

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
der Universität Hamburg
Abteilung für zelluläre Signaltransduktion

Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase:

**Identifizierung und zelluläre Effekte pflanzlicher Hemmstoffe
sowie
Erstellung eines Substratselektivitätsprofils**

Dissertation

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

vorgelegt von
Kirsten Hillemeier
aus Uetersen

Hamburg 2001

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

Annahmevermerk

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Eppendorf in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion in der Zeit vom September 1995 bis August 2001 angefertigt.

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

Tag der letzten Prüfung: 16. August 2001

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Eppendorf in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion durchgeführt.

Dem geschäftsführenden Direktor des Institutes für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Herrn Prof. Dr. Georg W. Mayr, danke ich für die Bereitstellung der räumlichen, apparativen und materiellen Voraussetzung zur Durchführung dieser Arbeit, für die interessante Themenstellung sowie für die intensive Betreuung.

Herrn Dr. Uwe Bertsch danke ich für die Bereitstellung der für diese Arbeit erforderlichen rekombinanten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Isoform A aus Hühnererythrozyten und der humanen Isoform B sowie der hilfreichen Unterstützung in molekularbiologischen Arbeitstechniken.

Frau Christina Deschermeier danke ich für die Bereitstellung der Mutanten der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A.

Frau Claudia Albert danke ich für die hilfreiche Unterstützung zur Durchführung der HPLC-Analysen.

Frau Tina Serreck danke ich für die Hilfestellung in EDV-technischen Fragestellungen.

Frau Karin Müller danke ich für die Einführung sowie der Unterstützung in zellbiologischen Arbeiten.

Frau Sigrid Poll danke ich für die Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken und die aufmunternde Unterstützung in frustrierenden Momenten während dieser Arbeit.

Danksagung

Herrn Prof. B.V.L. Potter an der School of Pharmacy and Pharmacology der University of Bath, England sowie Priv. Doz. Dr. C. Schultz am Institut für Organische Chemie der Universität Bremen danke ich für die zur Verfügung gestellten Inositolphosphate und Substratanaloga.

Herrn Dr. E. Eendel am Forschungsinstitut Borstel danke ich für die fachlichen Hinweise und die Bereitstellung apparativer Mittel zur Durchführung der Zellzyklusanalysen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Marquardt für die Betreuung am Fachbereich Chemie.

Weiterhin möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, aber hier nicht namentlich erwähnt wurden, bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Inositol-Phospholipid-Signalübertragungsweg.....	1
1.2. Intrazelluläre Ins(1,4,5)P ₃ – Rezeptoren.....	5
1.2.1. Molekulare Struktur des Rezeptors.....	5
1.2.2. Funktionen des Rezeptors.....	6
1.3. Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase.....	7
1.3.1. Isoformen der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase.....	8
1.3.2. Regulation der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase.....	10
1.3.3. Schlüsselrolle der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase.....	11
1.4. Metabolisierung und biologische Funktionen der Inositolphosphate.....	12
1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	20
2.1. Material.....	20
2.1.1. Geräte.....	20
2.1.2. Zelllinien.....	22
2.1.3. Inhibitoren.....	22
2.1.4. Inositolphosphate und Analoga.....	26
2.1.4.1. Myo-Inositolphosphate.....	26
2.1.4.2. Substratanaloga.....	27
2.1.5. Antibiotika.....	27
2.1.6. Enzyme.....	28
2.1.7. Zellkulturmedien.....	28
2.1.7.1. Wachstumsmedium für Jurkat T-Zellen.....	28
2.1.7.2. Selektionsmedium für Jurkat T-Zellen.....	28
2.1.7.3. Klonierungsmedium für Jurkat T-Zellen.....	29
2.1.7.4. Minimalmedium für Jurkat T-Zellen.....	29
2.1.7.5. Wachstumsmedium für NIH 3T3-Zellen.....	29
2.1.8. Chemikalien.....	30
2.1.9. Proteinmarker.....	32

2.1.10.	Angewandte Kits	32
2.1.11.	Weitere Materialien	32
2.1.12.	Rezepturen.....	33
2.1.12.1.	10x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	33
2.1.12.2.	Trypsin/EDTA-Lösung.....	33
2.1.12.3.	Coomassie-Färbelösung	33
2.1.12.4.	Entfärbelösung	34
2.2.	Methoden	35
2.2.1.	Expression und Reinigung der rekombinanten Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A, der Mutanten und der rekombinanten humanen Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase B.....	35
2.2.2.	Charakterisierung der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A	36
2.2.3.	Inhibierung der Aktivität der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A.....	37
2.2.3.1.	Messung der Hemmeigenschaft von Hypericin unter Bestrahlung	38
2.2.4.	Test auf Einfluß der Hemmstoffe auf die Kopplungsenzyme	38
2.2.5.	Test auf Einfluß des Photometerlichtes auf lichtempfindliche Hemmstoffe	39
2.2.6.	Messung des Hemmstoffeinflusses auf den K _{m,app} -Wert für ATP	39
2.2.7.	Messung des Hemmstoffeinflusses auf den K _m -Wert für D-Ins(1,4,5)P ₃	39
2.2.8.	Messung des Calmodulineinflusses auf die Hemmung der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A.....	40
2.2.9.	Messung der Reversibilität der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase-Hemmung durch Triton X-100	40
2.2.10.	Differenzspektroskopische Untersuchung der Hemmstoff / Triton X-100 Interaktion	41
2.2.11.	Untersuchung der Bindungsstelle der Hemmstoffe unter Verwendung von Punktmutanten der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A	41
2.2.12.	Versuch des Cross-linkings von Gossypol an die Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A.	42
2.2.13.	Hemmung der Topoisomerase II	42
2.2.14.	Substratspezifität der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A.....	44
2.2.15.	HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte der umgesetzten Isomere bzw. Analoga mittels der Metal-Dye-Detection-Methode (MDD)	44
2.2.15.1.	Umsatz und HPLC-Analyse der als Substrat eingesetzten Inositolphosphatisomere bzw. Analoga und ihrer Produkte	46
2.2.16.	Bestimmung von K _m -Werten für substrataktive InsPs und Analoga.....	48
2.2.17.	Bestimmung von K _i -Werten für substratinaktive InsPs und Analoga	48

