

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Bedeutung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	3
1.2 Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase.....	5
1.3 Regulation der PIP-5-Kinase durch monomere GTPasen.....	7
1.4 LIM-Kinase und Cofilin als Effektoren der Rho-Proteine	11
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Radioaktive Chemikalien	15
2.1.3 c-DNA-Konstrukte.....	15
2.1.4 Sonstige Materialien.....	16
2.2 Methoden	16
2.2.1 Kultivierung von HEK-293-Zellen	16
2.2.2 Transiente Transfizierung.....	17
2.2.4 Proteinbestimmung.....	18
2.2.5 Bestimmung der PIP-5-Kinase-Aktivität	18
2.2.7 PIP ₂ -Phosphataseaktivitätsbestimmung	19
2.2.8 Aufreinigung von GST-tagged RhoA und LIM-Kinase	20
2.2.9 Aufreinigung von Cofilin aus E. coli.....	20
2.2.11 Phosphorylierung von Cofilin durch rekombinante LIM-Kinase.....	21
2.2.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	22
2.2.13 PIP ₂ -Massenbestimmung.....	23
3 Ergebnisse	25
3.1 Stimulation der PIP-5-Kinase durch die monomeren GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42..25	
3.1.1 Stimulation der PIP-5-Kinase durch Rac1 und Cdc42 ist unabhängig von RhoA.....25	
3.1.2 Rho-Kinase vermittelt Stimulation der PIP-5-Kinase durch RhoA, nicht aber durch Rac1 und Cdc42.....	28
3.2 Einfluss von LIM-Kinase auf PIP-5-Kinase	29
3.2.1 LIM-Kinase beeinflusst die PIP-5-Kinase.....	29
3.2.2 Rekombinante LIM-Kinase phosphoryliert Cofilin.....	32
3.2.3 Rekombinante LIM-Kinase stimuliert die PIP-5-Kinase	33
3.3 Effekte von Rho-Kinase und LIM-Kinase auf die PI-4-Kinase	35
3.4 Effekte der LIM-Kinase auf die durch Rho-GTPasen stimulierte PIP-5-Kinase-Aktivität..38	
3.4.1 LIM-Kinase verstärkt die durch Rho-GTPasen stimulierte PIP-5-Kinase-Aktivität.....38	
3.4.2 Kinase-defiziente LIM-Kinase hebt die Stimulation der PIP-5-Kinase durch die Rho- GTPasen auf	40
3.4.3 LIM-Kinase steht unter der Kontrolle von Rho-Kinase	42
4 Diskussion	44

5	Zusammenfassung.....	52
6	Literaturverzeichnis	53
7	Verwendete Abkürzungen.....	60
8	Anhang	62