttle unterliegt. Dieser aktive Transport wird durch eine nicht-klassische Kern-Lokalisation-Aktivität und ein Leucinreiches Kernexport-Signal in der N-terminalen Domäne des Proteins vermittelt. Die Mechanismen des nukleären Imports von Proteinen sind seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung, wohingegen der nukleäre Export vor allem in den letzten Jahren sehr intensiv untersucht wurde [Gorlich & Mattaj, 1996; Nigg, 1997].

In eukaryotischen Zellen bilden Kern und Zytoplasma separate Kompartimente, die durch die Kernhülle voneinander getrennt werden [Gorlich & Kutay, 1999; Gama-Carvalho & Carmo-Fonseca, 2001]. Die Doppelmembran der Kernhülle bildet ein Kontinuum mit dem Endoplasmatischen Retikulum und wird von Kernporenkomplexen durchdrungen, die einen Austausch von Makromolekülen ermöglichen. Nukleozytoplasmatischer Transport ist eine Notwendigkeit für die Zelle, da z.B. alle nukleären Proteine, wie Histone und Transkriptionsfaktoren nach ihrer Bildung an im Zytoplasma lokalisierten Ribosomen zu ihrem Wirkort im Zellkern transportiert werden müssen [Gorlich & Kutay, 1999]. Ein anderes Beispiel sind die verschiedenen, im Kern gebildeten RNA-Typen (Transport-RNA, ribosomale RNA, Boten-RNA), die durch die Kernhülle zu ihrem Wirkort im Zytoplasma transportiert werden müssen. Sehr aufschlußreich ist auch die Biogenese der Ribosomen, die zuerst den nukleären Import der ribosomalen Proteine und dann nach der Assemblierung im Nukleolus mit den ribosomalen RNAs den nukleären Export der Ribosomen-Untereinheiten erfordert.

Der nukleozytoplasmatische Austausch erfordert eine energetische Aktivität der eukaryotischen Zelle. Dies zeigt sich u.a. an der Beteiligung von mehreren hundert verschiedenen Proteinen [Gorlich & Kutay, 1999]. Die Bildung eines nukleären Kompartiments bietet aber auch klare Vorteile, die den Eukaryoten wahrscheinlich die Bildung von komplexen multizellulären Organismen erst ermöglicht hat. Ein spezialisiertes Organell erhöht die genetische Stabilität und ermöglicht die Handhabung von größeren Mengen genetischer Information. Außerdem kann die Regulation der Genexpression zusätzlich durch die Kontrolle des Zugangs von regulatorischen Elementen (z.B. Transkriptionsfaktoren) zum Kern gesteuert werden. Die räumliche Trennung von Transkription und Translation ermöglicht erst den modularen Aufbau von Genen aus Exons und Introns. Ausschließlich die reife mRNA gelangt ins Zytoplasma und wird an den Ribosomen translatiert, während die Introns enthaltende prä-mRNA sich im Kern befindet.

Hierdurch wird die auf jeden Fall unnütze, wahrscheinlich sogar schädliche Translation von unreifer mRNA verhindert.

1.3.1 Nukleärer Import

Der am besten charakterisierte Mechanismus für den nukleären Import von Proteinen ist der klassische Kernlokalisierungssignal (NLS) abhängige Weg (siehe Abbildung 7) [Gorlich & Kutay, 1999]. Hervorzuheben an diesem Transportmechanismus ist die Einbeziehung von Adaptorproteinen. Das zu transportierende Protein ist gekennzeichnet durch ein bestimmtes Motiv in der Aminosäuresequenz, das NLS genannt wird (siehe Abbildung 8). Die meisten dieser Signale stellen kurze Bereiche in der Primärstruktur dar, die reich an basischen Aminosäuren (Lysine, Arginine) sind. Am besten bekannt sind das monopartite und das bipartite NLS [Fontes et al., 2000], für die auch Konsensus-Sequenzen erstellt wurden. Das monopartite NLS besteht aus einem einzelnen basischen Cluster, wohingegen im bipartiten NLS zwei solcher Cluster durch eine Linkersequenz aus beliebigen Aminosäuren getrennt sind. Nach der Biogenese eines NLS-tragenden Proteins an den Ribosomen im Zytoplasma ist

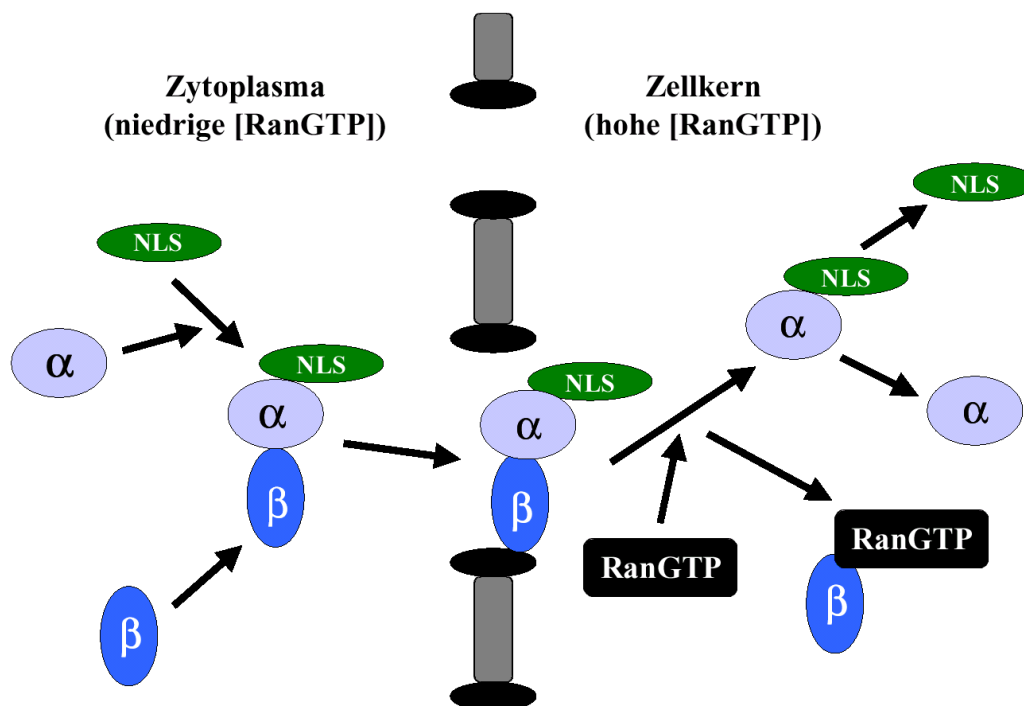


Abbildung 7: Nukleärer Import von Proteinen mit Kernlokalisierungssignal (NLS)

Das im Zytoplasma gebildete Protein (grün) trägt ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Dieses wird vom Adaptorprotein Importin- α (hellblau, α) erkannt und gebunden. Ein ternärer Komplex aus NLS-Protein, Importin- α und Importin- β (blau, β) wird über den Kernporenkomplex durch die Kernhülle transportiert. Im Zellkern wird durch RanGTP (schwarz) der Zerfall des ternären Komplexes und die Freisetzung des NLS-Proteins bewirkt. (modifiziert nach [Gorlich & Kutay, 1999])

dieses durch die Kernhülle vom Kern ausgeschlossen und kann (bei einer Größe von >30kD) nicht passiv durch den Kernporenkomplex diffundieren [Cole et al., 1998]. Das NLS wird nun durch das Adaptorprotein Importin- α erkannt und gebunden [Gorlich & Kutay, 1999]. Das mit dem zu transportierenden Protein beladene Importin- α ist dazu in der Lage, das für den Kernimport-verantwortliche Importin- β zu binden. Importin- β vermittelt nun die Interaktion mit dem Kernporenkomplex und den aktiven Transport des ternären Komplexes (Importin- α , Importin- β , NLS-Protein) durch die Poren in den Kern. Im Zellkern liegt eine hohe Konzentration der mit GTP-beladenen Form des Ran-Proteins (RanGTP) vor. RanGTP bindet direkt an Importin- β und bewirkt eine sterische Umorientierung, die es Importin- β unmöglich macht, weiterhin an Importin- α zu binden. Der zurückbleibende Komplex aus Importin- α und NLS-Protein ist auf Dauer nicht stabil und zerfällt. Das NLS-tragende Protein wird im Zellkern freigesetzt und kann diesen bei entsprechender Größe (>30kD) auch nicht mehr durch passive Diffusion verlassen. Die beiden am Transport beteiligten Importine müssen jedoch wieder zurück in das Zytoplasma gebracht werden, um für weitere Transportzyklen zur Verfügung zu stehen. Der Importin- β /RanGTP Komplex wird durch den Kernporenkomplex aktiv ins Zytoplasma transportiert, wobei das RanGTP-gebundene Importin- β in diesem Mechanismus die Exportin-Funktion für seinen eigenen Transport ausübt. Im Zytoplasma befinden sich zwei Ran-spezifische Proteine mit GAP-Aktivität. Das Ran-bindende-Protein 1 (RanBP1) und das Ran-GTPase-aktivierende-Protein (RanGAP) erhöhen die GTPase-

monopartites NLS

K-[KR]-X-[KR]

bipartites NLS

[KR]-[KR]-X(10-12)-3[KR] in 5 Resten

Leucin-reiches NES

L-X(2-3)-[LIVFM]-X(2-3)-L-X-[LI]

Abbildung 8: Kernlokalisierungssignale (NLS) und Kernexportssignale (NES)

Die gut charakterisierten Consensus-Sequenzen von monopartitem NLS, bipartitem NLS und Leucinreichem NES sind wiedergegeben. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Kode dargestellt. Eckige Klammern bezeichnen mehrere mögliche Aminosäuren an einer Position ([LI] bedeutet Leucin oder Isoleucin). Beliebige Reste werden mit X bezeichnet und ihre Anzahl wird in runden Klammern angegeben [X(1-5) bedeutet eine bis fünf beliebige Aminosäuren]. [Gorlich & Kutay, 1999]

Aktivität von Ran um mehrere Größenordnungen. Das durch Hydrolyse von GTP gebildete RanGDP ist nicht länger in der Lage Importin- β zu binden, welches nun im Zytoplasma freigesetzt wird und für weitere Transportzyklen zur Verfügung steht. Der nukleäre Export vom Adaptorprotein Importin- α erfolgt durch das spezifische Exportin CAS. Ein ternärer Komplex aus Importin- α /CAS/RanGTP bildet sich im Kern und wird vermittelt durch das Exportin CAS über den Kernporenkomplex ins Zytoplasma transportiert. Dort bewirken die schon beschriebenen Ran-spezifischen Proteine mit GAP-Aktivität die Hydrolyse von GTP zu GDP und den Zerfall des Komplexes in seine drei Bestandteile. Auch das freigesetzte Adaptorprotein Importin- α steht nun für neue Transportvorgänge zur Verfügung.

1.3.2 Nukleärer Export

Die Mechanismen des nukleären Exports ähneln denen des NLS-vermittelten nukleären Imports (siehe Abbildung 9) [Wen et al., 1995; Michael et al., 1995; Gorlich & Kutay, 1999], weisen aber auch bedeutende Unterschiede auf. Nukleäre Proteine können ab einer Größe von ca. 30 kD den Kern nicht mehr durch passive Diffusion über den Kernporenkomplex verlassen [Cole et al., 1998]. Für den aktiven Transport ist ihre Markierung durch ein

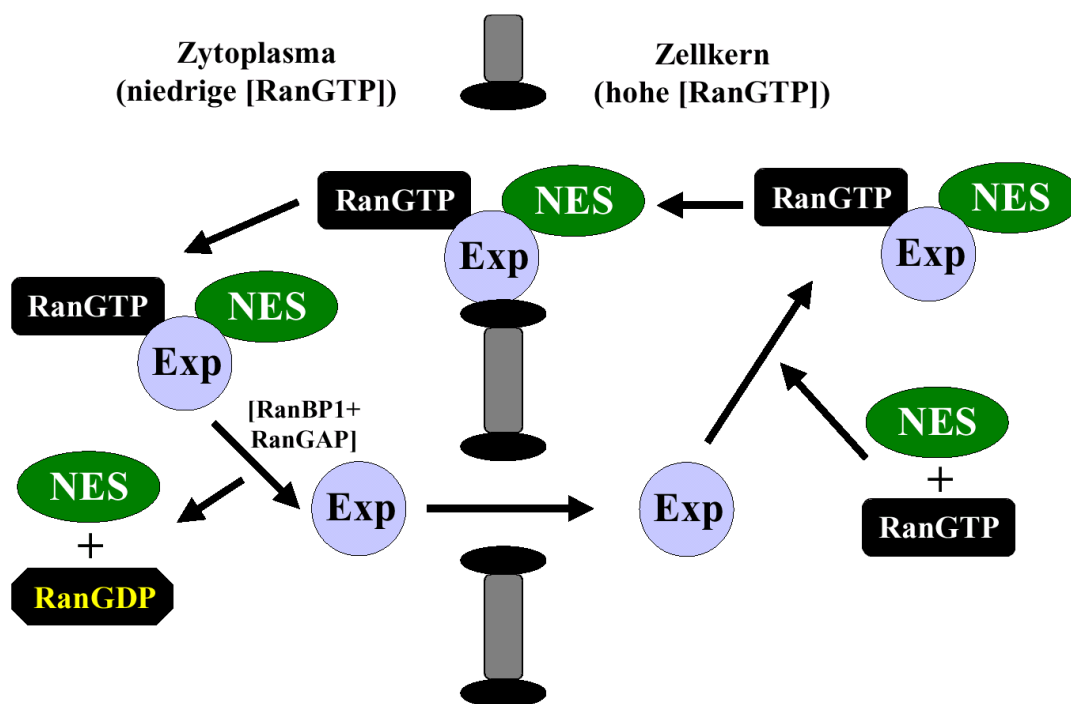


Abbildung 9: Nukleärer Export von Proteinen mit Kernexportsignal (NES)

Das nukleäre Protein (grün) trägt ein Kernexportsignal (NES). Dieses Signal wird vom Exportin 1 (hellblau, Exp) erkannt und gebunden. Ein ternärer Komplex aus NES-Protein, Exportin 1 und RanGTP (schwarz) bildet sich und wird aktiv über den Kernporenkomplex durch die Kernhülle ins Zytoplasma transportiert. Zwei zytoplasmatische Proteine mit GAP-Aktivität (RanBP1, RanGAP) bewirken die Hydrolyse von GTP zu GDP, den Zerfall des ternären Komplexes und die Freisetzung des NES-Proteins im Zytoplasma. (modifiziert nach [Gorlich und Kutay, 1999])

Kernexportsignal (NES) notwendig [Gorlich & Kutay, 1999; Fischer et al., 1995], welches wie das NLS durch eine bestimmte Abfolge von Aminosäuren in der Primärstruktur des Proteins gekennzeichnet ist. Es wurde eine Konsensus-Sequenz für das gut untersuchte Leucin-reiche NES erstellt, das durch vier hydrophobe Reste in definierten Abständen charakterisiert ist. Dieses Signal wird ohne die Vermittlung eines Adaptorproteins direkt vom Exportin 1 erkannt und gebunden. Im Kern bildet sich ein ternärer Komplex aus NES-tragendem Protein, Exportin 1 und RanGTP, das im Kern in höherer Konzentration als im Zytoplasma vorliegt. Das Exportin 1 bindet hierbei sowohl NES-Protein als auch RanGTP. Dieser Komplex wird vermittelt durch das Exportin 1 aktiv über den Kernporenkomplex ins Zytoplasma transportiert. Durch zwei zytoplasmatische Proteine mit GAP-Aktivität wird die schnelle Hydrolyse von GTP zu GDP und die damit verbundene Destabilisierung des ternären Komplexes bewirkt. Das Frachtprotein wird im Zytoplasma freigesetzt und kann bei entsprechender Größe nicht durch passive Diffusion, sondern nur durch aktiven Import erneut in den Kern gelangen. Das freigesetzte Exportin 1 wird ohne Bindung an Adaptorproteine aktiv über den Kernporenkomplex in den Zellkern transportiert. Bei diesem Mechanismus wird die Import-Aktivität vom freien Exportin 1 selber bereitgestellt, das nun für neue Transportzyklen bereitsteht. Das RanGDP muß ebenfalls in den Kern transportiert und in die mit einem Molekül GTP beladene Form überführt werden, um den für den nukleozytoplasmatischen Transport notwendigen RanGTP/RanGDP-Gradienten zwischen Zellkern und Zytoplasma aufrecht zu erhalten. Das RanGDP wird aus dem Zytoplasma durch den Nukleären Transport Faktor 2 (NTF2) über den Kernporenkomplex in den Zellkern transportiert. Im Kern selber bewirkt RCC1, ein nukleäres Protein mit GEF-Aktivität, den Austausch von GDP gegen GTP, so dass der RanGTP/RanGDP-Gradient erhalten bleibt.

Ein sehr nützliches Werkzeug zur Charakterisierung von Exportin 1-vermittelten Exportmechanismen ist Leptomycin B (LMB) [Kudo et al., 1998; Wolff et al., 1997; Yoshida

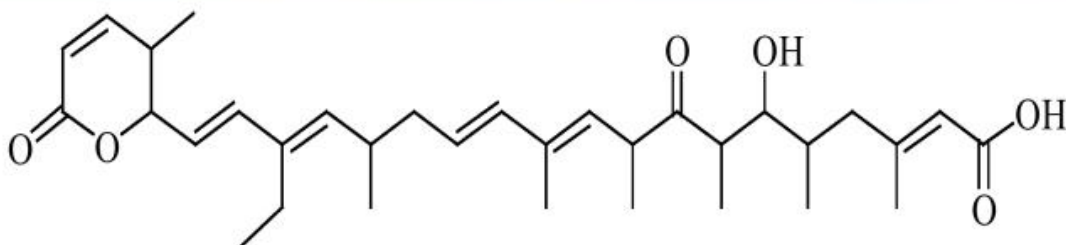


Abbildung 10: Leptomycin B (LMB)

LMB wird von verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen gebildet und ist ein spezifischer Inhibitor des Exportin 1-vermittelten Kernexports. Es bindet kovalent an einen Cystein-Rest von Exportin 1 und verhindert dadurch die für den Export notwendige Bildung eines ternären Komplexes aus Exportin 1, RanGTP und NES-tragendem Protein.

et al., 1990]. LMB ist eine ungesättigte, verzweigt-kettige Fettsäure (siehe Abbildung 10), die von verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen gebildet wird und bereits in nanomolaren Konzentrationen die Funktion von Exportin 1 in höheren Eukaryoten inhibiert. Dieser Effekt wird durch die kovalente Bindung von LMB an einen Cystein-Rest von Exportin 1 bewirkt. Diese Modifikation stabilisiert die Ran-freie Konformation vom Exportin 1 und verhindert so die Bindung von RanGTP und von dem für den Export markierten Protein.

1.3.3 Nukleozytoplasmatisches Shuttling

Die räumliche Trennung von mRNA-Synthese im Kern und Proteinbiosynthese im Zytoplasma eröffnet den Eukaryoten die Möglichkeit höherer Komplexität bis hin zur Bildung von multizellulären Lebensformen, erzeugt aber auch die Notwendigkeit von aktiven Transportmechanismen über die Kernhülle hinweg. In einer vereinfachten Darstellung werden nukleäre Proteine in den Kern importiert und die verschiedenen RNA-Typen aus dem Kern exportiert. Die aktuelle Forschung [Gorlich & Kutay, 1999; Gama-Carvalho & Carmo-Fonseca, 2001] hat zu dieser Sichtweise den bidirektionalen Transport über die Kernhülle hinzugefügt, u.a. durch die Charakterisierung der Mechanismen des dem Kernimport gegenüberstehenden Kernexports. Mittlerweile sind viele Proteine bekannt, die kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herpendeln [Gama-Carvalho & Carmo-Fonseca, 2001]. Diese Shuttleproteine (Pendelproteine) sind Schlüsselfaktoren in der Informationsübermittlung zwischen zytoplasmatischen und nukleären Aktivitäten. Kennzeichnend für sie ist das Vorhandensein von einem Kernlokalisierungssignal (NLS) und einem Kernexportsignal (NES). Eine große Anzahl solcher nukleozytoplasmatischer Shuttleproteine wurde inzwischen beschrieben, u.a. Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, Transportrezeptoren und -adaptoren, Steroidhormonrezeptoren und RNA-Bindeproteine. Insbesondere bei der Regulation der Genexpression spielt das nukleozytoplasmatische Shuttling von Proteinen eine wichtige Rolle. Als zu einfach hat sich auch die ursprüngliche Vorstellung erwiesen, dass die regulatorischen Faktoren solange im Kern oder Zytoplasma festgehalten werden, bis ein angemessenes Signal ihren Transport auf die andere Seite der Kernhülle auslöst (Modell von Retention und Transport). Es konnte vielmehr ein steter Transport in den Kern hinein und aus ihm heraus gezeigt werden, wobei jedoch ein vorherrschender Aufenthalt im Kern oder im Zytoplasma beobachtet wird in Abhängigkeit von der Balance zwischen Import- und Exportaktivität. Dieser Mechanismus des steten Transports erlaubt eine deutlich dichtere Regulation der Proteinaktivitäten. Durch

die ständige Bindung der Shuttle-Proteine an Exportine und Importine entstehen höchstwahrscheinlich inaktive Komplexe, die auch beim (kurzfristigen) Aufenthalt an ihrem Wirkort keine Funktion ausüben können. Ein angemessenes Signal führt dann zur Maskierung vom Import- oder Exportsignal, so dass die Proteine ungebunden und somit in einer aktiven Form vorliegen. Aufgrund des steten Shuttlings befindet sich ein Teil der Proteine zu diesem Zeitpunkt bereits an seinem Wirkort und kann rasch mit den entsprechenden Zielen zur Signalinduktion assoziieren.

1.4 Zielsetzung

Die Forschungen der letzten Jahre zeigen immer deutlicher, dass es zum zytoplasmatischen Stoffwechsel der Phosphatidylinositole und Inositolphosphate ein nukleäres Gegenstück gibt. Entsprechende Enzymaktivitäten und Inositolderivate wurden in den Kernen von Säugerzellen gefunden. In der Hefe ist schon seit längerem die Rolle von Inositolphosphaten in der Transkriptionsregulation und im mRNA-Export bekannt. Doch erst seit kurzem wird die Bedeutung der Inositolphosphat-abhängigen Chromatin-Remodellierung für die Transkriptionsregulation in Hefen und Säugern untersucht [Rando et al., 2003].

Ziel dieser Arbeit war ein besseres Verständnis des nukleären Inositolphosphat-Metabolismus durch Aufklärung der intrazellulären Zielsteuerung von bekannten und neuartigen Enzymen, die zelluläre Inositolphosphate umsetzen. Nach der Klonierung von Vollängen cDNAs sollten Fusionsgene mit dem Grün Fluoreszierenden Protein hergestellt und in Säugetierzellen exprimiert werden. Die intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine sollte durch Fluoreszenzmikroskopie und Gegenfärbung mit Organell-spezifischen Farbstoffen bestimmt werden. Durch gezielte Mutagenese wurden die Fusionsgene verändert, um für die Zielsteuerung verantwortliche Bereiche zu identifizieren. Die besondere Aufmerksamkeit war hierbei auf nukleäre Import- und Exportmechanismen gerichtet. Ausgewählte Translokationsmechanismen können durch spezifische Hemmstoffe inhibiert werden, um ihre Bedeutung für die intrazelluläre Lokalisation der untersuchten Fusionsproteine zu bestimmen.

Im Rahmen dieser Studien sollte das Verständnis des nukleären Inositolphosphat-Metabolismus durch Charakterisierung von Zielsteuerungsmechanismen der beteiligten Enzyme erweitert werden. Außerdem wurde die Natur der seit längerem beobachteten Verbindung zwischen Transkriptionsregulation und Inositolphosphat-Metabolismus in Säugerzellen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

XL1-Blue (*E. coli*): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*

[F'*proAB lacI^fZDM15 Tn10* (Tet^r)] [Bullock et al., 1987]

Der Stamm wurde kommerziell erworben von Stratagene (Cedar Creek, TX, USA).

2.1.2 Zelllinien

Die Zelllinien wurden erworben von „Cell Lines Service and Cellbank“ (Heidelberg).

2.1.2.1 NRK 52E-Zellen

NRK 52E-Zellen (normal rat kidney) leiten sich von Epithelzellen des proximalen Tubulus (PTE, proximal tubule epithelium) der Rattenniere ab. Diese Zelllinie ist nicht tumorigen und hat sich viele morphologische und physiologische Eigenschaften von PTE erhalten [Chang et al., 2000 ; Best et al., 1999].

2.1.2.2 PC12-Zellen

Die PC12-Zellen leiten sich von einem Phäochromocytom des Nebennierenmarks der Ratte ab. Zwar haben sie viele Eigenschaften der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks bewahrt, zeigen aber auch deutliche Unterschiede. Eine reversible neuronale Differenzierung von PC12-Zellen zu PC12⁺-Zellen ist durch den Nerve Growth Factor (NGF) induzierbar [Greene und Tischler, 1976]. Da die PC12-Zellen das Enzym Phenylethanolamin-N-Methyltransferase nicht besitzen, produzieren sie kein Adrenalin [Tischler und Greene, 1978].

2.1.3 Enzyme

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

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

2.1.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden kommerziellen Herstellern erworben:

Aldrich (Steinheim)

Biomol (Hamburg)

Fluka (Buchs, Schweiz)

Merck (Darmstadt)

Sigma (Deisenhofen)

2.1.5 DNA-Molekulargewichtsstandard

1 kb DNA Leiter GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas, Heidelberg)

100 bp DNA Leiter GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Heidelberg)

2.1.6 Kits

Big Dye Terminator Sequencing Kit Applied Biosystems (Weiterstadt)

Silica Spin Kit for Plasmid DNA Minipreparation Biometra (Göttingen)

QIAEX II Gel Extraction Kit Qiagen (Hilden)

Metafectene Biontex (München)

2.1.7 Plasmide

pEGFP-N1 Clontech (Palo Alto, CA, USA) [Living Colors User Manual]

pEGFP-C1 Clontech (Palo Alto, CA, USA) [Living Colors User Manual]

pGEM-T Easy Promega (USA)

2.1.8 Medien für eukaryotische Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium GIBCO BRL (Eggenstein)

RPMI GIBCO BRL (Eggenstein)

OptiMEM GIBCO BRL (Eggenstein)

2.1.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei MWG (Ebersberg) bestellt.

Humane Inositolphosphat Multikinase (HsIPMK)

Klonierung der Volllänge in pEGFP-N1

MN020 5´-GCT AGC ATG GCA ACA GAG CCA CCA TC-3´
MN021 5´-GTA CTT CGA AGT ATT TTA GAC AAT TCA GAT CT-3´

Klonierung der Volllänge in pEGFP-C1

MN022 5´-GGT ACC ATG GCA ACA GAG CCA CCA TC-3´
MN023 5´-CTT CGA AGT ATT TTA GAC AAT TGA GGA TCC

Quikchange Mutagenese ÄAdenosin 451

MN025 5´-GGA TGT AAA GAT AGG GCA AAA AAG CTA TGA TCC TTT
 TGC CTC-3´
MN026 5´-GAG GCA AAA GGA TCA TAG CTT TTT TGC CCT ATC TTT
 ACA TCC-3´

Klonierung von Fragment AS 263-370

MN081 5´-GGT ACC CCA ACC ACT ACA AAA TTG AAT-3´
MN082 5´-GGA TCC GGG AAG ATG GTA GAA AAC TTT-3´

Klonierung von Fragment AS 308-341

MN083 5´-GGT ACC TCT TCA GTG GGC AAA AGC TTG-3´
MN084 5´-GGA TCC CTC CAG ATT TTC AAC TTT CAA-3´

Oligoligation von Fragment AS 320-330

MN085 5´-CCG TCA CAG GAA AAT ATA TAC AAA AAA GCA TCA CTG
 AG-3´
MN086 5´-GAT CCT CAG TGA TGC TTT TTT GTA TAT ATT TTC CTG
 TGA CGG GTA C-3´

Quikchange Mutagenese ÄAS 308-341

MN065 5´-ACA GCT AAT GGA AAA ATA GAG CAA GAC AAT GGG TGG
AAA AGC-3´

MN066 5´-GCT TTT CCA CCC ATT GTC TTG CTC TAT TTT TCC ATT
AGC TGT-3´

Quikchange Mutagenese ÄAS 320-330

MN051 5´-TTG TCC AAG ATG TAT GCG AGT CAG ACT TCA TTG AAA-3´

MN052 5´-TTT CAA TGA AGT CTG ACT CGC ATA CAT CTT GGA CAA-3´

Quikchange Mutagenese RK322QQ

MN045 5´-CCA AGA TGT ATG CGC GTC ACC AGC AAA TAT ATA CAA
AAA AGC ATC ACA G -3´

MN046 5´-CTG TGA TGC TTT TTT GTA TAT ATT TGC TGG TGA CGC
GCA TAC ATC TTG G-3´

Quikchange Mutagenese KK327QQ

MN047 5´-GTC ACA GGA AAA TAT ATA CAC AAC AGC ATC ACA GTC
AGA CTT CAT TG-3´

MN048 5´-CAA TGA AGT CTG ACT GTG ATG CTG TTG TGT ATA TAT
TTT CCT GTG AC -3´

Quikchange Mutagenese ÄAS 1-91

MN067 5´-AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC ATG GTT TAT GCT GCT
GAC TGT-3´

MN068 5´-ACA GTC AGC AGC ATA AAC CAT GGT ACC GTC GAC TGC
AGA ATT-3´

Quikchange Mutagenese ÄAS 1-198

MN069 5´-AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GGA AGA AGC TTA ACA
AAA GAA-3´

MN070 5´-TTC TTT TGT TAA GCT TCT TCC GGT ACC GTC GAC TGC
AGA ATT-3´

Quikchange Mutagenese ÄAS 1-302

MN071 5' -AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC AAT GGA AAA ATA GAG
TCT TCA-3'

MN072 5' -TGA AGA CTC TAT TTT TCC ATT GGT ACC GTC GAC TGC
AGA ATT-3'

Quikchange Mutagenese ÄAS 1-30

MN073 5' -AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GGC ACC CCG CAG CCG
GCG GGC-3'

MN074 5' -GCC CGC CGG CTG CGG GGT GCC GGT ACC GTC GAC TGC
AGA ATT-3'

Quikchange Mutagenese ÄAS 1-56

MN075 5' -AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC ATG TAC GGG AAG GAC
AAA GTG-3'

MN076 5' -CAC TTT GTC CTT CCC GTA CAT GGT ACC GTC GAC TGC
AGA ATT-3'

Sequenzierprimer

MN024 5' -CCC ATA AAT TTA ATA AGC CCT G-3'

MN020 5' -GCT AGC ATG GCA ACA GAG CCA CCA TC-3'

MN021 5' -AGA TCT GAA TTG TCT AAA ATA CTT CGA AGT AC-3'

MN022 5' -GGT ACC ATG GCA ACA GAG CCA CCA TC-3'

MN023 5' -GGA TCC TCA ATT GTC TAA AAT ACT TCG AAG-3'

MN024 5' -CCC ATA AAT TTA ATA AGC CCT G-3'

Ratten Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase C (RnIP3K-C)

Klonierung der Volllänge in pEGFP-N1

MN001 5' -AGC GCT ATG AGG CGC TGC CCG TGC CG-3'

MN003 5' -CTC GAG GCT CTG GGC CAG GCC CTG AA-3'

Klonierung der N-terminalen Domäne in pEGFP-N1

MN001 5' -AGC GCT ATG AGG CGC TGC CCG TGC CG-3'

MN002 5' -CTC GAG TCC AGA TCT GTC CTC AGG ATC GCT-3'

Klonierung der Volllänge in pEGFP-C1

MN004 5'-GTC GAC ATG AGG CGC TGC CCG TGC CG-3'
MN006 5'-GGA TCC TAG CTC TGG GCC AGG CCC TGA A-3'

Klonierung der N-terminalen Domäne in pEGFP-C1

MN004 5'-GTC GAC ATG AGG CGC TGC CCG TGC CG-3'
MN005 5'-GGA TCC TAT CCA GAT CTG TCC TCA GGA TCG CT-3'

Quikchange Mutagenese ΔAS 318-326

MN087 5'-TCC CAC CTG GAG TGC AGC TCC ACC TCA GAG TCT CCT
GAG CCT-3'
MN088 5'-AGG CTC AGG AGA CTC TGA GGT GGA GCT GCA CTC CAG
GTG GGA-3'

Quikchange Mutagenese L318CPV→ACPA

MN151 5'-TCC CAC CTG GAG TGC AGC TCC GCG TGT CCT GCG CCC
CGC CTT ATC ATC ACC TCA-3'
MN152 5'-TGA GGT GAT GAT AAG GCG GGG CGC AGG ACA CGC GGA
GCT GCA CTC CAG GTG GGA-3'

Oligoligation vom isolierten NES in pEGFP-N1

MN107 5'-GCT ATG CTG TGC CCT GTG CCC CGC CTC ATC ATT C-3'
MN108 5'-TCG AGA ATG ATG AGG CGG GGC ACA GGG CAC AGC ATA
GC-3'

Oligoligation vom isolierten NES in pEGFP-C1

MN109 5'-TCG ACC TGT GCC CTG TGC CCC GCC TCA TCA TTG-3'
MN110 5'-GAT CCA ATG ATG AGG CGG GGC ACA GGG CAC AGG-3'

Humane Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase C (HsIP3K-C)

Klonierung der Volllänge in pEGFP-N1

MN001 5'-AGC GCT ATG AGG CGC TGC CCG TGC CG-3'
MN093 5'-CTC GAG GCT CTG TGC CAG CCC CTG CA-3'

Klonierung der Volllänge in pEGFP-C1

MN004 5'-GTC GAC ATG AGG CGC TGC CCG TGC CG-3'
MN094 5'-GGA TCC TAG CTC TGT GCC AGC CCC TGC A-3'

Quikchange Mutagenese K³⁸⁷→STOP

MN126 5'-CCC GAG GAC AGG TCT GGG AGC TAA CCC TGG AAG AAG
CTG AAG A-3'
MN127 5'-TCT TCA GCT TCT TCC AGG GTT AGC TCC CAG ACC TGT
CCT CGG G-3'

Quikchange Mutagenese ΔAS 324-332

MN099 5'-TCT CAC CTG AAG TGT AGC CCC ACC CCT GAG ACC CCT
GAG CCT-3'
MN100 5'-AGG CTC AGG GGT CTC AGG GGT GGG GCT ACA CTT CAG
GTG AGA-3'

Quikchange Mutagenese L324A/V327A

MN101 5'-TCT CAC CTG AAG TGT AGC CCC GCC TGC CCT GCT CCC
CGC CTC ATC ATT ACC CCT-3'
MN102 5'-AGG GGT AAT GAT GAG GCG GGG AGC AGG GCA GGC GGG
GCT ACA CTT CAG GTG AGA-3'

Quikchange Mutagenese L330A/I332A

MN103 5'-CCC CTG TGC CCT GTG CCC CGC GCC ATC GCT ACC CCT
GAG ACC CCT GAG CCT-3'
MN104 5'-AGG CTC AGG GGT CTC AGG GGT AGC GAT GGC GCG GGG
CAC AGG GCA CAG GGG-3'

Sequenzierprimer

MN095 5'-TCC AGG GCC CAT GAA CCC CTG-3'
MN096 5'-CTC TTG GGA GAG CCT GAG GAT-3'
MN097 5'-CCC CGG CCA CCA CGT CAT CCT-3'
MN098 5'-GAA GAG GAG CTA GTG AAG GCA-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Mikrobiologische Arbeitstechniken

Reaktionsgefäße, Glaswaren, Pipettenspitzen, LB-Lösungen und -Medien werden vor Verwendung bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 1,2 bar für 35 min autoklaviert. Lösungen mit hitzelabilen Zusätzen wie Antibiotika werden sterilfiltriert. Arbeitsflächen und Geräte werden durch Besprühen mit 80%-igem Ethanol desinfiziert.

2.2.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli* Kulturen

Bakterienkulturen werden aus einem einzigen Klon gezüchtet, um einheitliche Plasmid-Präparationen gewinnen zu können. Dazu werden Zellen einer Flüssigkultur durch Ausstreichen mit einer Platinöse auf einer Agar-Platte vereinzelt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C sind aus den einzelnen Bakterien dann Kolonien herangewachsen.

Die Agar-Platten können zur kurzfristigen Aufbewahrung der Bakterien mit Parafilm versiegelt und bei 4°C gelagert werden.

LB-Medium: 4 g Bacto-Trypton
2 g Hefeextrakt
4 g NaCl
ad 400 ml H₂O
pH 7,2 (mit NaOH einstellen),
autoklavieren

Agarplatten: 4 g Bacto-Trypton
2 g Hefeextrakt
6 g Bacto-Agar
0,5 ml 4 M NaCl
ad 400 ml H₂O,
autoklavieren

LB-Medium und Agarplatten werden entsprechend ihrer Verwendung mit Antibiotika und anderen Zusätzen versetzt.

2.2.1.3 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Es werden 3 ml LB-Medium mit einer Kolonie des Bakterienstamms der Wahl angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Dem Medium wird ein angemessenes Antibiotikum zugesetzt, um ein Überwachsen durch freilebende Bakterien zu verhindern. Mit 1 ml der Kultur werden 100 ml LB-Medium angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C so lange kultiviert, bis eine $OD_{600\text{ nm}}$ von ca. 0,6 erreicht ist. Die Kultur wird 15 min auf Eis abgekühlt und 15 min mit 2000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 33,5 ml eiskaltem RF I-Medium resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut 15 min mit 2000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 8 ml eiskaltem RF II-Medium resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden zu 100 µl in 1,5 ml Eppendorf-Tubes aliquotiert. Die kompetenten Zellen können unmittelbar verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

RFI-Puffer: 100 mM RbCl
50 mM $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$
30 mM K-Acetat
10 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
15% Glycerol
pH 5,8 mit Essigsäure einstellen,
sterilfiltrieren und bei 4°C lagern

RFII-Puffer: 10 mM MOPS (pH 6,8)
10 mM RbCl
75 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
15% Glycerol
pH 6,8 mit Essigsäure einstellen,
sterilfiltrieren und bei 4°C lagern

2.2.1.4 Transformation von *E. coli* nach [Hanahan D 1983]

Es wird ein Aliquot kompetenter Zellen (100 µl) für 15 min auf Eis aufgetaut. Ein vollständiger Ligationsansatz (20 µl), ein Fünftel (10µl) von einem QuikChange-Ansatz oder 100ng von einem Plasmid zur Retransformation werden zu den Zellen gegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 1-minütigen Hitzeschock bei 42°C wird zu dem Ansatz 1 ml LB-Medium gegeben und er wird 60 min bei 37°C im Tisch-Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend werden 10µl, 100µl und 800µl des Ansatzes auf LB -Agar-Platten mit angemessenem Antibiotika-Zusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA („Mini-Präparation“)

Zur Präparation von Plasmid-DNA wird das “Silica Spin Kit for Plasmid DNA Minipreparation“ (Katalog-Nummer 100-451) von Biometra GmbH (Rudolf-Wissell-Str. 30, D-37079 Göttingen) verwendet. Mit diesem System können bis zu 30 µg DNA aus 1,5 bis 5 ml *E. coli* Übernacht-Kulturen gewonnen werden. Für die Präparation wird über Nacht eine 3 ml *E. coli* Kultur in LB-Medium kultiviert.

Alle Zentrifugationsschritte werden mit Maximalgeschwindigkeit in einer konventionellen Tischzentrifuge durchgeführt. In ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß werden 1,8 ml der Bakterien-Kultur überführt. Die Bakterien werden durch 5-minütige Zentrifugation bei 5000 Upm geerntet. Nun wird der Überstand abgenommen und die Bakterien werden in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Es werden 200 µl Puffer P2 zugegeben und das Gefäß wird mehrmals invertiert. Die Lösung wird durch die Lyse der Bakterien schwach durchsichtig. Es werden 200 µl Puffer P3 zugegeben und das Gefäß wird mehrmals invertiert. Es bildet sich ein flockiger weißer Niederschlag aus SDS/Protein-Präzipitat. Die Lösung wird 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, so dass die Zelltrümmer ein kompaktes Pellet bilden. Ein Silica Spin Filter wird in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß platziert und der Überstand der letzten Zentrifugation wird in den Filter eingefüllt. Die Lösung wird eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, während sich die Plasmid-DNA an den Filter gebunden hat. Zum Waschen werden 500 µl Puffer W1 auf den Filter gegeben. Die Lösung wird eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen. Zum weiteren Waschen werden 500 µl Puffer W2 auf den Filter gegeben. Die Lösung wird eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluß wird erneut verworfen. Es wird eine weitere Minute zentrifugiert, um restlichen Puffer W2 zu entfernen. Der Filter wird in ein sauberes 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Elution der Plasmid-DNA werden 100 µl Wasser auf den Filter gegeben. Nach 1-minütigem Warten wird die Lösung eine Minute zentrifugiert. Der aufgefangene Durchfluß enthält die Plasmid-DNA.