2.2.18. Proteinbestimmung	49
2.2.19. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.2.20. Konzentrationsbestimmung von DNA	51
2.2.21. Zellbiologische Methoden	51
2.2.21.1. Allgemeine Methoden der Zellbiologie	51
2.2.21.1.1. Aseptisches Arbeiten	51
2.2.21.1.2. Subkultivierung von Suspensionszellen (Jurkat T-Zellen)	52
2.2.21.1.3. Subkultivierung von adhärennten Zellen (NIH 3T3).....	52
2.2.21.1.4. Zellzahlbestimmung mittels Coulter Counter	52
2.2.21.1.5. Bestimmung der Vitalität von Zellen	53
2.2.22. Spezielle Methoden der Zellbiologie	54
2.2.22.1. Proliferationshemmung von Jurkat T-Zellen.....	54
2.2.22.2. Proliferationshemmung von NIH 3T3-Zellen	55
2.2.22.3. Einfluß der Hemmstoffe auf den Zellzyklus von Jurkat T-Zellen	55
2.2.22.4. 5-Bromo-2'-deoxy-uridin-Einbau in Jurkat T-Zellen.....	56
2.2.22.5. Hemmung der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase Aktivität in Jurkat T-Zellen	57
2.2.22.6. Aufarbeitung der Hemmstoff- bzw. DMSO- ausgesetzten Jurkat T-Zellen für die HPLC-Analyse von Inositolphosphaten.....	58
2.2.22.7. Stabile Transfektion von Jurkat T-Zellen mittels Elektroporation	59
2.2.22.7.1. Präparation der Plasmid-DNA für die Transfektion.....	59
2.2.22.7.2. Transfektion von Jurkat T-Zellen	61
2.2.22.7.3. Auswertung der Transfektion durch Fluoreszenzmikroskopie	61
2.2.22.7.4. Selektion der transfizierten Jurkat T-Zellen	62
2.2.22.7.5. Klonierung der transfizierten Jurkat T-Zellen	62
3. Ergebnisse	64
3.1. Charakterisierung enzymatischer Eigenschaften der rekombinanten Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A aus Vogelerythrozyten	64
3.1.1. Bestimmung des Km,app-Wertes für D-Ins(1,4,5)P ₃ in Gegenwart von variierendem Produkt Ins(1,3,4,5)P ₄ und von variablem ATP.....	64
3.1.2. Bestimmung des Km,app-Wertes für ATP	67
3.2. Screening nach Inhibitoren der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinaseaktivität.....	68
3.3. Hemmstoffeinflüsse auf die Kopplungsenzyme	79
3.4. Einfluß des Photometerlichtes ($\lambda = 339 \text{ nm}$) auf lichtempfindliche Hemmstoffe	79

3.5. Einfluß der potenten Hemmstoffe auf den $K_{m,app}$ -Wert für ATP und Ins(1,4,5) P_3	81
3.5.1. Effekte auf den $K_{m,app}$ -Wert für ATP	81
3.5.2. Effekte auf den $K_{m,app}$ -Wert für D-Ins(1,4,5) P_3	84
3.6. Einfluß von Calmodulin auf die Hemmung der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinaseaktivität	87
3.7. Einfluß von Triton X-100 auf die Hemmung der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinaseaktivität.....	89
3.8. Differenzspektroskopische Untersuchung der Hemmstoff / Triton X-100 Interaktion	92
3.9. Identifizierung einer Bindungsstelle von Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase-Hemmstoffen im Polypeptid	95
3.10. Cross-linking von Gossypol an die Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A	96
3.11. Hemmung der Topoisomerase II	97
3.12. „Active site mapping“ der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A durch Verwendung von Substratanaloga	99
3.12.1. Gute alternative Substrate unter den Ins P_{2-} , Ins P_{3-} und Ins P_{4-} -Isomeren mit Phosphatgruppen an Position D-(4,5)	99
3.12.2. Alternative Ins P_{2-} , Ins P_{3-} und Ins P_{4-} -Substrate ohne Phosphatgruppen an Position D-(4,5)	100
3.12.3. Substrataktive Ins P_{2-} , Ins P_{3-} und Ins P_{4-} -Analoga mit Phosphatgruppen an Position D-(4,5)	102
3.12.4. Substrataktive Ins P_{2-} , Ins P_{3-} und Ins P_{4-} -Analoga ohne Phosphatgruppen an Position D-(4,5)	104
3.12.5. Inaktive Ins P_{2-} , Ins P_{3-} und Ins P_{4-} -Isomere und Analoga.....	104
3.12.6. HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte der substrataktiven Isomere und Analoga	105
3.12.7. Bestimmung der $K_{m,app}$ -Werte für potente InsPs und Analoga	108
3.12.8. InsPs-Isomere und Analoga als Hemmstoffe der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A	110
3.12.9. Hemmung der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinaseaktivität durch PtdIns(4,5) P_2	112
3.13. Hemmung des Zellwachstums durch die im Screening optimierten Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase-Inhibitoren	114
3.13.1. Jurkat T-Zellen	114
3.13.2. NIH 3T3-Zellen.....	119
3.14. Einfluß der Hemmstoffe der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase auf den Zellzyklus von Jurkat T-Zellen	123
3.14.1. Effekte von (-)-EGCG.....	123
3.14.2. Effekte von Gossypol	124
3.14.3. Effekte von 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon	126
3.14.4. Effekte von Quercetin.....	127
3.14.5. Vitalität und Apoptose	128

