

Um auf verschiedene äußere Umstände reagieren zu können, zu wachsen und sich zu vermehren, müssen Zellen in der Lage sein, ihre Form zu verändern. Eine fundamentale Rolle spielt dabei das Aktomyosin-Zytoskelett der Zelle, das die Veränderung der Form möglich macht. Die Fortbewegung von Zellen, die Anheftung von Zellen, die Zellteilung und z.B. der Transport von Vesikeln beruhen auf der Umgestaltung des Zytoskeletts. Für krankhafte Prozesse wie die Metastasierung von Krebszellen und die Degeneration von Nervenzellen ist ein Zusammenhang mit einer Dysfunktion des Zytoskeletts beschrieben worden. Zellen müssen dabei in der Lage sein Reize, die außerhalb der Zelle vorliegen, wahrzunehmen und über die Plasmamembran ins Innere zu leiten, um dort entsprechende Signalketten auszulösen. Die Familie der DMPK-Kinasen umfasst wichtige Enzyme, wie ROCK und MRCK, die an dieser Signalweiterleitung beteiligt sind. ROCK und MRCK werden dabei von Lipiden, kleinen GTPases und verschiedenen Adaptoren an der Membran lokalisiert und phosphorylieren daraufhin Effektormoleküle, was die Umgestaltungen des Zytoskeletts zur Folge hat. Für ROCK konnten wir die Struktur lösen und die Konformation und enzymatischen Eigenschaften beschreiben. Die Kinase Domäne, die die enzymatische Funktion ausübt und die regulatorischen Domänen sind dabei über eine 107 nm lange Spiralkette miteinander verbunden. Diese Spiralkette funktioniert wie ein molekulares Maßband und eine Kürzung dieses Maßbandes beeinträchtigt die Umgestaltung des Zytoskeletts. Das stellt eine völlig neue Art der Regulierung von Aktivität dar.

Wir nehmen an, daß unser neues Model der Regulierung auf andere DMPK-Kinasen übertragbar ist und die Regulierung der DMPK-Kinasen über einen gemeinsamen Mechanismus erfolgt. Wir möchten daher in diesem Proposal die Struktur, Konformation und enzymatischen Funktionen von MRCK studieren.

Für eine effektive Phosphorylierung durch ROCK und MRCK ist es dabei auch von entscheidender Bedeutung, daß beide Kinasen an spezifischen Membranstellen platziert werden. Obwohl die korrekte Platzierung von wesentlicher Bedeutung ist, sind die Bindepartner für ROCK und MRCK bis heute nicht beschrieben worden. Wir werden einen hochmodernen Assay verwenden, der es erlaubt mit hohem Durchsatz viele Bindepartner zu testen und die Bindung zu quantifizieren.

Parallel dazu möchten wir die Struktur der membran-bindenden Domänen von MRCK aufklären. Das Wissen über die spezifischen Bindepartner und den 3-dimensionale Aufbau der Domänen wird es uns erlauben, Rückschlüsse auf die spezifische Lokalisation zu ziehen, eine der wichtigsten Fragen in Bezug auf die Arbeitsweise dieser Kinasen.

Um außerdem die Lokalisation und Konformation von ROCK und MRCK direkt in Zellen zu studieren, werden wir neueste hochauflösende Mikroskopiertechniken verwenden und dabei von zwei Experten-Laboren in Deutschland unterstützt werden. Insgesamt werden wir biophysikalische, biochemische und zellbiologische Techniken verwenden, um mit den in diesem Proposal dargestellten Experimenten wichtige Fragen zur Signalweiterleitung durch die Kinasen ROCK und MRCK zu beantworten und zu erforschen, wie das Zytoskelett der Zelle reguliert wird.