Puffer	Zusammensetzung
P1	0,05 M Tris/HCl; 0,01M EDTA pH 7,5; 0,05 mg/ml RNase
P2	0,2 M NaOH, 1% SDS
P3	4,0 M Guanidin-HCl; 0,75 M KOAc; pH 4,6
W1	4,0 M Guanidin-HCl; 0,75 M KOAc; pH 4,6
W2	0,05 M Tris/HCl; 0,01 M EDTA; pH 7,5; 200 mM NaCl, 50% Ethanol

2.2.2.2 DNA-Fällung mit Ethanol

Die zu fällende DNA-Lösung wird mit einem Zehntel Volumen 3M Natriumacetat (pH5,2) versetzt und gut gemischt. Nach Zugabe von 2,5 Volumen 96% Ethanol und erneutem Mischen wird die Lösung für 30min bis 2h bei -20°C gelagert. Nach einer anschließenden 30-minütigen Zentrifugation mit Höchstgeschwindigkeit in einer konventionellen Tischzentrifuge wird der Überstand abgenommen und 1 Volumen 70% Ethanol zugegeben. Es wird erneut für 5min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, das Pellet für ca. 10min luftgetrocknet und dann in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration und Reinheit von z.B. durch Minipräparation gewonnenen DNA-Lösungen wird durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei Doppelstrang-DNA entspricht eine $\text{OD}_{260\text{ nm}}$ von 1 ungefähr einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm gibt die Reinheit der DNA wieder und liegt für reine DNA über 1,8.

2.2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von doppelsträngigen DNA-Proben erfolgt nach der Didesoxy-Methode [Sanger et al., 1977, modifiziert]. Es wird das Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) und der Taq-Polymerase-Puffer Half-Term (GENPAK) verwendet.

Die Sequenzieransätze haben folgende Zusammensetzung:

DNA	500 ng
Primer	15 pmol
Big Dye	3 µl
Half Term	5 µl
H₂O	ad 20 µl

Das folgende Temperaturwechselprogramm wird in einem Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt. Es wird ein Heiß-Start durchgeführt.

25x	Denaturierung bei 96°C für 10 s Annealing bei 50°C für 5 s Verlängerung bei 60°C für 4 min
-----	--

Nach Beendigung des Temperaturwechselprogramms wird der Reaktionsansatz durch eine Ethanol-Fällung gereinigt. Hierzu wird der Ansatz mit 40µl 100% Ethanol gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird 25 min bei Maximalgeschwindigkeit mit einer konventionellen Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und das Pellet luftgetrocknet.

Der Probenauftrag, die Gelelektrophorese und die Sequenzbestimmung werden im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, UKE durchgeführt. Der ABI-Sequenator 377 (Applied Biosystems) wird gemäß den Herstellerangaben benutzt.

2.2.2.5 Analytische und präparative Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die sequenzspezifische Hydrolyse von Doppelstrang-DNA werden verschiedene Restriktionsendonukleasen von MBI Fermentas verwendet. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen und hydrolysieren die DNA innerhalb bzw. außerhalb dieser Erkennungssequenz. Sowohl analytische als auch präparative Hydrolysereaktionen werden in einem Gesamtvolumen von 20µl unter Verwendung der vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und Temperaturen durchgeführt. Die Inkubationszeiten betragen 1 bis 3 Stunden. Für analytische Hydrolysen wurden DNA-Mengen von ca. 500ng eingesetzt, präparative Hydrolysen wurden mit 1-2µg DNA durchgeführt. Pro 1µg DNA wurden 10U Enzym eingesetzt.

2.2.2.6 Analytische und präparative Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von Doppelstrang-DNA-Fragmenten von unterschiedlicher Länge erfolgt durch Gelelektrophorese in Agarosegelen. Dazu werden 0,7-2,0% (0,35-1,0g) Agarose in 50ml TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Niederprozentige Gele mit 0,7% Agarose eignen sich insbesondere zur Auftrennung hochmolekularer DNA-Fragmente zwischen 0,8 und 12 kb. Hochprozentige Gele mit 2,0% Agarose eignen sich hingegen zur Auftrennung niedermolekularer DNA-Fragmente zwischen 0,5 und 2,0 kb. Das noch flüssige Gel wird nach einer Abkühlung auf ca. 50°C mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt und in ein Gelbett mit Kamm gegossen. Nach der vollständigen Aushärtung wird das Gel in einer Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet. Der Kamm wird entfernt. Die Proben werden mit 1/5 Volumen 6xDNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gefüllt. Für die Analyse werden Proben mit einem Volumen von 20µl und für die Präparation mit einem Volumen von 50µl verwendet. Die Fragmente werden bei 5-10 Volt/cm Gelbreite 1-1,5h aufgetrennt. Die DNA wird im UV-Durchlicht sichtbar gemacht, fotografiert und für präparative Zwecke mit einem Skalpell ausgeschnitten.

6xDNA-Auftragspuffer: 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylencyanol FF
 15% Ficoll 400
 in wässriger Lösung

2.2.2.7 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von Doppelstrang-DNA aus Agarosegelen wird mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Catalog # 20021) von QIAGEN durchgeführt. Bei diesem System wird zuerst die Agarose mit chaotropen Salzen solubilisiert. Die Nukleinsäuren werden dann selektiv und fast quantitativ durch Kieselgel-Partikel unter Hochsalzbedingungen adsorbiert. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung von Agarose- und Salzresten wird die Doppelstrang-DNA unter Niedrigsalzbedingungen von den Kieselgel-Partikeln eluiert. Die Durchführung erfolgt gemäß dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Protokoll. Zur Elution der DNA von den Kieselgel-Partikeln werden 20µl 10mM TrisCl mit pH8,5 verwendet.

2.2.2.8 A-Tailing von PCR-Produkten

In den in Rahmen dieser Arbeit häufig verwendeten pGEM-T Easy-Vektor können nur Doppelstrang-DNA-Fragmente mit jeweils einer überhängenden Desoxyadenosinbase an jedem Strangende ligiert werden. Verschiedene thermostabile Polymerasen fügen selbsttätig und Template-unabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden der Amplikons an. Einige thermostabile Polymerasen mit Proofreading-Aktivität (z.B. *Pfu*, *Pwo*, *Tli*) erzeugen jedoch DNA-Fragmente mit glatten Strangenden. Mit diesen Fragmenten muß vor der Ligation in pGEM-T Easy-Vektoren ein A-Tailing durchgeführt werden.

Folgender Ansatz wird verwendet:

13µl	gereinigtes PCR-Produkt
1µl	50 mM MgCl ₂
2µl	2 mM dATP
2µl	10x Taq-Puffer
2µl	<i>Taq</i> -Pol (10U)
20µl	gesamt

Dieser Ansatz wird 30 min bei 72°C inkubiert. Für eine anschließende Ligation werden 2 µl des Ansatzes direkt eingesetzt.

2.2.2.9 Ligation von Doppelstrang-DNA-Fragmenten

Zur Ligation von Doppelstrang-DNA-Fragmenten wird die T4 DNA Ligase (Catalog # 15224-025) von GIBCO BRL verwendet. Die T4 DNA Ligase kann DNA-Fragmente mit glatten oder kompatiblen überhängenden Enden verbinden, indem sie unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe katalysiert.

Der Ligationsansatz besteht aus 50 ng Vektor-DNA. Dazu wird Insert-DNA in dreifachem molarem Überschuß gegeben.

50 ng	Vektor-DNA
x ng	Insert-DNA
4,0 µl	5x Ligase Reaktions Puffer
1,0 µl	T4 DNA Ligase (1U)
ad 20 µl	H ₂ O

Bei Ligationen mit kohäsiven Enden wird über Nacht bei 15°C inkubiert. Diese Temperatur führt zu einem optimalen Verhältnis von Ligase-Aktivität und –Stabilität. Bei Überhängen, die aus nur einer Base bestehen, wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Diese niedrige Temperatur vermindert zwar die Aktivität der Ligase, ermöglicht aber das Annealing von Ein-Basen-Überhängen. Bei Ligationen mit glatten Enden wird über Nacht bei 25°C inkubiert. Bei diesen Ligationen spielt das Annealing keine Rolle. Die höhere Temperatur steigert die Aktivität der Ligase, vermindert aber auch ihre Stabilität.

2.2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion mit Plasmid-DNA als Template

Zur Amplifikation von Doppelstrang-DNA-Fragmenten unter Einsatz von Plasmid-DNA als Template wird *Pfu* DNA Polymerase (Catalog # M7745) von Promega verwendet. Die *Pfu* DNA Polymerase besitzt neben der 5'→3'-Polymerase-Aktivität auch eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität. Aufgrund dieser Proofreading-Fähigkeit arbeitet diese Polymerase mit besonders hoher Genauigkeit.

Der PCR-Ansatz wird in einem 0,2 ml Eppendorf-Tube angesetzt. Diese für die PCR optimierten Reaktionsgefäße sind besonders dünnwandig und erlauben so einen schnellen Temperaturwechsel.

38µl	ddH ₂ O
5µl	10XPfu-Puffer
1µl	10 mM dNTPs
1µl	<i>Pfu</i> -Pol (2,8 U/µl)
2µl	10 µM downstream Primer
2µl	10 µM upstream Primer
1µl	pDNA (c _{DNA} = 10 ng/µl)
50µl	gesamt

Das Temperaturwechselprogramm wird in einem Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt. Es wird ein Heiß-Start durchgeführt.

1x	Template bei 95°C für 2 min denaturieren
20x	Denaturierung bei 95°C für 30 s Annealing (Temperatur je nach T _m der Primer) für 30 s Verlängerung bei 72°C (2 min für jedes 1kb des Amplikons)
1x	Verlängerung bei 72°C für 5 min

2.2.2.11 QuikChange-Mutagenese

Bei der QuikChange-Mutagenese-Methode können Mutationen an beliebigen Stellen der Nukleotidsequenz eingefügt werden, wobei als Template ein *dam*-methyliertes, zirkuläres Doppelstrang-DNA-Plasmid dient. Viele kommerziell erhältliche *E. coli* Stämme tragen das für die entsprechende *dam*-Methylase [Lewin, 1997, S. 522] codierende Gen. Durch zwei zueinander revers-komplementäre Primer wird die Mutation in das Zielplasmid eingefügt. Die Mutagenese-Primer binden an die zu mutierenden Bereiche des Plasmids und werden anschließend durch die Polymerase zu einem vollständigen, mutierten DNA-Strang aufgefüllt. Das Template wird durch Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* entfernt. Diese Nuklease hydrolysiert spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA an der häufig vorkommenden Zielsequenz 5'-Gm⁶ATC-3' [Nelson & McClelland, 1992]. Bei der methylierten DNA handelt es sich um die eingesetzte Template-DNA, während die hemimethylierte DNA durch Zusammenlagerung von einem Strang der Template-DNA und einem komplementären PCR-Produkt entsteht. Das Produkt der QuikChange-Mutagenese kann durch Transformation in kompetente *E. coli* Zellen eingebracht werden. Durch die zelleigenen Reparatursysteme werden die Nicks geschlossen und das Plasmid methyliert und repliziert. Aufgrund der erneuten Methylierung kann das durch eine Mini-Präparation gewonnene Mutagenese-Produkt als Template für weitere Mutagenese-Runden eingesetzt werden.

Folgender Ansatz wird für die QuikChange-Mutagenese benutzt:

10ng	Plasmid-DNA als Template
125ng	Sense-Mutageneseprimer
125ng	Antisense-Mutageneseprimer
250µM	dNTPs
2,5U	Turbo- <i>Pfu</i> -Polymerase (aus <i>Pyrococcus furiosus</i>)
5µl	10x Turbo- <i>Pfu</i> -Puffer
ad 50 µl	ddH ₂ O

Im Eppendorf Mastercycler Gradient wird folgendes Temperaturwechselprogramm durchgeführt:

1x	Initiale Denaturierung bei 95°C für 30s
18x	Denaturierung bei 95°C für 30s Annealing bei 55°C für 60s Polymerasereaktion bei 68°C für 1min pro kb Plasmid

Zum Reaktionsansatz werden 10U DpnI gegeben und es erfolgt eine Inkubation bei 37°C für 1h. Von dem Ansatz werden 10µl durch Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien eingebracht.

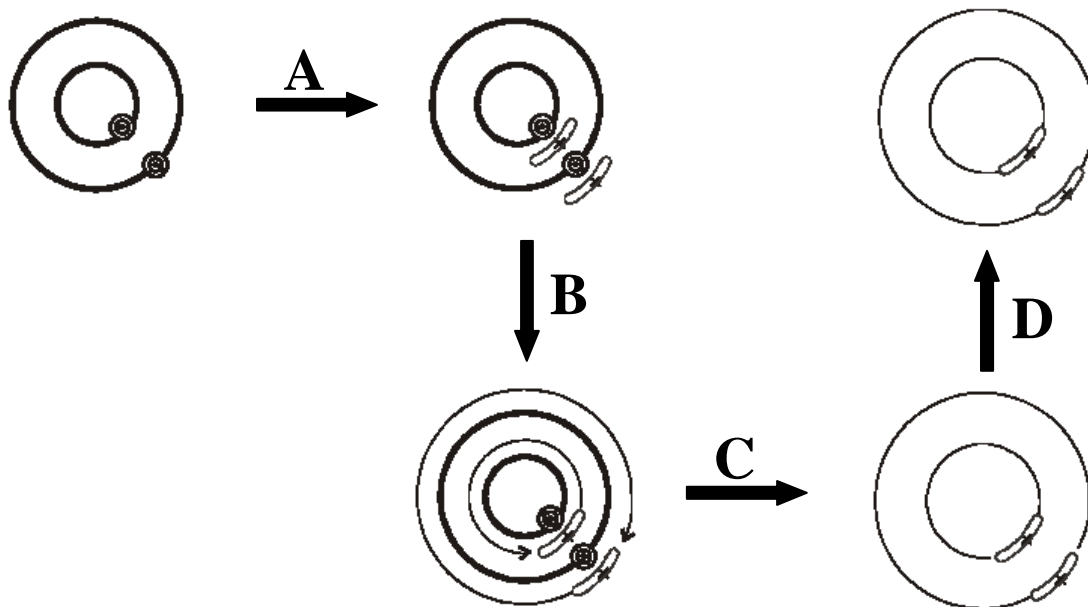


Abbildung 11: Prinzip der Quikchange Mutagenese (QCM) von DNA-Plasmiden

Als DNA-Matrize für die QCM dient ein zirkuläres, methyliertes, doppelsträngiges Plasmid, das durch Minipräparation einer *E. coli* Kultur gewonnen wurde. Im ersten Schritt (A) lagern sich zwei komplementäre Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation tragen, an die entsprechenden Sequenzbereiche des Plasmids an. Durch die Aktivität der *Pfu*-Polymerase (B) werden die Oligonukleotide verlängert zu einem nicht-methylierten Plasmid, das die gewünschte Mutation trägt und genickt ist. Durch Zugabe der Restriktionsendonuklease *DpnI* (C) werden methylierte Ausgangsplasmide und hemi-methylierte Hybridplasmide abgebaut. Nur die vollständig nicht-methylierten Plasmide, die in beiden Strängen die gewünschte Mutation tragen, bleiben erhalten. Diese Plasmide werden durch Transformation in *E. coli* Zellen eingebracht (D). Durch die *E. coli*-eigenen Reparatursysteme werden die Nicks geschlossen. Durch Minipräparation kann das mutierte Plasmid gewonnen werden, um durch Sequenzierung die gewünschte Mutation zu bestätigen und unerwünschte Second-Site-Mutationen auszuschließen.

2.2.2.12 Erweiterte QuikChange-Mutagenese [Wang et al., 1999]

Die erweiterte QuikChange-Mutagenese wird benutzt, um „schwierige“ Mutationen (umfangreiche Deletionen und Insertionen, Multimutationen) in die Template-DNA einzufügen [Wang et al., 1999]. Bei diesen Mutationen unterscheidet sich die Sequenz der Primer deutlich von der Vektorsequenz, so dass die Bildung von „Primer-Dimern“ gegenüber der Bindung des Mutagenese-Primers an sein Template stark bevorzugt ist. Deshalb wird zuerst mit zwei getrennten Ansätzen mit jeweils nur einem Mutagenese-Primer gearbeitet. Die konkurrierende Bildung von Primer-Dimern ist nicht mehr möglich.

Folgender Ansatz wird für den Prä-PCR-Schritt benutzt:

50 ng	Plasmid-DNA als Template
125 ng	Sense-Mutageneseprimer oder Antisense-Mutageneseprimer
250 µM	dNTPs
2,5 U	Turbo- <i>Pfu</i> -Polymerase (aus <i>Pyrococcus furiosus</i>)
5 µl	10x Turbo- <i>Pfu</i> -Puffer
ad 50 µl ddH ₂ O	

Im Eppendorf Mastercycler Gradient wird folgendes Temperaturwechselprogramm durchgeführt:

1x	Initiale Denaturierung bei 95°C für 30s
10x	Denaturierung bei 95°C für 30s Annealing bei 55°C für 60s Polymerasereaktion bei 68°C für 1min pro kb Plasmid

Jeweils 25µl von jedem Ansatz werden miteinander vereint und mit 1µl Turbo-*Pfu*-Polymerase versetzt. Anschließend wird folgendes Temperaturwechselprogramm durchlaufen:

1x	Initiale Denaturierung bei 95°C für 30s
18x	Denaturierung bei 95°C für 30s Annealing bei 55°C für 60s Polymerasereaktion bei 68°C für 1min pro kb Plasmid

Zum Reaktionsansatz werden 10U DpnI gegeben und es erfolgt eine Inkubation bei 37°C für 1h. Von dem Ansatz werden 10µl durch Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien eingebracht.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

Reaktionsgefäße, Glaswaren, Pipettenspitzen und Lösungen werden bei 121°C und 1,2 bar für 35 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen (z.B. Kulturmedien mit Antibiotika) werden sterilfiltriert. Arbeitsflächen und Geräte werden durch Besprühen mit 80%-igem Ethanol desinfiziert.

2.2.3.2 Kontinuierliche Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Es werden PC12- und NRK 52E-Zellen in Routinekultur gehalten. Dazu werden T75 Flaschen (250 ml, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) verwendet. Die PC-12 Zellen werden in RPMI-Medium mit 5% FCS (Foetales Rinder Serum - fetal cattle serum) und 10% HS (Pferde Serum – horse serum) mit Penicillin und Streptomycin kultiviert; NRK-Zellen in Dulbecco's Modified Eagle Serum (DMEM) mit 10% FCS und ebenfalls Penicillin und Streptomycin. Wenn die adhären wachsenden Zellen eine ungefähr 80%-ige Konfluenz erreichen, werden sie passagiert. Dazu werden die verwendeten Lösungen auf 37°C erwärmt. Der Zellrasen wird mit 1xPBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO BRL, #25300-054) bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Zellen sich ablösen. Es werden 4ml Kultur-Medium zugegeben. Von dieser Zellsuspension werden 1,5ml in eine neue 250ml-Gewebekulturflasche überführt und mit Kultur-Medium auf 15ml aufgefüllt. Die Zellen werden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die nächste Passage erfolgt nach zwei Verdopplungen der Zellzahl. Aufgrund der Generationszeit von 24h entspricht dies in ungefähr 48h.

PBS 8g NaCl
 0,2g KCl
 1,77g Na₂HPO₄*2H₂O
 0,24g KH₂PO₄
 ad 800ml ddH₂O
 pH7,4 mit HCl einstellen
 ad 1000ml ddH₂O
 autoklavieren und bei 4°C lagern

2.2.3.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen und Fluoreszenzmikroskopie

Die bei der Passage der Zelllinien erhaltene Zellsuspension wird für die Aussaat von Zellen für die Transfektion eingesetzt. Dazu werden 1ml Suspension auf 9ml Vollmedium bzw. 0,5ml Suspension auf 9,5ml Vollmedium gegeben. Jeweils 1ml von beiden Verdünnungen wird in zwei Kammern von einem Vierkammer-Deckglas (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und 24h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird Plasmid-DNA durch transiente Transfektion mit dem Transfektionsreagenz MetafecteneTM (Biontex, München) in die Zellen eingebracht. Das polykationische Transfektionsreagenz liegt in Kombination mit einem neutralen Colipid in liposomaler Form vor. Vor Beginn der Transfektion werden zwei Lösungen (A,B) hergestellt.

Lösung A: 50µl OptiMEM I (37°C)
1µg Plasmid-DNA
mischen durch auf- und abpipettieren

Lösung B: 50µl OptiMEM I (37°C)
6µl Metafectene
mischen durch auf- und abpipettieren

Die beiden Lösungen werden vereint, durch auf- und abpipettieren gemischt und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jeder Kammer der Deckgläser werden jeweils 25µl Transfektionsmix gegeben und die Zellen werden über Nacht inkubiert. Bei einem Teil der Versuche werden die Zellen mit dem Export-Inhibitor Leptomycin B (LMB) behandelt. Dazu wird der Überstand über den Zellen abgesaugt und durch 250µl Vollmedium mit LMB (20nM; 11ng/ml) ersetzt. Die anschließende Inkubation dauert 2, 6 oder 24h. Die Zellen werden mit Paraformaldehyd fixiert. Paraformaldehyd ist ein polymeres Formaldehyd, das benachbarte Proteine durch kovalente Bindung freier Aminogruppen vernetzt [Alberts et al., 1994, S. 142]. Der Überstand über den transfizierten Zellen in den Vierkammer-Deckgläsern wird abgesaugt. Es wird zweimal mit 1ml PBS gewaschen und anschließend werden 250µl 3% Paraformaldehyd (in PBS) pro Kammer zugegeben. Nach einer Inkubation von 10min bei 37°C sind die Zellen fixiert. 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) ist ein AT-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet und bei UV-Anregung (340 nm) mit einer Wellenlänge von 490 nm (blau) fluoresziert [Hennig, 1995, S. 116]. Die Zellen werden zweimal mit 1ml PBS gewaschen. Anschließend werden 250µl DAPI (10µg/ml in PBS) in jede Kammer gegeben und es wird 10min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Schließlich

Material und Methoden

wird erneut zweimal mit PBS gewaschen und jede Kammer mit PBS überschichtet. Die Präparate werden zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop mit 250µl PBS und zur längeren Aufbewahrung bei 4°C mit 1ml PBS überschichtet. Zur Auswertung werden die Präparate an einem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25 CFL (Zeiss, Jena) betrachtet. Zur Bilddokumentation dient eine digitale Kamera (Kappa DX30, Kappa, Gleichen) und es wird die Software Kappa ImageBase (Kappa, Gleichen) verwendet. Es werden von jeder Zelle jeweils zwei Aufnahmen mit unterschiedlichen Filtereinsätzen gemacht. Für die Detektion der EGFP-Fluoreszenz wird ein FITC-Filter (Exzitationsfilter 450-490, Strahlteiler FT-510, Emissionsfilter LP 520) und für die DAPI-Fluoreszenz wird ein DAPI-Filter (Exzitationsfilter G365, Strahlteiler FT-395, Emissionsfilter LP 420) verwendet. Die Aufnahmen erfolgen bei 1000-facher Vergrößerung (100x Ölimmersions-Objektiv, 10x Okular). Durch Doppelfluoreszenzbilder kann die Verteilung von zwei Fluorophoren in einer Zelle unmittelbar verglichen werden. Eine Aufnahme der EGFP- und eine Aufnahme der DAPI-Fluoreszenz, die den gleichen Bildausschnitt der gleichen Zellen zeigen, werden in Corel PhotoPaint 9 (Corel, Unterschleissheim) geladen. Die Intensitäten der beiden Einzelfluoreszenzbilder werden über die Registerkarte „Helligkeit-Kontrast-Intensität“ aneinander angeglichen. Das Doppelfluoreszenz-Kompositbild wird über die Registerkarte „Berechnungen“ durch die Funktion „Hinzufügen“ unter Verwendung aller Farbkanäle erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Zielsteuerung und *in vivo* Lokalisation der humanen Inositolphosphat Multikinase (HsIPMK)

3.1.1 Klonierung einer für die humane Inositolphosphat Multikinase kodierenden cDNA

Das multifunktionelle Hefeprotein ArgRIII ist nicht nur eine Inositolphosphat Multikinase [Saiardi et al., 1999], sondern auch ein Transkriptionsregulator und ein wichtiger Faktor im mRNA-Export [Shears, 2000]. Diese zusätzlichen Funktionen werden ermöglicht durch die nukleäre Lokalisation des Proteins, die bei der Hefe gezeigt werden konnte [El Bakkoury, 2000]. Ziel dieser Arbeit ist die Klonierung und Charakterisierung von homologen Genen aus Säugetieren.

Es wurde zunächst eine computergestützte Suche in Datenbanken für genomische Sequenzen des Menschen mit der bekannten Vollängen-Sequenz des ArgRIII-Proteins durchgeführt. Dabei wurde auf die Datenbank HTGS (High Throughput Genomic Sequence) zugegriffen, die humane genomische Sequenzen enthält. Der Zugriff erfolgte durch das Programm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) über den Server des National Center for Biological Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) [Altschul et al., 1990]. Es wurde die Suchfunktion tBLASTn gewählt. Bei dieser Funktion wird die eingegebene Aminosäuresequenz mit Nukleinsäuresequenzen verglichen, die in allen sechs möglichen Leserastern translatiert wurden. Der Chromosom 10 Klon RP11-637J22 (GenBank2 accession no. AL358155.10) weist deutliche Ähnlichkeiten zur Inositolphosphat Bindungsstelle von ArgRIII auf. Die chromosomale Lokalisation ist 10q21. Eine hypothetische cDNA-Sequenz wurde durch Analyse von putativen Spleißstellen im genomischen Klon assembliert. Sechs Exons tragen zur kodierenden Sequenz bei (siehe Abbildung 12). Das offene Leseraster kodiert für ein Protein von 416 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 47,219 kD. Auf Ebene der Aminosäuresequenz besteht eine Ähnlichkeit von 82% zur Ratten Inositolphosphat Multikinase (RnIPMK) (siehe Abbildung 13). Funktional wichtige Motive sind zwischen der HsIPMK und ArgRIII aus Hefe konserviert. Die höchste Ähnlichkeit wird in der Inositolphosphat Bindungsstelle gefunden. Die ATP-Bindungsstelle und die katalytisch wichtige SSSL-Domäne sind ebenfalls eindeutig konserviert (siehe Abbildung 14).

Expressed sequence tags (ESTs) sind durch automatisierte Sequenzierung von cDNA-Banken gewonnene, kurze Nukleotidsequenzen. Sie werden von verschiedenen am EST-Projekt

beteiligten Laboren gewonnen und in der Datenbank Genbank veröffentlicht [Adams et al., 1991, Boguski, 1995]. Mit der hypothetischen cDNA-Sequenz des Homologs von ArgRIII wurde die humane EST-Datenbank durchsucht. Dazu wurde das Programm BLAST und die Suchfunktion BLASTn benutzt. Diese Funktion dient der Suche mit einer Nukleotidsequenz gegen eine Datenbank mit Nukleotidsequenzen. Der cDNA Klon IMAGE:4510867 (GenBank2 accession no. BG258567) wurde vom IMAGE Konsortium [Lennon et al., 1996] bezogen. Die cDNA lag im Vektor pCMV-SPORT6 vor. Das Plasmid wurde durch

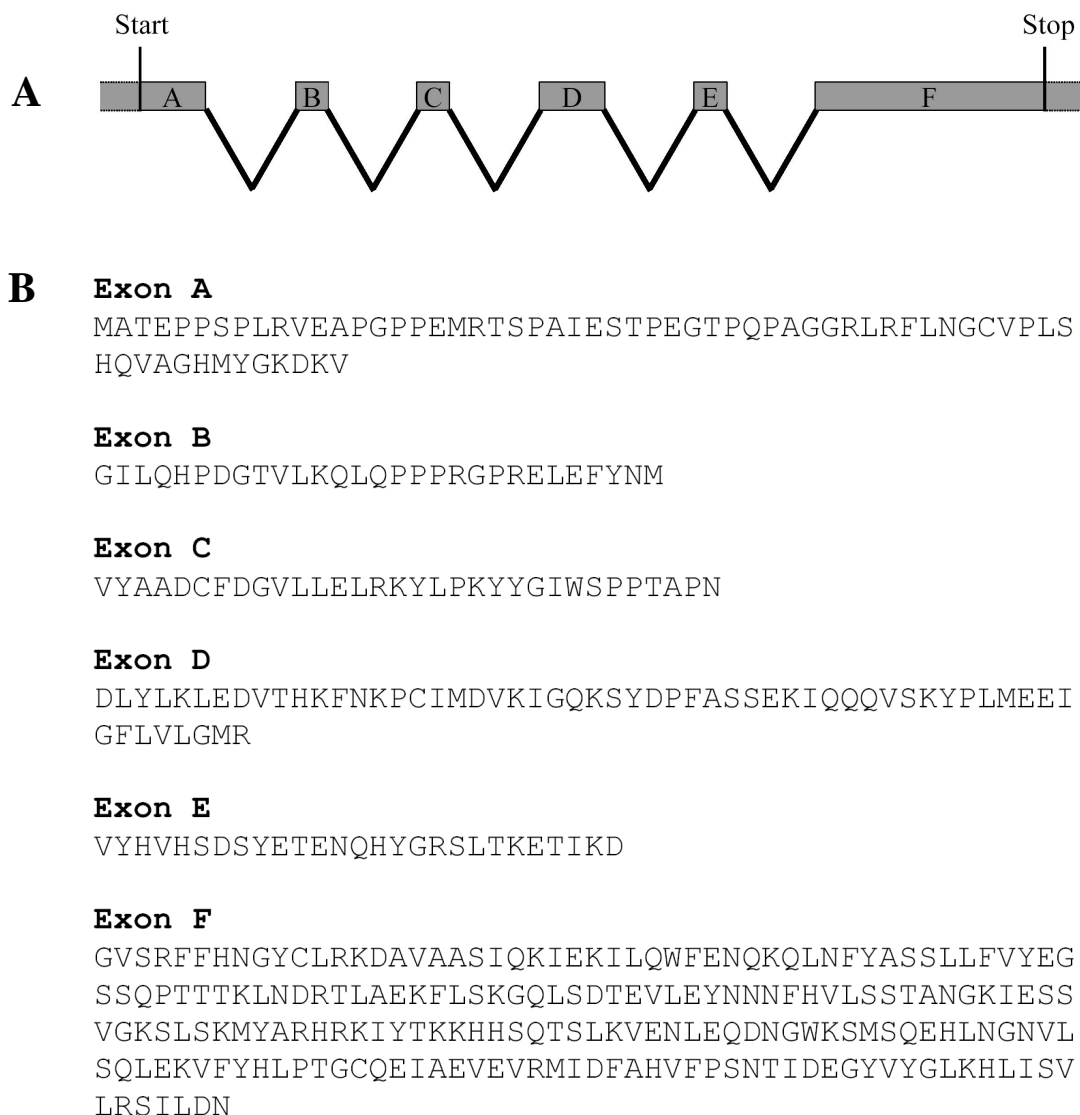


Abbildung 12: Genstruktur der HsIPMK

Die Sequenz des für die HsIPMK kodierenden Gens mit der chromosomalen Lokalisation 10q21 und von der entsprechenden cDNA wurden aufgeklärt. Die cDNA kodiert für ein Protein von 416 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 47 kDa. (A) Die Genstruktur wurde durch Untersuchung von putativen Spleißstellen und Assemblierung einer hypothetischen cDNA-Sequenz bestimmt. Sechs Exons von deutlich unterschiedlicher Größe tragen zur kodierenden Sequenz bei. Die Kästen stellen Exons und die Striche Introns dar. (B) Die von den Exons A bis F kodierten Aminosäurebereiche sind im Ein-Buchstaben-Kode dargestellt.

Minipräparation gewonnen und mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *Sall* verdaut. Die entsprechenden Schnittstellen flankieren das cDNA-Insert und der Verdau führt zu seiner Freisetzung. Die entstehenden Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (vgl. auch Abbildung 15). Das cDNA-Insert hat eine Größe von etwas mehr als 1500bp und kann somit die gesamte kodierende Sequenz der HsIPMK von ca. 1200bp tragen. Das Insert wurde vollständig sequenziert. Das offene Leseraster ist vollständig und entspricht der

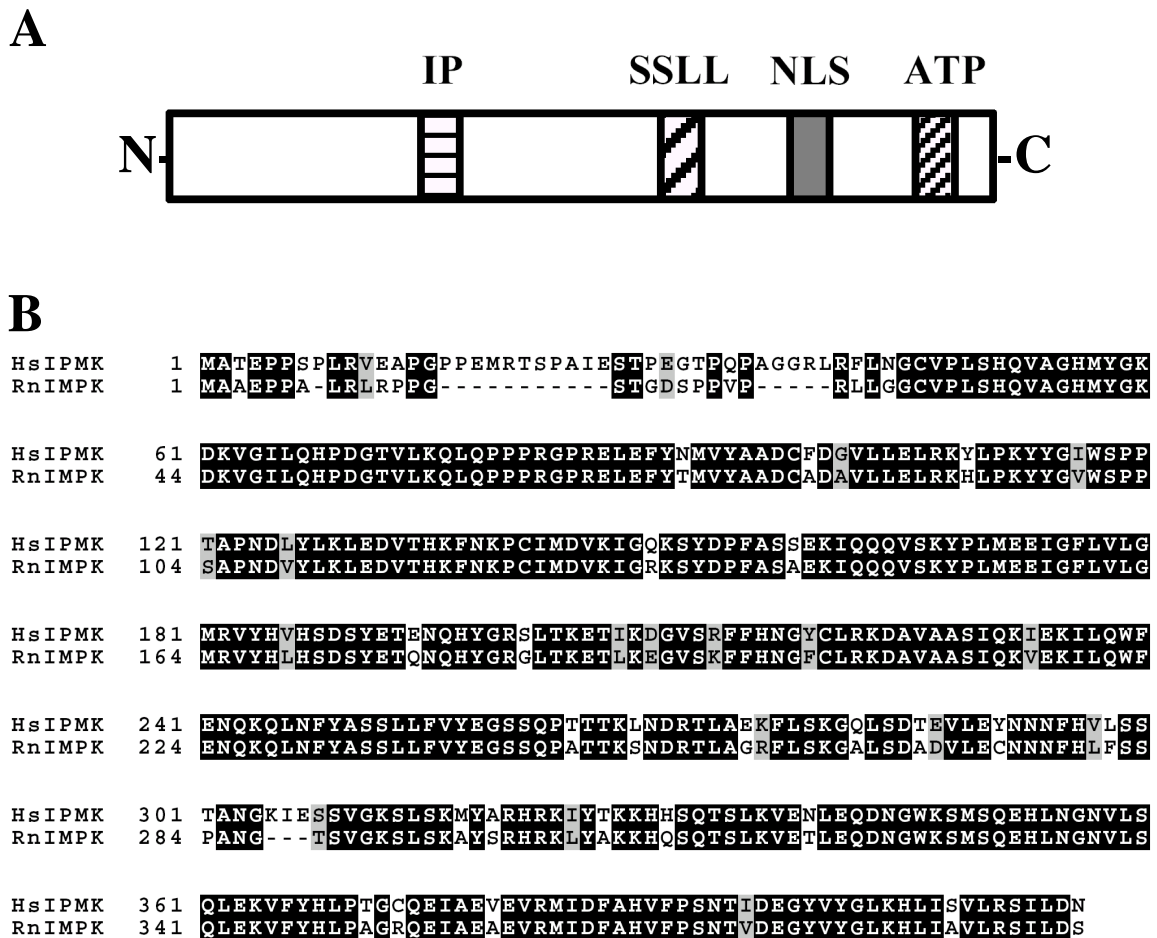


Abbildung 13: Humane Inositolphosphat Multikinase (HsIPMK)

Die cDNA der HsIPMK kodiert für ein Protein von 416 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 47 kDa. (A) Die HsIPMK kann in funktionale Domänen eingeteilt werden. Vom N- zum C-Terminus sind die Inositolphosphat-Bindungsdomäne (IP), die katalytisch wichtige SSSL-Domäne (SSLL), das Kernlokalisationsignal (NLS) und die ATP-Bindungsstelle (ATP) dargestellt. (B) Auf Ebene der Aminosäuresequenz besteht eine Ähnlichkeit von 82% zwischen der HsIPMK und dem homologen Protein aus Ratte (RnIPMK). Die Divergenzen befinden sich vor allem im äußersten N-terminalen Bereich, während weiter C-terminal die Ähnlichkeit bei über 90% liegt. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Kode dargestellt. Konservierte Reste werden als weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund und ähnliche Reste als weiße Buchstaben auf grauem Hintergrund gezeigt

hypothetischen cDNA-Sequenz. Es ist jedoch eine Ein-Basen-Insertion an der Nukleotid-Position 451 vorhanden, die zum Verlust des Leserasters und zu einem vorzeitigen Stopp-Kodon führt. Diese Insertion eines Adenosin-Nukleotids in einen Polyadenosin-Bereich wurde möglicherweise durch Slipping („Ausrutschen“) der Reversen Transkriptase verursacht. Die Insertion wurde durch Quikchange-Mutagenese der cDNA beseitigt. Das Protein wurde als humane Inositolphosphat Multikinase (HsIPMK) bezeichnet.

Inositolphosphat Bindungsstelle

				*		*	*	*															
ScArgRIII	126	K	P	N	I	L	D	I	K	L	G	K	T	L	Y	D	S	K	A	S	L	E	K
HsIPMK	139	K	P	C	I	M	D	V	K	I	G	Q	K	S	Y	D	P	F	A	S	S	E	K

SSLL Domäne

ScArgRIII	255	I	S	S	L	L	F	I	Y	E	G														
HsIPMK	249	Y	A	S	S	L	L	F	V	Y	E	G													

ATP Bindungsstelle

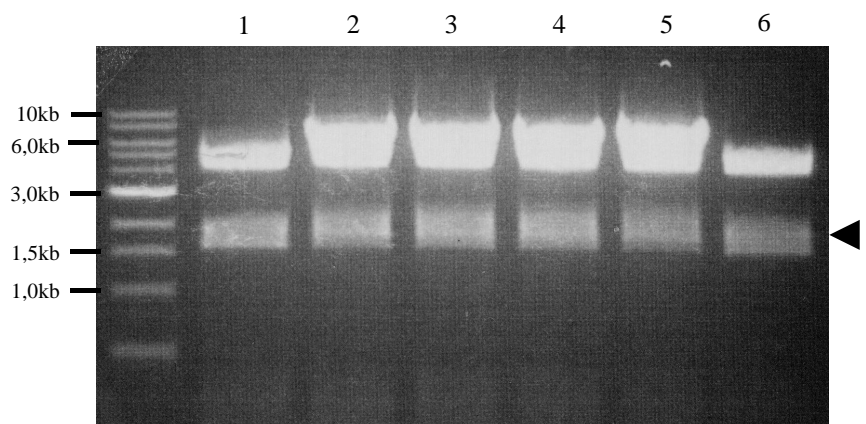
ScArgRIII	320	S	M	S	L	I	D	F	A	H																
HsIPMK	380	E	V	R	M	I	D	F	A	H																

Abbildung 14: Funktional wichtige Domänen der HsIPMK

Die lokalen Sequenzalignments zeigen funktional wichtige Abschnitte des Hefeproteins ArgRIII und die korrespondierenden Abschnitte der HsIPMK. Die Inositolphosphat Bindungsstelle, die katalytisch wichtige SSLL-Domäne und die ATP Bindungsstelle zeigen deutliche Ähnlichkeiten zwischen Hefe und humanem Protein. Die Nummern bezeichnen die Position der ersten gezeigten Aminosäure in der Primärsequenz des untersuchten Proteins. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Kode dargestellt. Konservierte Reste werden als weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund und ähnliche Reste als weiße Buchstaben auf grauem Hintergrund gezeigt. Die in allen untersuchten Spezies invariablen Reste in diesen Motiven sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Abbildung 15: Klonierungsvektor pCMV-SPORT6 trägt eine für die HsIPMK kodierende cDNA

Nach der reversen Transkription der für die HsIPMK kodierenden mRNA wurde die entstandene cDNA in dem Klonierungsvektor pCMV-SPORT6 über die Schnittstellen *NotI* und *Sall* zwischenkloniert. Der Vektor wurde vom IMAGE-Konsortium mit IMAGE:4510867 bezeichnet. Sechs Minipräparationen des Plasmids wurden mit *NotI/Sall* verdaut und die entstandenen Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der leere Vektor ist als Fragment von ca. 4,5kb Größe sichtbar, während die cDNA als Fragment von >1,5kb Größe (schwarzer Pfeil) beobachtet wird. Der kodierende Bereich der HsIPMK umfasst lediglich 1200bp. Zur Überprüfung wurde die klonierte cDNA sequenziert.



3.1.2 Vektoren zur eukaryotischen Expression von GFP-Fusionsproteinen der HsIPMK

Für die Untersuchung der *in vivo* Lokalisation wurden Vektoren hergestellt, die eine eukaryotische Expression von Fusionsproteinen der HsIPMK mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) ermöglichen. Es bietet sich eine Fusion des GFP entweder an den N- oder an den C-Terminus des zu untersuchenden Proteins an. Außerdem besteht die Möglichkeit, die für das GFP kodierende cDNA an beliebiger Stelle in die cDNA des zu untersuchenden Proteins einzufügen. Eine solche Insertion würde aber in den allermeisten Fällen zu einer schweren Störung der Proteinfaltung und damit zu einer Veränderung der räumlichen Struktur führen. Eine solche Vorgehensweise ist deshalb nur möglich, wenn die 3D-Struktur des Proteins vorliegt und man das GFP gezielt zwischen zwei exakt definierte Domänen einfügen kann. Da die Struktur der HsIPMK nicht bekannt ist, bietet sich die Fusion des GFP an einen Terminus an. Auch diese Vorgehensweise kann sich schädlich auswirken, da das GFP z.B. durch sterische Wechselwirkung die Erkennung eines Lokalisations-determinierenden Signals behindern kann [Illies, 2002]. Aus diesem Grunde wurden Vektoren für die Expression von Fusionsproteinen mit beiden Anordnungen von GFP und HsIPMK hergestellt. Eine Übereinstimmung der *in vivo* Lokalisation macht einen Einfluß des GFP unwahrscheinlich, da eine (mögliche) Störung der Lokalisation nicht bei beiden Anordnungen gleich sein sollte.