3.15. 5-Bromo-2'-deoxy-uridin-Einbau in Jurkat T-Zellen	129
3.16. Hemmstoffeffekte auf den Inositolpolyphosphat-Metabolismus.....	131
3.16.1. Wirkung von Quercetin.....	132
3.16.2. Wirkung von Gossypol	136
3.17. Versuch der stabilen Überexpression einer hemmstoffsensitiven Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase mutante in Jurkat T-Zellen	139
4. Diskussion	141
4.1. Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A.....	141
4.1.1. Quercetin.....	142
4.1.2. 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon.....	144
4.1.3. (-)-ECG, (-)-EGCG	145
4.1.4. Hypericin	147
4.1.5. Gossypol	149
4.1.6. Ellagsäure	151
4.1.7. ATA	152
4.2. Hemmtypen der getesteten Inhibitoren an der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A	154
4.2.1. Hemmtyp in Bezug auf das Substrat ATP.....	154
4.2.2. Hemmtyp in Bezug auf Ins(1,4,5)P ₃	155
4.3. Antagonistischer Effekt von Calmodulin auf die Hemmung der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinaseaktivität.....	157
4.4. Antagonistischer Effekt von Triton X-100 auf die Hemmung der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinaseaktivität.....	158
4.5. Analyse der Hemmstoffbindungsstelle.....	159
4.6. Hemmung der humanen Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase B.....	161
4.7. Wirkung der Inhibitoren auf das Zellwachstum	162
4.7.1. Quercetin.....	163
4.7.2. (-)-ECG, (-)-EGCG	163
4.7.3. Hypericin	163
4.7.4. Gossypol	163
4.7.5. ATA	164
4.7.6. Proliferationshemmung der Jurkat T-Zellen und NIH 3T3-Zellen.....	164
4.7.7. Vitalitätsrate/Apoptose der Jurkat T-Zellen unter dem Einfluß der Kinaseinhibitoren.....	166

Inhaltsverzeichnis

4.8. Einfluß der Inhibitoren auf den Zellzyklus	168
4.9. Einfluß der Inhibitoren auf die DNA-Synthese	170
4.10. Hemmung der Biosynthese der höher phosphorylierten Inositole	171
4.11. Schlussfolgerung	172
4.12. Substratspezifität der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A.....	176
4.12.1. Struktur-Aktivitätsbeziehung der Inositolphosphate und Analoga „active site mapping“ der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase-Bindungsstelle	176
4.12.1.1. Die D-3-äquivalente äquatoriale Phosphatakzeptor-Hydroxylgruppe (D-3*-OH)	178
4.12.1.2. Die 4,5-äquivalente vicinale äquatoriale Phosphatgruppe D-(4*-äq-P, 5*-äq-P).....	179
4.12.1.3. Die zum äquatorialen D-6-OH äquivalente Hydroxylgruppe (D-6*-OH)	180
4.12.1.4. Die zum äquatorialen D-1*-P-äquivalente Phosphatgruppe (D-1*-P)	181
4.12.1.5. Substituenten an der D-2*-Position.....	181
4.12.1.6. Sonderfall: Konfiguration chiro	183
4.12.1.7. Allgemeines Strukturmodell.....	188
4.12.1.8. Bindungsaffinität von InsPs und Analoga.....	189
5. Zusammenfassung.....	196
5.1. Summary.....	199
6. Literatur.....	202
7. Anhang.....	246
7.1. Gefahrstofflisten.....	246
7.2. Abkürzungen.....	249
7.2.1. Allgemeine Abkürzungen	249
7.2.2. Myo-Inositolphosphate und Phosphatidylinositole	253
7.2.3. Substratanaloga	254
7.2.4. Einbuchstaben-Code der Aminosäuren	254

1. Einleitung

1.1. Inositol-Phospholipid-Signalübertragungsweg

Die Inositol-Phospholipide (Phosphoinositide) sind die Ausgangsverbindungen zur Bildung der Botenstoffe Inositol (1,4,5)-trisphosphat $\{\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\}$ und Diacylglycerol (DAG).

In der Plasmamembran ist das Phosphoinositid Phosphatidylinositol (PtdIns) enthalten, welches durch eine spezifische Kinase in der 4-Position des Inositolringes zunächst zum Phosphatidylinositol-4-phosphat $\{\text{PtdIns}(4)\text{P}\}$ phosphoryliert wird. Durch eine weitere Phosphorylierung in der 5-Position entsteht das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat $\{\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2\}$. Die hydrolytische Spaltung dieses Phosphoinositides in DAG und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ erfolgt durch die Phospholipase C (PLC) (Berridge & Irvine, 1984).

Es konnten verschiedene Isoformen dieses Enzyms in unterschiedlichen Geweben von Säugetieren nachgewiesen werden. Diese Isoformen werden in die drei Gruppen β , γ und δ eingeteilt (Majerus, 1992; Berridge, 1993).

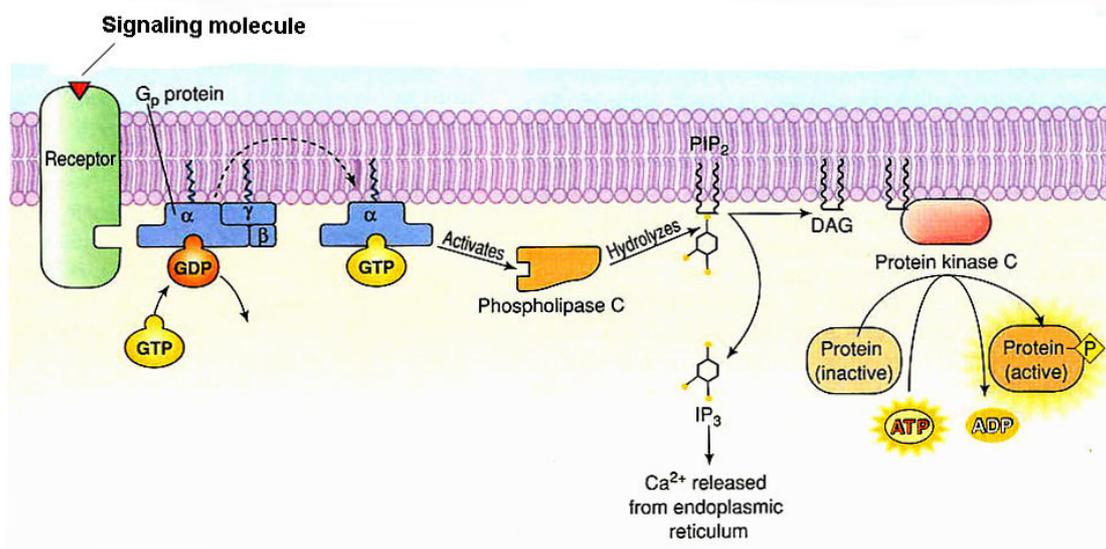
Die Aktivierung von PLC erfolgt über zwei unterschiedliche Wege.

a) Eine Vielzahl G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Dessauer et al., 1996), z.B. für die Agonisten Acetylcholin, Histamin und Vasopressin, stimuliert die Subtypen der Isoform PLC- β (Abb. 1.1.1.).

b) Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF etc.) an die extrazelluläre Domäne von Rezeptor-Tyrosinkinasen findet eine Dimerisierung dieser Rezeptoren und hierdurch wiederum die gegenseitige Phosphorylierung von Tyrosinresten statt. Diese gegenseitige Phosphorylierung wird Autophosphorylierung genannt. Über die SH2 -Domänen, die in der γ -Isoform der PLC vorkommen, bindet dieses Enzym an die Tyrosinphosphatdomänen des aktivierten Rezeptor. Durch diese Membrantranslokation - nur dort ist das Substrat der PLC vorhanden - sowie durch die Phosphorylierung der Tyrosinreste erfolgt eine Aktivierung der PLC- γ (Berridge, 1993).

Der Aktivierungsmechanismus für die PLC- δ konnte bislang noch nicht im Detail aufgeklärt werden. Das Enzym besitzt ein EF-Hand-Motiv, wodurch eine Beeinflussung der Aktivität durch Calcium möglich ist (Berridge, 1993).

Abb.1.1.1.: Darstellung des Signalwegs zur Entstehung von Inositol 1,4,5-trisphosphat {Ins(1,4,5)P₃} und Diacylglycerol (DAG)



Durch die Bindung eines Signalmoleküls an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor werden die Subtypen der Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese katalysiert die Hydrolyse des in der Plasmamembran vorkommenden Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol (1,4,5)-trisphosphat {Ins(1,4,5)P₃}. Während DAG die Proteinkinase C aktiviert, mobilisiert Ins(1,4,5)P₃ die Ca²⁺-Freisetzung aus den Speichern im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Kleinsmith & Kish, 1995).

Das fettlösliche DAG verbleibt in der Plasmamembran und aktiviert die Ca²⁺- und DAG-abhängigen Isoformen der Proteinkinase C (PKC), die durch Phosphorylierung von Zellproteinen an zahlreichen intrazellulären Regulationsmechanismen beteiligt sind.

Weiterhin scheint die PKC an der Rückstellung der durch Ins(1,4,5)P₃ verursachten intrazellulären Ca²⁺-Erhöhung sehr oft beteiligt zu sein (Nishizuka, 1988).

Die Verstoffwechslung von DAG erfolgt über zwei Wege. Zum einen wird DAG durch Lipasen unter Entstehung von Arachidonsäure deacyliert, die Vorstufe für die Synthese von ebenfalls als Botenstoffe agierenden Eicosanoiden ist. Zum anderen wird DAG durch eine spezifische DAG-Kinase zur Phosphatidsäure phosphoryliert und anschließend unter Beteiligung von Cytidin-5'-triphosphat (CTP) in CDP-Diacylglycerol umgewandelt. Zusammen mit myo-Inositol wird es dann über die Zwischenstufen von PtdIns und PtdIns(4)P der Resynthese von PtdIns(4,5)P₂ zugeführt (Shears, 1991), wodurch der Phosphoinositidzyklus geschlossen wird.