Die cDNA der HsIPMK wurde in die Vektoren pEGFP-N1 und pEYFP-C1 von Clontech umkloniert. Beide Vektoren sind für die eukaryotische Expression von Fusionsproteinen ausgelegt. Der Vektor pEGFP-N1 kodiert für ein Fusionsprotein mit C-terminalem GFP-Tag, der Vektor pEYFP-C1 für ein Fusionsprotein mit N-terminalem GFP-Tag.

3.1.2.1 Vektor für die eukaryotische Expression eines HsIPMK-Fusionsproteins mit GFP-Tag am N-Terminus

Für die Expression eines Fusionsproteins mit N-terminalem, spektral modifiziertem GFP-Tag wurde der Vektor pEYFP-C1 benutzt (siehe Abbildung 16). Es wurde eine Klonierungsstrategie mit den Schnittstellen *KpnI* und *BamHI* gewählt. Beide Schnittstellen sind in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors, aber nicht in der restlichen Vektorsequenz und auch nicht in der kodierenden Sequenz der HsIPMK vorhanden. Durch eine *Pfu*-PCR wurde unter Wahrung des Leserasters eine *KpnI* Schnittstelle am 5'-Ende und eine *BamHI* Schnittstelle am 3'-Ende der kodierenden Sequenz der HsIPMK eingefügt. Bei der PCR entstand ein Produkt von der erwarteten Größe von ca. 1200bp (siehe Abbildung 17A). Das PCR-Produkt wurde durch Ligation mit dem Vektor pGEM-Teasy

kloniert. Nach erfolgter Transformation konnte durch einen analytischen Verdau mit *KpnI/BamHI* die erfolgreiche Klonierung gezeigt werden (siehe Abbildung 17B). Der für die HsIPMK kodierende Sequenzbereich mit den eingefügten Schnittstellen wurde vollständig sequenziert, um durch die PCR ungewollt erzeugte Mutationen auszuschließen. Nun wurden sowohl der Vektor pGEM-Teasy mit der klonierten cDNA als auch der Vektor pEYFP-C1 im präparativen Maßstab mit *KpnI/BamHI* verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (siehe Abbildung 17C). Durch Ligation wurde die kodierende Sequenz der HsIPMK mit dem linearisierten Vektor pEYFP-C1 verbunden. Nach erfolgter Klonierung bestätigte ein analytischer Verdau mit *KpnI/BamHI* den korrekten Aufbau des Vektors (siehe Abbildung 17D), der pEYFP/HsIPMK genannt wurde.

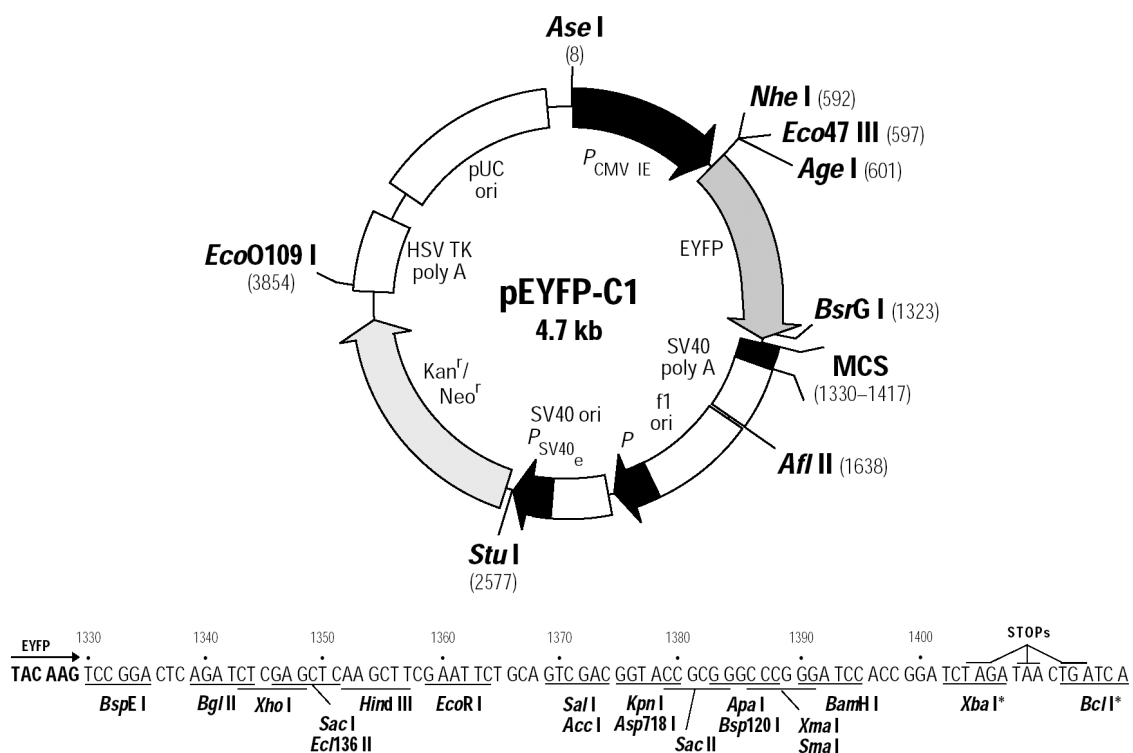


Abbildung 16: Vektor für die eukaryotische Expression von Fusionproteinen mit N-terminalem EYFP-Tag

Der Expressionsvektor pEYFP-C1 dient der eukaryotischen Expression von Fusionsproteinen, die N-terminal mit einem fluoreszierenden Protein als Tag versehen sind. Der Vektor kodiert für eine verbesserte gelb-grüne Variante (EYFP) des Grün Fluoreszierenden Proteins aus *Aequoria victoria*. Das Fluoreszenz-Exzitationsmaximum dieser Variante liegt bei 513nm und das Emissionsspektrum hat ein Maximum bei 527nm im Gelbgrünen. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) liegt zwischen der kodierenden Sequenz des EYFP und dem Stopp-Kodon. In die MCS klonierte Gene werden bei der Expression an den C-Terminus des EYFP fusioniert, wenn das Leseraster gewahrt bleibt und keine Stopp-Kodons im selben Leseraster vorliegen. Das EYFP bewahrt im Fusionsprotein seine Fluoreszenzeigenschaften und kann für *in vivo* Lokalisationsstudien benutzt werden. Der Vektor besitzt einen SV40 Origin (SV40 ori) für die Replikation und eine Neomycin Resistenz (Neo^r) für die Selektion in eukaryotischen Zellen. Außerdem bietet der Vektor einen pUC19 Origin (pUC19 ori) und eine Kanamycin Resistenz für die Vermehrung und Selektion in *E.coli* Zellen.

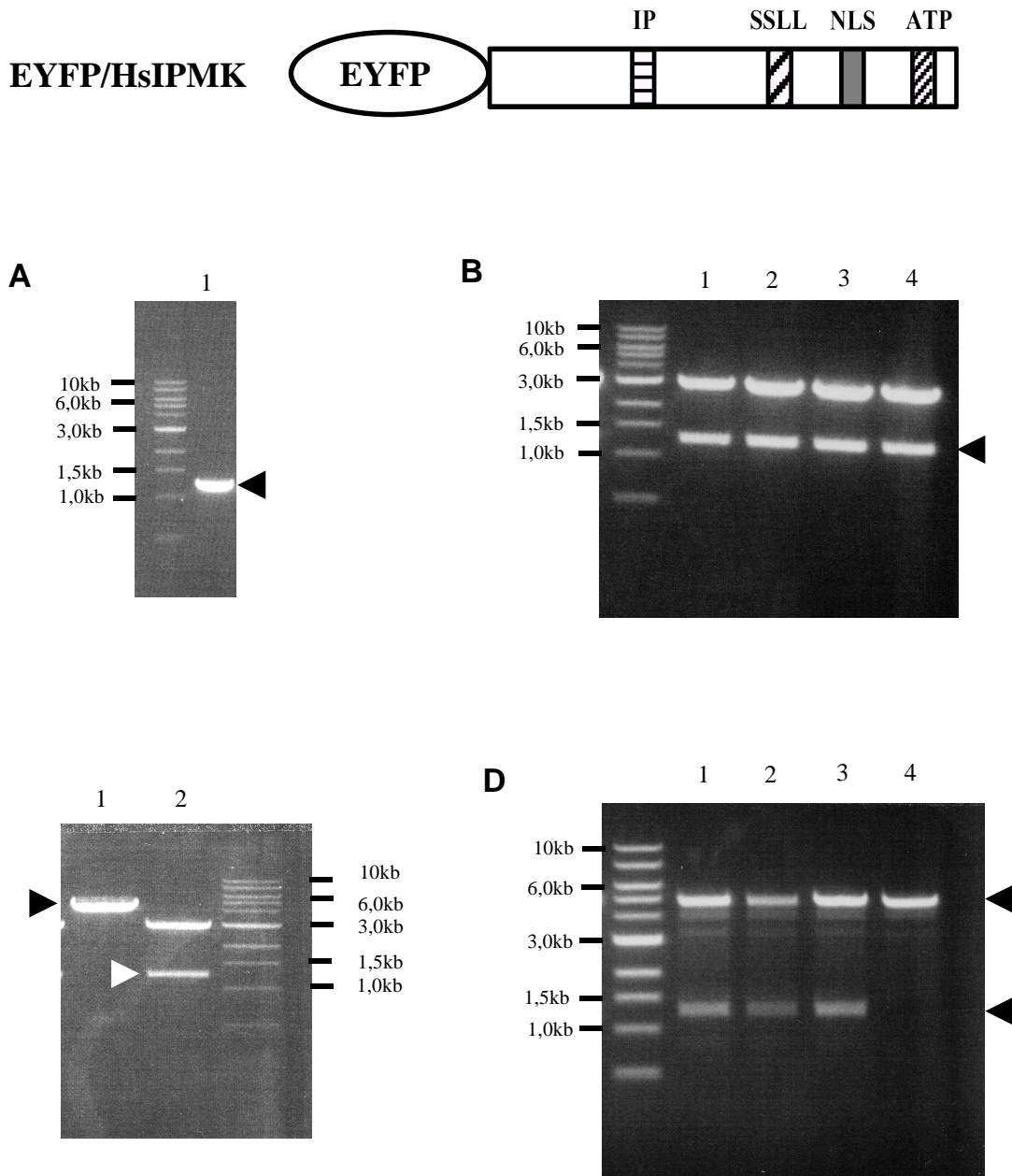


Abbildung 17: Herstellung eines Vektors für die eukaryotische Expression der HsIPMK mit N-terminalem EYFP

Die für die HsIPMK kodierende Sequenz wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor pEYFP-C1 umkloniert, um die HsIPMK an ihrem N-Terminus mit einem Grün Fluoreszierenden Protein zu fusionieren. (A) Die kodierende Sequenz wurde mit einer *Pfu*-PCR amplifiziert. Hierbei wurde unter Beachtung des Leserasters am 5'-Ende eine *KpnI* und am 3'-Ende eine *BamHI* Schnittstelle eingefügt. Das entstandene Fragment (Spur 1; schwarzer Pfeil) hat die erwartete Größe von ca. 1200bp. (B) Das PCR-Produkt wird im Klonierungsvektor pGEM-Teasy zwischenkloniert. Vier Minipräparationen (Spur 1 bis 4) des Vektors werden mit *KpnI/BamHI* verdaut. Nach der Auftrennung auf einem Agarosegel ist der leere Vektor als Fragment von ca. 3kb Größe und das erfolgreich klonierte PCR-Produkt als Fragment (schwarzer Pfeil) mit einer Größe von ca. 1200bp sichtbar. (C) Der Expressionsvektor pEYFP-C1 (Spur 1) und ein Minipräparationsprodukt aus Schritt B (Spur 2) wurden im präparativen Maßstab mit *KpnI/BamHI* verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der linearisierte Expressionvektor (schwarzer Pfeil) und die HsIPMK-cDNA (weißer Pfeil) werden aus dem Gel extrahiert und ligiert. (D) Vier Minipräparationsprodukte (Spur 1-4) des durch die Ligation in Schritt C gebildeten Expressionsvektors wurden zur Kontrolle mit *KpnI/BamHI* verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die durch erfolgreiche Ligation und Transformation entstandenen Produkte 1 bis 3 zeigen wie erwartet den leeren Vektor mit einer Größe von knapp 5kb und das cDNA-Insert mit einer Größe von ca. 1,2kb. Der Vektor wird als pEYFP/HsIPMK bezeichnet.

3.1.2.2 Vektor für die eukaryotische Expression eines HsIPMK-Fusionsproteins mit GFP-Tag am C-Terminus

Die angewandte Klonierungsstrategie für die Herstellung eines Vektors für die eukaryotische Expression eines HsIPMK-Fusionsproteins mit C-terminalem GFP-Tag nutzt den Vektor pEGFP-N1 (siehe Abbildung 18) und die Schnittstellen *NheI* und *BglIII*. Beide Schnittstellen sind in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors vorhanden, kommen aber in der restlichen Sequenz des Vektors und in der cDNA der HsIPMK nicht vor. Unter Anwendung einer *Pfu*-PCR wurde am 5'-Ende der kodierenden Sequenz der HsIPMK eine *NheI* und am 3'-Ende eine *BglIII* Schnittstelle unter Wahrung des Leserasters eingefügt (siehe Abbildung 19A). In einem Klonierungsschritt wurde das PCR-Produkt in den Vektor pGEM-Teasy durch Ligation eingefügt. Nach erfolgter Transformation wurde der Erfolg der

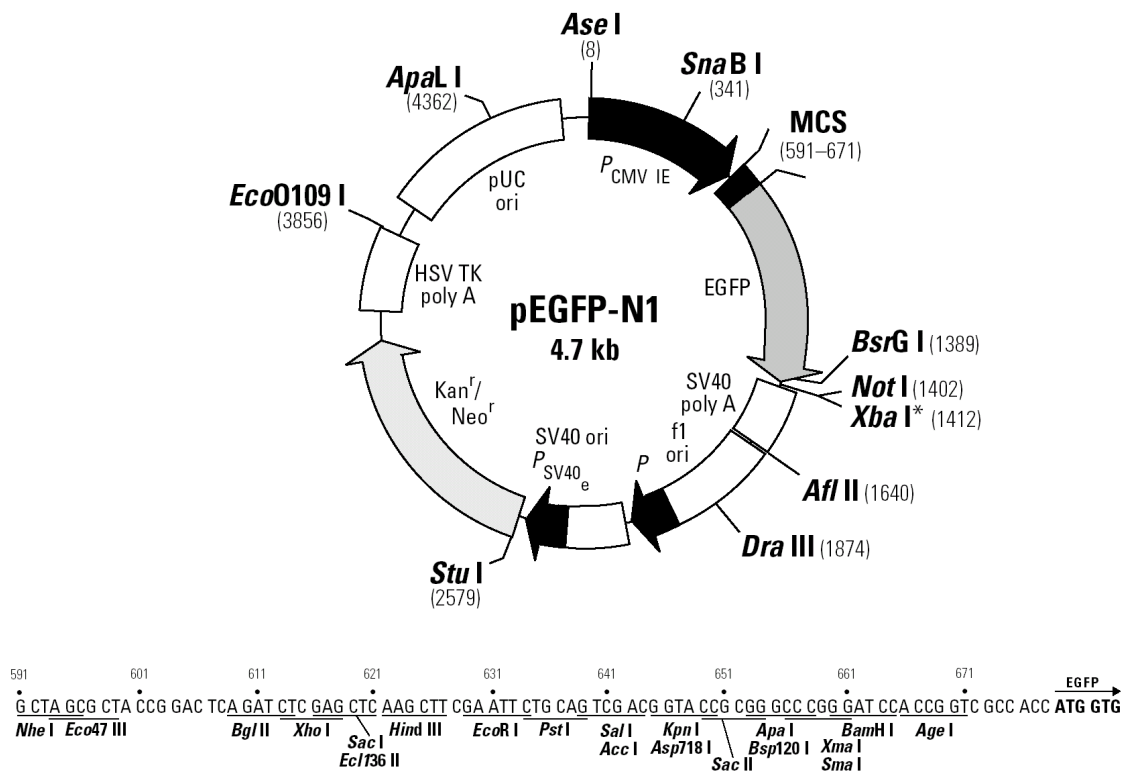


Abbildung 18: Vektor für die eukaryotische Expression von Fusionproteinen mit C-terminalem EGFP-Tag

Mit dem Vektor pEGFP-N1 können in eukaryotischen Zellen Fusionproteine mit dem Grün Fluoreszierenden Protein exprimiert werden, um deren *in vivo* Lokalisation zu untersuchen. Das fluoreszierende Protein behält auch nach der Fusion die Eigenschaften des nativen Proteins bei. Das Zielgen kann direkt in den Expressionsvektor kloniert werden. Es muss ein Start-ATG und es darf keine Stopp-Kodons enthalten. pEGFP-N1 kodiert für eine rot-verschobene Variante des Wildtyp GFP, die für stärkere Fluoreszenz und höhere Expression in eukaryotischen Zellen optimiert wurde. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) befindet sich zwischen dem Immediate Early Promotor ($P_{CMV IE}$) und der für das EGFP kodierenden Sequenz. SV40 Polyadenylierungssignale (SV40 Poly A) downstream vom EGFP Gen stellen eine korrekte Prozessierung des 3'-Endes der mRNA sicher. Der SV40 Replikationsorigin (SV40 ori) erlaubt die Replikation und eine Neomycin Resistenz-Kassette (Neo^R) die Selektion in eukaryotischen Zellen. Durch einen bakteriellen Promotor upstream von dieser Kassette wird eine Kanamycin-Resistenz bereit gestellt und ein pUC Ursprung der Replikation erlaubt die Vermehrung in *E.coli* Zellen.

Ergebnisse

Klonierung durch einen analytischen Verdau der gewonnenen Plasmide bestätigt (siehe Abbildung 19B). In einem anschließenden *NheI/BglII* Verdau im präparativen Maßstab wurden sowohl ein Vektor pGEM-Teasy mit kloniertem PCR-Produkt, als auch der Expressionsvektor pEGFP-N1 umgesetzt (siehe Abbildung 19C). Die entstandenen Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. Die Fragmente wurden ligiert und transformiert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch einen analytischen Verdau des erhaltenen Vektors bestätigt (siehe Abbildung 19D). Der erzeugte Vektor wurde pHsIPMK/EGFP genannt.

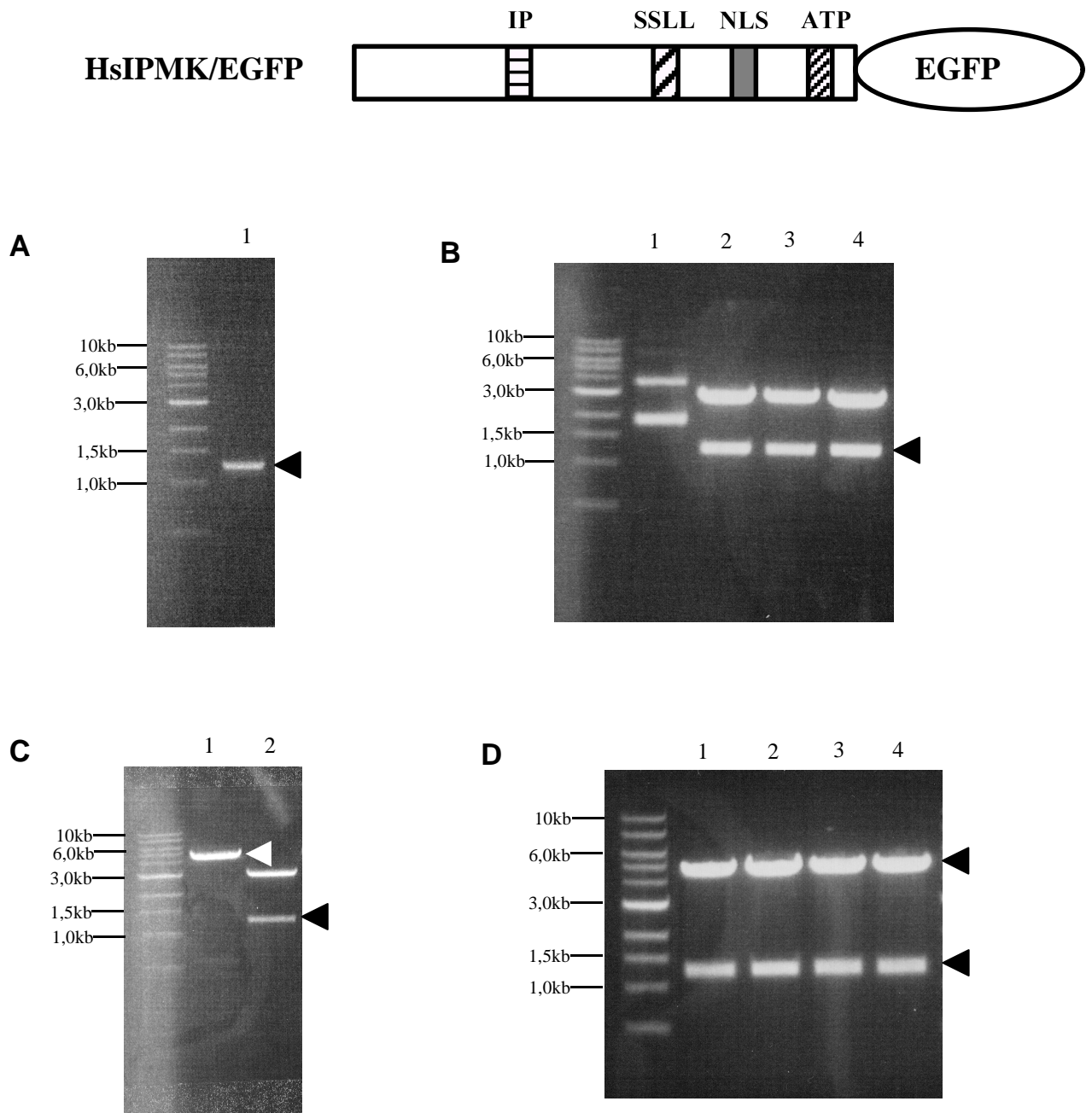


Abbildung 19: Herstellung eines Vektors für die eukaryotische Expression der HsIPMK mit C-terminalem EGFP

Der eukaryotische Expressionsvektor pEGFP-N1 wird benutzt, um die HsIPMK an ihrem C-Terminus mit dem Grün Fluoreszierenden Protein EGFP zu fusionieren. **(A)** Zunächst wurde mit einer *Pfu*-PCR die kodierende Sequenz der HsIPMK amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende eine *NheI* und am 3'-Ende eine *BglII* Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel (Spur 1) analysiert und hatte die erwartete Größe von 1200bp (schwarzer Pfeil). **(B)** Nach einer Gelextraktion wurde das Fragment mit dem Klonierungsvektor pGEM-Teasy ligiert und in *E.coli* Zellen transformiert. Vier Minipräparationsprodukte (Spur 1 bis 4) wurden mit *NheI* und *BglII* verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Produkte 2 bis 4 zeigen wie erwartet den leeren Vektor als Fragment von ca. 3kb Größe und die HsIPMK-cDNA als Fragment (schwarzer Pfeil) von ca. 1,2kb Größe. Durch Sequenzierung wurden unerwünschte Mutationen durch die PCR ausgeschlossen. **(C)** Der Vektor pEGFP-C1 (Spur 1) und ein Klonierungsvektor aus Schritt B wurden im präparativen Maßstab mit *NheI* und *BglII* verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der linearisierte Vektor (weißer Pfeil) mit der erwarteten Größe von ca. 5kb und die cDNA (schwarzer Pfeil) mit der erwarteten Größe von ca. 1,2kb wurden aus dem Gel extrahiert, ligiert und in *E.coli* Zellen transformiert. **(D)** Vier Minipräparationen des in Schritt C hergestellten Expressionsvektors wurden zur Kontrolle mit *NheI* und *BglII* verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Es lagen leerer Vektor mit einer Größe von ca. 5kb und die cDNA mit einer Größe von ca. 1,2kb vor. Die Herstellung des Expressionsvektors pHsIPMK/EGFP war erfolgreich.

3.1.3 Vektoren zur eukaryotischen Expression von GFP-Fusionsproteinderivaten der HsIPMK

Durch *in vivo* Lokalisationsstudien wurde gezeigt, dass sich in Säuger-Zellen exprimierte Fusionsproteine aus HsIPMK und GFP vorherrschend im Zellkern befinden (siehe Ergebnisse 3.1.4). Die Fusionsproteine können aufgrund ihres Molekulargewichts von ca. 75 kDa nicht passiv durch den Kernporenkomplex diffundieren [Cole et al., 1998]. Folglich muss ein aktiver nukleärer Import stattfinden. Für einen solchen Importmechanismus ist in den allermeisten Fällen eine Markierung des zu transportierenden Proteins mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) notwendig [Fontes et al., 2000]. Am besten untersucht sind das monopartite und das bipartite NLS, für die Konsensus-Sequenzen definiert worden sind (siehe Einleitung 1.3.1). Die Aminosäuresequenz der HsIPMK enthält jedoch keine Bereiche, die dem einen oder anderen Konsensus exakt entsprechen. Es sind jedoch eine Vielzahl von nicht-klassischen NLS beschrieben [Christophe et al., 2000]. Diese gehorchen zwar keiner exakten Konsensus-Sequenz, sind aber durch kurze Abschnitte mit vielen basischen Aminosäuren (Lysine und Arginine) charakterisiert. Im C-terminalen Bereich der HsIPMK (Aminosäure 320-328) befindet sich ein solcher Abschnitt mit fünf basischen Aminosäuren in einem Segment von neun. Außerdem ist die Position der basischen Reste konserviert zwischen diesem Fragment und einem Fragment des humanen c-Myc Proteins, das erwiesenermaßen eine NLS-Aktivität besitzt [Dang & Lee, 1988] (siehe Abbildung 20).

Der Effekt von diesem mutmaßlichen NLS auf die zelluläre Topologie der HsIPMK sollte weitergehend untersucht werden. Hierzu musste geklärt werden, ob dieser Sequenzabschnitt notwendig und hinreichend für die beobachtete Lokalisation des Proteins ist. Die Untersuchung von verkürzten Fragmenten ist eine Möglichkeit, um den hinreichenden Charakter des Lokalisationssignals zu untersuchen. Das Fragment allein sollte nach Fusion mit einem Tag wie z.B. GFP in der Lage sein, das Fusionsprotein in den Kern zu steuern. Unter Umständen sind hierzu aber auch flankierende Bereiche der Signalsequenz notwendig, um eine korrekte räumliche Struktur des Lokalisationssignals zu garantieren. Die Lokalisation von Deletionsmutanten gibt Aufschluss darüber, ob das Signal notwendig für die beobachtete Zielsteuerung ist. Ein Vollängen-Protein mit deletiertem Lokalisationssignal sollte in diesem Fall nicht mehr die für die Volllänge beschriebene Lokalisation ausweisen. Bei diesem Ansatz sollten unterschiedliche Grenzen für die Deletionen gewählt werden, um die Gefahr von Veränderungen der räumlichen Struktur zu vermindern. Eine übereinstimmende Lokalisation von verschiedenen Deletionsmutanten ist ein Hinweis, dass die beobachteten Effekte nicht durch eine Beeinträchtigung der Struktur verursacht werden. Trotzdem besteht aber immer die

Möglichkeit, dass die Deletionen zu einer Veränderung in der räumlichen Struktur und einer damit verbundenen Behinderung des Zugangs von Importinen (siehe Einleitung 1.3.1) zum NLS führen. Durch eine solche sterische Maskierung des NLS würden die gleichen Effekte verursacht werden wie durch seine direkte Deletion. Eine bessere Strategie ist deshalb die Mutation von basischen Resten zu polaren nicht-basischen Resten, die den ausgetauschten Resten in ihren sterischen Ansprüchen und in ihrer Hydrophilie ähneln. Es ist unwahrscheinlich, dass eine solche funktionale Ausschaltung des NLS Auswirkungen auf die Faltung des Proteins hat. Ein übereinstimmendes Lokalisationsverhalten von unterschiedlichen Deletions- und Punktmutanten würde überzeugend zeigen, inwieweit das Lokalisationssignal hinreichend und/oder notwendig ist für die beobachtete Zielsteuerung des Proteins.

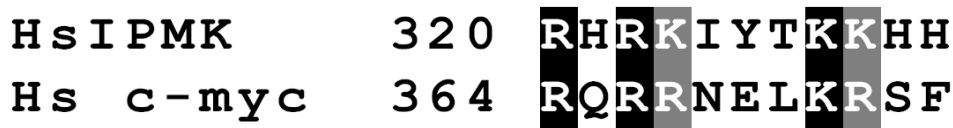


Abbildung 20: Funktionales Kernlokalisierungssignal (NLS) der HsIPMK

Die HsIPMK besitzt in ihrem C-terminalen Bereich ein funktionales NLS. Das lokale Sequenzalignment zeigt das NLS der HsIPMK zusammen mit einer Sequenz im humanen c-Myc Protein, die eine schwache NLS Aktivität besitzt. Die Nummern bezeichnen die Position der ersten gezeigten Aminosäure in der Primärsequenz des untersuchten Proteins. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Kode dargestellt. Konservierte Reste werden als weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund und ähnliche Reste als weiße Buchstaben auf grauem Hintergrund gezeigt.

3.1.3.1 Vektoren für die eukaryotische Expression von Fragmenten der HsIPMK mit GFP-Tag

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob das putative NLS im C-terminalen Bereich hinreichend für eine nukleäre Lokalisation ist. Verschiedene Fragmente mit unterschiedlich großen flankierenden Bereichen wurden N-terminal mit EYFP fusioniert. Die flankierenden Bereiche wurden in die Fragmente miteinbezogen, da sie unter Umständen eine Rolle für die räumliche Struktur des Lokalisationssignals spielen und ihr Fehlen zur Proteinmissfaltung führen könnte. Für die Proteinabschnitte von Aminosäure 263-370 bzw. 308-341 kodierende DNA-Fragmente wurden durch *Pfu*-PCR amplifiziert (siehe Abbildung 21), in einem Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Am 5'-Ende wurde durch die PCR eine *KpnI* und am 3'-Ende eine *BamHI* Schnittstelle eingefügt. Diese Fragmente wurden in pGEM-Teasy kloniert und sequenziert. Anschließend wurden sie durch

KpnI/BamHI-Verdau in pEYFP-C1 umkloniert. Die entstandenen Vektoren wurden mit pEYFP/HsIPMK(263-370) und pEYFP/HsIPMK(308-341) bezeichnet. Ein Vektor für die Expression des Proteinsabschnitts von Aminosäure 320-330 wurde durch Oligonukletid-Ligation hergestellt. Durch Zusammenlagerung von zwei synthetischen Oligonukleotiden entstand ein DNA-Fragment, das für die entsprechenden Aminosäuren kodiert und am 5'-Ende eine *KpnI* und am 3'-Ende eine *BamHI* Schnittstelle enthält. Dieses Fragment wurde mit einem *KpnI/BamHI* geschnittenen Vektor pEYFP-C1 ligiert und in *E.coli* Zellen transformiert. Der gewonnene Vektor wurde sequenziert und als pEYFP/HsIPMK(320-330) bezeichnet.

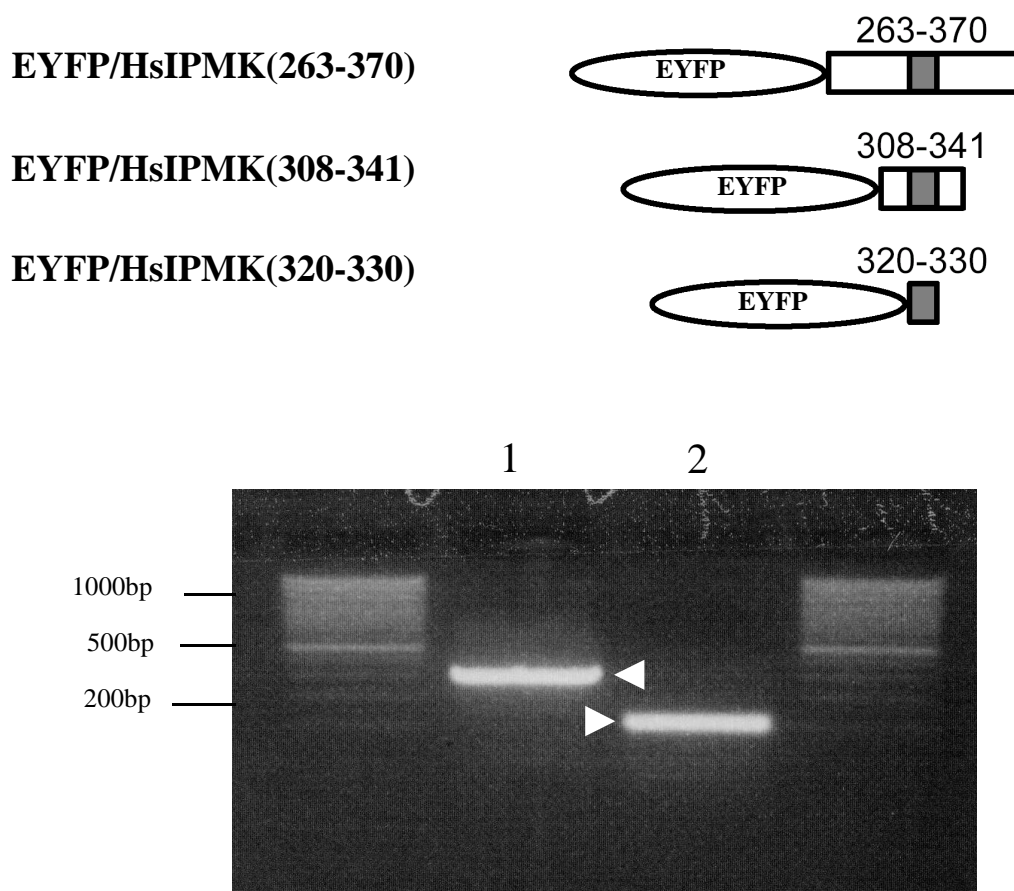


Abbildung 21: Herstellung von Vektoren für die eukaryotische Expression von Fragmenten der HsIPMK mit N-terminalem EYFP

Es wurden Teilbereiche der für die HsIPMK kodierenden cDNA durch eine *Pfu*-PCR amplifiziert. Diese Bereiche kodieren für Fragmente, die in zentraler Position das NLS tragen und von unterschiedlich langen, flankierenden Bereichen umgeben sind. Die Fragmente sind durch Kästen dargestellt; das NLS ist grau gefärbt. Außerdem wurden durch die PCR am 5'-Ende eine *KpnI* und am 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Fragment in Spur 1 (weißer Pfeil) hatte eine Größe von ca. 300bp und kodiert für die Aminosäuren 263-370, während das Fragment in Spur 2 (weißer Pfeil) mit einer Größe von ca. 100bp für die Aminosäuren 308-341 kodiert. Die PCR-Produkte wurden im Klonierungsvektor pGEM-Teasy zwischenkloniert und mit einer *KpnI/BamHI* Strategie in den eukaryotischen Expressionsvektor pEYFP-C1 umkloniert. Ein Fragment, das für die Aminosäuren 320-330 kodiert, wurde durch Zusammenlagerung von Oligonukleotiden erzeugt und direkt mit dem linearisierten Vektor ligiert. Die erzeugten Expressionsvektoren werden mit pEYFP/HsIPMK(263-370), pEYFP/HsIPMK(308-341) und pEYFP/HsIPMK(320-330) bezeichnet.

3.1.3.2 Vektoren für die eukaryotische Expression von Deletionsmutanten der HsIPMK mit GFP-Tag

In diesem Abschnitt der Studie sollte untersucht werden, ob das putative Lokalisationssignal im C-terminalen Bereich der HsIPMK notwendig ist für die fast ausschließlich nukleäre Lokalisation des Proteins. Das putative NLS wurde zusammen mit unterschiedlich großen flankierenden Bereichen (Aminosäuren 308-341 bzw. 320-330) deletiert. Diese Deletionen tragenden Vollängenproteine wurden N-terminal mit EYFP markiert. Durch eine Deletion wird ein drastischer Eingriff vorgenommen, der die räumliche Struktur eines Proteins

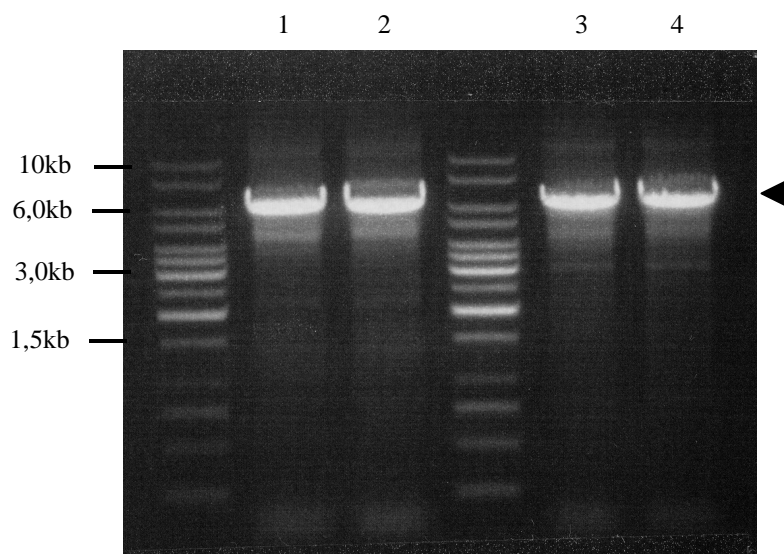
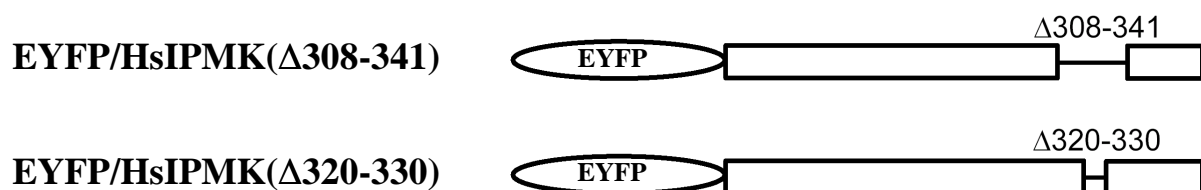


Abbildung 22: Herstellung von Vektoren für die eukaryotische Expression von Deletionsmutanten der HsIPMK mit N-terminalem EYFP

Unterschiedliche Abschnitte im C-terminalen Bereich der HsIPMK wurden durch erweiterte Quikchange Mutagenese deletiert. Die deletierten Sequenzabschnitte tragen in zentraler Position das NLS und sind von unterschiedlich langen flankierenden Sequenzen umgeben. Durch Quikchange Mutagenese wurden die für die Aminosäuren 308-341 bzw. für die Aminosäuren 320-330 kodierenden Nukleotide entfernt. Ein Teil der Ansätze wurde vor (Spur 1 und 3) bzw. nach dem Verdau mit *DpnI* (Spur 2 und 4) auf einem Agarosegel aufgetrennt. Durch den *DpnI* Verdau wird die für die Mutagenese verwendete (methylierte) DNA-Matrize abgebaut, während die (nicht-methylierten) Mutagenese Produkte erhalten bleiben. Die PCR-Produkte (schwarzer Pfeil) haben die erwartete Größe von ca. 6kb und wurden durch Transformation in *E.coli* Zellen vermehrt. Die erzeugten Vektoren wurden mit pEYFP/HsIPMK(Δ 308-341) und pEYFP/HsIPMK(Δ 320-330) bezeichnet.

maßgeblich verändern kann. Aus diesem Grunde wurden die Deletionen so gewählt, das (laut Sekundärstrukturvorhersage) keine α -Helices oder β -Faltblätter unterbrochen werden. Aus diesem Grunde wurden unterschiedliche Grenzen bei den verschiedenen Deletionsmutanten gewählt, um einen Effekt durch die Unterbrechung einer Sekundärstruktur auszuschließen. Die Deletionen wurden durch erweiterte Quikchange-Mutagenese in den Vektor pEYFP/HsIPMK eingefügt. Ein Teil des Mutageneseansatzes wurde vor bzw. nach dem *DpnI* Verdau auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 22). Anschließend wurde der mutierte Vektor in *E.coli* Zellen transformiert, durch Minipräparation gewonnen und sequenziert. Die hergestellten Vektoren wurden mit pEYFP-HsIPMK(Δ 308-341) und pEYFP-HsIPMK(Δ 320-330) bezeichnet.

3.1.3.3 Vektoren für die eukaryotische Expression von Substitutionsmutanten der HsIPMK mit GFP-Tag

Es wurden bereits Deletionsmutanten hergestellt, um die Bedeutung des putativen Lokalisationssignals im C-terminalen Bereich der HsIPMK für die Zielsteuerung des Proteins zu bestimmen. Deletionen sind jedoch massive Eingriffe und können zu Veränderungen der räumlichen Struktur eines Proteins führen. Durch eine solche Maskierung kann der Zugang von Importinen (siehe Einleitung 1.3.1) zum Kernlokalisationsignal behindert werden. Die Kernimport-Aktivität erlischt in einem solchen Fall ohne eine direkte Deletion des Lokalisationssignals. Eine bessere Alternative ist deshalb der Austausch von einzelnen Aminosäuren unter Wahrung des sterischen Anspruchs und der Hydrophilie. Nicht-klassische Kernlokalisationsignale sind gekennzeichnet durch eine Anhäufung von basischen Resten (Lysine und Arginine). Bei einem Austausch von diesen gegen polare, nicht-basische Reste (z.B. Glutamine) bleibt der Charakter der Aminosäuren erhalten, so dass Auswirkungen auf die Proteinstruktur unwahrscheinlich sind. Die Funktion des Kernlokalisationsignals geht jedoch verloren, da es nicht mehr von den entsprechenden Importinen erkannt [Fontes et al., 2000] und in den Zellkern transportiert wird. Es wurden zwei Mutanten hergestellt, in denen jeweils die basischen Reste in einem Dipeptid-Segment zu Glutamin-Resten mutiert sind ($R^{322}K \rightarrow QQ$; $K^{327}K \rightarrow QQ$). Die Substitution erfolgte durch Quikchange-Mutagenese des Vektors pEYFP-HsIPMK. Ein Teil des Mutagenese-Ansatzes wurde vor bzw. nach dem *DpnI* Verdau auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt (siehe Abbildung 23). Die mutierten Vektoren wurden durch Transformation in *E.coli* Zellen eingebracht, durch Minipräparation gewonnen und sequenziert. Die Vektoren wurden als pEYFP-HsIPMP($R^{322}K \rightarrow QQ$) und pEYFP-HsIPMP($K^{327}K \rightarrow QQ$) bezeichnet.

Zusätzlich wurde ein weiteres basisches Cluster (Aminosäuren 107-112) in der HsIPMK mit drei basischen Aminosäuren in einem Segment von sechs aufgefunden und durch Substitution von basischen Resten in einem Dipeptid-Segment funktional ausgeschaltet. Durch Quikchange-Mutagenese des Vektors pEYFP-HsIPMK wurde der Vektor pEYFP-HsIPMK(K¹⁰⁷K→QQ) erzeugt. Aus diesem Vektor wurde durch einen weiteren Quikchange-Mutagenese-Schritt der Vektor pEYFP-HsIPMP(K¹⁰⁷K→QQ / K³²⁷K→QQ) abgeleitet.

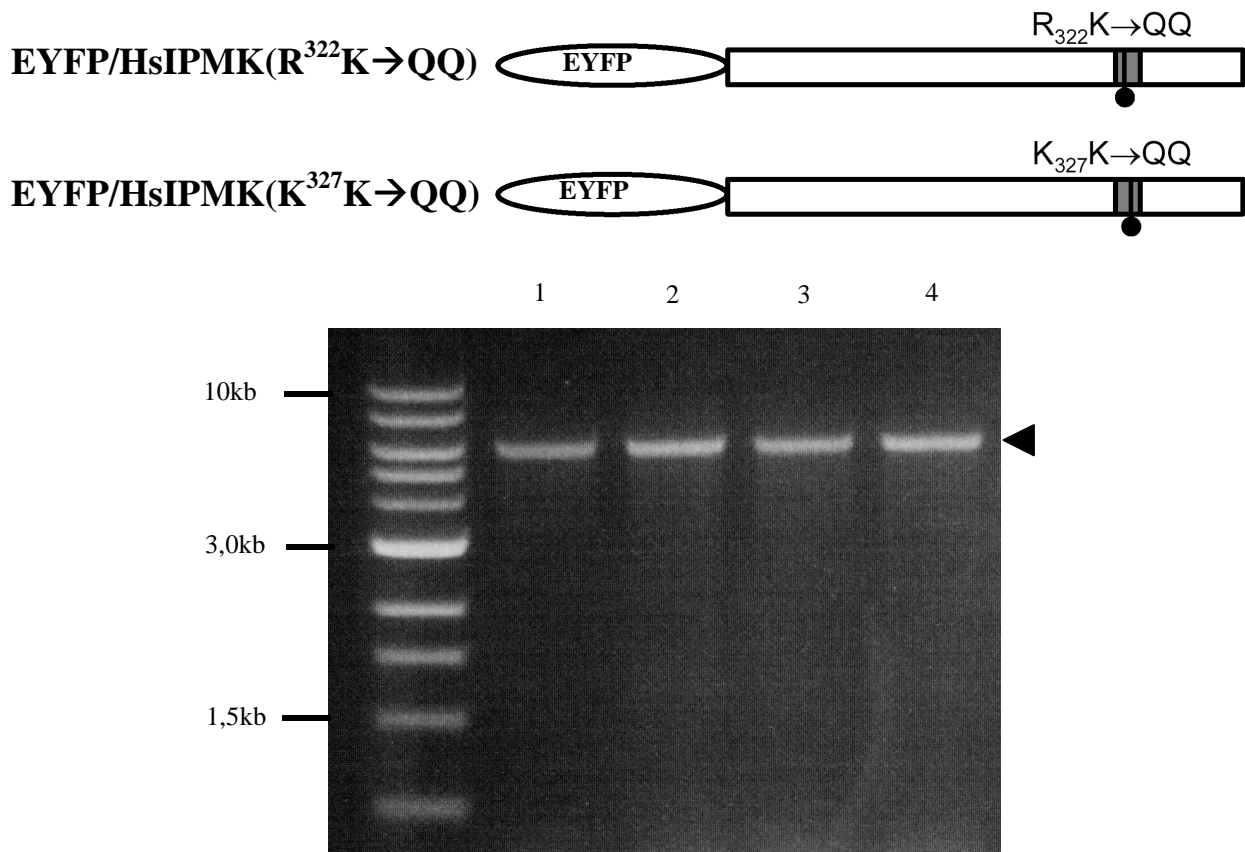


Abbildung 23: Herstellung von Vektoren für die eukaryotische Expression von Substitutionsmutanten der HsIPMK mit N-terminalem EYFP

Die Substitution von einzelnen basischen Aminosäuren gegen polare nicht-basische Aminosäuren ist insbesondere im Vergleich zu Deletionen ein schonender Eingriff. Eine drastische Auswirkung auf die räumliche Struktur des Proteins ist deshalb unwahrscheinlich. Es wurden die basischen Aminosäuren (Lysine und Arginine) in Dipeptid-Segmenten des NLS gegen Glutamine ausgetauscht, da dieser Rest einen ähnlichen sterischen Anspruch und eine ähnliche Hydrophilie besitzt. Die Doppelsubstitution von R³²²K zu QQ bzw. K³²⁷K zu QQ erfolgte durch Quikchange Mutagenese. Die Agarosegelelektrophorese zeigt die Mutagenese-Produkte mit der erwarteten Größe von ca. 6kb (schwarzer Pfeil) vor (Spur 1 und 3) bzw. nach *DpnI* Verdau (Spur 2 und 4). Die mutierten Expressionsvektoren wurden in *E.coli* Zellen transformiert, durch Minipräparation gewonnen und pEYFP/HsIPMK(R³²²K→QQ) bzw. pEYFP/HsIPMK(K³²⁷K→QQ) genannt.

3.1.4 *in vivo* Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Vollängen HsIPMK

Die im vorhergehenden Abschnitt 3.1.2 beschriebenen eukaryotischen Expressionsvektoren kodieren für GFP-Fusionsproteine der Vollängen HsIPMK und werden eingesetzt, um die *in vivo* Lokalisation des Proteins zu bestimmen. Durch die Expression einer mit N-terminalem (EYFP-HsIPMK) und einer mit C-terminalem Tag (HsIPMK-EGFP) markierten HsIPMK sollten mögliche Einflüsse des Grün Fluoreszierenden Proteins auf die intrazelluläre Verteilung bestimmt werden. Das GFP könnte z.B. durch sterische Hinderung einen für die Zielsteuerung notwendigen Sequenzbereich maskieren und dadurch die *in vivo* Lokalisation verändern [Illies, 2002]. Es ist unwahrscheinlich, dass der Tag unabhängig vom für die Fusion benutzten Terminus den gleichen Effekt auf die Lokalisationsvorgänge hat.

Die eukaryotischen Expressionsvektoren (pEYFP-HsIPMK, pHsIPMK-EGFP) wurden durch liposomale Transfektion in zwei verschiedene Zelllinien eingebracht. In den transfizierten Zellen kodieren die Vektoren für die entsprechenden Fusionsproteine, die mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht wurden. Zum Zwecke der Gegenfärbung wurde die DNA des Zellkerns mit DAPI markiert. Die beiden Fluoreszenzaufnahmen wurden zu einem Doppelfluoreszenzbild vereinigt. Es wurden NRK 52E und PC12 Zellen verwendet, um Zelllinien-abhängige Effekte bei den Lokalisationsmechanismen zu untersuchen. NRK 52E Zellen (normal rat kidney) sind aus Epithelzellen des proximalen Tubulus der Rattenniere hervorgegangen. PC12 Zellen stammen von einem Phäochromocytom des Nebennierenmarks der Ratte ab und haben sich viele Charakteristika der chromaffinen Zellen erhalten (vgl. Material&Methoden 2.1.2). Eine ähnliche *in vivo* Lokalisation in beiden Zelllinien wäre ein Hinweis auf einen nicht-gewebespezifischen Lokalisationsmechanismus bei der Zielsteuerung der HsIPMK. Zur Kontrolle wurden die Zellen auch mit den leeren Vektoren pEYFP-C1 und pEGFP-N1 transfiziert, um die *in vivo* Lokalisation der Grün Fluoreszierenden Proteine EYFP und EGFP allein zu untersuchen. Durch diese Kontrollen sollte ausgeschlossen werden, dass eine beobachtete Zielsteuerung der Fusionsproteine durch den Tag und nicht durch das untersuchte Protein verursacht wird.

Das Fusionsprotein aus HsIPMK und einem N-terminalen EYFP-Tag (EYFP/HsIPMK) zeigte nach der Transfektion von NRK 52E Zellen eine vorherrschend nukleäre Lokalisation (siehe Abbildung 24). Der überwiegende Teil der Fluoreszenz war in einem Organell lokalisiert, das durch Gegenfärbung mit DAPI eindeutig als Zellkern identifiziert werden konnte. Auch ein Fusionsprotein mit der umgekehrten Anordnung von HsIPMK und Tag wurde in NRK 52E Zellen exprimiert. Die HsIPMK war hierzu an ihrem C-Terminus mit dem Grün

Fluoreszierenden Protein EGFP fusioniert worden (HsIPMK/EGFP). Auch bei der Transfektion mit diesem Konstrukt wurde eine vorherrschend nukleäre Lokalisation beobachtet (siehe Abbildung 24); aber die Transfektionseffizienz war deutlich verringert. Die EYFP allein exprimierenden Kontrollzellen zeigten wie zu erwarten eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz über Zellkern und Zytoplasma.

Mit den verschiedenen Konstrukten wurden ebenfalls PC12 Zellen transfiziert, um eine mögliche Abhängigkeit des Lokalisationsverhaltens von der Zelllinie zu untersuchen. Die Fusionsproteine (EYFP/HsIPMK; HsIPMK/EGFP) zeigten unabhängig von der Positionierung des Tags am N- oder C-Terminus eine vorherrschend nukleäre Lokalisation (siehe Abbildung 25). Durch Gegenfärbung mit DAPI wurde die Position des Zellkerns im Vergleich zu der GFP-Fluoreszenz bestimmt. Die Transfektionseffizienz war beim Konstrukt mit dem C-terminalen Tag deutlich verringert. Das zur Kontrolle exprimierte EYFP zeigte, wie aufgrund des geringen Molekulargewichts erwartet, eine gleichmäßige Verteilung über die Zelle.

Die Ergebnisse der Transfektionsversuche stimmen bei NRK 52E- und PC12-Zellen überein. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf Zelllinien-unabhängige Zielsteuerungsmechanismen für die Lokalisation der HsIPMK. Bei den weiteren Untersuchungen wurden ausschließlich NRK 52E-Zellen verwendet. Die Positionierung des Tags am N- bzw. C-Terminus der HsIPMK hat anscheinend keinen Einfluss auf die Zielsteuerung des Proteins. Eine C-terminale Lokalisation des EGFP im Fusionsprotein scheint aber die Effizienz der Expression zu verringern. Aus diesem Grunde wurde bei den weiteren Versuchen ausschließlich mit dem N-terminalen Tag gearbeitet.

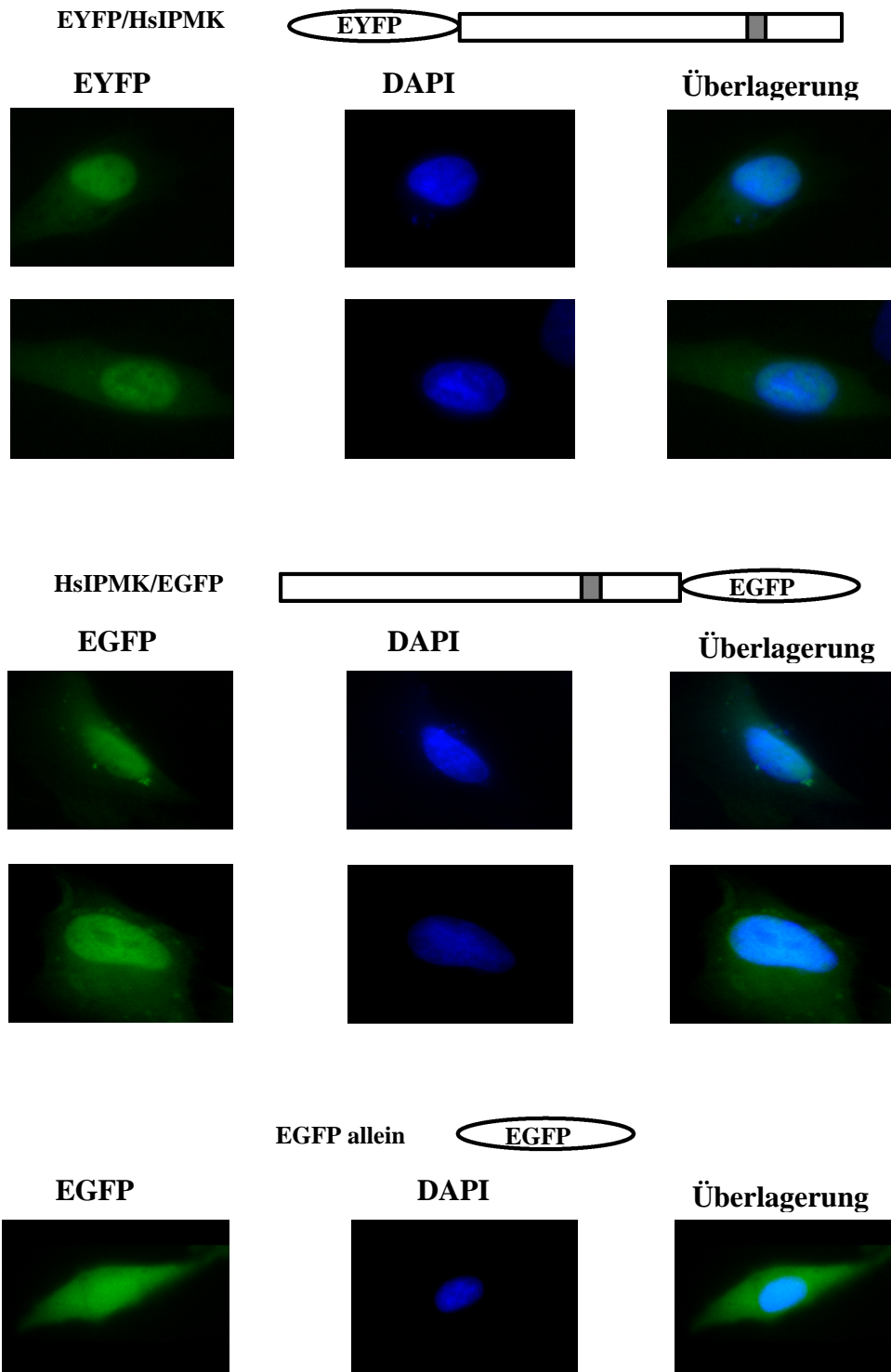


Abbildung 24: Expression der Vollängen-HsIPMK in NRK 52E Zellen

In transient transfizierten NRK 52E Zellen wurde mit Hilfe von eukaryotischen Expressionsvektoren das Vollängen-Protein der HsIPMK exprimiert. Die HsIPMK ist mit einem Grün Fluoreszierenden Protein am N-Terminus (EYFP/HsIPMK) bzw. C-Terminus (HsIPMK/EGFP) markiert worden, um die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins (grün) durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmen zu können. Der Zellkern (blau) wurde mit dem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert. Durch Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen können Bereiche der Ko-Lokalisation (hellblau) sichtbar gemacht werden. Zur Kontrolle wurde das Grün Fluoreszierende Protein allein (EGFP) exprimiert.

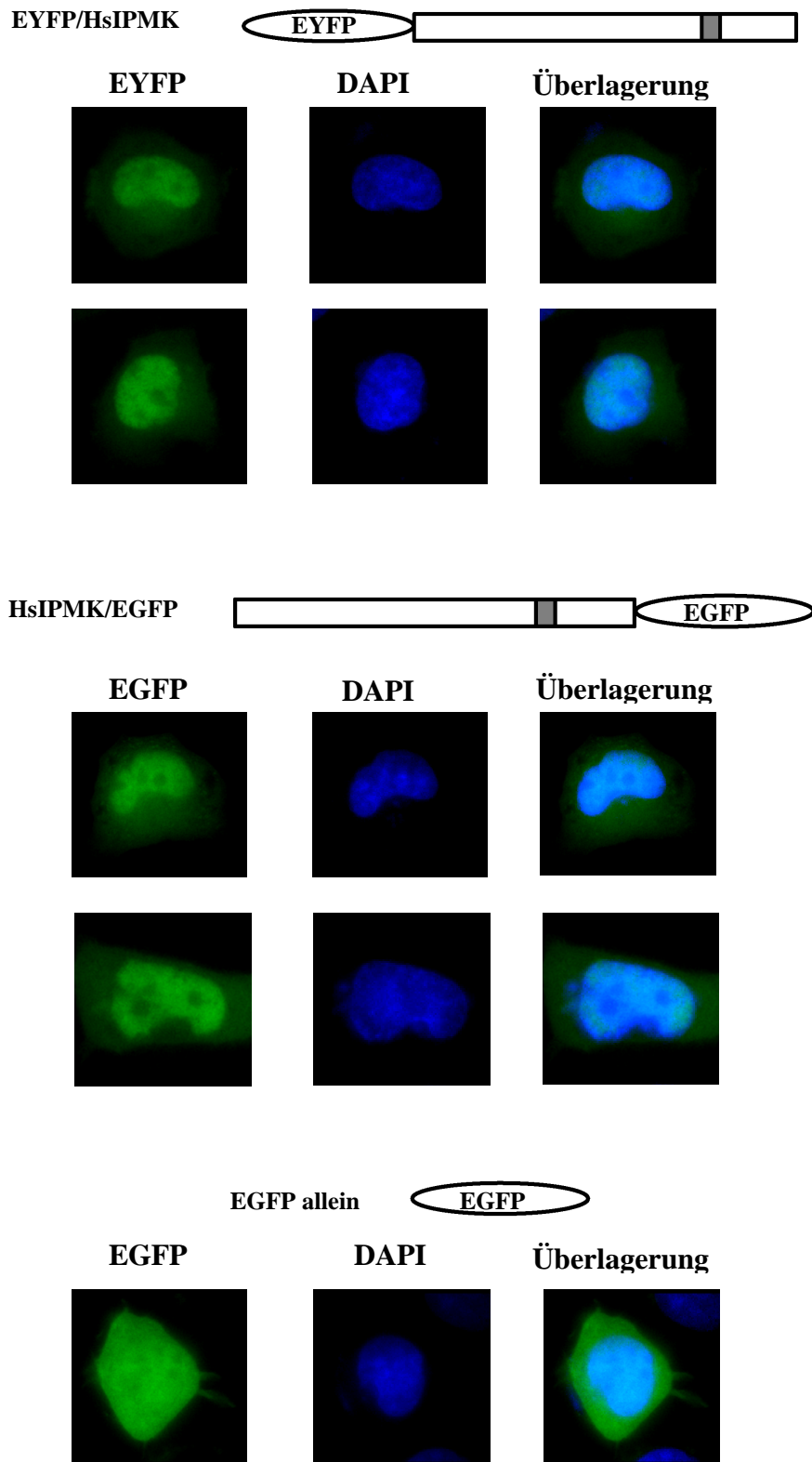


Abbildung 25: Expression der Vollängen-HsIPMK in PC12 Zellen

PC12 Zellen wurden transient transfiziert mit Vektoren, die für Fusionsproteine aus HsIPMK und GFP kodieren. Der Tag wurde am N- bzw. C-Terminus des Proteins angefügt, um Effekte des Grün Fluoreszierenden Proteins auf die intrazelluläre Lokalisation zu untersuchen. Zur Kontrolle wurde EGFP allein in den Zellen exprimiert, um eine durch den Tag verursachte Lokalisation auszuschließen. Siehe Abbildung 24 für weitere Erklärungen.

3.1.5 *in vivo* Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen von Fragmenten und Mutanten der HsIPMK

Es wurden verschiedene Fusionsproteinderivate der HsIPMK in NRK 52E Zellen exprimiert und ihre *in vivo* Lokalisation bestimmt. Durch diese Versuche sollten die für die beobachtete, vorherrschend nukleäre Lokalisation hinreichenden bzw. notwendigen Sequenzbereiche des Proteins identifiziert werden. Ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS) (siehe Abbildung 20) wurde zusammen mit flankierenden Sequenzen mit GFP fusioniert, um seinen hinreichenden Charakter für die Kernlokalisation eines Proteins zu untersuchen (siehe Abbildung 21). Dieses NLS wurde außerdem durch verschiedene Deletionen aus dem Vollängenprotein entfernt (siehe Abbildung 22) bzw. durch verschiedene Aminosäuresubstitutionen funktional inaktiviert (siehe Abbildung 23). Dadurch konnte seine Notwendigkeit für die ausschließlich nukleäre Lokalisation untersucht werden.

3.1.5.1 *in vivo* Lokalisation von Fragmenten der HsIPMK mit GFP-Tag

Es wurden drei Fragmente mit abnehmender Länge (Aminosäuren 263-370, 308-341, 320-330) ausgewählt und mit einem N-terminalen EYFP markiert (siehe Abbildung 21). In diesen Fragmenten war das putative Kernlokalisierungssignal (NLS) aus dem C-terminalen Bereich der HsIPMK stets zentral gelegen. Es wurden unterschiedlich lange, flankierende Sequenzen gewählt, um die Möglichkeit einer Proteinmißfaltung durch unterbrochene Sekundärstrukturen auszuschließen. Alle drei Fragmente zeigten bei ihrer Expression in NRK 52E Zellen wie das Vollängen Fusionsprotein eine vorherrschende Lokalisation im Zellkern (siehe Abbildung 26). Folglich ist das basische Cluster im C-terminalen Bereich der HsIPMK (Aminosäure 320-330) eine hinreichende Minimalsequenz für die Kernlokalisation eines Proteins (siehe Abbildung 20).

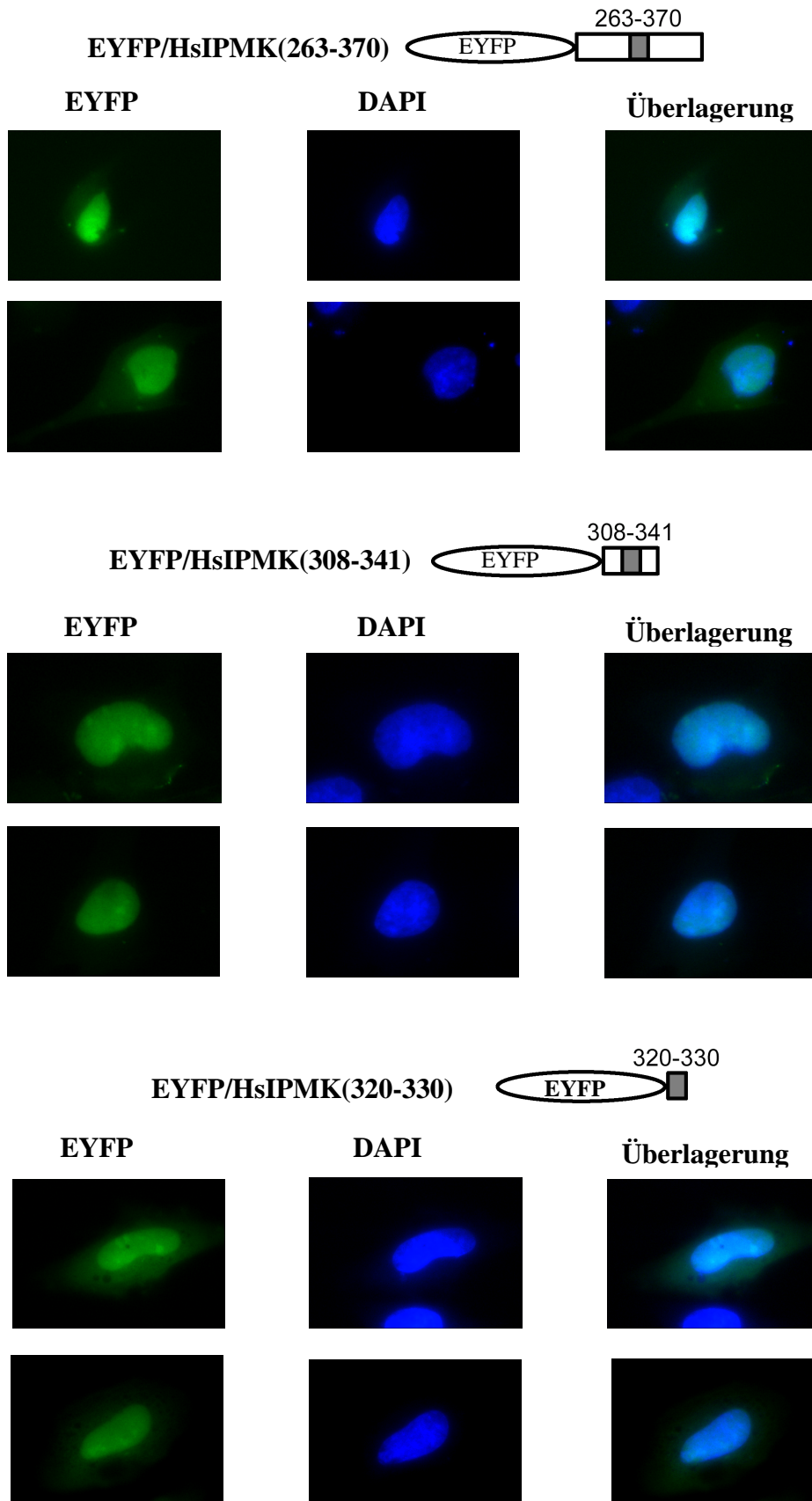


Abbildung 26: Expression von Fragmenten der HsIPMK in NRK 52E Zellen

Durch liposomale Transfektion wurden eukaryotische Expressionsvektoren in NRK 52E Zellen eingebracht, die für unterschiedliche Fragmente der HsIPMK mit einem N-terminalen Grün Fluoreszierenden Protein kodieren. Alle Fragmente tragen in zentraler Position das Kernlokalisierungssignal aus dem C-terminalen Bereich der HsIPMK und unterschiedlich lange, flankierende Bereiche. Die Position der ersten und der letzten Aminosäure des Fragments ist angegeben. Siehe Abbildung 24 für weitere Erklärungen.

3.1.5.2 *in vivo* Lokalisation von Deletionsmutanten der HsIPMK mit GFP-Tag

Als nächstes wurde die *in vivo* Lokalisation von zwei Deletionsmutanten untersucht, in denen das NLS allein ($\Delta 320-330$) bzw. das NLS mit flankierenden Sequenzen ($\Delta 308-341$) entfernt worden war (siehe Abbildung 22). Es wurden unterschiedliche Bereiche gewählt, um die Gefahr der Proteinmißfaltung durch unterbrochene Sekundärstrukturen zu begrenzen. Beide Konstrukte zeigten in den transfizierten NRK 52E Zellen eine gleichmäßige Verteilung zwischen Kern und Zytoplasma, vergleichbar der intrazellulären Lokalisation von EYFP allein (siehe Abbildung 27). Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass das basische Cluster positiv in den Kernimport der HsIPMK einbezogen ist. Es kann aber auch eine Maskierung des NLS durch eine Proteinmißfaltung nicht ausgeschlossen werden, da eine Deletion stets ein massiver Eingriff in die Proteinstruktur darstellt.

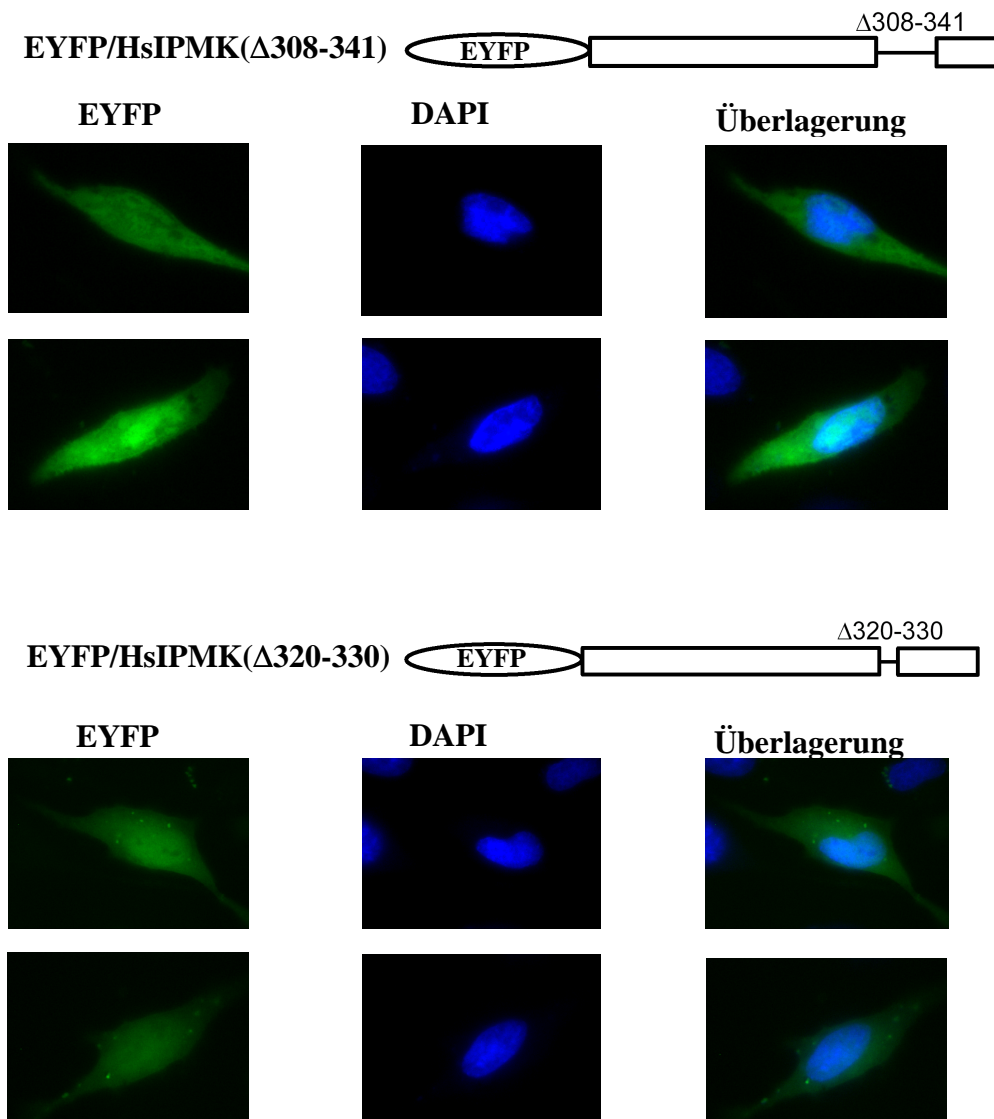


Abbildung 27: Expression von Deletionsmutanten der HsIPMK in NRK 52E Zellen

Eukaryotische Expressionsvektoren wurden durch transiente Transfektion in NRK 52E Zellen eingebracht und die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine wurde untersucht. Beide Vollängen-Proteine der HsIPMK enthalten Deletionen, die das Kernlokalisierungssignal und flankierende Sequenzen entfernen. Die Position der ersten und der letzten Aminosäure der Deletion ist angegeben. Siehe Abbildung 24 für weitere Erklärungen.

3.1.5.3 *in vivo* Lokalisation von Substitutionsmutanten der HsIPMK mit GFP-Tag

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Deletion eines internen Sequenzabschnitts eines Proteins ist ein drastischer Eingriff, der zur Mißfaltung und folglich zu Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur führen kann. Wie bereits beschrieben können diese Veränderungen ein Zielsteuerungssignal maskieren, das nicht direkt deletiert wurde. Eine schonendere Strategie zur funktionalen Ausschaltung eines putativen NLS ist die Veränderung von basischen Aminosäuren zu polaren nicht-basischen Aminosäuren. Zwei Substitutionsmutanten (siehe Abbildung 23) wurden in NRK 52E Zellen exprimiert, in denen Lysin- und Argininreste in Dipeptid-Segmenten des NLS zu Glutaminresten mutiert wurden ($R^{322}K \rightarrow QQ$; $K^{327}K \rightarrow QQ$). Sterische Auswirkungen von diesen Mutationen sind unwahrscheinlich, weil sich die Reste in ihrem sterischen Anspruch und in ihrer Hydrophilie ähneln. In den transfizierten Zellen zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz zwischen Zellkern und Zytoplasma, vergleichbar der Expression von EYFP allein (siehe Abbildung 28). Dies ist eine weitere Bestätigung, dass das C-terminal gelegene, basische Cluster der HsIPMK positiv in die Zielsteuerung der HsIPMK zum Zellkern einbezogen ist.

Es gibt ein weiteres basisches Cluster in der Primärsequenz der HsIPMK (Aminosäuren 107-112). Auch dieses putative NLS wurde durch Substitution von basischen Resten in einem Dipeptid-Segment funktional ausgeschaltet. Bei der Expression der Substitutionsmutante ($K^{107}K \rightarrow QQ$) in NRK 52E Zellen zeigte sich eine ähnliche intrazelluläre Verteilung wie beim Wildtyp (Daten nicht wiedergegeben). Offensichtlich ist dieses Cluster nicht notwendig für die Zielsteuerung der HsIPMK zum Kern, aber vielleicht besitzt es eine zusätzliche NLS-Aktivität. Möglicherweise wird seine funktionale Ausschaltung durch die starke Aktivität des C-terminalen Clusters maskiert. Deshalb wurde eine weitere Substitutionsmutante mit einer zusätzlichen Mutation im C-terminalen Cluster untersucht, die nachweislich dessen Aktivität beeinträchtigt ($K^{107}K \rightarrow QQ / K^{327}K \rightarrow QQ$). Die intrazelluläre Verteilung dieser Mutante ist vergleichbar mit der Substitutionsmutante EYFP-HsIPMP($K^{327}K \rightarrow QQ$) (Daten nicht wiedergegeben). Offensichtlich besitzt das zweite basische Cluster keine NLS-Aktivität. Es sind keine weiteren Kandidatensequenzen für die Zielsteuerung zum Zellkern vorhanden.

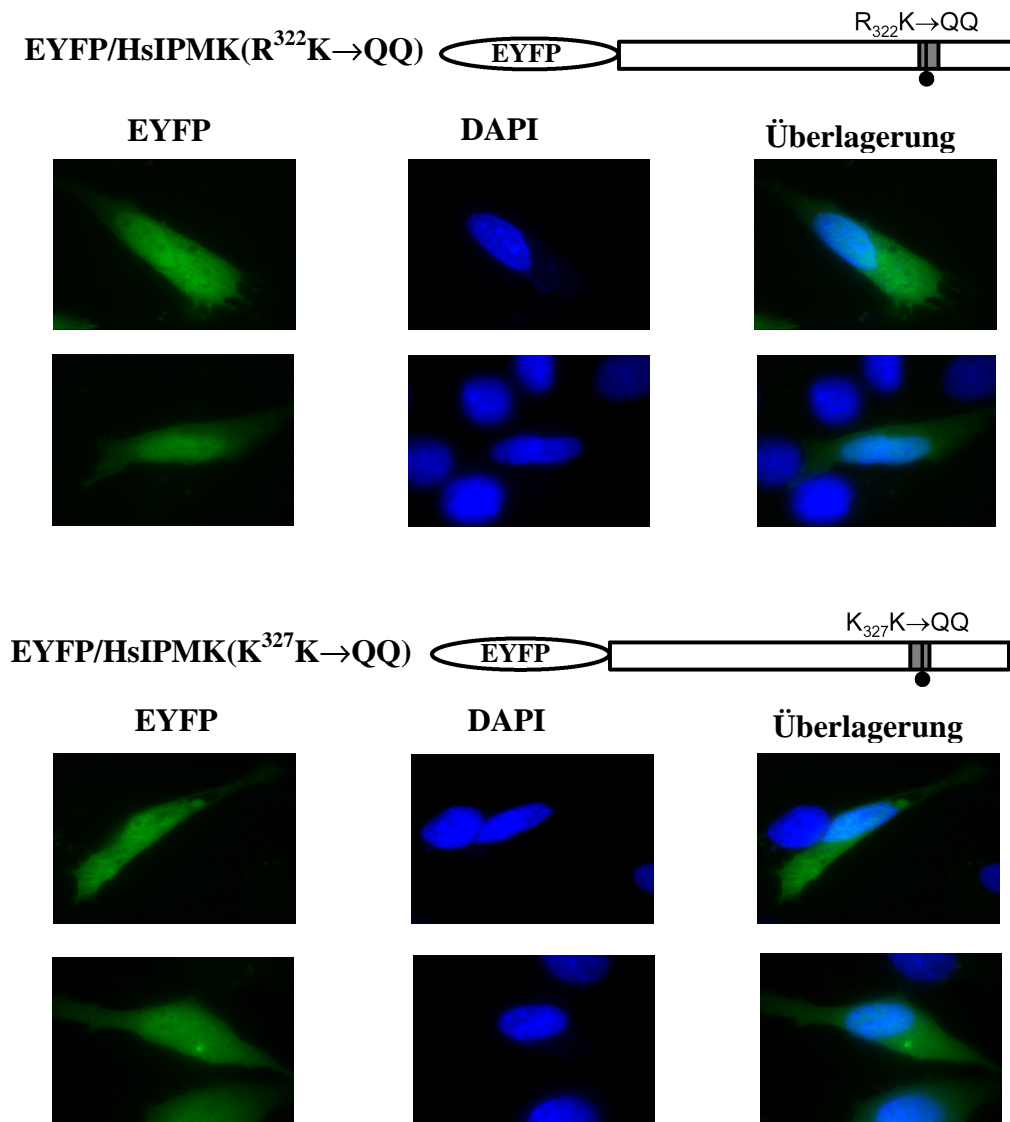


Abbildung 28: Expression von Substitutionsmutanten der HsIPMK in NRK 52E Zellen

Es werden Vollängen-Proteine der HsIPMK durch transiente Transfektion in NRK 52E Zellen exprimiert. Dipeptid-Segmente von basischen Aminosäuren im Kernlokalisationsignal wurden zu polaren, nicht-basischen Aminosäuren mutiert. Die Substitutionen R³²²K→QQ K³²⁷K→QQ sind mit einem Punkt markiert. Siehe Abbildung 24 für weitere Erklärungen.

3.2 Nukleozytoplasmatischen Shuttling und *in vivo* Lokalisation der Inositol (1,4,5,)-trisphosphat 3-Kinase C (IP3K-C) aus Mensch und Ratte

3.2.1 Analyse der für die Inositol (1,4,5,)-trisphosphat 3-Kinase C kodierenden cDNAs aus Mensch und Ratte

Die Familie der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinasen (IP3K) katalysiert die Übertragung einer Phosphatgruppe vom ATP auf die 3'-Hydroxylgruppe des sekundären Botenstoffes Inositol (1,4,5)-trisphosphat. Während die Isoformen A und B schon seit längerem bekannt sind, wurde erst vor kurzem eine neuartige Isoform C beschrieben (siehe Einleitung 1.2.1). Die Analyse der für die intrazelluläre Zielsteuerung verantwortlichen Mechanismen der IP3K-C ist ein Ziel der vorliegenden Arbeit.