1. Einleitung

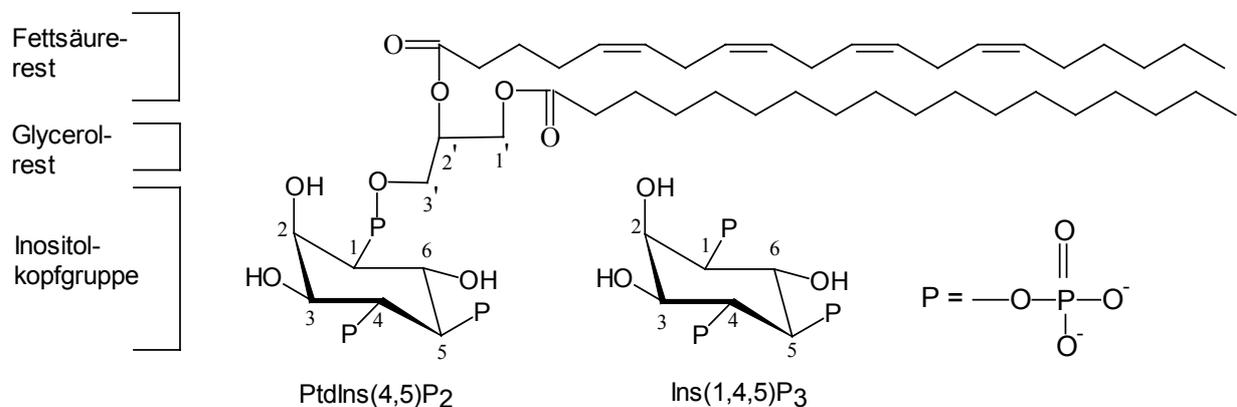
Das wasserlösliche $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ diffundiert in das Zytosol und bindet an den $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums (ER), bei dem es sich um einen tetrameren intrazellulären Rezeptor- Ca^{2+} -Kanal handelt (Berridge, 1993). Hierdurch wird der Kanal geöffnet, so daß im Lumen des ER gespeichertes Ca^{2+} in das Zytosol ausströmt. Intrazelluläres Calcium spielt eine große Rolle in vielen zellulären Prozessen wie z.B. Zellwachstum, Zellmobilität, Muskelkontraktion und Sekretion.

Die Inaktivierung des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Signals kann durch zwei Metabolisierungswege erfolgen. Durch Isoformen I bis III der Inositolpolyphosphat-5-phosphatase wird $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in der 5-Position zum $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ dephosphoryliert. Weitere Dephosphorylierungen folgen in der 1- und 4-Position unter Bildung von myo-Inositol, welches in die Resynthese von Phosphoinositiden eingeht (Mayr, 1988; Shears, 1991).

Der andere Metabolisierungsweg ist die Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in der 3-Position mit Hilfe von Inositoltrisphosphat 3-Kinasen (InsP_3 3-Kinasen) zum Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat $\{\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4\}$ (Irvine et al., 1986).

Der natürlich vorkommende Verwandte vom D-myo- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ist das $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, welches sich durch das Vorhandensein des Glycerolrestes am Phosphat 1 sowie der zwei Acylketten vom D-myo- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ unterscheidet (Abb. 1.1.2.). Auf Grund dieser hydrophoben 1-stearoyl- (C_{18}), 2-arachidonoyl- (C_{20}) Acylketten sind die Phosphoinositide wasserunlöslich und befinden sich in Zellmembranen. Die Phosphoinositide mit mehr als einem Phosphatrest (PtdInsP und PtdInsP_2) befinden sich fast ausschließlich im inneren zytosolischen Blatt der Plasmamembran.

Abb. 1.1.2.: Schematische Darstellung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$



PtdIns(4,5)P₂ ist ein Phosphoinositid, welches in allen eukaryontischen Zellen gefunden wurde. Durch Wechselwirkung mit vielen Proteinen ist es an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt. Es interagiert mit Aktin-bindenden Proteinen, so daß dieses Phosphoinositid in der Ausbildung von Mikrofilamenten des Zytoskellets eine wichtige Rolle spielt (Janmey, 1994).

Weiterhin interagiert PtdIns(4,5)P₂ mit Proteinen und Enzymen, die im Vesikeltransport involviert sind. Das Phospholipid ist ein spezifischer und potenter Aktivator der aus Gehirn partiell aufgereinigten Phospholipase D (PLD). Es erhöht um das 10-fache dessen Enzymaktivität (Liscovitch et al., 1994). Ebenfalls bindet das Phosphoinositid an den ADP-ribosylation Faktor (Arf) 1 mit einer Dissoziationskonstanten (K_d) von $45 \pm 13 \mu\text{M}$ (Randazzo, 1997).

PtdIns(4,5)P₂ interagiert mit „pleckstrin homology“ (PH) Domänen diverser anderer Proteine. Dadurch können Proteine, die eine oder zwei PH-Domänen enthalten, durch eine Interaktion mit PtdIns(4,5)P₂ an der Membran lokalisiert werden (Harlan et al., 1994). PtdIns(4,5)P₂ interagiert ebenso mit der Typ I PI 3-Kinase über eine C2 Domäne, die ursprünglich in den calciumabhängigen Isoformen der PKC identifiziert wurden (Bottomley et al., 1998).

PtdIns(4,5)P₂ wird nicht nur durch die PLC hydrolytisch in DAG und Ins(1,4,5)P₃ gespalten, sondern es wird auch durch PI 3-Kinase Typ I zu dem membranständigen sekundären Botenstoff Phosphatidylinositol-(3,4,5)P₃ {PtdIns(3,4,5)P₃} phosphoryliert (Stephens et al., 1993). Das PtdIns(3,4,5)P₃ ist in normalen ruhenden Zellen praktisch nicht nachweisbar. Werden die Zellen dagegen mit einem Wachstumsfaktor oder mit bestimmten Agonisten stimuliert, kommt es zu einem raschen Anstieg der PtdIns(3,4,5)P₃-Konzentration (Bae et al., 1998).

1.2. Intrazelluläre Ins(1,4,5)P₃ - Rezeptoren

Der Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor konnte bislang aus der glatten Muskulatur, den Thrombozyten und dem Kleinhirn aufgereinigt werden. Es handelt sich hierbei um glykosylierte tetramere Proteine mit Molekulargewichten von jeweils 220 - 260 kDa, die einen tetrameren Ca²⁺-Kanal im ER bilden. In Säugetieren wurden drei von unterschiedlichen Genen codierte Rezeptortypen gefunden, die als Typ 1, Typ 2 und Typ 3 bezeichnet wurden.

Im Gegensatz zu den anderen Rezeptortypen ist der Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor vom Typ 1 in einem wesentlich höheren Maße in neuronalen und anderem Gewebe exprimiert (Yoshida & Imai, 1997). Der Rezeptor kommt in der Membran des ER vor und bildet den Ca²⁺-Kanal (Yoshida & Imai, 1997).