Die stärkste Ähnlichkeit mit ca. 75% besitzt die Ratten Isoform C (siehe Abbildung 29) zur humanen Isoform C, wobei katalytische, Calmodulin-Bindungs- und PEST-Domäne mit ca. 90% und mehr eine hochgradige Konservierung aufweisen (siehe Abbildung 30). Die N-terminalen Domänen von Mensch und Ratte zeigen mit gut 50% eine deutlich geringere Ähnlichkeit. Die Sequenz der katalytischen Domäne der Ratten Isoform C ähnelt mit 65% gleichmäßig den anderen Isoformen von Ratte und Mensch. Hingegen hat die Calmodulin-Bindungsdomäne der Isoform C eine deutlich größere Ähnlichkeit zur entsprechenden Domäne der Isoform B aus Mensch und Ratte als zur Isoform A. Ein uneinheitliches Bild bietet die PEST-Domäne der Ratten Isoform C, die bei der Ratte größere Ähnlichkeit zur Isoform A, beim Menschen aber größere Ähnlichkeit zur Isoform B aufweist. Die Ähnlichkeiten der N-terminalen Domänen der verschiedenen Isoformen und Spezies sind deutlich geringer ausgeprägt. Selbst die Isoform C von Ratte und Mensch zeigt in ihrer N-terminalen Domäne nur eine Ähnlichkeit von 54%.

Ergebnisse

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  ATGAGGCGCTGCCCGTGCCGGGGGAGCCTGAGCGAGGCGGAGGCCGGCGCATTGCCAGCCGAGGCCCGCATGGGGCTGGA
  M R R C P C R G S L S E A E A G A L P A E A R M G L E

      90     100     110     120     130     140     150     160
81  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GGCGCTGCGAGGTGGGCGGGCGACAGCCGGGATTGCAGCGCCCTGGGCCGGGAGCAGGTGGCCCGACGGGACGGCCAG
  A L R G G R R R Q P G L Q R P G P G A G G P T G R P

      170     180     190     200     210     220     230     240
161  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  AGGGGGCGGTCCCCGGGCCTGGATCGAGGGGTTTCAGCCTGCACTCAGAGGCGGAGAGGACCGACTTCGGGCCTGCGCCG
  E G G G P R A W I E G F S L H S E A E R T D F G P A P

      250     260     270     280     290     300     310     320
241  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  TGTCCGGACGGTCCACAGGCAGAACCCTGTGGAGACGAACACGAGGAGTGCGAAGCAGCTGGCCTAGGAGTTGCCTCGGA
  C P D G P Q A E P C G D E H E E C E A A G L G V A S E

      330     340     350     360     370     380     390     400
321  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GAAGCCAGCCAAAAATAAGGAGCTAGACGGGTCCAACCTCCAGACACATCCAAAACCTGAGCAGCCCCCTGGCTGAGATGG
  K P S Q N K E L D G S N L Q T H P K L S S P L A E M

      410     420     430     440     450     460     470     480
401  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  AGATGGCCGGTTCCTGGACAGATGGTTTTCGAACTGATCTTCACAGACCTGACCTCCAGGCTCGGCCAAAGAGAGCCAGC
  E M A G S W T D G F R T D L H R P D L Q A R P K R A S

      490     500     510     520     530     540     550     560
481  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  CTCTGTACCCAACCAGGGTTTGATGAATCCTGGACCGAACTGGACAGATCCGAGCTGTGGCAGACTCTACCAGAGAGGGA
  L C T Q P G F D E S W T E L D R S E L W Q T L P E R D

      570     580     590     600     610     620     630     640
561  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  CAAGCCCTGGGTTGATCACCTCGGACCCACCAAGACATGTCCAGACTCCAAAATCACCCAGCCTGCCCTCACCAGAGC
  K P W V D H L R T H Q D M S R L Q N H P A C P S P E

      650     660     670     680     690     700     710     720
641  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  CAAGTGCTGGTACCTCCTGCAAAGAATTGAGCGCAGATGGTTCAGGACACCACATGACACCGATGGCTTCTGGATAGAG
  P S A G T S C K E L S A D G S R T P H D T D G F W I E

      730     740     750     760     770     780     790     800
721  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  TCCAAACTGATGGCTCCCTCATAGGACCTAGTACTCAGACAGCCTGCAGACAGCCTGCAAACGATGGTTTTTCAGCACA
  S Q T D G S L I G P S T Q T A C R Q P A N D G F S A Q

      810     820     830     840     850     860     870     880
801  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GGACTGACGGTACTTTGATTCAACCTGGCACTGATGATGGTCCCTGGGTTGATAGCGTTTTGGAGAAGTCCAATGGAG
  D T D G T L I Q P G T D D G P W V D S V L E K S N G

      890     900     910     920     930     940     950     960
881  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  ATGATCCATTAATGGAACCAGAGCCCAGAGACTTGGTGACTAACCTGTGCTCCACCTGGAGTGCAGCTCCCTGTGTCCT
  D D P L M E P E P R D L V T N L C S H L E C S S L C P

      970     980     990     1000     1010     1020     1030     1040
961  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GTGCCCCGCTTATCATCACCTCAGAGTCTCCTGAGCCTGGGGCCAGCCGCTGGGACCCCAAGCCCGGATTGAGGGGGG
  V P R L I I T S E S P E P G A Q P L G P Q A R I E G G

```

Ergebnisse

```

1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1041 GACTGGCGGCTTCTCTTCTGCTCctcTTTGGACGAATCTGAGGATGACTTGGTGGCTGGGGGCGGAGGTACCAGCGATC
  T G G F S S A S S F D E S E D D L V A G G G G T S D

1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1121 CTGAGGACAGATCTGGAAGCAAGCCTTGAAGAAGCTGAAGACAGTTCTGAAGTACTCGCCTTTCGTGGTCTCCTTCCAT
  P E D R S G S K P W K K L K T V L K Y S P F V V S F H

1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1201 AAGCACTACTACCCCTGGGTACAGCTTTCGGACATGCTGGGAACTTCCAGGCTGGTGAGGATGGCCGGATTCTGAAACG
  K H Y Y P W V Q L S G H A G N F Q A G E D G R I L K R

1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1281 TTTCTGCCAATGTGAGCAGCGCAGCCTGGAGCTGCTGATGGGAGACCCCTGCGCCTTTCGTGCCACTTATTATGGCA
  F C Q C E Q R S L E L L M G D P L R P F V P T Y Y G

1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1361 TGGTGCAGCGGATGGCCAGGCCTTCAACCAGATGGAAGACCTCCTGGCCGACTTTGAGGGCCCCTCTATCATGGACTGC
  M V Q R D G Q A F N Q M E D L L A D F E G P S I M D C

1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1441 AAGATGGGCAGCAGGACATACCTGGAAGAGGAGCTGGTGAAGGCCCGGAACGACCCAAACCCCGAAAAGATATGTATGA
  K M G S R T Y L E E E L V K A R E R P K P R K D M Y E

1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1521 GAAGATGGTGGCAGTGGACCCAGGGGCTCCACCCCAGAGGAGCACGCTCAGGGTGCGGTCACTAAGCCCCGATAACATGC
  K M V A V D P G A P T P E E H A Q G A V T K P R Y M

1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1601 AGTGGAGGGAGACCCTGAGTTCAACTTCCACCCTGGGCTTCCGGATTGAAGGCATCAAGAAGGCCGATGGGACCTGCAAC
  Q W R E T L S S T S T L G F R I E G I K K A D G T C N
  →

1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1681 ACCAACTTCAAGAAGACACAGGCTCTGGAGCAGGTGACAAAGGTGTTGGAAGACTTTGTGAATGGGGACGTTGGAATCCT
  T N F K K T Q A L E Q V T K V L E D F V N G D V G I L

1770      1780      1790      1800      1810      1820      1830      1840
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1761 AAGAAAGTACGTGGCGGACTGGAGACCTTCGAGACACTCTGGAGAATTCTCCCTTCTTCAAGACCCACGAGGTAGTGG
  R K Y V A R L E D L R D T L E N S P F F K T H E V V

1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1841 GCAGTTCCCTGCTCTTTGTGCATGACCACACCCGGCCTGGCCAAGGTTTGGATGATTGACTTCGGCAAGACAGTGGcCCTG
  G S S L L F V H D H T G L A K V W M I D F G K T V A L

1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1921 cCTGACCACCAGATGCTCAGTCACAGGCTGCCTTgGGCTGAgGGCaACCGTgAAGATGGCTACcTCTGGGGTTTGGACAA
  P D H Q M L S H R L P W A E G N R E D G Y L W G L D N
  ←