1.2.1. Molekulare Struktur des Rezeptors

Der Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor kann in drei Domänen eingeteilt werden. Es handelt sich hierbei um die N-terminale Ligandenbindungsdomäne, die in der Mitte gelegene modulatorische Domäne sowie um die C-terminale Domäne, die den Ca²⁺-Kanal bildet. Die Untereinheiten der Rezeptoren besitzen in der Ligandenbindungsdomäne eine Übereinstimmung von 68 %, in der modulatorischen Domäne von 53 % und in der Ca²⁺-Kanal-Domäne von 59 % (Yoshida & Imai, 1997).

Die N-terminale Ligandenbindungsdomäne besitzt eine Bindungsstelle für Ins(1,4,5)P₃, so daß der tetramere Rezeptorkomplex vier Moleküle Ins(1,4,5)P₃ bindet. Die Bindung von Ins(1,4,5)P₃ erfolgt mit hoher Affinität. Es konnte eine Bindungskonstante (K_d) im Bereich von 2 - 100 nM in vitro, von 0.5 - 2 µM in vivo gemessen werden. Ebenfalls liegt eine hohe Spezifität für D-Ins(1,4,5)P₃ vor (Yoshida & Imai, 1997).

Die modulatorische Domäne ist Ziel für zahlreiche regulatorische Signalinputs. Ebenso dient diese Domäne zur Weiterleitung des Ins(1,4,5)P₃-Bindungssignals an die Ca²⁺-Kanaldomäne. Außerdem konnten mutmaßliche Bindungsstellen für verschiedene Modulatoren des Kanals (ATP, Calmodulin, Ca²⁺) identifiziert werden. Die modulatorische Domäne trägt Phosphorylierungsstellen für einige Proteinkinasen {cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), Proteinkinase C (PKC),

Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)}. Diese strukturellen Merkmale deuten auf eine komplexe Regulation der durch Ins(1,4,5)P₃ induzierten Öffnung des Ca²⁺-Kanals hin und macht dieses zelluläre System zu einem „Signalintegrationssystem“ für viele exogene und intrazelluläre Signalinputs (Yoshida & Imai, 1997).

Vier Untereinheiten lagern sich zur eigentlichen Kanaldomäne (C-terminale Domäne) zusammen. Hierbei passiert die Peptidkette der einzelnen Untereinheit vermutlich sechsmal die Membran.

1.2.2. Funktionen des Rezeptors

Experimente mit aufgereinigtem Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor vom Typ1 zeigten, daß sowohl der Rezeptor als auch der Ca²⁺-Kanal in dem gleichen Protein lokalisiert sind. Der Ca²⁺-Kanal des aus dem Kleinhirn isolierten Rezeptors (Typ 1) wird durch Ins(1,4,5)P₃ aktiviert. Ins(1,4,5)P₃ besitzt an diesem Kanal eine Effektivdosis 50 (EC₅₀) von ca. 0.2 µM. Die maximale Kanalaktivität wird bei einer Ins(1,4,5)P₃-Konzentration von 1 µM erreicht. Die Bindung von Ins(1,4,5)P₃ führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch der Ca²⁺-Kanal geöffnet wird. Ist der Rezeptor aktiviert, kann der Kanal neben Ca²⁺-Ionen auch andere Erdalkalitionen (Ba²⁺, Sr²⁺, Mg²⁺) durchlassen (Yoshida & Imai, 1997).

Initial steigt die freie zytosolische Ca²⁺-Konzentration durch die Öffnung des Ca²⁺-Kanals des ER an, indem die intrazellulären Ca²⁺-Speicher ins Zytosol entleert werden. Länger erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen werden in einer zweiten Phase durch den Einstrom extrazellulären Calciums vermittelt (Berridge, 1993).

Die Idee, daß der Calcium-Einstrom in die Zelle durch einen kapazitiven Mechanismus erfolgt, wurde zuerst von Putney 1986 diskutiert. Hiernach soll der extrazelluläre Calcium-Einstrom durch den Calciumgehalt der Speicher reguliert werden. Sind die Speicher im ER gefüllt, erfolgt kein Einstrom von Calcium in die Zelle. Sobald die Speicher entleert werden, setzt der extrazelluläre Einstrom an Calcium ein (Berridge, 1995). Hoth und Penner (1992) haben diesen Calciumstrom durch den „kapazitiven Ca²⁺-Kanal“ mit „calcium-release-activated-current“ (I_{CRAC}) benannt.

Wie die Information nach Entleerung der Ca²⁺-Speicher vom ER zur Plasmamembran gelangt, ist bislang nicht geklärt. Zum einen wird angenommen, daß vom ER ein Faktor freigesetzt wird, der zur Plasmamembran diffundiert, um dort I_{CRAC} zu öffnen.

Dieser Faktor wird als „calcium influx factor“ (CIF) bezeichnet. Es wird angenommen, daß es sich hierbei um eine Verbindung mit niedrigem Molekulargewicht handelt, die im ER gespeichert ist (Berridge, 1995). In der Arbeitsgruppe von Guse wurden viele Hinweise erarbeitet, daß cyclo-ADP-Ribose an diesem Phänomen beteiligt ist (Guse, 1999).

Zum anderen wird vermutet, daß durch Protein-Protein Interaktionen es zum extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom kommt. Hierbei wird angenommen, daß der ausgedehnte zytoplasmatische Kopf des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors Informationen zwischen dem ER und der Plasmamembran übermittelt.