2010      2020      2030
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
2001 TTTGATCTGCCTCCTTCAGGGCCTGGCCCAgAGCTGA
  L I C L L Q G L A Q S *

```

Abbildung 29: Vollängen cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäure-Sequenz der Ratten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Isoform C

Das abgeleitete 678-Aminosäuren-Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 74,5kDa. Die 5'-untranslatierte Region der cDNA umfasst 353bp. Die durch die degenerierten Primer erkannten Sequenzbereiche in der zwischen den Isoformen hochkonservierten katalytischen Domäne sind mit Pfeilen markiert (→).

RnIP3K-C	1	MRRCPCRGSLSEAEAGALPAEARMGLEALRGRRRRQPGLQRPFGPAGGPTGRPEGGGPRA
HsIP3K-C	1	MRRCPCRGSLNEAEAGALPAAARMGLEAPRGRRRRQPQQRPFGPAGAPAGRPEGGGPWA
RnIP3K-C	61	WIEGFSLHSEAEERTDFGPAPCPDGPQAEPCGDEHEECEAAAGLGVASEKPSQNKELDGSNL
HsIP3K-C	61	RTEGSSLHSEPERAGLGPAPGTESPOAEFWTDGQTEPAAGLGVETETPKQKTEPDRSSL
RnIP3K-C	121	QTHPKLSSPLAEMEMAGSWT---DGFRIDLHRPDLQARPKRASLCTQPGFDESWELEDR
HsIP3K-C	121	RTH--LEWSWSELETTCLWTETGTDGLWTDPHRSDLQFQPEEASPWTPQPGVHGFWTELET
RnIP3K-C	177	SELWQTLPERDKPVDHLRTHQDMSRLQNHFF--ACPSPEPSAGTSCKELSA DGSRTPHDT
HsIP3K-C	179	HGS-QTQPERVKSWADNLWTHQNSSSLQTHPEGACPSKEPSADGSKWELYT DGSRTQDDI
RnIP3K-C	235	DGFWIEISQTDGSLIGPSTQTACRQPANDGFSAQ-DTDGTLIQPGTDDG--FVVDVSVLEK
HsIP3K-C	238	EGPWTEPYTDGSQKKQDTEARKQPGTGFQIQDQDQDGSWTQPSSTDGSQLPAGTDCLLGE
RnIP3K-C	291	SNGDDPLMEPEPRDLVNTLCSHLECSSLCPVPRLIITSESPPEPGAQPLGPQARIEGGTGG
HsIP3K-C	298	PE-DGPLEEPEPEGELLTHLYSHLKCSPLCPVPRLIITPETPEPEAQPVGPPSRVEGSGG
RnIP3K-C	351	FSSASSFDESEDDLVAGGGGTSDPEDRSGSKPWKKLKTVLKYSPFVVSEFKHYVPWVQLS
HsIP3K-C	357	FSSASSFDESEDDLVAGGGGASDPEDRSGSKPWKKLKTVLKYSPFVVSEFKHY-PWVQLS
RnIP3K-C	411	GHAGNFQAGEDGRILKRFCQCEQRSLELLMGDPLRPFVPTYYGMVQRDGOAFNQMEDLLA
HsIP3K-C	416	GHAGNFQAGEDGRILKRFCQCEQRSLEQLMKDPLRPFVPAYYGMVLQDGOAFNQMEDLLA
RnIP3K-C	471	DFEGPSIMDCKMGSRTYLEEELVKARERPKPRKDMYEKMVAVDPGAPTPEEHAQGAVTKP
HsIP3K-C	476	DFEGPSIMDCKMGSRTYLEEELVKARERPRPRKDMYEKMVAVDPGAPTPEEHAQGAVTKP
RnIP3K-C	531	RYMQWRETLSSTSTLGFRIEGIKKADGTCNTNFKKTQALEQVTKVLEDFVNGDVGILRKY
HsIP3K-C	536	RYMQWRETMSSTSTLGFRIEGIKKADGTCNTNFKKTQALEQVTKVLEDFVGDHVILOKY
RnIP3K-C	591	VARLEDLRDTLENLSPFFKTHEVVGSSLLFVHDHTGLAKVWMIDFGKTVALPDHQLSHRL
HsIP3K-C	596	VACLEELREALELSPFFKTHEVVGSSLLFVHDHTGLAKVWMIDFGKTVALPDHQTLSHRL
RnIP3K-C	651	PWAEGNREDGYLWGLDNLICLLQGLAQS
HsIP3K-C	656	PWAEGNREDGYLWGLDNMICLLQGLAQS

Abbildung 30: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase Isoform C von Ratte und Mensch

Die Isoformen A und B der IP3K sind schon seit längerem bekannt. Vor kurzem wurde eine neuartige Isoform C aus Ratte (RnIP3K-C) und Mensch (HsIP3K-C) identifiziert. Die cDNA aus Ratte kodiert für ein 678-Aminosäuren-Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 74,5kDa; die humane cDNA für ein 683-Aminosäuren-Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 75,2kDa. Die Proteine aus den beiden Arten besitzen auf Aminosäureebene eine Gesamtähnlichkeit von 75%. Die Sequenz ist in den Domänen mit bekannter Funktion (katalytische, PEST-, und Calmodulin-Bindungsdomäne) sogar zu ca. 90% konserviert, während die N-terminalen Domänen (in Abbildung markiert) mit gut 50% eine deutlich geringere Ähnlichkeit zeigen. Die äußerst N-terminal gelegene Sequenz ist jedoch deutlich stärker zwischen Mensch und Ratte bewahrt als die gesamte Domäne.

3.2.2 Vektoren zur eukaryotischen Expression von GFP-Fusionsproteinen der IP3K-C aus Mensch und Ratte

Im Rahmen dieser Studie wurden Expressionsvektoren hergestellt, um Fusionsproteine aus Grün Fluoreszierendem Protein und IP3K-C aus Mensch und Ratte in eukaryotischen Zellen zu exprimieren und ihre intrazelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie zu bestimmen. Die Lokalisation des Proteins in der Zelle gibt u.U. Aufschluss darüber, welche Funktionen von der IP3K-C wahrgenommen werden. Der zytoplasmatische Stoffwechsel der Inositolphosphate und Phosphatidylinositole ist gut charakterisiert; aber in letzter Zeit rückt immer mehr ein entsprechendes, noch nicht vollständig aufgeklärtes Stoffwechselsystem im Zellkern in den Mittelpunkt der Forschung [Irvine, 2002]. Die intrazelluläre Zielsteuerung eines Inositolphosphate-umsetzenden Enzyms gibt Hinweise in welchem der beiden Systeme sein Wirkort angesiedelt ist. Es wurden im Rahmen dieser Studie Fusionproteine mit N-terminalem und C-terminalem Tag verwendet, um eine mögliche Beeinflussung der Zielsteuerung des Fusionsproteins zu untersuchen (vgl. Abschnitt 3.1.4 und [Illies, 2002]). Die Erkennung von Signalsequenzen eines Proteins durch entsprechende Transportproteine kann durch einen voluminösen Tag wie das EGFP negativ beeinflusst werden. Es ist aber unwahrscheinlich, dass der Tag unabhängig vom für die Fusion benutzten Terminus die gleichen Effekte auf die intrazelluläre Lokalisation hat. Die Klonierungsschritte zur Konstruktion der verschiedenen eukaryotischen Expressionsvektoren sind ausführlich und mit Abbildungen für die Fusionsgene der humanen Inositolphosphat Multikinase beschrieben (Abschnitte 3.1.2&3.1.3).

3.2.2.1 Vektoren für die eukaryotische Expression von Fusionsproteinen der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit N-terminalem GFP-Tag

Für die eukaryotische Expression von Fusionproteinen der IP3K-C aus Ratte und Mensch mit N-terminalem GFP-Tag wurden die Vektoren pEGFP-C1 und pEYFP-C1 verwendet. Zunächst wurden die „Offenen Leseraster“ der cDNAs durch *Pfu*-PCRs amplifiziert. Dabei wurden Schnittstellen für die Überführung in einen Expressionsvektor am 5'- und 3'-Ende der Fragmente eingefügt. Diese Schnittstellen sind in der Multiplen Klonierungsstelle des Vektors jeweils einmal und im Offenen Leseraster der cDNA gar nicht vorhanden. Die Klonierungsstrategie wurde so gewählt, dass ein möglichst langer Linker zwischen Kinase und EGFP entsteht.

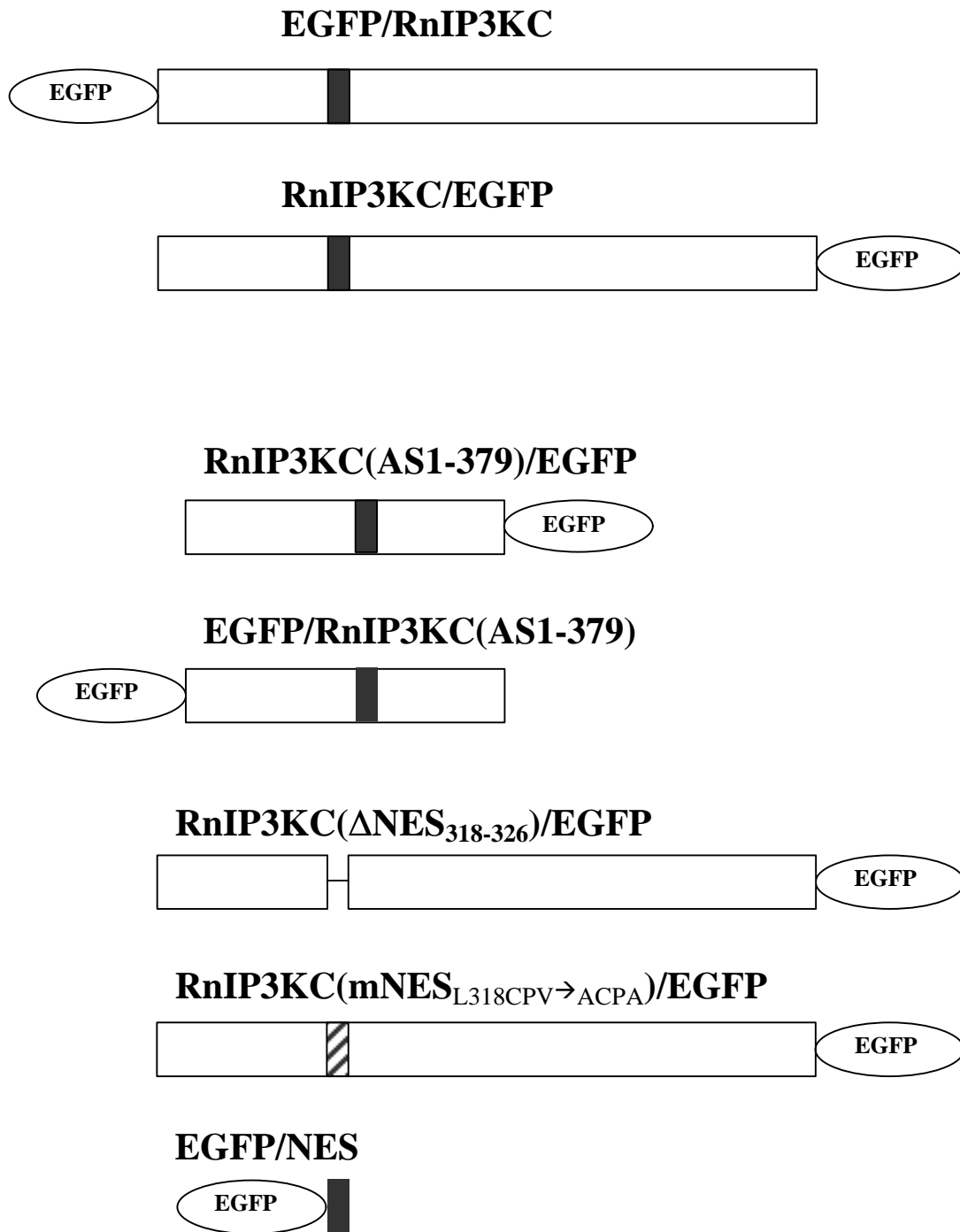


Abbildung 31: EGFP-Fusionsproteine und deren Derivaten der Ratten IP3K-C

Es wurden verschiedene eukaryotische Expressionsvektoren hergestellt, die für EGFP-Fusionsproteine der Vollängen-Form, der mutierten Vollängen-Form und der isolierten N-terminalen Domäne kodieren. Die Ratten IP3K Isoform C wurde sowohl an ihrem N-Terminus (EGFP/RnIP3KC) als auch an ihrem C-Terminus (RnIP3KC/EGFP) mit einem EGFP-Tag fusioniert, um die intrazelluläre Lokalisation in Abhängigkeit von der Position des Tags zu untersuchen. Die IP3K-C ist als weißer Kasten und das putative NES als schwarzer Kasten dargestellt. Ein durch Punktmutationen inaktiviertes NES wird als schwarz gestrichelter Kasten abgebildet. Der EGFP-Tag ist als Oval abgebildet. Es wurde auch die isolierte N-terminale Domäne an beiden Termini mit einem Tag fusioniert [RnIP3KC(AS1-379)/EGFP; EGFP/RnIP3KC(AS1-379)], um die Bedeutung von diesem Proteinabschnitt für die Zielsteuerung zu untersuchen. Ein putatives Kernexportsignal (NES) in der N-terminalen Domäne wurde in einem Vollängen-Konstrukt deletiert [RnIP3KC(Δ NES_{AS318-326})/EGFP] bzw. durch Substitution von hydrophoben Resten funktional inaktiviert [RnIP3KC(mNES_{L318CPV}→_{ACPA})/EGFP]. Durch diese Konstrukte sollte die Notwendigkeit dieses Sequenzabschnittes für die Zielsteuerung untersucht werden. Außerdem wurde das isolierte Core-NES mit einem Tag fusioniert, um seinen möglicherweise hinreichenden Charakter für den aktiven Kernexport zu bestimmen.

Bei der IP3K-C aus Ratte wurde am 5'-Ende eine *SalI*- und am 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt. Bei der entsprechenden Isoform aus Mensch wurden die gleichen Restriktionsschnittstellen verwandt. Die Amplifikate wurden in den Klonierungsvektor pGEM-Teasy eingefügt und vollständig sequenziert, um unerwünschte Second-Site-Mutationen auszuschließen. Der Vektor mit der cDNA der Ratten IP3K-C und der eukaryotische Expressionsvektor pEYFP-C1 wurden mit *SalI*- und *BamHI*-Restriktionsenzymen verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Der linearisierte Vektor wurde mit der cDNA ligiert und das Ligationsprodukt in kompetente *E.coli* Zellen transformiert. Anschließend wurden die entstandenen Plasmide durch Minipräparation gewonnen, vollständig sequenziert und als pEYFP/RnIP3K-C (siehe Abbildung 31) bezeichnet. Durch die gleiche Vorgehensweise wurde die cDNA der humanen IP3K-C in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-C1 eingefügt und ein entsprechender Expressionsvektor pEGFP/HsIP3K-C (siehe Abbildung 32) erzeugt.

3.2.2.2 Vektoren für die eukaryotische Expression von Fusionsproteinen der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit C-terminalem GFP-Tag

Die Position des EGFP-Tags in einem Fusionsprotein kann Einfluss auf dessen intrazelluläre Lokalisation nehmen, wenn er durch sterische Hinderung den Zugang zu Zielsteuerungssequenzen erschwert. Aus diesem Grunde wurden ergänzend zu den eukaryotischen Expressionsvektoren, die Fusionsproteine mit N-terminalem GFP-Tag kodieren, weitere Expressionvektoren hergestellt, die den Tag an den C-Terminus anfügen. Die für die IP3K-C aus Ratte und Mensch kodierenden cDNAs wurden mit einer *Pfu*-PCR amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden an den Enden Restriktionsschnittstellen für eine Umklonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N1 eingefügt. Am 5'-Ende des kodierenden Bereichs wurde eine *Eco47III*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Die Amplifikate wurden in den Klonierungsvektor pGEM-Teasy ligiert und die Inserts in den entstandenen Plasmiden wurden vollständig sequenziert, um die Veränderung der Nukleotid-Sequenz durch unerwünschte Mutationen auszuschließen. Die das Insert tragenden Klonierungsvektoren und der eukaryotische Expressionsvektor pEGFP-N1 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Eco47III* und *XhoI* umgesetzt. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Die für die IP3K-C kodierenden Fragmente wurden mit dem linearisierten Vektor ligiert und die entstandenen Ligationsprodukte wurden durch Transformation in *E.coli* Bakterien eingebracht. Die

entstandenen Vektoren wurden durch Mini-Präparation gewonnen und sequenziert. Die gewonnenen Vektoren für die eukaryotische Expression der IP3K-C aus Ratte bzw. Mensch mit C-terminalem EGFP-Tag wurden als pRnIP3K-C/EGFP und pHsIP3K-C/EGFP (siehe Abbildung 31&32) bezeichnet.

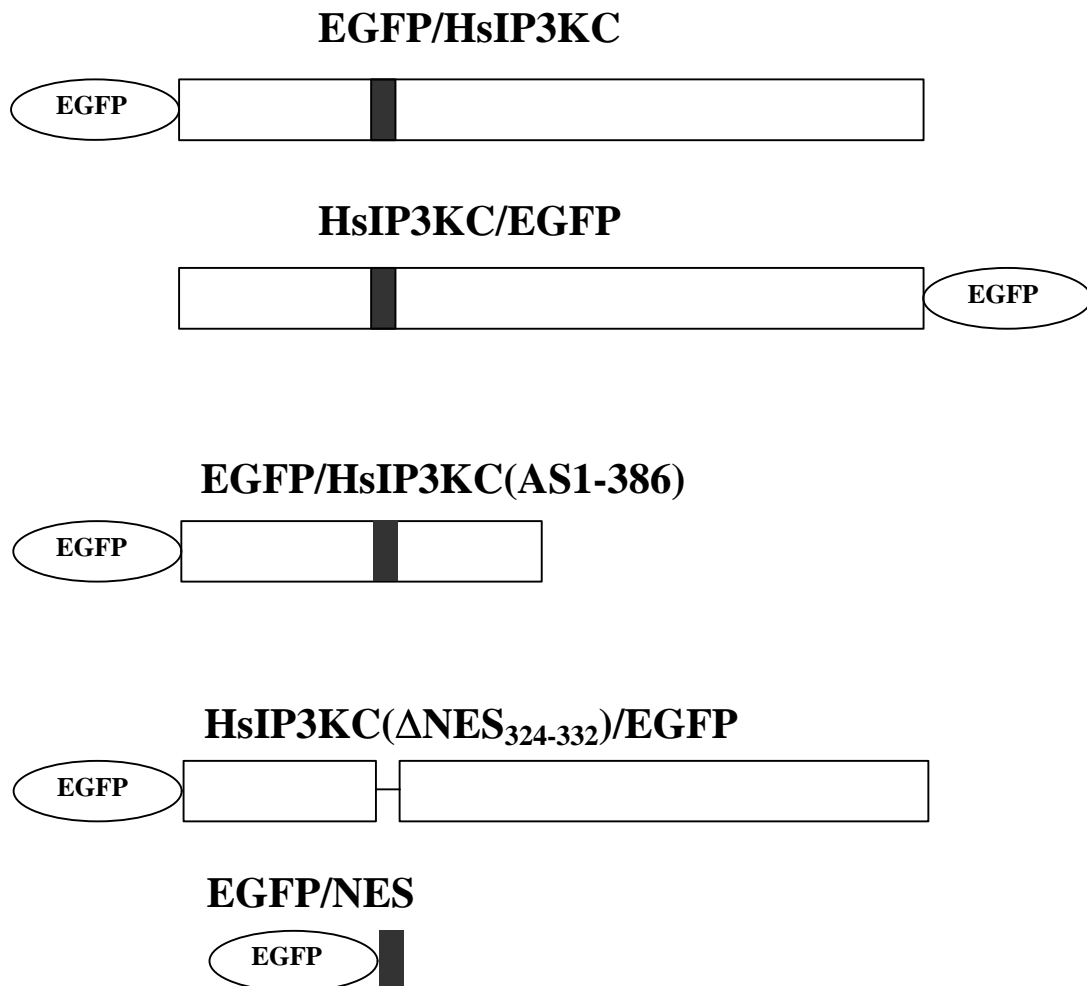


Abbildung 32: EGFP-Fusionsproteine und deren Derivate der humanen IP3K-C

Die intrazelluläre Lokalisation der humanen IP3K-C wurde mit verschiedenen EGFP-Fusionsproteinen und Fusionsproteinderivaten untersucht. Das Vollängenprotein wurde am N- bzw. C-Terminus (EGFP/HsIP3KC bzw. HsIP3KC/EGFP) mit einem EGFP-Tag fusioniert, um seine Lokalisation in eukaryotischen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu bestimmen. Außerdem wurde die isolierte N-terminale Domäne [EGFP/HsIP3KC(AS1-386)] an ihrem N-Terminus mit EGFP fusioniert, um ihre Rolle in der Zielsteuerung des Proteins zu klären. Zusätzlich wurde zur Bestimmung seiner Funktion für die intrazelluläre Lokalisation das putative NES in der N-terminalen Domäne deletiert [HsIP3KC(Δ NES_{AS324-332})/EGFP]. Das Core-NES ist in seiner Aminosäuresequenz vollständig zwischen Mensch und Ratte konserviert. Das Konstrukt aus EGFP und isoliertem NES entspricht dem bei der Untersuchung der Ratten IP3K-C verwandten. Der EGFP-Tag ist als Oval, die IP3K-C als weißer Kasten dargestellt. Der schwarze Kasten symbolisiert das putative NES in der N-terminalen Domäne.

3.2.3 Vektoren zur eukaryotischen Expression von GFP-Fusionsproteinderivaten der IP3K-C aus Mensch und Ratte

Im Rahmen von *in vivo* Lokalisationsstudien mit Fusionsproteinen aus Vollängen IP3K-C und EGFP in eukaryotischen Zellen konnte gezeigt werden, dass der Zusatz des auf das Exportin 1 wirkenden Inhibitors Leptomycin B (LMB) zu einer nukleären Anreicherung des Fusionsproteins führt (siehe Ergebnisse 3.2.4.2). Das Protein wurde in ungefähr der Hälfte der transfizierten Zellen ausschließlich im Zytoplasma und in der anderen Hälfte gleichmäßig verteilt zwischen Zellkern und Zytoplasma beobachtet. Nach Behandlung mit LMB sank der Anteil der Zellen mit ausschließlich zytoplasmatischer Lokalisation des Fusionsproteins deutlich. Bei den Fusionsproteinen der Ratten IP3K-C wurden nach Behandlung mit LMB keine transfizierten Zellen mit ausschließlich zytoplasmatischer Lokalisation beobachtet. Aufgrund der molekularen Größe der Vollängen-Fusionsproteine von >100kDa kann eine passive Diffusion über den Kernporenkomplex in den Zellkern ausgeschlossen werden (siehe Einleitung 1.3.1). Es erfolgt also ein aktiver Import in den Zellkern, welcher nach dem heutigen Stand des Wissens meistens durch ein Kernlokalisierungssignal (NLS) vermittelt wird. Die am besten untersuchten Signale sind das monopartite und das bipartite NLS, für die Konsensus-Sequenzen definiert werden konnten [Fontes et al., 2000]. Mit hoher Wahrscheinlichkeit befinden sich auch in der IP3K-C die Lokalisations-bestimmenden Signalsequenzen in der N-terminalen Domäne, wie es bereits für die Zielsteuerung der IP3K-A an F-Aktin in dendritischen Dornen gezeigt werden konnte [Schell et al., 2001]. In dieser Domäne der IP3K-C konnte jedoch kein Sequenzbereich identifiziert werden, der einem der beiden NLS-Konsensus-Sequenzen entspricht. Der Inhibitor LMB wirkt negativ auf den aktiven Export von Proteinen aus dem Zellkern über den Exportin1-vermittelten Mechanismus, indem er dieses Exportin kovalent modifiziert. Die für den Export bestimmten Proteine tragen ein Kernexportsignal (NES), dessen Konsensus-Sequenz ebenfalls bekannt ist [Bogerd et al., 1996]. Ein dem Konsensus entsprechender Sequenzbereich, der zusätzlich zwischen IP3K-C von Ratte (As 318-326) und Mensch (As 324-332) vollständig konserviert ist, konnte in der N-terminalen Domäne identifiziert werden (siehe Abbildung 33).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Mutanten hergestellt, um die für den aktiven Import in den Zellkern und für den aktiven Export aus dem Zellkern heraus verantwortlichen Sequenzbereiche zu charakterisieren. Die isolierte N-terminale Domäne der IP3K-C, die vermutlich eine wichtige Rolle bei der Lokalisation des Vollängen-Proteins spielt, wurde mit einem N-terminalen bzw. C-terminalen EGFP-Tag fusioniert und in eukaryotischen Zellen

exprimiert. Diese Studie sollte zeigen, ob die isolierte N-terminale Domäne ein Lokalisationsverhalten zeigt, das vergleichbar dem des Vollängen-Proteins ist. Aufgrund seiner molekularen Größe von >67kDa ist dieses Fusionsprotein sowie das Vollängen-Protein von der passiven Diffusion durch den Kernporenkomplex ausgeschlossen. Außerdem wurden Konstrukte hergestellt, um die Bedeutung des putativen NES für die Lokalisation des Vollängen-Proteins zu untersuchen. Eines dieser Konstrukte kodiert für ein Vollängen-Fusionsprotein ohne NES und ein anderes für das isolierte NES. Die Deletion eines Aminosäureabschnittes aus einem Protein ist ein drastischer Eingriff, der die dreidimensionale Struktur verändern und dadurch die Erkennung von Signalsequenzen erschweren kann. Eine schonendere Methode ist die funktionale Inaktivierung der Signalsequenz durch Substitution von für die Funktion wichtigen Aminosäure-Resten. In einer Doppelmutante wurden zwei funktional wichtige hydrophobe Reste des NES im Vollängen-Protein mutiert, um dieses zu inaktivieren.

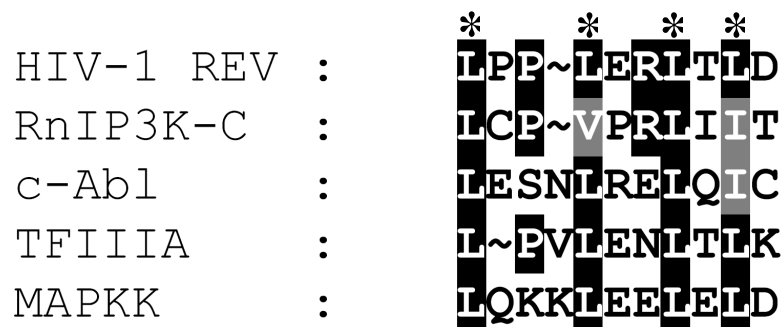


Abbildung 33: Kernexportsignal der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Isoform C aus Ratte und Mensch

Der überwiegende Teil des aktiven Proteinexports aus dem Zellkern wird über einen Exportin 1-vermittelten Mechanismus abgewickelt. Die für den Export bestimmten Proteine tragen ein Leucin-reiches Kernexportsignal (NES), das durch Exportin 1 erkannt und gebunden werden kann. Die Aminosäure-Sequenz des NES ist gekennzeichnet durch eine Häufung von hydrophoben Resten (Leucin, Isoleucin, Valin), die durch Spacer-Bereiche von beliebigen Aminosäuren getrennt sind. Die RnIP3K-C besitzt ein funktionales NES in ihrer N-terminalen Domäne an der Aminosäureposition 318-326. Dieser Sequenzabschnitt ist vollständig konserviert zwischen Ratte und Mensch. Das NES der IP3K wird verglichen mit den bekannten NES von HIV-1 REV, c-Abl, TFIIIA und MAPKK. Die für die Funktion notwendigen hydrophoben Reste sind mit Sternchen markiert. Der Ein-Buchstaben-Code wird benutzt. Konservierte Reste sind als weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund und ähnliche Reste als weiße Buchstaben auf grauem Hintergrund dargestellt.

3.2.3.1 Vektoren für die eukaryotische Expression der N-terminalen Domäne der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit GFP-Tag

Die IP3K-C aus Mensch und Ratte fusioniert mit einem EGFP-Tag ist mit über 100kDa eindeutig zu groß, um passiv durch den Kernporenkomplex zu diffundieren. Aus diesem Grunde muss der Transport in den Kern von eukaryotischen Zellen und der LMB-sensitive Transport aus dem Zellkern durch aktive Mechanismen vermittelt werden. Die katalytische, die Calmodulin-Bindungs- und die PEST-Domäne der IP3K sind zwischen den bekannten Isoformen in Aminosäure-Sequenz und Funktion eindeutig konserviert, wohingegen die

N-terminalen Domänen von überwiegend unbekannter Funktion sich in Größe und Sequenz deutlich zwischen den Isoformen unterscheiden. Für die Isoform A konnte gezeigt werden, dass ihre Lokalisation an F-Aktin und dendritische Dornen durch einen Sequenzabschnitt in ihrer N-terminalen Domäne vermittelt wird [Schell et al., 2001]. Eine ähnliche Bedeutung dieser Domäne in der Zielsteuerung kann auch bei der IP3K-C vermutet werden. Zur weiteren Untersuchung dieser Hypothese wurden verschiedene Konstrukte hergestellt, die für die isolierte N-terminale Domäne mit einem EGFP-Tag kodieren. Auch diese Fusionsproteine mit einem Molekulargewicht von fast 70kDa sind, wie das Vollängen-Fusionsprotein, vom passiven Transport durch den Kernporenkomplex ausgeschlossen. Ein Transport in den Zellkern und aus ihm heraus kann also nur durch aktive Mechanismen erfolgen.

Die N-terminale Domäne der Ratten IP3K-C (Aminosäure 1-379) wurde in zwei unabhängigen *Pfu*-PCRs amplifiziert, wobei an den Enden der DNA-Fragmente einzigartige Restriktionsschnittstellen für die Überführung in eukaryotische Expressionsvektoren eingefügt wurden. Die entstandenen Fragmente wurden im Klonierungsvektor pGEM-Teasy amplifiziert und durch Mini-Präparation gewonnen. Die Vektoren und die zugehörigen eukaryotischen Expressionsvektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und die entstandenen DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt und extrahiert. Die für die N-terminale Domäne kodierenden cDNAs und die entsprechenden linearisierten Vektoren wurden ligiert, in kompetente *E.coli* Zellen transformiert und durch Mini-Präparation gewonnen. Für den Expressionvektor eines RnIP3K-C Fusionsproteins mit C-terminalem EGFP-Tag wurden der Vektor pEGFP-N1 und eine *Eco47III/XhoI*-Strategie verwandt. Der gewonnene Vektor wurde mit pRnIP3K-C(As1-379)/EGFP (siehe Abbildung 31) bezeichnet. Für das entsprechende Konstrukt mit N-terminalem EGFP-Tag wurden der Vektor pEGFP-C1 und eine *SalI/BamHI*-Strategie angewandt. Der gebildete Vektor wurde pEGFP/RnIP3K-C(As1-379) (siehe Abbildung 32) genannt.

Ein eukaryotischer Expressionsvektor, der für die N-terminale Domäne der humanen IP3K-C (Aminosäure 1-386) mit N-terminalem EGFP-Tag kodiert, wurde mit einer anderen Strategie hergestellt. Der Expressionsvektor pEGFP/HsIP3K-C, der für ein Vollängen HsIP3K-C Fusionsprotein mit N-terminalem Tag kodiert, wurde durch erweiterte Quikchange-Mutagenese mutiert, so dass der Lysin-Rest an Position 387 durch ein Stopp-Codon ersetzt wurde. Der neue Expressionsvektor wurde als pEGFP/HsIP3K-C(As1-386) (siehe Abbildung 32) bezeichnet.

3.2.3.2 Vektoren für die eukaryotische Expression von Deletionsmutanten, von Substitutionsmutanten und von einem kurzen Fragment der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit GFP-Tag

Die Fusionsproteine aus Vollängen IP3K-C und EGFP werden aktiv in den Kern von eukaryotischen Zellen hinein und LMB-sensitiv aus dem Kern heraus transportiert. Aufgrund des Molekulargewichts von mehr als 100kDa kann ein passiver Transport durch den Kernporenkomplex ausgeschlossen werden. Der nukleäre Export der IP3K-C kann durch Gabe des Export-Inhibitors LMB beeinflusst werden (siehe Ergebnisse 3.2.4.2). Der Inhibitor LMB wirkt durch kovalente Modifikation auf das für den nukleären Exportmechanismus notwendige Exportin 1. Die Funktion von Exportin 1 ist die Erkennung und Bindung von Kernexportsignalen (NES) in zu transportierenden Proteinen. Ein Sequenzabschnitt, der zwischen IP3K-C aus Ratte und Mensch vollständig konserviert ist, entspricht dem für das NES definierten Konsensus (siehe Abbildung 33). Die entsprechenden Aminosäuren wurden in Vollängen-Fusionsproteinen deletiert, um so die Notwendigkeit von diesem Motiv für den nukleären Export zu überprüfen. Außerdem wurde das isolierte NES-Fragment mit einem EGFP-Tag fusioniert. Die intrazelluläre Lokalisation von diesem Fragment sollte zeigen, ob der Sequenzabschnitt hinreichend ist, um den nukleären Export eines Fusionsproteins zu vermitteln.

In der RnIP3K-C befindet sich das putative NES an der Aminosäureposition 318-326. Die entsprechende Nukleotid-Sequenz wurde durch erweiterte Quikchange-Mutagenese aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pRnIP3K-C/EGFP entfernt und der neu entstandene Expressionsvektor, der für ein Vollängen-Fusionsprotein ohne NES kodiert, als pRnIP3K-C(Δ NES_{As318-326})/EGFP (siehe Abbildung 31) bezeichnet. Eine ähnliche Strategie wurde angewandt, um das putative NES der HsIP3K-C an der Position 324-332 zu deletieren. Der Expressionsvektor pEGFP/HsIP3K-C wurde durch erweiterte Quikchange-Mutagenese zum Vektor pEGFP/HsIP3K-C(Δ NES_{As324-332}) (siehe Abbildung 32) umgewandelt, der für ein Vollängen-Fusionsprotein der humanen IP3K-C ohne NES kodiert. Die Deletion eines Aminosäureabschnittes ist ein drastischer Eingriff, der zu Änderungen in der dreidimensionalen Struktur führen und so die Zielsteuerung des Proteins ungewollt beeinflussen kann. Eine weit schonendere Methode ist die funktionale Inaktivierung eines putativen Zielsteuerungssignals durch Substitution von für die Funktion notwendigen Aminosäuren. Zwei konservierte hydrophobe Aminosäuren (Leucin an Position 318 und Valin an Position 321) wurden durch erweiterte Quikchange-Mutagenese zu Alanin-Resten mutiert. Dieser Austausch wird aufgrund der Ähnlichkeit der Reste in Hydrophobizität und

sterischem Anspruch mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf die Proteinfaltung haben. Die Funktion dieses Sequenzabschnittes für die Zielsteuerung des Proteins geht aber verloren. Der eukaryotische Expressionvektor, der für das Vollängen-Fusionsprotein der Ratten IP3K-C mit inaktiviertem NES kodiert, wurde vom Vektor pEGFP/RnIP3K-C abgeleitet und als pEGFP/RnIP3K-C(L³¹⁸CPV→ACPA) bezeichnet (siehe Abbildung 31). Es wurde außerdem ein Vektor hergestellt, der für ein 9-Aminosäuren-Fragment des Core-NES mit einem N-terminalem EGFP-Tag kodiert. Das Konstrukt wurde durch Oligonukleotid-Ligation mit einer *Sall/BamHI*-Strategie hergestellt und als pEGFP/NES (siehe Abbildung 32) bezeichnet. Es wurde nur ein Konstrukt erzeugt, da die Aminosäure-Sequenz der putativen NES vollständig zwischen Ratte und Mensch konserviert ist.

3.2.4 Nukleozytoplasmatisches Shuttling der IP3K-C aus Mensch und Ratte

Die intrazelluläre Lokalisation von IP3K-C aus Mensch und Ratte wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, um ihren Wirkort in eukaryotischen Zellen einzugrenzen. Die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation erlaubt unter Umständen Rückschlüsse auf die Funktion der Kinase im zytoplasmatischen und/oder nukleären Inositolphosphat-Stoffwechsel (siehe Einleitung 1.1.1).

Die entsprechenden Expressionsvektoren für verschiedene GFP-Fusionsproteine der IP3K-C aus Mensch und Ratte wurden durch liposomale Transfektion in eukaryotische Zellen eingebracht. Es wurden sowohl NRK 52E- als auch PC12-Zellen verwendet, um Zelllinien-abhängige Effekte zu untersuchen. Nach mindestens 24-stündiger Expression der Fusionsproteine wurden die transfizierten Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und der Zellkern durch den DNA-spezifischen Farbstoff DAPI markiert. Anschließend wurde die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Vollängen-Fusionsproteine können aufgrund ihrer Größe von mehr als 100kDa nicht passiv über den Kernporenkomplex zwischen ihrem Synthesort im Zytoplasma und dem Zellkern wechseln. Die beobachtete nukleäre Lokalisation kann also nur durch einen aktiven Transport in den Zellkern zustande kommen. Die für diese Zielsteuerung in den Zellkern verantwortlichen Signalsequenzen wurden durch Untersuchungen mit N-terminalen Fragmenten der IP3K-C eingegrenzt. Außerdem erfolgt ein aktiver, Leptomycin B (LMB)-sensitiver Export der IP3K-C aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Die hierfür verantwortliche Signalsequenz wurde ebenfalls durch Lokalisationsstudien mit N-terminalen Fragmenten der Ratten IP3K-C zunächst eingegrenzt und dann durch Deletions- und Substitutionsmutagenese identifiziert.

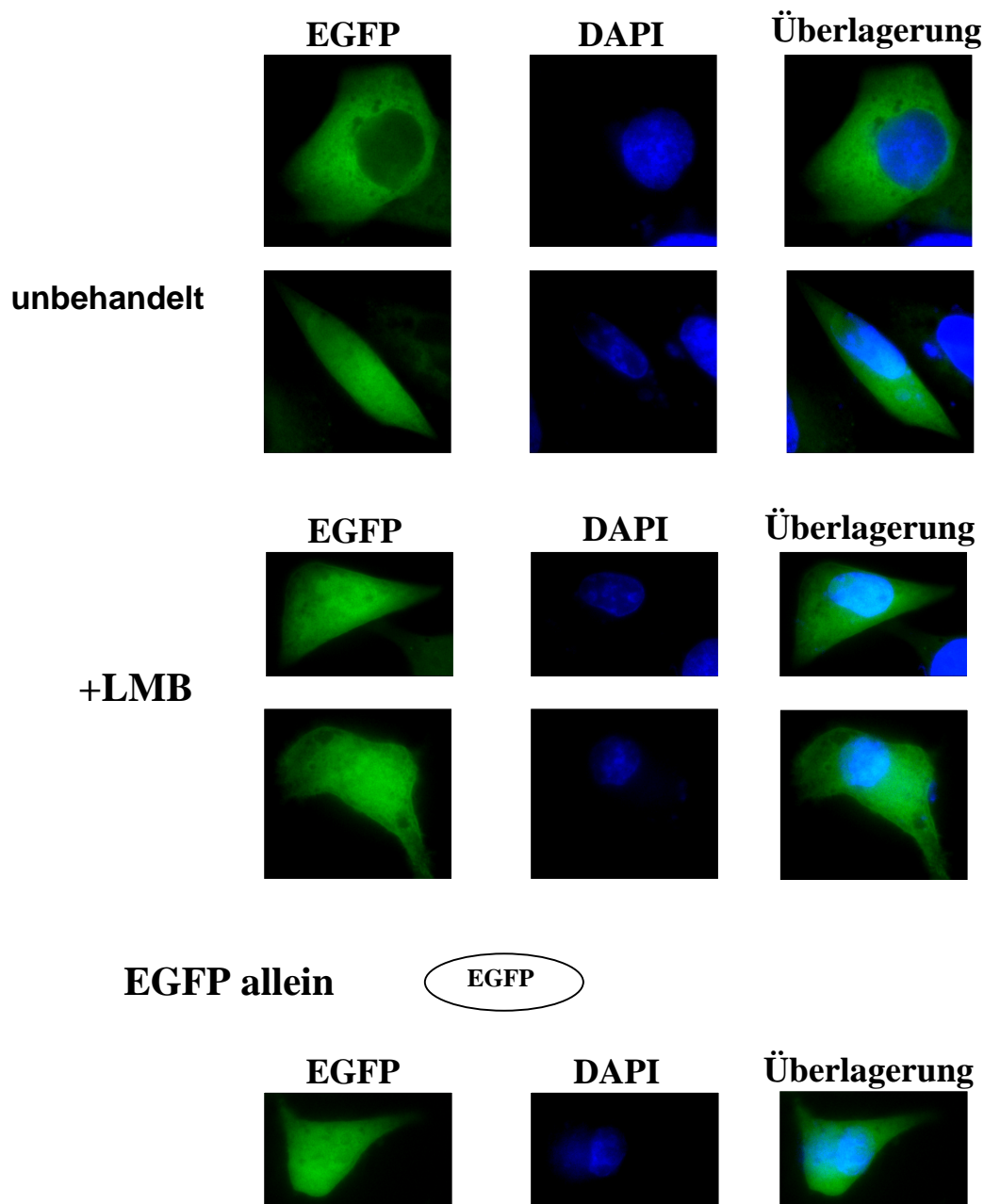
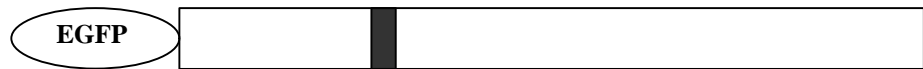
3.2.4.1 *in vivo* Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Vollängen IP3K-C aus Mensch und Ratte

Es wurde die intrazelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Vollängen IP3K-C aus Mensch und Ratte untersucht. Hierzu wurden jeweils zwei Fusionsproteine hergestellt, die den Tag am N-Terminus bzw. C-Terminus des Proteins tragen. Auf diese Weise sollte ein möglicher Einfluss des EGFP-Tags auf die Zielsteuerung des Proteins bestimmt werden.

Es wurde zur Kontrolle das Grün Fluoreszierende Protein EGFP allein in den beiden Zelllinien exprimiert und seine intrazelluläre Lokalisation untersucht. Die Fluoreszenz ist gleichmäßig über die Zelle verteilt, wie es aufgrund des niedrigen Molekulargewichts des Tags (~15kDa) auch zu erwarten ist. Folglich hat der Tag alleine keine Zielsteuerungsfunktion und beeinflusst nicht direkt die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins. Eine indirekte Beeinflussung durch sterische Behinderungen bei der Erkennung von Zielsteuerungssignalen ist aber trotzdem möglich und wurde gesondert untersucht.

Die Fusionsproteine der Ratten IP3K-C sind in ungefähr der Hälfte der transfizierten NRK 52-Zellen ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert und in der anderen Hälfte gleichmäßig verteilt zwischen Zellkern und Zytoplasma. In einem geringen Bruchteil der Zellen liegt das Fusionsprotein ausschließlich im Zellkern vor (siehe Abbildung 34). Dieses Muster der intrazellulären Lokalisation wird bei der Ratten IP3K-C unabhängig vom mit dem Tag fusionierten Terminus beobachtet. Deshalb hat der Tag mit großer Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf die Zielsteuerung des Fusionsproteins. Bei transfizierten PC12-Zellen ist mit beiden Fusionskonstrukten ein ähnliches Lokalisationsmuster zu beobachten. Durch weitere Transfektionsstudien mit NRK 52E-Zellen wurde das Muster der intrazellulären Verteilung von Fusionsproteinen der humanen IP3K-C untersucht. Hierbei wurde eine Abhängigkeit der intrazellulären Lokalisation von der Position des EGFP-Tags beobachtet (siehe Abbildung 34). Das Fusionsprotein mit einem N-terminalen Tag zeigt eine intrazelluläre Lokalisation, die vergleichbar mit dem Muster der Ratten IP3K-C ist. Ungefähr die Hälfte der transfizierten Zellen zeigt eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation und die andere Hälfte eine Gleichverteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma. Bei einer Positionierung des Tags am C-Terminus wird jedoch ausschließlich eine Gleichverteilung der Fluoreszenz in der Zelle beobachtet. Entsprechende Ergebnisse wurden bei der Untersuchung der intrazellulären Lokalisation dieser Konstrukte in PC12-Zellen erzielt (siehe Abbildung 35).

EGFP/RnIP3KC


Abbildung 34: Intrazelluläre Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen der Ratten IP3K-C in NRK 52E-Zellen

In eukaryotische Zellen wurden durch liposomale Transfektion Expressionsvektoren eingebracht, die für eine Vollängen IP3K-C aus Ratte mit N-terminalem Tag kodieren (pEGFP/RnIP3KC). Die transfizierten NRK 52E-Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, die DNA des Zellkerns mit DAPI anfärbt und die intrazelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Fusionsproteine sind in den Abbildungen grün, die DAPI-gefärbten Zellkerne blau und die Gebiete der Ko-Lokalisation hellblau dargestellt. In einem Teil der Studien wurden die transfizierten Zellen mit Leptomycin B (LMB) behandelt, um den nukleären Proteinexport zum Erliegen zu bringen. Die Vollängen IP3K-C zeigte ohne Behandlung („unbehandelt“) mit LMB in ungefähr der Hälfte der transfizierten Zellen eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation und in den anderen Zellen eine Gleichverteilung über die gesamte Zelle. Bei mit LMB behandelten Zellen („+LMB“) wurde stets eine Gleichverteilung des Fusionsproteins zwischen Zellkern und Zytoplasma beobachtet. Außerdem wurde zur Kontrolle der isolierte EGFP-Tag in den NRK 52E-Zellen exprimiert.

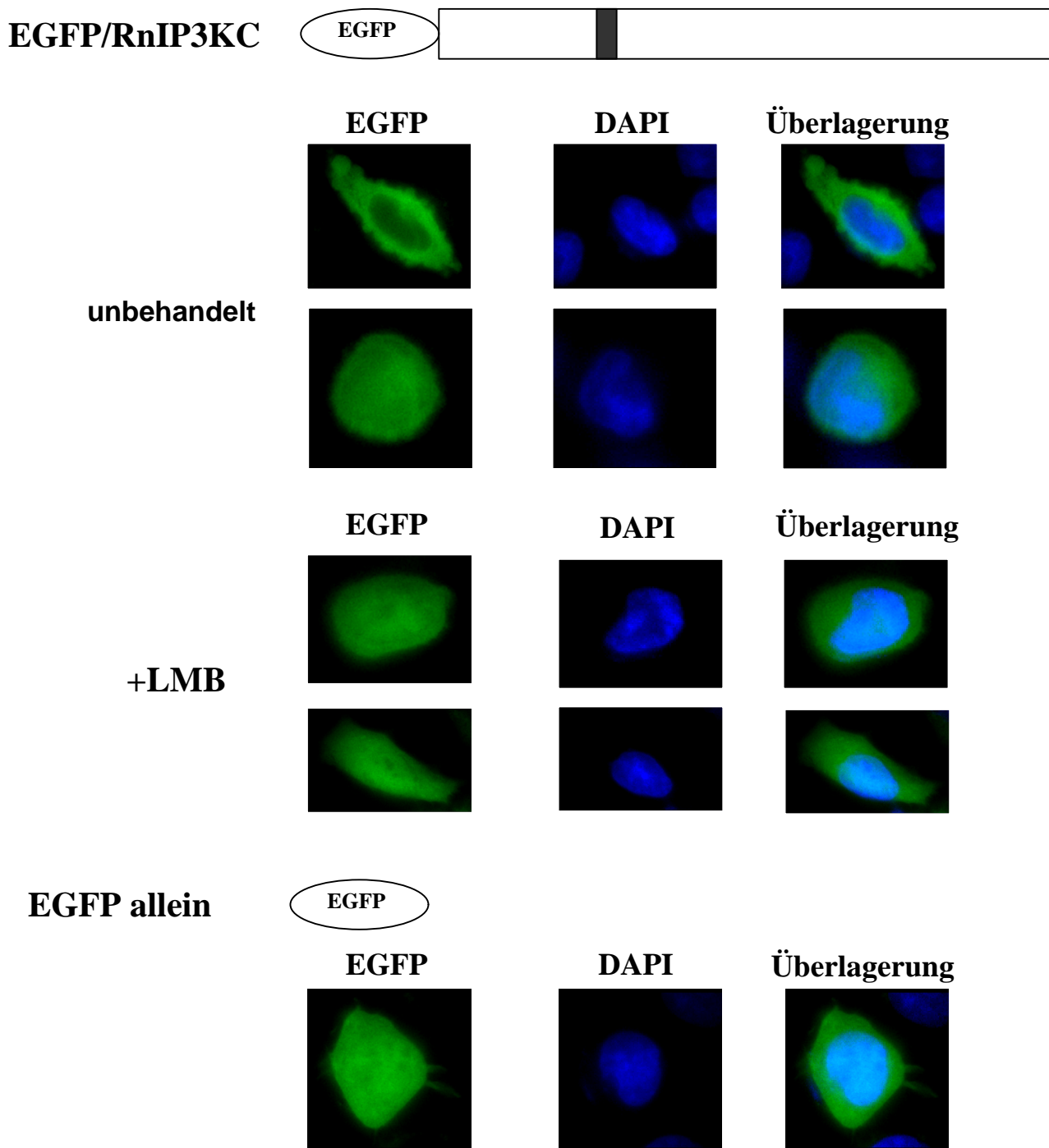


Abbildung 35: Intrazelluläre Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen der Ratten IP3K-C in PC12-Zellen

Die intrazelluläre Lokalisation der Vollängen IP3K-C aus Ratte (pEGFP/RnIP3KC) wurde in PC12-Zellen untersucht. Die experimentelle Durchführung ist in Abbildung 34 beschrieben. Die Fusionsproteine sind grün, die Zellkerne blau und die Gebiete der Ko-Lokalisation hellblau dargestellt. Das Fusionsprotein zeigte in ungefähr gleich großen Anteilen der unbehandelten PC12-Zellen („unbehandelt“) eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation bzw. Gleichverteilung über Zellkern und Zytoplasma. Nach Behandlung mit dem Inhibitor des nukleären Exportes Leptomycin B („+LMB“) konnte in allen Zellen eine Gleichverteilung des Fusionsproteins beobachtet werden. Das Grün Fluoreszierende Protein EGFP alleine wurde zu Kontrollzwecken in PC12-Zellen exprimiert.

3.2.4.2 *in vivo* Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Vollängen IP3K-C aus Mensch und Ratte bei Behandlung mit dem Exportinhibitor Leptomycin B

Die vorhergehenden Lokalisationsstudien haben gezeigt, dass die IP3K-C aktiv von ihrem Syntheseort im Zytoplasma in den Zellkern transportiert wird. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde untersucht, ob auch ein aktiver Export des Fusionsproteins aus dem Kern heraus stattfindet. Dazu wurden die das Vollängen-Fusionsprotein exprimierenden eukaryotischen Zellen mit dem Export-Inhibitor Leptomycin B (LMB) behandelt. Für den LMB-sensitiven Export ist die Erkennung und Bindung der durch ein Kernexportsignal markierten Proteine durch das Exportin 1 notwendig. Der Inhibitor LMB bindet kovalent an Exportin 1 und verhindert dessen Interaktion mit Leucin-reichen Kernexportsignalen.

Expressionsvektoren, die für Vollängen EGFP-Fusionsproteine der IP3K-C von Ratte und Mensch kodieren, wurden durch liposomale Transfektion in NRK 52E-Zellen eingebracht. Diese Zellen wurden anschließend mit LMB inkubiert und die intrazelluläre Lokalisation des EGFP-Fusionsproteins wurde bestimmt. Ein Fusionsprotein der Ratten IP3K-C mit N-terminalem EGFP-Tag zeigte nach Behandlung mit LMB in fast allen transfizierten Zellen eine gleichmäßige Verteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma. Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen wurde in keiner Zelle eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation beobachtet. Ein geringer Bruchteil der Zellen zeigte eine vorherrschend nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins. Dies ist eine deutliche Veränderung zu den unbehandelten Zellen, bei denen ungefähr die Hälfte der Zellen eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation zeigten (siehe Abbildung 34). Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation nach LMB-Behandlung mit PC12-Zellen zeigten ähnliche Ergebnisse (siehe Abbildung 35).

Darüber hinaus gehend wurde der Einfluss von LMB auf das Muster der intrazellulären Verteilung von der humanen IP3K-C mit N-terminalem EGFP-Tag untersucht. Fast alle transfizierten NRK 52E-Zellen zeigten nach der Behandlung mit LMB eine Gleichverteilung des Fusionsproteins zwischen Zellkern und Zytoplasma. Dies ist eine deutliche Veränderung im Verteilungsmuster, da die unbehandelten Zellen ungefähr zur Hälfte eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation zeigten. Dies konnte auch durch Versuche mit PC12-Zellen bestätigt werden.

3.2.4.3 *in vivo* Lokalisation der N-terminalen Domäne der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit GFP-Tag

Im Rahmen der Lokalisationsstudien mit der IP3K-C aus Mensch und Ratte wurde gezeigt, dass die entsprechenden Vollängen-Fusionsproteine aktiv in den Zellkern importiert und aktiv

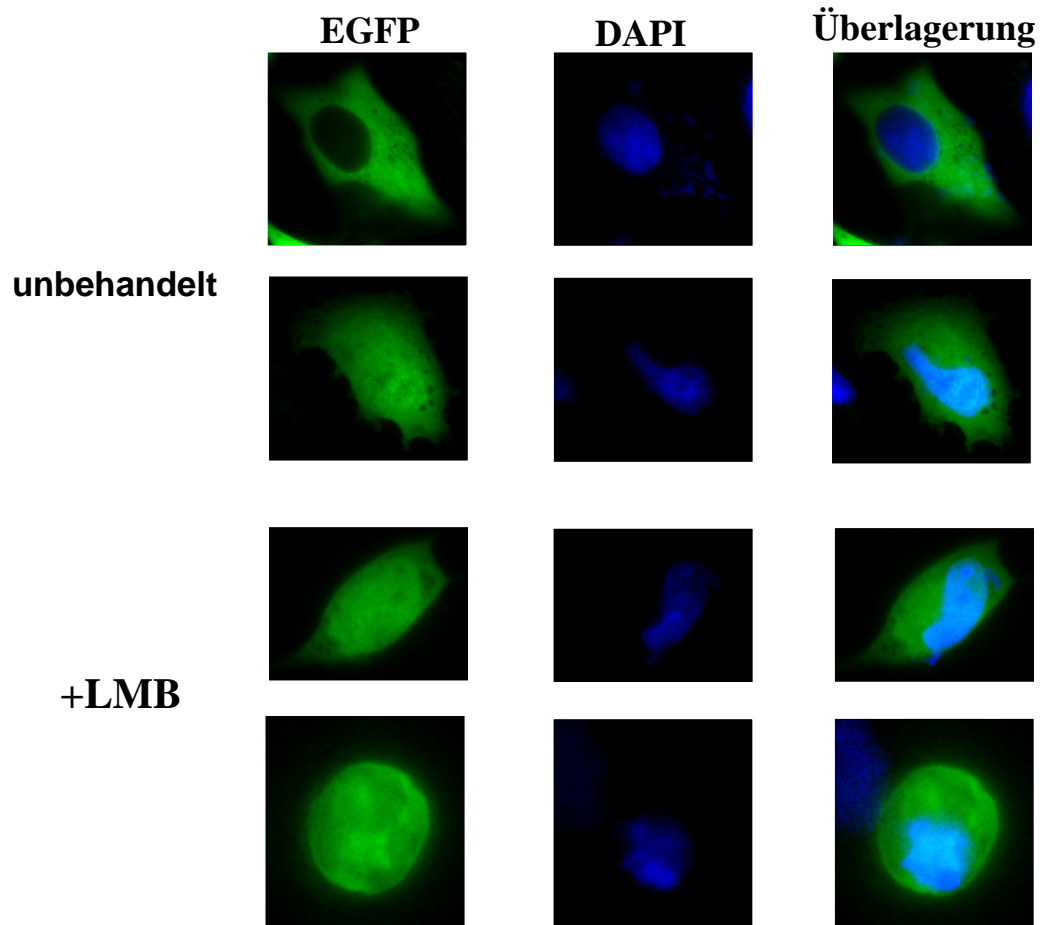
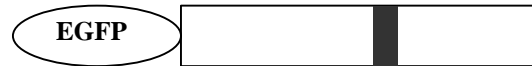
aus dem Zellkern exportiert werden (Abschnitte 3.2.4.1&3.2.4.2). Für diese Transportmechanismen ist es notwendig, dass die zu transportierenden Proteine entsprechende Zielsteuerungssequenzen enthalten. Für die IP3K-A konnte ein Sequenzmotiv für die Lokalisation an F-Aktin und dendritische Dorne in der N-terminalen Domäne identifiziert werden [Schell et al., 2001]. Die N-terminalen Domänen der IP3Ks unterscheiden sich untereinander deutlich in ihrer Aminosäuresequenz und in ihrer Funktion in Regulation und Zielsteuerung. Die isolierten N-terminalen Domänen der IP3K von Mensch und Ratte wurden mit einem EGFP-Tag fusioniert, um die Position der Zielsteuerungssequenzen für nukleären Import und Export einzugrenzen.

Die N-terminale Domäne (Aminosäure 1-379) der Ratten IP3K-C wurde am N-Terminus bzw. C-Terminus mit EGFP fusioniert und ihre intrazelluläre Lokalisation in NRK 52E-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die N-terminale Domäne ist unabhängig von der Position des Tags in ungefähr der Hälfte der transfizierten Zellen ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert und in der anderen Hälfte gleichmäßig zwischen Kern und Zytoplasma verteilt. Dieses Verteilungsmuster entspricht den Beobachtungen bei der Untersuchung von Vollängen Fusionsproteinen der Ratten IP3K-C. Das EGFP-Fusionsprotein der isolierten N-terminalen Domäne ist zu groß, um passiv über den Kernporenkomplex zwischen Kern und Zytoplasma zu wechseln. Die Beobachtung einer nukleären Lokalisation zeigt, dass die N-terminale Domäne ein Sequenzmotiv für die Zielsteuerung in den Zellkern beinhaltet. Anschließend wurde die N-terminale Domäne mit N-terminalem EGFP-Tag in Zellen exprimiert, die mit dem Export-Inhibitor Leptomycin B (LMB) behandelt wurden, um so die mögliche Positionierung eines nukleären Exportsignals in der N-terminalen Domäne zu untersuchen. Die transfizierten Zellen zeigten nach der Behandlung mit LMB eine Gleichverteilung des Fusionsproteins zwischen Zellkern und Zytoplasma. Damit entspricht das Verteilungsmuster der isolierten N-terminalen Domäne mit bzw. ohne LMB-Behandlung dem entsprechenden Verteilungsmuster der Vollängen-Form der Ratten IP3K-C. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine Positionierung der Zielsteuerungssequenzen für nukleären Import und Export in dieser Domäne (siehe Abbildung 36). Diese Ergebnisse zur intrazellulären Lokalisation der Konstrukte wurden in PC12-Zellen bestätigt.

In weiteren Studien wurde die isolierte N-terminale Domäne (Aminosäure 1-386) der humanen IP3K-C mit einem N-terminalen EGFP-Tag fusioniert. Dieses Konstrukt zeigte in NRK 52E-Zellen ausschließlich eine Gleichverteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma. Durch Behandlung mit LMB wurde keine Veränderung der intrazellulären Lokalisation erreicht. Die transfizierten Zellen zeigten weiterhin eine Gleichverteilung des Fusionsproteins.

Das Fusionsprotein besitzt ein zu großes Molekulargewicht, um passiv in den Zellkern zu gelangen. Offensichtlich besitzt die isolierte N-terminale Domäne ein Sequenzmotiv für die Zielsteuerung in den Zellkern. Das bei der Volllänge beobachtete LMB-sensitive Signal für den nukleären Export scheint aber bei der humanen Form nicht in der N-terminalen Domäne lokalisiert zu sein, da deren intrazelluläre Lokalisation nicht vom Export-Inhibitor LMB beeinflusst wird.

EGFP/RnIP3KC(AS1-379)



EGFP allein

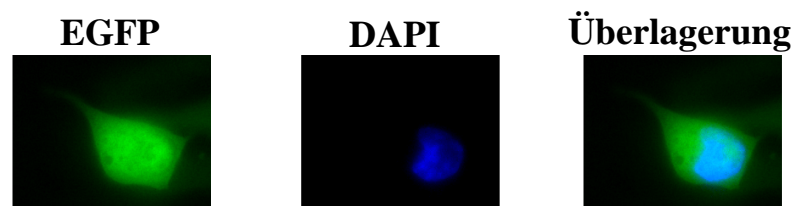


Abbildung 36: Intrazelluläre Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen der N-terminalen Domäne der Ratten IP3K-C in NRK 52E-Zellen

In NRK 52E-Zellen wurden durch liposomale Transfektion eukaryotische Expressionsvektoren eingebracht, die für Fusionsproteine aus EGFP und der N-terminalen Domäne kodieren. Das Lokalisationsverhalten der isolierten Domäne ähnelte dem des Vollängenproteins. In unbehandelten NRK 52E-Zellen („unbehandelt“) zeigte das Fusionsprotein in ungefähr der Hälfte der transfizierten Zellen eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation und in der anderen Hälfte eine Gleichverteilung über die gesamte Zelle. Nach der Behandlung mit dem Export-Inhibitor Leptomycin B („+LMB“) wurde in allen transfizierten Zellen eine gleichmäßige intrazelluläre Verteilung des Fusionsproteins beobachtet. In den Abbildungen sind die Fusionsproteine grün, die Zellkerne blau und die Gebiete der Ko-Lokalisation hellblau dargestellt. In Abbildung 34 ist die experimentelle Durchführung beschrieben.

3.2.4.4 *in vivo* Lokalisation von Deletions- und Substitutionsmutanten der IP3K-C aus Mensch und Ratte mit GFP-Tag