Nach Entleerung der Ca^{2+} -Speicher könnte eine Konformationsänderung des Rezeptors die Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran verursachen (Berridge, 1995). Diese Kanäle könnten in ihrer Aktivität zusätzlich durch $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ beeinflußt werden, so daß diesem Inositolphosphat eine Rolle bei der Kontrolle des intrazellulären Calciumgehaltes zugeschrieben wird (Irvine & Moor, 1986). Außerdem wurde ein plasmamembranständiger Ca^{2+} -Kanal identifiziert, der durch $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ reguliert wird. Anhand dieses Kanals konnte für Endothelzellen gezeigt werden, daß $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ an dem Einstrom extrazellulären Calciums beteiligt ist (Lückhoff & Clapham, 1992).

1.3. Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase

Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase { $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase} ist ein Enzym, welches ubiquitär in allen bisher untersuchten tierischen Geweben gefunden wurde (Irvine et al., 1986). Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle in dem anabolen Signal-Stoffwechsel von Inositolphosphaten in tierischen Zellen. Es metabolisiert den sekundären Botenstoff $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ unter Mitwirkung von ATP zum $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, welches das Hauptsubstrat für die Biosynthese aller höher phosphorylierten Inositole (Inositoltetrakis-, -pentakis- und hexakisphosphate) ist.

Die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinasen binden $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mit hoher Affinität und hoher Spezifität. Dieses wird anhand der niedrigen K_m -Werte verdeutlicht, die in einem Bereich von 0.4 - 2.1 μM gefunden wurden (Ryu et al., 1987; Yamaguchi et al., 1988; Shin et al., 1995; Bertsch et al., 1999).

1.3.1. Isoformen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase

Dieses Enzym wurde aus der glatten Muskulatur der Schweineaorta (Yamaguchi et al., 1988), aus Rattenhirn (Johanson et al., 1988; Lee et al., 1990, Takazawa et al., 1990a), aus Rattenleber (Conigrave et al., 1992), aus Rinderhirn (Takazawa et al., 1989) und aus menschlichen Thrombozyten (Lin et al., 1993, Communi et al., 1994) aufgereinigt. Die ermittelten Molekulargewichte der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus diesen verschiedenen Quellen liegen in einem Bereich von 32 - 93 kDa. Diese Heterogenität der Polypeptide waren auf die Existenz von Isoformen der Kinase (Takazawa et al., 1990) oder auf eine Proteolyse während der Proteinaufreinigung (Lee et al., 1990) zurückzuführen. Weiterhin wurde die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase in der Rattenleber (Biden et al., 1988), in Makrophagen (Kimura et al., 1987), in humanen Lymphozyten (D'Santos et al., 1994), im Rattenthymus (D'Santos et al., 1994) und in der Retina (Tarver & Anderson, 1988) identifiziert.

Aus etlichen Organen menschlicher sowie tierischer Herkunft ist es gelungen, cDNA's für verschiedene Isoformen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase zu klonieren.

Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern konnte ein cDNA-Klon aus Rattenhirn isoliert werden, der für ein 50 kDa Polypeptid mit Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität codiert (Choi et al., 1990, Takazawa et al., 1990b). Die Expression dieser cDNA in COS-Zellen führte zur Synthese eines 53 kDa großen Polypeptides, welches mit der aus Rattenhirn gereinigten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase übereinstimmte (Choi et al., 1990).

1991 konnten weiterhin zwei cDNA -Klone aus menschlichem Hirngewebe isoliert werden, die als Isoform A und B bezeichnet wurden (Takazawa et al., 1991a, Takazawa et al., 1991b). Der Klon der Isoform A weist eine 93 %ige Homologie zur cDNA aus Rattenhirn auf (Takazawa et al., 1991b).

Zwischen den Isoformen A und B dagegen liegen größere Unterschiede in der Sequenz vor. Diese kommen hauptsächlich im Bereich der N-terminalen Domäne vor, deren Funktion bislang noch nicht geklärt ist. Die größte Homologie zwischen diesen Isoformen liegt in der C-terminalen katalytischen Domäne vor (Takazawa & Erneux, 1991c).

Die Molekulargewichte der Polypeptide betragen 51 kDa für die Isoform A (Ratte, Mensch), 64 kDa für die humane Isoform B (Vanweyenberg et al., 1995) sowie 75 kDa für die aus Ratte isolierte Isoform B (Thomas et al., 1994).

Es besteht die Annahme, daß noch weitere Isoformen in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Die aus humanen Thrombozyten isolierte Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase wurde nicht anhand von spezifischen Antikörpern, die Peptidsequenzen der humanen Isoformen A und B erkennen, detektiert. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine neue Isoform der Kinase (Communi et al., 1994), eine mittlerweile klonierte und im Humangenom gefundene Isoform C. Der cDNA-Klon dieser Isoform wurde aus humanem Placenta- sowie aus humanem Schilddrüsengewebe kloniert und codiert für ein 75 kDa Polypeptid mit Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität (Dewaste et al., 2000).

In Vogelerythrozyten konnten zwei Formen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um eine lösliche, Ca²⁺/Calmodulin (Ca²⁺/CaM) -insensitive und um eine membrangebundene Ca²⁺/CaM-sensitive Form der Kinase (Morris et al., 1987).

Die cytosolische, Ca²⁺/CaM-insensitive Form konnte gereinigt und partiell kloniert werden (Bertsch et al., 1999). Die Enzymaktivität dieser Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase geht von einem 34 kDa großen Polypeptid im Gesamtprotein aus. Die partielle Aminosäuresequenz weist eine 79 %ige und eine 67 %ige Homologie zur humanen Isoform A und B, sowie eine 58 %ige Homologie zur humanen Isoform C auf.

Anhand von Northernblot-Untersuchungen konnte eine gewebe- und zellspezifische Expression der Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase in Mensch und Ratte nachgewiesen werden.

Die Isoform A wird speziell im Gehirn und im Hoden der Ratte exprimiert.