In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die IP3K-C aus Ratte und Mensch ein nukleozytoplasmatisches Shuttling-Protein ist. Es erfolgt ein aktiver Import in den Zellkern und ein aktiver Export aus dem Kern heraus, da aufgrund des Molekulargewichtes ein passives Durchqueren des Kernporenkomplexes ausgeschlossen ist. Bei der Ratten Isoform konnten die für den nukleären Import und für den Leptomycin B (LMB)-sensitiven Export verantwortlichen Zielsteuerungssequenzen auf die N-terminale Domäne des Proteins eingegrenzt werden. Hingegen ist offensichtlich in der N-terminalen Domäne der humanen Isoform nur eine Signalsequenz für den aktiven Import, aber keine Sequenz für einen aktiven Export vorhanden.

In der N-terminalen Domäne der Ratte entspricht eine einzige Kandidatensequenz (Aminosäure 318-326) vollständig dem Konsensusmotiv eines Leucin-reichen Kernexportsignals. Diese Sequenz wurde im Vollängen EGFP-Fusionsprotein deletiert, um ihre Bedeutung für den nukleären Export zu untersuchen. Die eine Deletionsmutante exprimierenden NRK 52E-Zellen zeigten eine einheitliche Verteilung der Fluoreszenz über Zytoplasma und Zellkern. Es wurden im Gegensatz zum Wildtyp keine transfizierten Zellen mit einer ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisation beobachtet (siehe Abbildung 37A). Das Verteilungsmuster der Deletionsmutante entsprach vielmehr dem von LMB-behandelten Zellen. Offensichtlich führt die Deletion des putativen NES zum Zusammenbruch des nukleären Exportes der IP3K-C. Die Entfernung einer Teilsequenz aus einem Protein ist ein drastischer Eingriff in dessen Struktur und kann zu Fehlfaltungen und zu Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur des Protein führen. Diese Veränderungen können durch sterische Hinderung die Erkennung von Zielsteuerungssequenzen erschweren, obwohl diese Sequenzen nicht deletiert wurden. Die Substitution von essentiellen Aminosäureresten einer putativen Signalsequenz durch Reste mit ähnlichem sterischen Anspruch und ähnlicher Hydrophobizität ist eine schonendere Methode. Eine entsprechende Substitutionsmutante mit funktional inaktiviertem Kernexportsignal wurde auf ihre intrazelluläre Lokalisation untersucht. Diese Mutante zeigte genauso wie die Deletionsmutante eine gleichmäßige Verteilung des Fusionsproteins zwischen Zellkern und Zytoplasma in transfizierten NRK 52E-Zellen (siehe Abbildung 37B). Offensichtlich ist die putative Zielsteuerungssequenz in der N-terminalen Domäne der Ratten IP3K-C notwendig für den aktiven nukleären Export. Die Konstrukte zeigten in transfizierten PC12-Zellen ein vergleichbares Verteilungsmuster.

Bei der humanen Isoform wurde die entsprechende Aminosäuresequenz 324-332 ebenfalls im Vollängen Fusionsprotein deletiert. Es wurde keine Veränderung des Lokalisationsverhaltens in NRK 52E-Zellen und PC12-Zellen beobachtet. Vergleichbar mit dem Wildtyp zeigte ungefähr die Hälfte der transfizierten Zellen eine ausschließlich nukleäre Lokalisation und die andere Hälfte eine gleichmäßige Verteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma. Dieses Sequenzmotiv hat bei den humanen Isoform offensichtlich keine funktionale Bedeutung für die intrazelluläre Verteilung.

In einem weiteren Versuch wurde das putative Kernexportsignal mit einem N-terminalen EGFP-Tag versehen, um seinen hinreichenden Charakter für eine Zielsteuerung aus dem Zellkern ins Zytoplasma zu untersuchen. Da die Aminosäuresequenz des putativen Kernexportsignals vollständig zwischen Mensch und Ratte konserviert ist, wurde nur ein Konstrukt hergestellt und in NRK 52E- und PC12-Zellen exprimiert. Das EGFP-Fusionsprotein ist gleichmäßig über die Zellen verteilt vergleichbar der intrazellulären Lokalisation des EGFP-Tags allein (siehe Abbildung 37C&D). Das untersuchte Sequenzmotiv allein ist offensichtlich nicht hinreichend für die Vermittlung eines nukleären Exportes.

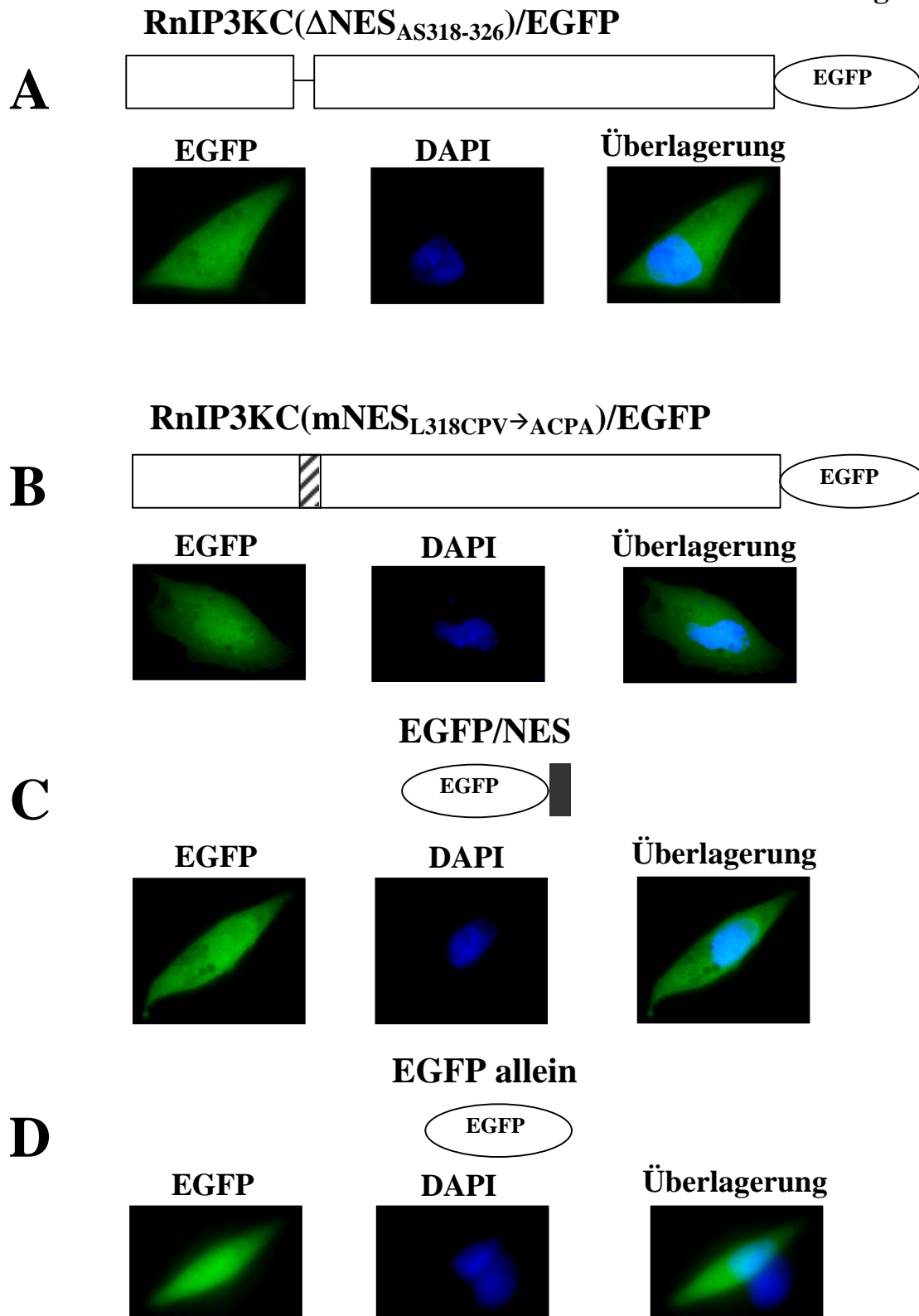


Abbildung 37: Intrazelluläre Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen von verschiedenen Mutanten der Ratten IP3K-C in NRK 52E-Zellen

Es wurde die intrazelluläre Lokalisation einer Deletions- und einer Substitutionsmutante der Vollängen IP3K-C aus Ratte untersucht. In der Deletionsmutante (A) wurde das putative Kernexportsignal (NES) in der N-terminalen Domäne des Vollängen-Proteins entfernt. Das mutierte EGFP-Fusionsprotein zeigte eine gleichmäßige Verteilung über Zellkern und Zytoplasma. Eine ähnliche Verteilung wurde auch bei der Substitutionsmutante (B) beobachtet, in der das putative NES durch den Austausch von zwei essentiellen hydrophoben Aminosäureresten inaktiviert wurde. Das Core-NES fusioniert mit EGFP (C) zeigte genauso wie das isolierte EGFP (D) eine gleichmäßige Verteilung in der gesamten Zelle. In den Abbildungen sind die Fusionsproteine grün, die Zellkerne blau und die Gebiete der Ko-Lokalisation hellblau dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Das multifunktionale Hefeprotein ArgRIII und homologe Proteine in Tieren und Pflanzen

4.1.1 Inositolphosphat Multikinasen aus Tieren und Pflanzen sind zum Hefeprotein ArgRIII homologe Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zum Hefeprotein ArgRIII homologes Protein aus *Homo sapiens* identifiziert und eingehend charakterisiert. Die Funktion des ArgRIII Proteins als Transkriptionsregulator im Argininmetabolismus ist schon seit längerem bekannt und gut untersucht. Durch stabilisierende Wechselwirkungen mit einem Komplex von Transkriptionsfaktoren beeinflusst ArgRIII die metabolische Antwort der Hefezelle auf die Verfügbarkeit der Aminosäure Arginin als Stickstoffquelle im Nährmedium [El Bakkoury et al., 2000]. Zusätzliche Aktivitäten des ArgRIII Proteins als Inositolphosphat Multikinase und als notwendiger Faktor im nukleären mRNA-Export wurden erstmals von Snyder und Mitarbeitern beschrieben [Saiardi et al., 1999; Saiardi et al., 2000]. York und Mitarbeiter sehen in dieser enzymatischen Aktivität eine notwendige Voraussetzung für die Rolle des ArgRIII Proteins in der Transkriptionsregulation [Odom et al., 2000]. Dieser Zusammenhang wird jedoch von Messenguy und Mitarbeitern verneint [Dubois et al., 2000]. Vor kurzem rückte nun die Transkriptionskontrolle durch Inositolphosphat-induziertes Chromatin-Remodeling in den Mittelpunkt der Forschung [Rando et al., 2003].

In der vorliegenden Arbeit und in den Publikationen von anderen Arbeitsgruppen wird beschrieben, wie in letzter Zeit ArgRIII-homologe Proteine in einzelligen und vielzelligen Organismen identifiziert wurden. Die als Inositolphosphat Multikinase (IPMK) bezeichneten Proteine wurden im Einzeller *Schistosoma japonicum* und in verschiedenen Mehrzellern wie dem Bandwurm *Echinococcus granulosus*, dem Huhn und den Säugetieren Mensch und Ratte beschrieben (siehe Abbildung 38). Die entsprechenden Vollängen-cDNAs wurden aus Ratte [Saiardi et al., 2001] und Mensch (siehe Ergebnisse 3.1.1) kloniert. Auch eine pflanzliche IPMK aus *Arabidopsis thaliana* wurde mittlerweile identifiziert [Xia et al., 2003]. Auf Ebene der Aminosäuresequenz sind insbesondere die Inositolphosphat-Bindungsstelle, das katalytisch wichtige SSL-Motiv und die ATP-Bindungsstelle zwischen den verschiedenen Arten stark konserviert. Teilweise widersprüchliche Veröffentlichungen beschreiben deutliche Unterschiede zwischen den Arten bei der Gewebe-spezifischen mRNA-Expression und bei der enzymatischen Aktivität von rekombinant exprimiertem Protein. Eine nukleäre

Lokalisation wurde sowohl für das ArgRIII Protein in Hefe, als auch für die IPMKs in Mensch und *Arabidopsis thaliana* gezeigt. Möglicherweise spielen auch die ArgRIII-homologen Proteine in Säugetieren, die in dieser Arbeit vorrangig untersucht wurden, eine

Hs IMPK	1	MATEPPSPLRVEAPGPPPEMRTSPAIES	TPEGT	PQPAGGRLRF	INGCVPLSH	--	QVAGHMY
Rn IMPK	1	MAAEPPA-LRLRPPG	-----	STGDSP	PVP	-----	RLGGCVPLSH--QVAGHMY
Gg IPMK	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sj MF1	1	-----	-----	-----	-----	-----	MFSRYLHVVRNHMP
Eg IPMK	1	-----	-----	KMTVE	--	PLFNSGSISD	IPDHL-LAYQYQVGGHGT
Hs IMPK	59	GKDKV--GILQHP-DGTVLKQLOPPPRGP	PRELEF	YNM	YAAD	CFDGVLL	ELRKYLPKYYG
Rn IMPK	42	GKDKV--GILQHP-DGTVLKQLOPPPRGP	PRELEF	YTM	YAAD	CADAVLL	ELRKHLPKYYG
Gg IPMK	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sj MF1	14	FRWLV--IILEKI-Q-VILKDCQ--	RCMREVM	FYRRV	FSPD	ASEALIL	LRQFIPIYFG
Eg IPMK	33	LAKSVDYKMLRHPQEP	IVYKRLPP	DERGIL	LEANF	FKVFG	ENASPETA-KLRPIVPSFHG
Hs IMPK	116	IWSPPTAPNDLYLKLEDVTHK	PNKPCIMDVKIGOK	YDP	FASSEKI	QQQVSKYPLMEEIG	
Rn IMPK	99	VWSPPSAPNDVYLKLEDVTHK	PNKPCIMDVKIGRK	YDP	FASAEKI	QQQVSKYPLMEEIG	
Gg IPMK	1	VWSPPTAPNDTYLKLEDVTRK	PNKPCIMDVKIGOK	YDP	VASAEKI	QQQVSKYPLMEEIG	
Sj MF1	65	IFRCPTT-KAFYMGLSDLVAN	KQPNVCFKMGTI	YFP	DSEEDK	IAREQSKYAWRRKLG	
Eg IPMK	92	LYRDSNAV--LYIGLEDVLP	LSNPSVCDLKMGRV	CPD	ASEAKI	KAENAKYPHRDVTG	
Hs IMPK	176	FLVLGMRVYHVHSDSYETENQHYGRSLTKETI	KDGVSR	FFHNG	--	YCLRKDAVAAS	IQ
Rn IMPK	159	FLVLGMRVYHLHSDSYETONQHYGRGLTKETL	KEGVSK	FFHNG	--	ECLRKDAVAAS	IQ
Gg IPMK	61	FLVLGMRVYHVSDSYETONQHYGRSLTKETV	KDGLSK	FFHNG	--	YCLRKDAVAAS	IQ
Sj MF1	124	FVLSGMQVYDTEHCLIKFSKEFGRNLTPEQVYSV	GVKTF	LGSDST	YCIK	---	LAQNYIQ
Eg IPMK	150	FLFTGMKVYDQNSNCYLTVP	PRHYGRSLDFEAV	YVNG	KT	DYHDR	-----
Hs IMPK	232	KIEKILQWFEN--QKQ	NFYASSLLFVYE	ESSQPT	TKLND	RTLAEKF	LSKGQLSDTEV
Rn IMPK	215	KVEKILQWFEN--QKQ	NFYASSLLFVYE	ESSQPT	TKSND	RTLGRF	LSKGA
Gg IPMK	117	KVEKILKWFEG--QKQ	NFYASSLLFVYE	ESSQPT	VRLSD	VTLAEKRGV	KGLLSGGDI
Sj MF1	181	QLGHILNWRGIWRR	DVCRSSLLLIHE	---	TINN	SGNSIHDHCP	SKSC--PASL
Eg IPMK		-----	-----	-----	-----	-----	-----
Hs IMPK	289	LEYNNNFHVLSSSTANGKIESSV	GKSLSKMYARHRKIYTK	---	HSSQT	SLKVENLEQDN	
Rn IMPK	272	LECNNNFHFLFSSPANG---	TSVGKSLSKAYSRRHKLYAKK	---	HQSQT	SLKVETLEQDN	
Gg IPMK	175	LEYNNNIHVISSTENGKIEASV	SKGLSKFYAL				
Sj MF1	233	IFPSSSTHI--NNTHTSCATT	TVNPTIAKVP	APILNQLI	KKPSN	FNHSETP	LI-LNITKSSN
Eg IPMK		-----	-----	-----	-----	-----	-----
Hs IMPK	345	GWKSMSQEHLNGNVLSOLEKVFYHLPTGCQEIAE	EV	RMIDFAH	--		
Rn IMPK	325	GWKSMSQEHLNGNVLSOLEKVFYHL	PAGRQEIAE	EV	RMIDFAH	--	
Gg IPMK		-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sj MF1	291	GGSSSSS-----	SQTTSV	--	H-----	QVYLIDFAHW	EKSCSLTNDYTAAN
Eg IPMK		-----	-----	-----	-----	-----	-----
Hs IMPK	389	VFPSNT-----	IDE	GYVYGLKHLI	SVLRS	TLDN	-----
Rn IMPK	369	VFPSNT-----	VDE	GYVYGLKHLI	AVLRS	TLDS	-----
Gg IPMK		-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sj MF1	331	IHANNNSSSSSSSSSRGKSYWT	CELTDGFRH	GLKTL	TLISLMQR	TVNTENDIDVK	
Eg IPMK		-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 38: Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Inositolphosphat Multikinasen aus Tieren
 Zum multifunktionalen Hefeprotein ArgRIII homologe Proteine wurden in Pflanzen und Tieren identifiziert und als Inositolphosphat Multikinasen (IPMKs) bezeichnet. Die gründlich untersuchten IPMKs aus Säugetieren besitzen ähnliche enzymatische Aktivitäten wie das Hefeprotein. Außerdem konnte beim Menschen eine vorherrschend nukleäre Lokalisation gezeigt werden, die in der Hefe bereits gezeigte Aufgaben in Transkriptionsregulation und mRNA-Export auch bei Säugetieren vermuten lässt. Für den Einzeller *Schistosoma japonicum* (Sj) und für die Säugetiere Mensch (*Homo sapiens*, Hs) und Ratte (*Rattus norvegicus*, Rn) sind die vollständigen Sequenzen dargestellt. Das Homolog in *Schistosoma japonicum* wird als Mf1 Protein bezeichnet (GenBank accession no. AAK52432). Die Sequenzen der IPMKs aus dem Huhn (*Gallus gallus*, Gg) und dem Bandwurm *Echinococcus granulosus* (Eg) sind nicht vollständig bekannt. Vom N-Terminus zum C-Terminus sind die in ihrer Sequenz hochgradig konservierten und funktional wichtigen Proteinabschnitte Inositolphosphat-Bindungsstelle, SSSL-Motiv und ATP-Bindungsstelle durch Kästen hervorgehoben. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Kode dargestellt. In mindestens drei Arten konservierte Reste werden als weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund und ähnliche Reste als weiße Buchstaben auf grauem Hintergrund gezeigt.

Rolle bei der Transkriptionsregulation durch Inositolphosphat-induziertes Chromatin-Remodeling [Rando et al., 2003].

4.1.1.1 Expressionsmuster der Inositolphosphat Multikinase in verschiedenen Geweben von Ratte und Mensch

Die Expressionsstärke der Inositolphosphat Multikinase (IPMK) von Ratte und der im Rahmen dieser Arbeit erstmalig identifizierten IPMK von Mensch wurde in verschiedenen Geweben auf Ebene der mRNA von [Saiardi et al., 2001] und [Chang et al., 2002] untersucht. Bei diesen Northern Blot Studien zeigte sich eine insgesamt ähnliche, aber in einigen Geweben bemerkenswert unterschiedliche Verteilung in Ratte und Mensch. Die mRNA konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden, und zwar vorherrschend bei beiden Arten mit einer ähnlichen Expressionsstärke. Abweichend davon wurde die stärkste Expression beim Menschen in der Leber, aber bei der Ratte in Niere und Hirn gefunden (siehe Abbildung 39).

Die Unterschiede bei der beobachteten Expressionsstärke im Gehirn können dadurch erklärt werden, dass beim Menschen eine Gesamthirn-Probe und nicht einzelne Hirnbereiche wie bei der Ratte untersucht wurde. Bei der Ratte zeigen Cerebellum und Cortex eine deutlich stärkere Expression als der Hippocampus. Es kann vermutet werden, dass weitere die IPMK schwächer exprimierende Bereiche die durchschnittliche Expressionsstärke des Gesamthirns auch bei der Ratte auf ein ähnlich niedriges Niveau wie beim Menschen absenken. Eine

Gewebe	Expression	
	Mensch	Ratte
Hirn	+	?
Hippocampus	?	++
Cortex	?	+++
Cerebellum	?	+++
Herz	+	++
Skelettmuskel	++	?
Dickdarm	+	?
Thymus	+	++
Milz	+	+
Niere	+	+++
Leber	+++	+
Dünndarm	+	?
Plazenta	++	?
Hoden	?	++
Lunge	+	++
Leukozyten	++	?

Abbildung 39: Vergleich der Expressionsmuster der Inositolphosphat Multikinasen aus Mensch und Ratte

Die Expressionsstärke der Inositolphosphat Multikinase (IPMK) auf Ebene der mRNA wurde für verschiedene Gewebe aus Mensch und Ratte durch Northern Blot Untersuchungen bestimmt [Saiardi et al., 2001; Chang et al., 2002]. Eine besonders starke Expression (+++) wird beim Menschen in der Leber, bei der Ratte jedoch in der Niere und in bestimmten Hirnbereichen beobachtet. Die übrigen Geweben zeigen bei beiden Säugetieren eine ähnliche Expression der IPMK auf mittlerem (++) oder niedrigem (+) Niveau. Es wurden nicht alle Gewebe von beiden Arten untersucht (?). Die Expressionsmuster der beiden Säugetiere sind zwar eindeutig ähnlich, weisen aber in einigen Geweben bemerkenswerte Unterschiede auf.

Erklärung für die sehr starke Expression der IPMK in Niere und Leber in jeweils nur einer Art fällt schwerer. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die für eine mRNA-Präparation sehr wichtige schnelle Gewinnung und Aufarbeitung der Gewebeprobe beim Menschen nur bedingt möglich ist. Deshalb muss stets mit der Möglichkeit von experimentellen Verzögerungen und einer damit verbundenen (teilweisen) Degradation der mRNA gerechnet werden. Da auch nicht immer die vollständige Aufarbeitung des gesamten Organs sichergestellt werden kann, sollten Expressionsstudien mit humanen Geweben nicht vorbehaltlos mit Studien am viel leichter zugänglichen Tiermodell verglichen werden.

Es werden zwar insgesamt ähnliche Expressionsmuster der IPMK in Ratte und Mensch beobachtet, jedoch zeigen einige Gewebe für den Vergleich von Säugetieren bemerkenswerte Unterschiede. Entscheidender jedoch als die Stärke der mRNA-Expression ist für die physiologische Rolle der IPMK die Menge und Aktivität des im jeweiligen Gewebe gebildeten Proteins. Die vorhandene Menge an Protein wird nicht allein durch die Anzahl entsprechender mRNA-Moleküle, sondern auch durch die Stärke der Proteintranslation und –degradation bestimmt. Schließlich kann die Aktivität des vorhandenen Proteins durch posttranslationale Modifikationen und durch Interaktionen mit Protein- und Nicht-Protein-Faktoren stark beeinflusst werden.

4.1.1.2 Enzymatische Aktivitäten der Inositolphosphat Multikinase aus Ratte und Mensch

Nach der Aufdeckung von zusätzlichen Funktionen des Transkriptionsregulators ArgRIII wurden dessen enzymatische Aktivitäten von verschiedenen Arbeitsgruppen gründlich untersucht [Saiardi et al., 1999; Odom et al., 2000; Zhang et al., 2001]. Das ArgRIII Protein ist eine Inositolphosphat Multikinase (IPMK) (siehe Abbildung 40A), die den sekundären Botenstoff $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zum $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ phosphoryliert, wobei bevorzugt das Zwischenprodukt $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ gebildet wird.

Die enzymatischen Eigenschaften der IPMK aus Ratte (RnIPMK) wurden von Snyder und Mitarbeitern eingehend charakterisiert [Saiardi et al., 2000] und sind denen des Hefeproteins in den beobachteten Hauptaktivitäten sehr ähnlich (siehe Abbildung 40B). Auch die RnIPMK phosphoryliert $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ an der 3- oder 6-Hydroxylgruppe und in einer folgenden InsP_4 -Phosphorylierung an der verbleibenden 3- oder 6-Hydroxylgruppe zum $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$. Das bevorzugt gebildete Zwischenprodukt ist jedoch das $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ - und nicht wie bei der Hefe das $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ -Isomer. Der Grund für diese stark abweichenden Konzentrationen des InsP_4 -Zwischenproduktes ist nicht notwendigerweise, dass der Stoffwechselweg über

Ins(1,3,4,5)P₄ anders als bei der Hefe der eindeutig bevorzugte ist. Eine mögliche Ursache könnte genauso gut ein niedrigerer K_M und/oder ein höherer v_{max} für die Umsetzung des in geringeren Mengen detektierten Zwischenproduktes Ins(1,3,4,5)P₄ zum InsP₅ im Vergleich zur Umsetzung des Ins(1,4,5,6)P₄ zum InsP₅ sein. Eine weitere Phosphorylierung des von der RnIPMK gebildeten Ins(1,3,4,5,6)P₅ an der 2-Hydroxylgruppe zum InsP₆ wie in der Hefe beobachtet erfolgt in Säuger-Zellen wahrscheinlich nicht. Die für diese Umsetzung notwendige IP5 2-Kinase besitzt bei Säugetieren eine bemerkenswert niedrige spezifische Aktivität und ihre Expression ist in einigen Geweben offensichtlich schwach, obwohl in jedem dieser Gewebe InsP₆ vorhanden ist [Verbsky et al., 2002].

Die IPMK aus Mensch (HsIPMK) wurde erstmalig im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und kloniert und unabhängig von zwei Arbeitsgruppen mit deutlich unterschiedlichen Ergebnissen enzymatisch charakterisiert. Prof. Mayr und Mitarbeiter [Nalaskowski et al., 2002] konnten zeigen, dass die HsIPMK sehr ähnlich wie das homologe Protein aus Ratte eine effektive Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase mit niedrigem K_M und hoher spezifischer Aktivität ist und außerdem Ins(1,4,5,6)P₄ 3-Kinase-, Ins(1,4,5)P₃ 6-Kinase- und Ins(1,3,4,5)P₄ 6-Kinase-Aktivität aufweist (siehe Abbildung 40C). Von all diesen Aktivitäten ist die der Ins(1,3,4,5)P₄ 6-Kinase höchstwahrscheinlich die am wenigsten effektive, da sich nur dieses Zwischenprodukt bei der Umsetzung von Ins(1,4,5)P₃ zum Ins(1,3,4,5,6)P₅ stark anreichert. Eine weitere durch die HsIPMK katalysierte Umsetzung ist die Phyrophosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu mehreren PP-InsP₄-Isomeren. Die physiologische Bedeutung dieser Nebenaktivität bleibt unklar, da sie nur unter bestimmten Assaybedingungen beobachtet werden kann. Von Majerus und Mitarbeitern [Chang et al., 2002] wurden deutlich abweichende enzymatische Eigenschaften der HsIPMK beschrieben. Es wurde eine Hauptaktivität als Ins(1,3,4,6)P₄ 5-Kinase und u.a. eine Nebenaktivität als Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase beobachtet. Außerdem wurde anders als bei den homologen Proteinen von Hefe und Ratte und im Widerspruch zu den Beobachtungen von Prof. Mayr und Mitarbeitern kein InsP₅- und kein PP-InsP₄ gebildet. Es konnte außerdem keinerlei 6-Kinase Aktivität der HsIPMK gezeigt werden. Majerus sieht die von ihm als „humane Ins(1,3,4,6)P₄ 5-Kinase“ bezeichnete HsIPMK als Schlüsselenzym für die Biosynthese von InsP₆ bei Säugetieren (siehe Abbildung 40D). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen sind die von der jeweiligen Arbeitsgruppe angewandten Reinigungs- und Assaysysteme. Die Gruppe um Prof. Mayr arbeitete bei der Reinigung mit einem HsIPMK Fusionsprotein mit N-terminalem Strep-Tag [Skerra & Schmidt, 2000] und benutzte beim Assay ein TEA (Triethanolamin)-Puffersystem mit einer ATP-Konzentration von 0,5 mM, wohingegen Majerus einen N-terminalen His-Tag [Porath et

al., 1975] und ein System mit HEPES (Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure)-Puffer und 5 mM ATP einsetzte. Auffallend ist die ca. 50-fach höhere spezifische Aktivität des Strep-Tag-Fusionsproteins, die möglicherweise durch größtenteils fehlgefaltetes und deshalb inaktives His-Tag-Protein erklärt wird.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die enzymatischen Eigenschaften des Hefeproteins ArgRIII und der vor kurzem identifizierten IPMKs aus den Säugetieren Mensch und Ratte ähnlich, aber nicht identisch sind. Die stark abweichenden Beobachtungen einer Arbeitsgruppe [Chang et al., 2002] bleiben ungeklärt. Alle drei rekombinanten Fusionsproteine zeigen Inositolphosphat Multikinase Aktivität, die hauptsächlich die Umsetzung von Ins(1,4,5)P₃ zu Ins(1,3,4,5,6)P₅ katalysiert. Bei den Effizienzen der einzelnen Haupt- und Nebenaktivitäten gibt es geringfügige Unterschiede zwischen den Arten.

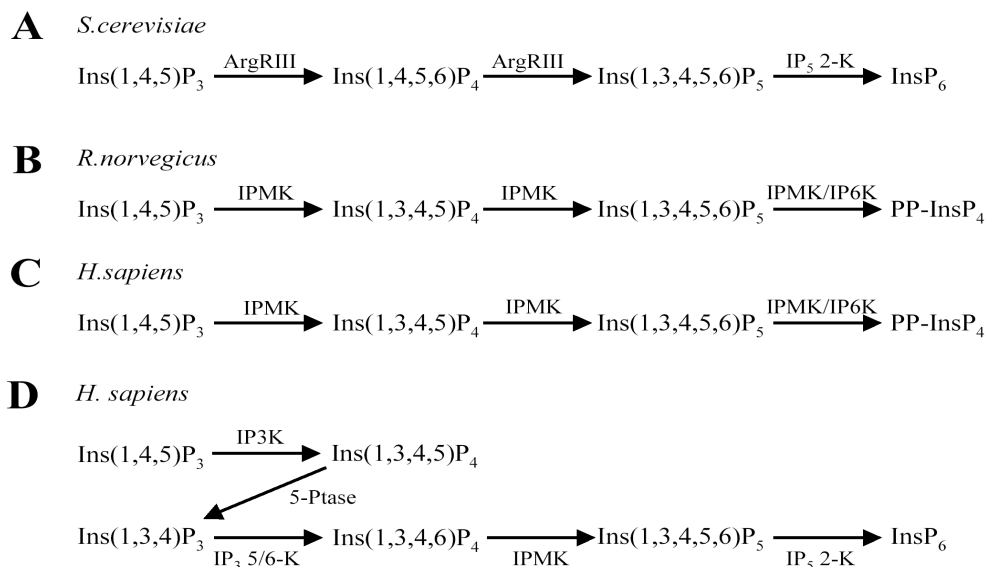


Abbildung 40: Vergleich der enzymatischen Eigenschaften des Hefeproteins ArgRIII und der Inositolphosphat Multikinasen aus Ratte und Mensch

Das multifunktionale Hefeprotein ArgRIII und die untersuchten homologen Proteine aus Säugetieren besitzen ähnliche, jedoch nicht identische Inositolphosphat Multikinase (IPMK) Aktivitäten. Ihre Rollen im zellulären Inositolphosphat Metabolismus unterscheiden sich offensichtlich deutlich. (A) Das im Zellkern lokalisierte Hefeprotein ArgRIII ist Bestandteil eines für den korrekten mRNA-Export notwendigen nukleären Stoffwechselweges. Es phosphoryliert Ins(1,4,5)P₃ zunächst an der 6-Hydroxylgruppe zum Ins(1,4,5,6)P₄ und dieses dann an der 3-Hydroxylgruppe zum Ins(1,3,4,5,6)P₅. Durch eine weitere, ebenfalls nukleäre Inositolphosphat Kinase wird dieses InsP₅-Isomer zum InsP₆ umgesetzt. (B) Die IPMK aus Ratte phosphoryliert wie das Hefeprotein Ins(1,4,5)P₃ zum Ins(1,3,4,5,6)P₅, jedoch ist das hauptsächlich gebildete Zwischenprodukt nicht das Ins(1,4,5,6)P₄, sondern das Ins(1,3,4,5)P₄-Isomer. Offensichtlich ist das gebildete InsP₅ jedoch bei Säugetieren kein Zwischenprodukt in einem bestimmenden Syntheseweg zum InsP₆. Wahrscheinlich wird das InsP₅ stattdessen von der IPMK und weiteren Inositolphosphat Kinasen zu Pyrophosphatgruppen-tragenden PP-InsP₄-Isomeren umgesetzt. (C) Den Beobachtungen bei der Ratte sehr ähnliche enzymatische Aktivitäten wurden bei der humanen IPMK von Mayr und Mitarbeitern bestimmt. Aufgrund dieser Studien kann bei den Säugetieren Mensch und Ratte eine sehr ähnliche zelluläre Funktion der IPMK vermutet werden. (D) Eine deutlich abweichende Enzymatik der humanen IPMK wurde von Majerus und Mitarbeitern beschrieben, die hauptsächlich eine Ins(1,3,4,6)P₄ 5-Kinase Aktivität beobachten und einen IPMK-abhängigen Hauptsyntheseweg zum InsP₆ in Säugetieren vermuten. Dieser Weg hat als Ausgangssubstrat Ins(1,4,5)P₃, verläuft aber über mehr Zwischenschritte als bei der Hefe und beinhaltet auch einen Dephosphorylierungs-Schritt.

4.1.2 Die nukleäre Zielsteuerung der humanen Inositolphosphat Multikinase

Die Lokalisation des ArgRIII Proteins im Kern der Hefezelle [El Bakkoury et al., 2000] entspricht seinen Aufgaben in der Transkriptionsregulation und im mRNA-Export. Erkenntnisse über eine ähnliche Zielsteuerung der homologen Proteine aus Säugetieren würden möglicherweise Aufschluss über vergleichbare Funktionen zusätzlich zu deren Inositolphosphat Multikinase (IPMK) Aktivität geben. Vor kurzem wurde außerdem die nukleäre Lokalisation der IPMK aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt [Xia et al., 2003].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen der humanen Inositolphosphat Multikinase (HsIPMK) in eukaryotischen Zellen untersucht. Bei diesem Verfahren kann mittels Fluoreszenzmikroskopie die Verteilung des Fusionsproteins unmittelbar in lebenden oder fixierten Zellen bestimmt werden. Außerdem ist die Untersuchung von durch Mutation veränderten Fusionsproteinen mit dem gleichen Verfahren möglich. Bei der Bewertung der Ergebnisse muß jedoch berücksichtigt werden, dass ein überexprimiertes Fusionsprotein und kein endogenes Protein vorliegt. Durch die Fusion mit einem Grün Fluoreszierenden Protein kann die räumliche Struktur und damit die Zielsteuerung des Proteins verändert werden [Illies, 2002]. Durch die Verwendung von weiteren Fusionsproteinen mit unterschiedlichen Tags sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus kann dieser Effekt untersucht werden. Die intrazelluläre Lokalisation der HsIPMK ist unabhängig von dem für die Fusion benutzten Terminus (siehe Ergebnisse 3.1.4), wodurch ein Einfluss des Tags auf die Zielsteuerung unwahrscheinlich wird. Eine Veränderung der Zielsteuerung gegenüber dem nativen Zustand kann außerdem durch die Überexpression des Fusionsproteins erfolgen. Die unphysiologisch erhöhte Konzentration eines Proteins kann zu einer Übersättigung von nur begrenzt vorhandenen Bindungspartnern oder zur Überlastung von beteiligten Transportsystemen führen. Eine Bestimmung der Lokalisation des endogenen Proteins durch Antikörper würde eine Beurteilung von diesem Effekt erlauben. Entsprechende Antikörper gegen die IPMK werden in einer Kooperation mit Prof. Dr. Friedrich Nolte und PD Dr. Friedrich Haag (Institut für Immunologie, UKE) hergestellt und charakterisiert, standen aber im Rahmen dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung.

Die untersuchten EGFP-Fusionsproteine der HsIPMK mit einem Molekulargewicht von 75 kDa überschreiten eindeutig die Ausschlussgrenze von ca. 40 kDa für eine passive Translokation über den Kernporenkomplex [Cole & Hammell, 1998]. Die vorherrschend nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins (siehe Ergebnisse 3.1.4) kann deshalb nur durch

einen aktiven, Kern-Lokalisations-Signal (NLS)-vermittelten Transport durch die Kernhülle erklärt werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt (Abschnitt 3.1.5), ist ein durch die Anhäufung von basischen Aminosäuren charakterisiertes NLS im C-Terminus des Proteins positiv an dessen nukleärer Lokalisation beteiligt (siehe Abbildung 41A). Durch Lokalisationsstudien mit Fragmenten der HsIPMK wurde weitergehend gezeigt, dass das isolierte NLS eine hinreichende Minimalsequenz für die Zielsteuerung von Proteinen in den Zellkern ist. Außerdem verändert die Deletion oder funktionale Elimination des NLS die vorherrschend nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins zu einer Gleichverteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma (siehe Abbildung 41B).

Diese verbleibende NLS-Restaktivität des Fusionsproteins ohne funktionalem NLS kann aufgrund eines Molekulargewichts oberhalb der Ausschlussgrenze für den Kernporenkomplex nicht durch passive Diffusion über die Kernhülle erklärt werden [Cole & Hammell, 1998]. Durch die Aufklärung der räumlichen Struktur wurde gezeigt, dass EGFP kein NLS besitzt [Ormo et al., 1996; Yang et al., 1996]. Ein aktiver Transport des Fusionsproteins in den Zellkern durch ein „kryptisches NLS“ im Grün Fluoreszierenden Protein wird von Wei und Mitarbeitern ausgeschlossen [Wei et al., 2003]. Offensichtlich durchquert EGFP den Kernporenkomplex ausschließlich durch passive Diffusion und es gibt keine aktive Komponente der Bewegung. Die nukleäre Zielsteuerung von Proteinen durch zwei oder mehr NLSs mit gleicher [Imagawa et al., 2000] oder unterschiedlicher Stärke [Dang & Lee, 1988] ist gut untersucht. Bei der Durchmusterung der Aminosäuresequenz der HsIPMK nach einem weiteren NLS wurde eine Kandidatensequenz (Aminosäure 107-112) mit einem hohen Anteil an basischen Resten identifiziert (siehe Ergebnisse 3.1.3). Die funktionale Inaktivierung dieses putativen NLS führte jedoch zu keiner Veränderung der intrazellulären Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Offensichtlich ist dieser Sequenzbereich nicht notwendig für die nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins. Möglicherweise ist die NLS-Aktivität der Kandidatensequenz aber auch nur so schwach, dass ihr Fehlen durch die starke Aktivität des C-terminalen NLS maskiert wird. Zur Klärung dieser Vermutung wurde das bereits identifizierte NLS im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich zur Kandidatensequenz durch eine weitere Mutation inaktiviert. Die Mutante zeigte keine weitergehende Veränderung der intrazellulären Lokalisation, so dass eine funktionale NLS-Aktivität der untersuchten Sequenz ausgeschlossen werden kann.

Da in der HsIPMK keine weiteren Kandidatensequenzen für eine Zielsteuerung in den Zellkern identifiziert werden konnten, bleibt als mögliche Erklärung die Translokation zusammen mit einem Interaktionspartner durch einen Ko-Transport-Mechanismus [Melen &

Julkunen, 1997]. Bekanntlich interagiert das Hefeprotein ArgRIII direkt mit zwei Transkriptionsfaktoren, die zur Erfüllung ihrer regulatorischen Funktion ebenfalls in den Zellkern verbracht werden müssen [El Bakkoury et al., 2000]. Das humane Homolog könnte an ähnliche Interaktionspartner im Zytoplasma binden und dann in einem heteromeren Komplex aktiv in den Zellkern transportiert werden. Beachtenswerterweise kann die IPMK aus *Arabidopsis thaliana* bei einem ArgRIII-defizienten Hefestamm ein normales Zellwachstum wiederherstellen, so dass es offensichtlich auch in Pflanzen an der Transkriptionsregulation beteiligte Interaktionspartner der IPMK ähnlich wie beim ArgRIII Protein der Hefe gibt [Xia et al., 2003].

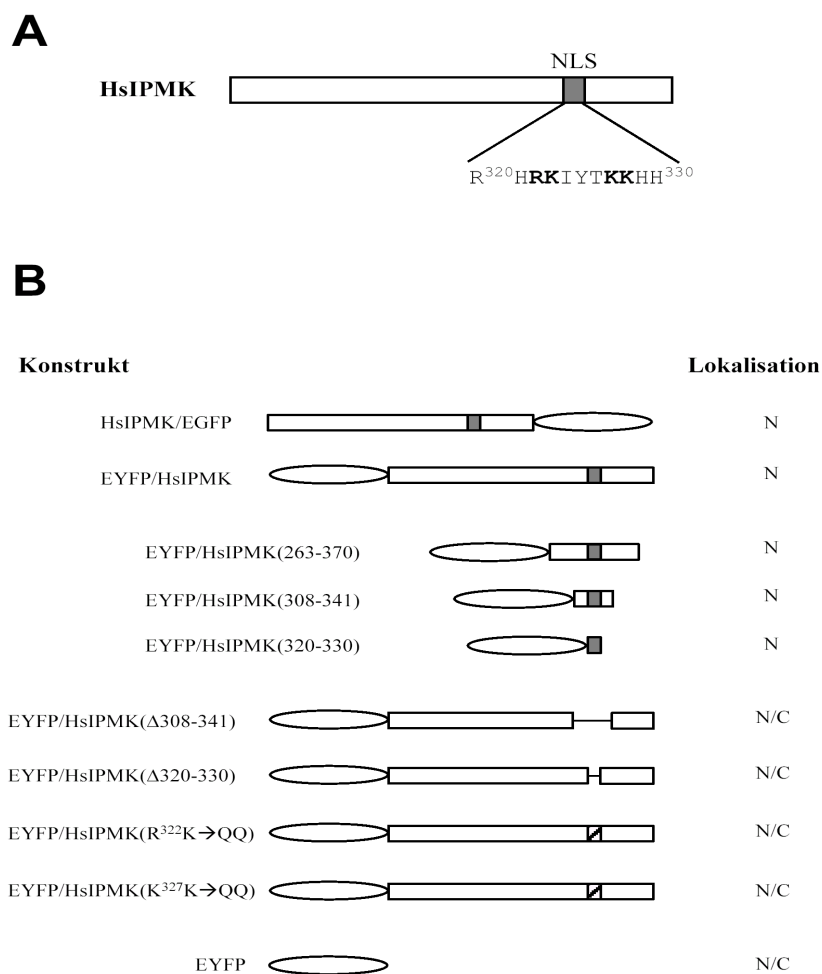


Abbildung 41: Nukleäre Zielsteuerung der humanen Inositolphosphat Multikinase durch ein funktionales Kernlokalisierungssignal

Die intrazelluläre Lokalisation von in Säugetier-Zellen transient exprimierten EGFP-Fusionsproteinen der humanen Inositolphosphat Multikinase (HsIPMK) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. (A) Ein durch die Anhäufung von basischen Aminosäuren gekennzeichnetes Kernlokalisierungssignal (NLS) im C-Terminus der HsIPMK ist positiv an der vorherrschend nukleären Lokalisation des Proteins beteiligt. (B) Die EGFP-Fusionsproteine der HsIPMK zeigen in Säugetier-Zellen unabhängig von der Position des Tags eine vorherrschend nukleäre Lokalisation („N“). Das isolierte NLS ist eine hinreichende Minimalsequenz für eine Zielsteuerung von Proteinen in den Zellkern, da NLS-tragende Proteinfragmente ebenfalls eine vorherrschend nukleäre Lokalisation zeigen. Die Deletion oder funktionale Inaktivierung des NLS führt zu einer gleichmäßigen Verteilung des Fusionsproteins zwischen Zellkern und Zytoplasma („N/C“), wobei die verbleibende Restaktivität wahrscheinlich durch einen Ko-Transport-Mechanismus verursacht wird. Als Kontrolle wurde die intrazelluläre Lokalisation des isolierten EGFP-Tags untersucht, um die Möglichkeit einer endogenen Zielsteuerungsaktivität auszuschließen.

Es ist eine vernünftige Annahme, dass Inositolphosphat Kinasen im Kern von Säugerzellen zusammen mit anderen Enzymen (z.B. nukleäre Phospholipase C [Cocco et al., 2001]) einen nukleären Inositolphosphat Signalweiterleitungs- und Phosphorylierungsweg bilden, der zu hochphosphorylierten Inositolphosphaten führt. In der Hefe ist ein Phospholipase C-abhängiger und zum InsP_6 führender Inositolphosphat Kinase Stoffwechselweg notwendig für effizienten mRNA Export und normales Zellwachstum [York et al., 1999]. Aufgrund der nukleären Lokalisation der HsIPMK kann man nun sicher davon ausgehen, dass die Kerne von Säugerzellen den kompletten Satz von enzymatischen Aktivitäten für die Biosynthese von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ aus nukleärem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ besitzen. Für die nukleäre IP6K Isoform 2 ist InsP_6 ein besseres Substrat als $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ [Saiardi et al., 2000a]. Möglicherweise wird auch bei Säugern InsP_6 im Zellkern synthetisiert und dann dort durch die IP6K-2 zur pyrophosphorylierten Inositolphosphaten weiter umgesetzt. Die Synthese von InsP_6 durch eine $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase in Hefe [York et al., 1999] und *Candida albicans* [Ives et al., 2000] ist gut untersucht. Das Hefeprotein ist im Zellkern und in einem punktförmigen Muster in der nukleären Peripherie lokalisiert, das typisch für den Kernporenkomplex bei der Hefe ist [York et al., 1999]. Die intrazelluläre Lokalisation eines vor kurzem identifizierten Homologs aus dem Menschen [Verbsky et al., 2002] ist Gegenstand der laufenden Forschung. Erste Ergebnisse sprechen zwar für eine nukleäre Zielsteuerung der humanen $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase, liefern aber keine Anhaltspunkte für eine Koloakalisation mit dem Kernporenkomplex (Maria Brehm aus der AG Mayr, persönliche Mitteilung). Möglicherweise ist die nukleäre Bildung von InsP_6 bei Säugetieren mit einer komplexen Regulation der Transkription durch eine Remodellierung des Chromatins verbunden [Rando et al., 2003].

4.2 Funktional divergente Isoformen der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase in Tieren

4.2.1 Isoformen der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase in Vertebraten und Invertebraten

Die neuartige Isoform C der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinasen (IP3Ks) aus Mensch und Ratte wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. IP3Ks katalysieren die Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ an der 3-Hydroxylgruppe zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$. Beide Isomere sind potentielle Modulatoren der Calcium-Homöostase [Irvine, 1991], wobei offensichtlich $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ durch Bindung an ein Protein der GAP1 (GTPase-aktivierendes-Protein 1)-Familie die Ca^{2+} -Freisetzung durch $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ beeinflusst [Cullen et al., 1995]. Drei Spleiß-Varianten von einem einzigen IP3K-Gen wurden im Invertebraten *Caenorhabditis elegans* charakterisiert [Clandinin et al., 1998]. Hingegen sind zwei von verschiedenen Genen kodierte Isoformen (genannt IP3K-A und -B) u.a. in den Vertebraten Mensch und Ratte seit längerem bekannt und gründlich untersucht [VanWeyenberg et al., 1995 und enthaltene Zitate]. In der Literatur wurde frühzeitig über weitere Mitglieder der IP3K-Familie spekuliert [Communi et al., 1994]. Vor kurzem ist es gelungen, gesicherte Vollängen cDNAs einer

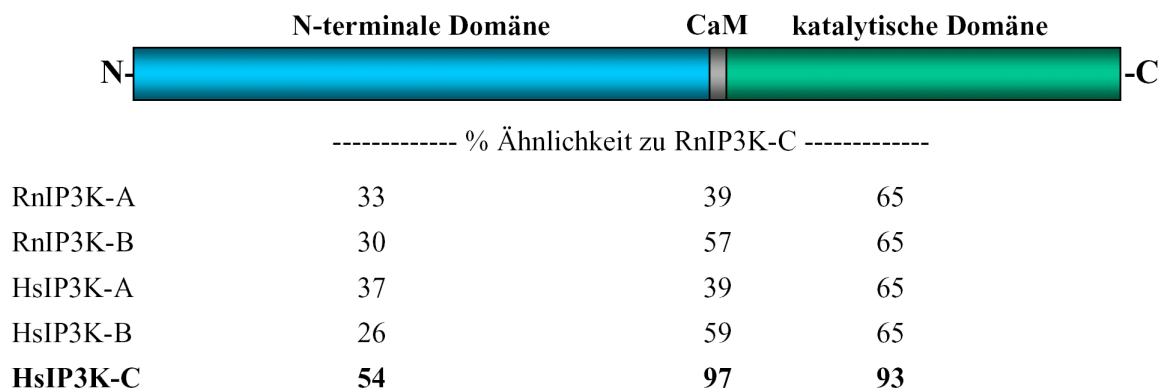


Abbildung 42: Sequenzvergleich auf Aminosäureebene der bekannten IP3K Isoformen aus Säugetieren

Die bekannten drei Isoformen (genannt A, B, C) der IP3K lassen sich übereinstimmend in drei Domänen unterteilen [Bertsch et al., 1999]. Vom N- zum C-Terminus folgen auf die in ihrer Funktion noch uncharakterisierte N-terminale Domäne die Calmodulin-Bindungsdomäne mit regulatorischer Funktion und die für die Phosphorylierung des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ verantwortliche katalytische Domäne. Insbesondere die katalytische Domäne zeigt eine deutliche Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zwischen den verschiedenen Isoformen von Ratte und Mensch. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung einer funktionalen Konservierung dieses Proteinabschnittes zwischen den Isoformen und Spezies. Die Calmodulin-Bindungsdomäne ist deutlich schwächer konserviert. Diese Domäne übt zwar in allen Isoformen die gleiche Funktion aus, die Regulation der Enzymaktivität durch Ca^{2+} -Calmodulin weist aber Isoform-abhängig auch deutliche Unterschiede auf. Dieser unterschiedlich starke Einfluss auf die Aktivität könnte in den beobachteten Sequenzunterschieden begründet sein. Die N-terminalen Domänen weisen die geringste Ähnlichkeit auf und auch ihre Funktionen in der Regulation und Zielsteuerung sind offensichtlich divergent.

dritten Isoform (genannt IP3K-C) in Mensch und Ratte zu identifizieren (siehe Einleitung 1.2.1). Diese cDNAs wurden für die weiteren Studien im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Die katalytische und die Ca^{2+} -Calmodulin-Bindungsdomäne sind zwischen den drei Isoformen der IP3K-Familie bei Mensch und Ratte in ihrer Länge und Aminosäure-Sequenz hochgradig konserviert. Die N-terminale Domäne zeigt hingegen in Länge, Aminosäure-Sequenz und -Komposition nur geringe Ähnlichkeiten zwischen den Mitgliedern der IP3K-Familie (siehe Abbildung 42) und auch ihre Funktionen in Regulation und Zielsteuerung sind zwischen den Isoformen offensichtlich divergent.

4.2.1.1 Expressionsmuster von Isoformen der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase in verschiedenen Geweben von Ratte und Mensch

Das Expressionsmuster der seit längerem bekannten Isoformen A und B, sowie der neuartigen Isoform C der IP3K wurde in der Ratte auf Ebene der mRNA in verschiedenen Geweben von Prof. Erneux, Prof. Mayr und Prof. Schmale untersucht [VanWeyenberg et al., 1995; Dewaste et al., 2000; Nalaskowski et al., 2003]. Bei den Northern Blot Studien zeigen die verschiedenen Isoformen ein teilweise überlappendes Expressionsmuster, aber auch bei mehreren Geweben eindeutige Unterschiede. Während die Isoform A eine spezifische Expression nur im Gehirn und Hoden zeigt, wurden die beiden anderen Isoformen auch in mehreren anderen Geweben der Ratte nachgewiesen. Zusätzlich zu Gehirn und Hoden wird die Isoform B auch in Thymus, Herz und Lunge; die Isoform C auch in Leber, Niere, Herz und Lunge exprimiert (siehe Abbildung 43). Da in einigen der untersuchten Gewebe mehr als eine Isoform vorhanden ist, kann eine Isoform-spezifische Spezialisierung vermutet werden. Eine Möglichkeit dazu ist die Lokalisation in unterschiedlichen Zelltypen des jeweiligen Gewebes oder die differierende intrazelluläre Verteilung der einzelnen Isoformen. Die Unterschiede könnten auch in den enzymatischen Aktivitäten und in deren Regulation z.B. durch Ca^{2+} -Calmodulin oder verschiedene Inositolphosphat-Isomere liegen. Deutliche Unterschiede gibt es nicht nur (wie oben beschrieben) im Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen, sondern auch zwischen der IP3K-C von Ratte und Mensch (siehe Abbildung 43). Die humane Isoform wird im Gegensatz zur Ratte nicht in Hirn und Niere, dafür aber im Skelettmuskel exprimiert. Bei der Bewertung dieser Unterschiede muss aber die besondere Problematik bei der Probengewinnung aus Humanmaterial berücksichtigt werden, die bereits im Abschnitt 4.1.1.1 über die Expressionsmuster der Inositolphosphat Multikinase diskutiert wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass aufgrund der teilweisen Überlappung in der Expression der Isoformen eine anderweitige Spezialisierung sehr wahrscheinlich ist. Von der Stärke der mRNA-Expression kann nicht in jedem Fall auf die Menge des exprimierten Proteins und seine Aktivität geschlossen werden. Die IP3K-Aktivität in Rohextrakten von Rattengewebe stimmen jedoch bei der Isoform A und B in der Tendenz mit den Ergebnissen der Northern Blot Untersuchungen überein [VanWeyenberg et al., 1995]. Beachtenswert ist außerdem die für zwei Säugetiere deutlichen Unterschiede zwischen Ratte und Mensch bei der mRNA-Expression der Isoform C.

Gewebe	Expression			
	RnIP3K-A	RnIP3K-B	RnIP3K-C	HsIP3K-C
Hirn	+	+	+	—
Hoden	+	+	+	?
Plazenta	?	?	?	+
Thymus	—	+	?	?
Milz	—	—	—	?
Leber	—	—	+	+
Niere	—	—	+	—
Herz	—	+	+	+
Lunge	—	+	+	+
Darm	—	—	?	?
Skelettmuskel	?	?	—	+
Pankreas	?	?	?	+

Abbildung 43: Vergleich der Expressionsmuster von Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinasen aus Mensch und Ratte

Die Expressionsstärke der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinasen (IP3Ks) auf Ebene der mRNA wurde für verschiedene Gewebe aus Mensch und Ratte durch Northern Blot Untersuchungen bestimmt. In der Ratte wurde in Herz und Hoden die Expression (+) von allen drei Isoformen und in Herz und Lunge von Isoform A und B beobachtet. Die anderen untersuchten Gewebe zeigen die Expression von nur jeweils einer Isoform. Die IP3K-C zeigt bei Mensch und Ratte ein für den Vergleich von zwei Säugetieren deutlich unterschiedliches Expressionsverhalten, insbesondere in Hirn und Niere. In den untersuchten Geweben wird die Expression (+) bzw. die nicht nachweisbare Expression (-) dargestellt. Die nicht untersuchten Gewebe sind mit (?) gekennzeichnet.

4.2.1.2 Regulation der enzymatischen Aktivitäten von Isoformen der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase in Ratte und Mensch

Die drei Isoformen der IP3K stimmen in ihrer katalytischen Aktivität, der Umsetzung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, überein und zeigen ein teilweise überlappendes Muster der mRNA-Expression in verschiedenen Geweben. Aus diesem Grunde ist eine anderweitige Spezialisierung wahrscheinlich, z.B. durch eine unterschiedliche Regulation der enzymatischen Aktivitäten.

Die Aktivität der humanen IP3K-C steigt nach Stimulation mit Ca^{2+} -Calmodulin nur auf das 1,5-fache an, wohingegen die Isoformen A und B eine Steigerung auf das 2-3-fache bzw. 10-fache zeigen. Aufgrund dieser Unempfindlichkeit der Isoform C schließen Erneux und Mitarbeiter [Dewaste et al., 2000 und enthaltene Zitate] ihre Beteiligung an Calcium-Oszillationen aus. Sie sehen vielmehr diese Isoform als Teil eines Stoffwechselweges, der unbeeinflusst von anderen Signalwegen an der Umsetzung von durch Phospholipase C-Aktivität gebildetem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zum Isomer $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ beteiligt ist. Das Isomer $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ hemmt die Aktivität der $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-Kinase und erhöht so die Konzentration von $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$, das als zelluläres Signal die Ionenleitfähigkeit von Cl^- -Kanälen reguliert [Xie et al., 1998].

A *H.sapiens*



B *R.norvegicus*

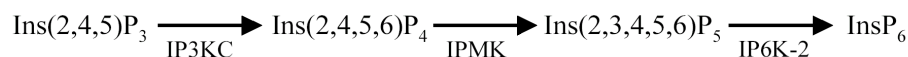
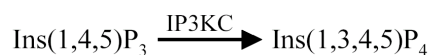


Abbildung 44: Enzymatische Eigenschaften der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase C aus Mensch und Ratte

Die Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase C (IP3K-C) überträgt wie die anderen Mitglieder dieser Enzymfamilie eine Phosphatgruppe von ATP auf die 3-Position von Inositol (1,4,5)-trisphosphat [$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$]. Durch diese Reaktion wird der Ca^{2+} -freisetzende Sekundäre Botenstoff $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in den putativen Sekundären Botenstoff $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ umgesetzt. (A) Bei der enzymatischen Charakterisierung von rekombinant exprimierter IP3K-C aus *Homo sapiens* wurde die für IP3Ks typische 3-Kinase-Aktivität festgestellt. (B) Das homologe Protein aus Ratte besitzt außer der 3-Kinase-Aktivität eine Nebenaktivität als 6-Kinase. Das biologisch relevante InsP_3 -Isomer $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ wird durch diese Aktivität zu $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$ umgesetzt. Die Inositolphosphat Multikinase (IPMK) und die Inositolhexakisphosphat Kinase (IP6K-2) können das gebildete Isomer weiter zum InsP_6 umsetzen (Prof. Mayr, persönliche Mitteilung). Alle an diesem alternativen Biosyntheseweg zum InsP_6 beteiligten Enzyme (IP3K-C, IPMK, IP6K-2) weisen eine nukleäre Lokalisation auf.

Eine Unempfindlichkeit der enzymatischen Aktivität gegenüber Ca^{2+} -Calmodulin-Gabe wurde jedoch von Prof. Mayr und Mitarbeitern bei dem homologen Protein aus Ratte nicht gefunden [Nalaskowski et al., 2003], so dass eine andere Form der Spezialisierung vermutet werden kann. Während IP3K-A und IP3K-B durch das Produkt der IP3K-Reaktion $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ merklich gehemmt werden, ist dieses Isomer in der Abwesenheit von Ca^{2+} -Calmodulin ein Aktivator der Isoform C aus Ratte. Diese Aktivierung ist möglicherweise ein physiologischer Feed-back-Mechanismus, der nur unter ruhenden Ca^{2+} -Konzentrationen aktiv ist. Die Freisetzung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aus der Plasmamembran verstärkt die Aktivitäten der Isoformen A und B, solange bis es zu einer merklichen Anhäufung des $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Isomers kommt. Hingegen ist die Ratten IP3K-C optimiert für enzymatische Aktivität nach der Bildung und Anreicherung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (vgl. Abbildung 44). Dadurch wird die Konzentration von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ unter Ruhebedingungen niedrig gehalten und eine basale $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ Bildung in der Abwesenheit von stimulatorischen Signalen sichergestellt. Vermutlich ist dieser kontinuierliche $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_3$ -Fluss in den anabolen Stoffwechsel notwendig für Zellwachstum und zelluläre Differenzierung.

4.2.2. Intrazelluläre Lokalisation und Zielsteuerung von Isoformen der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zielsteuerung der neuartigen Isoform C untersucht. Die Mechanismen der intrazellulären Lokalisation der beiden anderen Isoformen wurden bereits einleitend beschrieben. Die IP3K-A besitzt in ihrem N-Terminus eine neuartige F-Aktin-Bindungsregion, die von einem Bereich aus 66 Aminosäuren gebildet wird. Diese Region vermittelt die intrazelluläre Lokalisation an dendritische Dornen, die z.B. in Pyramidenneuronen von primären hippokampalen Kulturen beobachtet wird [Schell et al., 2001]. Die IP3K-B liegt zum größeren Teil als ein peripheres Membranprotein vor, das an die zytoplasmatische Seite des Endoplasmatischen Retikulums bindet. Teilweise liegt das Enzym auch in einer zytoplasmatischen Form vor bzw. an F-Aktin gebunden vor [Soriano et al., 1997; Dewaste et al., 2003]. Die für diese intrazellulären Lokalisationen verantwortlichen Regionen wurden noch nicht identifiziert. Im Gegensatz zu diesen statischen Lokalisationen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die IP3K-C einem dynamischen Prozess des nukleozytoplasmatischen Shuttling unterliegt (siehe Ergebnisse 3.2.4 und Abbildung 45). Ein EGFP-Fusionsprotein wird aktiv in den Kern von Säugetier-Zellen

importiert, da eine passive Diffusion durch den Kernporenkomplex aufgrund des Molekulargewichts ausgeschlossen ist. Der aktive Export aus dem Kern ins Zytoplasma wird offensichtlich durch das Exportin 1 vermittelt, da er durch den im Rahmen dieser Arbeit benutzten, spezifischen Inhibitor Leptomycin B (LMB) zum Erliegen gebracht wird. Die N-terminale Domäne vermittelt die intrazelluläre Lokalisation der IP3K-A [Schell et al., 2001] und vermutlich auch die der IP3K-B [Schreiber, 2002]. In der N-terminalen Domäne

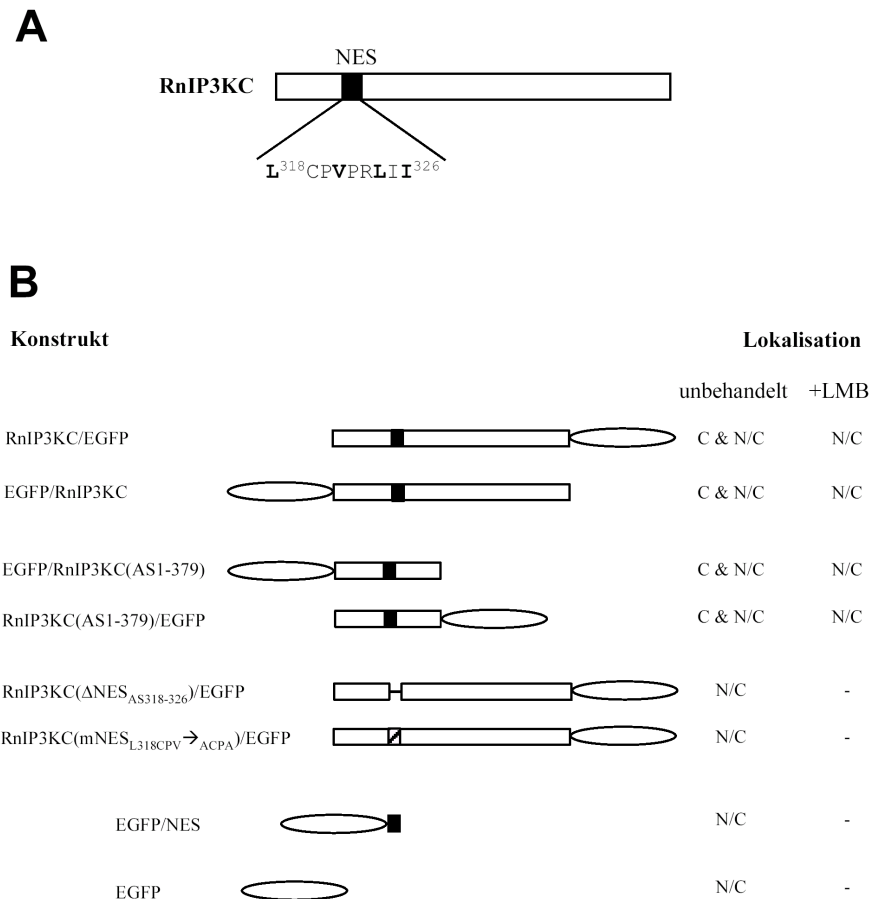


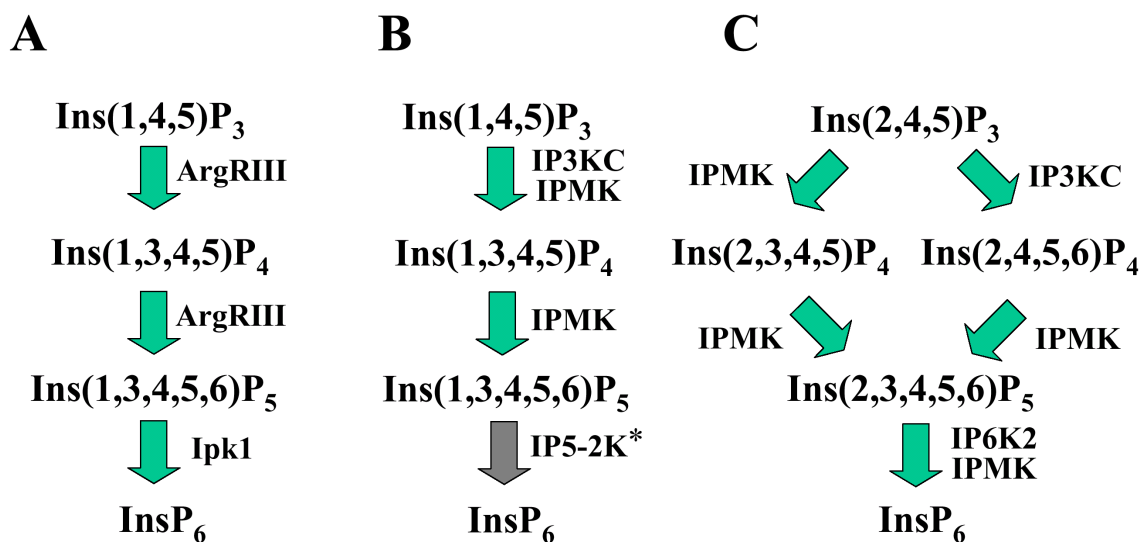
Abbildung 45: Nukleäre Zielsteuerung der Ratten Inositol (1,4,5)-trisphosphate 3-Kinase C durch funktionale Kernimport- und Kernexportaktivitäten der N-terminalen Domäne

Die intrazelluläre Lokalisation von in Säugetier-Zellen transient exprimierten EGFP-Fusionsproteinen der Ratten Inositol (1,4,5)-trisphosphate 3-Kinase C (RnIP3K-C) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. (A) Ein durch die Anhäufung von hydrophoben Aminosäuren gekennzeichnetes Kernexportsignal (NES) im N-Terminus der RnIP3K-C ist notwendig für den nukleären Export des Fusionsproteins. (B) Die EGFP-Fusionsproteine der Vollängen-IP3K-C zeigen in Säugetier-Zellen unabhängig von der Position des Tags eine vorherrschend zytoplasmatische Lokalisation („C“) oder eine Gleichverteilung zwischen Kern und Zytoplasma („N/C“). Nach Behandlung mit dem Export-Inhibitor Leptomycin B (LMB) wird ausschließlich eine Gleichverteilung beobachtet. Die für die Lokalisation verantwortlichen Aktivitäten sind offensichtlich in der N-terminalen Domäne lokalisiert, da die isolierte Domäne ein ähnliches Verhalten wie die Vollängen-Form zeigt. Die Deletion oder Inaktivierung des Kernexportsignals hat den gleichen Effekt wie die Behandlung mit LMB. Das isolierte NES zeigt wie EGFP allein eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte Zelle. Offensichtlich ist das NES notwendig, aber nicht hinreichend für die Export-Aktivität. Der Grund liegt wahrscheinlich im Fehlen der flankierenden Sequenzbereiche.

konnte kein Sequenzmotiv identifiziert werden, das dem Konsensus eines Kernlokalisierungssignals (NLS) entspricht. Hingegen wurde in der Ca^{2+} /Calmodulin Bindungsdomäne die Sequenz eines putativen monopartiten NLS gefunden (Aminosäure 384-387). Dieses Motiv ist jedoch offensichtlich für die nukleäre Lokalisation der IP3K-C nicht notwendig, da EGFP-Fusionsproteine der N-terminalen Domäne das gleiche nukleozytoplasmatische Shuttling wie das Vollängen-Protein zeigen. Offensichtlich sind die für den aktiven Import und aktiven Export verantwortlichen Regionen in diesem Bereich lokalisiert sind (siehe Ergebnisse 3.2.4.3). Anscheinend wird der nukleäre Import durch ein Nicht-Standard-NLS [Christophe et al., 2000] oder durch einen Ko-Transport-Mechanismus vermittelt [Melen & Julkunen, 1997]. Eine Sequenz, die dem Konsensus eines Kernexportsignals (NES) entspricht, konnte hingegen in der N-terminalen Domäne identifiziert werden. Die Deletion bzw. Inaktivierung von diesem NES führt zum Erliegen des nukleären Exports, vergleichbar dem Effekt durch die Behandlung mit LMB. Das isolierte NES besitzt jedoch keine Nukleäre-Export-Aktivität. Dieser Befund stimmt damit überein, dass für die Aktivität eines NES, anders als beim NLS, die in ihrer Sequenz variablen, flankierenden Bereiche notwendig sind [Paraskeva et al., 1999]. Darüberhinaus ist die Zielsteuerung der IP3K-C möglicherweise auch Zelltyp-abhängig, da sich ihre intrazelluläre Verteilung in NRK 52E- und PC12-Zellen (siehe Ergebnisse 3.2.4.1) deutlich von der in COS-7-Zellen [Dewaste et al., 2000] unterscheidet. Erneux und Mitarbeiter berichten bei ihren Studien mit Aktivitätsbestimmungen und Westernblot Analysen von einem beinahe vollständigen Kernausschluß. Diese Beobachtungen legen es nahe, dass bis jetzt noch nicht-identifizierte Faktoren die relative Stärke der nukleären Import- und Exportaktivitäten in verschiedenen Zelltypen beeinflussen. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Faktoren und ihrer Regulation durch Zellzyklus und Differenzierungsgrad der Zelle ist ein vorrangiges Ziel der laufenden Forschung.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die RnIP3K-C aufgrund ihrer komplexen Zielsteuerung nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Zellkern vorliegt. Dadurch werden die enzymatischen Aktivitäten für die Umsetzung von Inositolphosphaten im Zellkern weiter vervollständigt. In der Hefe ist schon seit längerem ein nukleärer Biosyntheseweg für die Bildung von InsP_6 bekannt (siehe Abbildung 46A) [York et al., 1999]. Offensichtlich steht bei Säugetieren für die Umsetzung von z.B. durch nukleäre Phospholipase C Aktivität [Cocco et al., 2001] gebildetes $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ im Zellkern sowohl die Inositolphosphat Multikinase (IPMK) als auch die IP3K-C zur Verfügung (siehe Abbildung 46B und Ergebnisse 3.1.4&3.2.4). Für die folgende Umsetzung von

Ins(1,3,4,5)P₄ zu Ins(1,3,4,5,6)P₅ ist hingegen neben der IPMK kein weiteres Enzym mit einer nukleären Lokalisation bekannt. Möglicherweise kommt der nukleären Umsetzung vom Ins(1,4,5)P₃-Isomer eine noch unbekannte, besondere zelluläre Bedeutung zu, so dass diese enzymatische Aktivität durch zwei Enzyme erbracht und dadurch gegen Ausfälle abgesichert wird. Die für die Umsetzung des im Kern gebildeten Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu InsP₆ verantwortliche Kinase [Verbsky et al., 2002] ist ebenfalls im Zellkern lokalisiert (Maria Brehm aus der AG Mayr, persönliche Mitteilung). In einem alternativer Stoffwechselweg zum InsP₆ (siehe Abbildung 46C und Diskussion 4.2.1.2) wird durch die IPMK und die IP3K-C das biologisch relevante InsP₃-Isomer Ins(2,4,5)P₃ zum Ins(2,3,4,5,6)P₅ umgesetzt. Die IP6K ist dazu in der Lage, das gebildete Ins(2,3,4,5,6)P₅ weiter zum InsP₆ umzusetzen (Natalie Bischoff aus der AG Mayr, persönliche Mitteilung). Die beteiligten Kinasen (IPMK, IP3K-C, IP6K Isoform 2) zeigen ebenfalls eine nukleäre Lokalisation.



* schwache bzw. keine Expression in den meisten Geweben

Abbildung 46: Inositolphosphat-Stoffwechsel im Kern von Hefe- und Säugetier-Zellen

A Ein Stoffwechselweg im Kern von Hefezellen, der ausgehend von nukleärem PtdIns(4,5)P₂ zur Bildung von InsP₆ führt, wurde von [York et al., 1999] beschrieben. Das beteiligte ArgRIII-Protein spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Transkriptionsregulation und das durch diesen Weg gebildete InsP₆ (oder ein Folgeprodukt) ist notwendig für einen korrekten mRNA-Export. **B** Eine PLC-Aktivität im Kern von Säugerzellen ist ebenfalls bekannt [Cocco et al., 2001]. Das gebildete Ins(1,4,5)P₃ kann durch die nukleäre IPMK und die (unter bestimmten Bedingungen) nukleäre IP3K-C zum Ins(1,3,4,5,6)P₅ umgesetzt werden, welches u.U. durch die ebenfalls nukleäre IP5-2K zum InsP₆ phosphoryliert werden kann. Die IP5-2K wird jedoch nur schwach und in vielen Geweben gar nicht exprimiert. **C** In einem alternativen Biosyntheseweg wird das in geringen Mengen gebildete Beiprodukt der PLC-Aktivität Ins(2,4,5)P₃ durch die Aktivitäten der nukleären Enzyme IPMK und IP3K-C zu Ins(2,3,4,5,6)P₅ umgesetzt. Das gebildete Isomer kann von der nukleären Isoform 2 der IP6K bzw. IPMK zum InsP₆ umgesetzt werden. Dieser Bypass-Weg ist somit von der Expression der IP5-2K unabhängig.

5 Zusammenfassung

Die Stoffwechselwege und die Signalfunktionen der Phosphatidylinositole in der Plasmamembran und der Inositolphosphate im Zytoplasma sind gründlich untersucht. Offensichtlich gibt es in eukaryotischen Zellen ein nukleäres Gegenstück für diese Stoffwechselwege, da die entsprechenden Enzymaktivitäten und Inositolderivate auch im Zellkern gefunden werden. Darüberhinaus gehend wurde eine Rolle der nukleären Inositolphosphate im mRNA-Export und in der Transkriptionsregulation beschrieben. Letztgenannte Funktion wird wahrscheinlich durch Inositolphosphat-abhängige Chromatin-Remodellierung vermittelt [Rando et al., 2003].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Zielsteuerung von Enzymen des Inositolphosphat-Stoffwechsels in Säugetierzellen eingehend untersucht. Ein humanes Homolog des Hefeproteins ArgRIII (genannt: humane Inositolphosphat Multikinase, HsIPMK) wurde erstmals identifiziert und die entsprechende Vollängen cDNA kloniert. Durch Lokalisationsstudien mit EGFP-Fusionsproteinen wurde ein für die Zielsteuerung in den Zellkern verantwortliches nicht-klassisches Kernlokalisierungssignal in der C-terminalen Region der HsIPMK identifiziert. Diese nukleäre Lokalisation ist bei der Hefe verantwortlich für zusätzliche Funktionen in der Transkriptionsregulation und im mRNA-Export. Außerdem konnten Hinweise für einen durch Bindungspartner der HsIPMK vermittelten Kotransport-Mechanismus charakterisiert werden, der beim Menschen eine ähnliche Rolle in der Transkriptionsregulation vermuten lässt. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die neuartige Isoform C der Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase (IP3K-C) aus Mensch und Ratte einem komplexen nukleozytoplasmatischen Shuttling unterliegt. In der N-terminalen Domäne befinden sich eine nicht-klassische Kernimport-Aktivität und ein Leucin-reiches Kernexportsignal. Der nukleäre Export wird durch das Exportin 1 vermittelt und durch das Toxin Leptomycin B zum Erliegen gebracht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Säugetieren die IPMK und die neuartige Isoform C der IP3K durch aktive Mechanismen in den Zellkern transportiert werden. Ihre enzymatischen Aktivitäten ergänzen den nukleären Inositolphosphat-Stoffwechsel, der dadurch einen ähnlichen Grad an Komplexität erreicht wie sein zytoplasmatisches Gegenstück. Eine Interaktion der HsIPMK mit Bindungspartnern, möglicherweise Transkriptionsfaktoren wie beim homologen Protein in der Hefe, könnte die vor kurzem beschriebene Verbindung zwischen Inositolphosphaten und Transkriptionsregulation vermitteln.

Summary

The metabolism and signaling function of phosphatidylinositols in the plasmamembrane and of inositol phosphates in the cytoplasm have been well studied. Apparently nuclear counterparts of these pathways exist in eucaryotic cells, since the corresponding enzyme activities and inositol derivatives are also found in the nucleus. Roles of nuclear inositol phosphates in mRNA export and transcription regulation have been described. The latter function is probably mediated by inositol phosphate-dependent chromatin remodeling [Rando et al., 2003].

In this thesis the intracellular targeting of mammalian enzymes of inositol phosphate metabolism was examined. A human homolog of the yeast protein ArgRIII (named: human inositol phosphate multikinase, HsIPMK) was identified and the corresponding full length cDNA cloned. A non-classical nuclear localization signal in the protein's C-terminal region determining its targeting to the nucleus was identified by localization studies in mammalian cells using EGFP fusion proteins. The protein's nuclear localization is appropriate to additional tasks in transcription regulation and mRNA export as observed in yeast. Furthermore the possibility of a co-transport mechanism mediated by binding partners of HsIPMK was found, indicating a role in transcription regulation. Further studies show that the novel C-isoform of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase (IP3K-C) from man and rat undergoes a complex nucleocytoplasmic shuttling. A non-classical nuclear import activity and a leucine-rich nuclear export signal are located in the N-terminal domain. The nuclear export is mediated by exportin 1 and can be inhibited by the toxin leptomycin B.

In summing up, the HsIPMK and the novel C-isoform of IP3K-C are transported into the cell nucleus by active mechanisms in mammalian cells. Their enzymatic activities complete the nuclear inositol phosphate metabolism exhibiting a similar degree of complexity as its cytoplasmic counterpart. An interaction of HsIPMK with binding partners, probably transcription factors as observed in yeast, could mediate the previously described connection between inositol phosphates and transcription regulation.

6 Literatur

- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, et al. (1991)
Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project
Science **252**:1651-6
- Abel K, Anderson RA, Shears SB (2001)
Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism
J Cell Sci **114**:2207-8
- Alberts B (1994)
Molecular Biology of the Cell
Garland Publishing Inc., New York
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990)
Basic local alignment search tool
J Mol Biol **215**:403-10
- Amar N, Messenguy F, El Bakkoury M, Dubois E (2000)
ArgR^{II}, a component of the ArgR-Mcm1 complex involved in the control of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, is the sensor of arginine
Mol Cell Biol **20**:2087-97
- Berridge MJ, Irvine RF (1989)
Inositol phosphates and cell signalling.
Nature **341**:197-205
- Berridge MJ (1993)
Inositol trisphosphate and calcium signalling
Nature **361**:315-25
- Bertsch U, Haefs M, Moller M, Deschermeier C, Fanick W, Kitzerow A, Ozaki S, Meyer HE, Mayr GW (1999)
A novel A-isoform-like inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from chicken erythrocytes exhibits alternative splicing and conservation of intron positions between vertebrates and invertebrates.
Gene **228**:61-71
- Bertsch U, Deschermeier C, Fanick W, Girkontaite I, Hillemeier K, Johnen H, Weglohner W, Emmrich F, Mayr GW (2000)
The second messenger binding site of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase is centered in the catalytic domain and related to the inositol trisphosphate receptor site.
J Biol Chem **275**:1557-1564
- Best CJ, Tanzer LR, Phelps PC, Merriman RL, Boder GG, Trump BF, Elliget KA (1999)
H-ras-transformed NRK-52E renal epithelial cells have altered growth, morphology, and cytoskeletal structure that correlates with renal cell carcinoma in vivo
In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**:205-14

- Bogerd HP, Fridell RA, Benson RE, Hua J, Cullen BR. (1996)
Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay.
Mol Cell Biol **16**:4207-14
- Boguski MS (1995)
The turning point in genome research
Trends Biochem Sci **20**:295-6
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987)
XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection
BioTechniques **5**:376-379
- Chang SC, Miller AL, Feng Y, Wentz SR, Majerus PW (2002)
The human homolog of the rat inositol phosphate multikinase is an inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate 5-kinase.
J Biol Chem **277**:43836-43
- Chang SH, Phelps PC, Berezesky IK, Ebersberger ML Jr, Trump BF (2000)
Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells (NRK-52E)
Am J Pathol **156**:637-49
- Choi KY, Kim HK, Lee SY, Moon KH, Sim SS, Kim JW, Chung HK, Rhee SG (1990)
Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase.
Science **248**:64-66
- Christophe D, Christophe-Hobertus C, Pichon B (2000)
Nuclear targeting of proteins: how many different signals?
Cell Signal **12**:337-41
- Clandinin TR, DeModena JA, Sternberg PW (1998)
Inositol trisphosphate mediates a RAS-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*.
Cell **92**:523-33
- Clapham DE (1995)
Calcium signaling.
Cell **80**:259-268
- Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Rhee SG, Manzoli FA (2001)
Nuclear phospholipase C and signaling.
Biochim Biophys Acta **1530**:1-14
- Cole CN, Hammell CM (1998)
Nucleocytoplasmic transport: driving and directing transport
Curr Biol **8**:R368-72

- Communi D, Vanweyenbergh V, Erneux C (1994)
Purification and biochemical properties of a high-molecular-mass inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme in human platelets.
Biochem J **298**:669-73
- Cullen PJ, Hsuan JJ, Truong O, Letcher AJ, Jackson TR, Dawson AP, Irvine RF (1995)
Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P₄-binding protein as a member of the GAP1 family.
Nature **376**:527-30
- Cullen PJ, Irvine RF, Dawson AP (1990)
Synergistic control of Ca²⁺ mobilization in permeabilized mouse L1210 lymphoma cells by inositol 2,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate.
Biochem J **271**:549-553
- Dang CV, Lee WM (1988)
Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal
Mol Cell Biol **8**:4048-54
- Dewaste V, Pouillon V, Moreau C, Shears S, Takazawa K, Erneux C (2000)
Cloning and expression of a cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C
Biochem J **352**:343-51
- Dewaste V, Roymans D, Moreau C, Erneux C (2002)
Cloning and expression of a full-length cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B
Biochem Biophys Res Commun **291**:400-5
- Dewaste V, Moreau C, De Smedt F, Bex F, De Smedt H, Wuytack F, Missiaen L, Erneux C. (2003)
The three isoenzymes of human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase show specific intracellular localization but comparable Ca²⁺ responses upon transfection in COS-7 cells.
Biochem J **in press**
- Drayer AL, Pesesse X, De Smedt F, Communi D, Moreau C, Erneux C (1996)
The family of inositol and phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatases.
Biochem Soc Trans **24**:1001-1005
- D'Santos CS, Communi D, Ludgate M, Vanweyenbergh V, Takazawa K, Erneux C (1994)
Identification of high molecular weight forms of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in rat thymus and human lymphocytes.
Cell Signal **6**:335-44
- Dubois E, Dewaste V, Erneux C, Messenguy F (2000)
Inositol polyphosphate kinase activity of Arg82/ArgRIII is not required for the regulation of the arginine metabolism in yeast.
FEBS Lett **486**:300-4

- El Bakkoury M, Dubois E, Messenguy F (2000)
Recruitment of the yeast MADS-box proteins, ArgRI and Mcm1 by the pleiotropic factor ArgRIII is required for their stability
Mol Microbiol **35**:15-31
- Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R (1995)
The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs
Cell **82**:475-83
- Fontes MR, Teh T, Kobe B (2000)
Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha
J Mol Biol **297**:1183-94
- Fukuda M, Mikoshiba K (1997)
The function of inositol high polyphosphate binding proteins.
Bioessays **19**:593-603
- Gama-Carvalho M, Carmo-Fonseca M. (2001)
The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins
FEBS Lett **498**:157-63
- Gorlich D, Mattaj IW (1996)
Nucleocytoplasmic transport.
Science **271**:1513-1518
- Gorlich D, Kutay U (1999)
Transport between the cell nucleus and the cytoplasm
Annu Rev Cell Dev Biol **15**:607-60
- Greene LA, Tischler AS (1976)
Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor
Proc Natl Acad Sci USA **73**:2424-2428
- Hanahan D (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J Mol Biol **166**:557-580
- Hennig W (1995)
Genetik
Springer-Verlag, Berlin
- Illies C (2002)
in vivo Lokalisation der humanen Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat bindenden Proteine Centaurin alpha 1 und 2
Dissertationsschrift, Universität Hamburg

- Imagawa M, Sakaue R, Tanabe A, Osada S, Nishihara T (2000)
Two nuclear localization signals are required for nuclear translocation of nuclear factor 1-A.
FEBS Lett **484**:118-24
- Irvine RF (1991)
Inositol tetrakisphosphate as a second messenger: confusions, contradictions, and a potential resolution.
Bioessays **13**:419-27
- Irvine RF, Schell MJ (2001)
Back in the water: the return of the inositol phosphates
Nat Rev Mol Cell Biol **2**:327-38
- Irvine RF. (2002)
Nuclear lipid signaling.
Sci STKE **2002**:RE13
- Ives EB, Nichols J, Wentz SR, York JD (2000)
Biochemical and functional characterization of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinases.
J Biol Chem **275**:36575-36583
- Knippers R (2001)
Molekulare Genetik
Thieme Verlag, Stuttgart
- Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, Horinouchi S, Yoshida M. (1998)
Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1
Exp Cell Res **242**:540-7
- Lennon G, Auffray C, Polymeropoulos M, Soares MB (1996)
The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression
Genomics **33**:151-2
- Lewin B (1997)
Genes VI
Oxford University Press, New York
- Living Colors User Manual. (1999) PT2040, Clontech
- Melen K, Julkunen I (1997)
Nuclear cotransport mechanism of cytoplasmic human MxB protein.
J Biol Chem **272**:32353-9
- Michal G (1999)
Biochemical Pathways. Biochemie-Atlas
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- Michael WM, Choi M, Dreyfuss G (1995)
A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway.
Cell **83**:415-422
- Nalaskowski MM, Deschermeier C, Fanick W, Mayr GW (2002)
The human homologue of yeast ArgR111 protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization.
Biochem J **366**:549-56
- Nalaskowski MM, Bertsch U, Fanick W, Stockebrand MC, Schmale H, Mayr GW. (2003)
Rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C is enzymatically specialised for basal cellular inositol trisphosphate phosphorylation and shuttles actively between nucleus and cytoplasm.
J Biol Chem. **278**:19765-19776
- Nelson M, McClelland M. (1992)
Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes
Methods Enzymol **216**:279-303
- Nigg EA (1997)
Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation.
Nature **386**:779-787
- Niinobe M, Yamaguchi Y, Fukuda M, Mikoshiba K (1994)
Synaptotagmin is an inositol polyphosphate binding protein: isolation and characterization as an Ins 1,3,4,5-P₄ binding protein.
Biochem Biophys Res Commun **205**:1036-1042
- Odom AR, Stahlberg A, Wentz SR, York JD (2000)
A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control
Science **287**:2026-9
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996)
Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.
Science **273**:1392-1395
- Paraskeva E, Izaurralde E, Bischoff FR, Huber J, Kutay U, Hartmann E, Luhrmann R, Gorlich D (1999)
CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm.
J Cell Biol **145**:255-64
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975)
Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.
Nature **258**(5536):598-9
- Rando OJ, Chi TH, Crabtree GR (2003)
Second messenger control of chromatin remodeling.
Nat Struct Biol **10**:81-3

- Saiardi A, Erdjument-Bromage H, Snowman AM, Tempst P, Snyder SH (1999)
Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases
Curr Biol **9**:1323-6
- Saiardi A, Caffrey JJ, Snyder SH, Shears SB (2000)
Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*
FEBS Lett **468**:28-32
- Saiardi A, Nagata E, Luo HR, Snowman AM, Snyder SH (2000a)
Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase.
J Biol Chem **276**:39179-39185
- Saiardi A, Nagata E, Luo HR, Sawa A, Luo X, Snowman AM, Snyder SH (2001)
Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate.
Proc Natl Acad Sci U S A **98**:2306-11
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463-5467
- Schell MJ, Erneux C, Irvine RF (2001)
Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A associates with F-actin and dendritic spines via its N terminus
J Biol Chem **276**:37537-46
- Schreiber I (2002)
Regulation und subzelluläre Verteilung der Isoform B von Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase aus *Rattus norvegicus*
Dissertationsschrift, Universität Hamburg
- Shears SB (1998)
The versatility of inositol phosphates as cellular signals.
Biochim Biophys Acta **1436**:49-67
- Shears SB (2000)
Transcriptional regulation: a new dominion for inositol phosphate signaling?
Bioessays **22**:786-9
- Skerra A, Schmidt TG (2000)
Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins.
Methods Enzymol **326**:271-304
- Soriano S, Thomas S, High S, Griffiths G, D'santos C, Cullen P, Banting G (1997)
Membrane association, localization and topology of rat inositol 1,4,5 trisphosphate 3-kinase B: implications for membrane traffic and Ca²⁺ homoeostasis
Biochem J **324**:579-89

- Takazawa K, Go M, Endo T, Erneux C, Onaya T. (1995)
Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in FRTL-5 cells: regulation of the enzyme activity by TSH.
J Endocrinol **144**:527-32
- Tischler AS, Greene LA (1978)
Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor
Lab Invest **39**:77-89
- Vanweyenberg V, Communi D, D'Santos CS, Erneux C (1995)
Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase isoenzymes
Biochem J **306**:429-35
- Verbsky JW, Wilson MP, Kisseleva MV, Majerus PW, Wentz SR (2002)
The synthesis of inositol hexakisphosphate. Characterization of human inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase.
J Biol Chem **277**:31857-62
- Wang W, Malcolm BA (1999)
Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis
Biotechniques **26**:680-2
- Wei X, Henke VG, Strubing C, Brown EB, Clapham DE (2003)
Real-Time Imaging of Nuclear Permeation by EGFP in Single Intact Cells.
Biophys J **84**:1317-1327
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS (1995)
Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus.
Cell **82**:463-473
- Wolff B, Sanglier JJ, Wang Y. (1997)
Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA
Chem Biol **4**:139-47
- Xia HJ, Brearley C, Elge S, Kaplan B, Fromm H, Mueller-Roeber B (2003)
Arabidopsis inositol polyphosphate 6-/3-kinase is a nuclear protein that complements a yeast mutant lacking a functional ArgR-Mcm1 transcription complex.
Plant Cell **15**:449-63
- Xie W, Solomons KR, Freeman S, Kaetzel MA, Bruzik KS, Nelson DJ, Shears SB (1998)
Regulation of Ca²⁺-dependent Cl⁻ conductance in a human colonic epithelial cell line (T84): cross-talk between Ins(3,4,5,6)P₄ and protein phosphatases.
J Physiol **510**:661-73

- Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr (1996)
The molecular structure of green fluorescent protein.
Nat Biotechnol. **14**:1246-1251
- York JD, Odom AR, Murphy R, Ives EB, Wente SR (1999)
A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export
Science **285**:96-100
- Yoshida M, Nishikawa M, Nishi K, Abe K, Horinouchi S, Beppu T (1990)
Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells.
Exp Cell Res **187**:150-156
- Yoshida Y, Imai S (1997)
Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
Jpn J Pharmacol **74**:125-37
- Zhang T, Caffrey JJ, Shears SB (2001)
The transcriptional regulator, Arg82, is a hybrid kinase with both monophosphoinositol and diphosphoinositol polyphosphate synthase activity
FEBS Lett **494**:208-12

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
E.coli	Escherichia coli
EGF	epidermal growth factor
G	Guanosin
g	Gramm
gg	gallus gallus
GAP	GTPase aktivierendes Protein
h	Stunde
Hs	homo sapiens
Ins(1,4,5)P ₃	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat
Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
IP	Inositolphosphat
IP3K	D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase
IP6K	Inositolhexakisphosphatkinase
IPMK	Inositolphosphat Multikinase
kb	Kilobasen

l	Liter
m	Meter
M	molar
μ	mikro
MCS	multiple cloning site
MDD	metal dye detection
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano
NADH	hydriertes Nikotinsäureamidadenindinukleotid
nM	nanomolar
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLC	Phospholipase C
Rn	rattus norvegicus
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
T	Thymidin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
wt	Wildtyp
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid

8 Wissenschaftliche Arbeiten

Nalaskowski MM, Deschermeier C, Fanick W, Mayr GW (2002)

The human homologue of yeast ArgRIII protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization.

Biochem J **366**:549-56

Nalaskowski MM, Bertsch U, Fanick W, Stockebrand MC, Schmale H, Mayr GW. (2003)

Rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C is enzymatically specialised for basal cellular inositol trisphosphate phosphorylation and shuttles actively between nucleus and cytoplasm.

J Biol Chem. **278**:19765-19776

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. G.W. Mayr danke ich für die interessante Themenstellung und seine große Diskussionsbereitschaft, sowie für seine stete Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. U. Bertsch und Frau Dr. C. Deschermeier für ihre ausgezeichnete Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Herrn W. Fanick und Herrn M.C. Stockebrand danke ich für die vertrauensvolle Zusammenarbeit in den gemeinsamen Forschungsprojekten.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Schmale bedanke ich mich für die Bereitstellung der für die Ratten Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase C kodierenden cDNA und für hilfreiche Diskussionen.

Ich bedanke mich bei Frau N. Bischoff und Frau M.A. Brehm für die Bereitstellung von wissenschaftlichen Ergebnissen vor deren Veröffentlichung.

Bei Frau Dr. C. Deschermeier und Frau Dr. I. Schreiber bedanke ich mich für das kritische Lesen des Manuskriptes und für hilfreiche Diskussionen.

Ich bedanke mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Instituts und der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Marquardt für die Übernahme der Betreuung der Arbeit am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg und für die zahlreichen Diskussionen.