Die Isoform B dagegen wird hauptsächlich in der Lunge, im Thymus, im Herzen, im Hoden und im Gehirn exprimiert. Weiterhin konnte die Isoform B in der humanen nicht-differenzierten promyelozytischen Leukämiezelllinie (HL-60) sowie in der humanen Gliomazelllinie (HTB-138) identifiziert werden (Vanweyenbergh et al., 1995).

Die Isoform C der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase wird im Pankreas, im Skelettmuskel, in der Leber, in der Lunge und in der Plazenta exprimiert. Ebenso konnte eine geringere Expression in der Niere sowie im Gehirn nachgewiesen werden (Dewaste et al., 2000). Bisher unveröffentlichte Daten von Schmale weisen auf eine starke Expression der C-Isoform in Geschmackspapillen hin.

1.3.2. Regulation der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase

Neben den verschiedenen Molekulargewichten, den Unterschieden in der Aminosäuresequenz sowie den unterschiedlichen gewebe- und zellspezifischen Expressionsmustern der Isoformen A und B der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase konnten ebenfalls Unterschiede in der Regulation der Kinaseaktivität nachgewiesen werden.

Die Aktivität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase wird sowohl durch Ca²⁺/CaM als auch durch Proteinphosphorylierung reguliert (Communi et al., 1995). Das aus verschiedenen Gewebe und Zelltypen gereinigte Enzym wird durch Ca²⁺/CaM stimuliert.

Erfolgte die Isolierung der Kinase aus Rattenhirn (Johanson et al., 1988; Lee et al., 1990; Takazawa et al., 1990a) oder aus Rattenleber (Conigrave et al., 1992), konnte eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 2 - 3 beobachtet werden. Eine 6 - 7-fache Erhöhung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität durch Ca²⁺/CaM konnte beim aus Rinderhirn isolierten Enzym gemessen werden (Ryu et al., 1987; Takazawa et al., 1989). Eine nur um den Faktor 1.44 erhöhte Enzymaktivität wurde bei der aus Hühnererythrozyten aufgereinigten Kinase beobachtet (Bertsch et al., 1999). Wurde das Enzym aus anderen Geweben (glatte Muskulatur der Schweineaorta, Rattenthymus, humane Thrombozyten und Lymphozyten) isoliert, konnte die Kinase um den Faktor 4 - 17 aktiviert werden (Yamaguchi et al., 1988; Lin et al., 1993; Communi et al., 1994, D'Santos et al., 1994). Die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase von insulinsekretorischen Zellen (RINm5F) wurde unter dem Einfluß von Ca²⁺/CaM um das 5-fache stimuliert (Biden et al., 1987).

Dagegen konnte aus Makrophagen eine Ca²⁺/CaM-unabhängige Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase isoliert werden (Kimura et al., 1990).

Zahlreiche Studien beinhalten, daß die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase ebenfalls ein Substrat für die PKC und für die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) ist. Es konnte gezeigt werden, daß eine Phosphorylierung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Rattenhirn durch PKA zu einer 1.8-fachen Erhöhung der Enzymaktivität führte. Wurde dagegen dieses Protein mittels der PKC phosphoryliert, reduzierte sich die Aktivität auf 25 % der basalen Aktivität (Lin et al., 1990; Sim et al., 1990; Woodring & Garrison, 1997).

Einige Arbeitsgruppen haben den Effekt von cAMP (Aktivator der Proteinkinase A) und 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA, Aktivator der PKC) auf die Bildung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ in unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Die Inkubation von permeabilisierten RINm5F-Zellen mit TPA bzw. cAMP erhöhte den Umsatz von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (Biden et al., 1988a). Ebenso konnte eine zweifache Steigerung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinaseaktivität in Extrakten von malignen humanen T-Zellen, die mit TPA behandelt wurden, beobachtet werden (Imboden & Pattison, 1987). Auch in Hepatozyten aus Ratten erhöhte sich die Aktivität der Kinase nach Inkubation mit TPA und Dibutyryl-cAMP (db.cAMP) um 40 %, während eine Inkubation mit TPA oder db.cAMP alleine keinen Effekt hatte (Biden et al., 1988b).

Weiterhin wurde die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaM KII) phosphoryliert, wodurch die Enzymaktivität um das 8 - 10-fache anstieg und der K_m -Wert für CaM sich von 52 nM auf 2 nM verringerte (Communi et al., 1997).

Ein weiterer interessanter Aspekt in der Regulation der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase war die Beobachtung, daß die Enzymaktivität im Rattenhirn innerhalb der Entwicklung vom Fötus zum adulten Tier um das 14-fache zunahm (Moon et al., 1989).

In Rattenfibroblasten konnte eine weitere Regulation der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase beobachtet werden. Wurden diese Zellen mit dem Onkogen v-src transformiert, erhöhte sich die Aktivität der Kinase um das 6 - 8-fache im zytosolischen Extrakt (Johnson et al., 1989; Mattingly et al., 1991; Woodring & Garrison, 1996). Dieses läßt auf eine Beteiligung von Proteintyrosinkinase an der Regulation schließen, da durch die Transformation mit v-src das Produkt pp60^{v-src} gebildet wird, welches Tyrosinkinaseaktivität besitzt.

1.3.3. Schlüsselrolle der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase

Die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase spielt eine zentrale Rolle innerhalb des Stoffwechsels der Inositolphosphate.

Durch die Phosphorylierung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wird das $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ gebildet, welches in tierischen Zellen das bislang einzig bekannte Substrat für die Biosynthese aller höher phosphorylierten Inositole (Inositoltrakis-, -pentakis- und hexakisphosphate) darstellt.

Weiterhin kommt es durch diese Phosphorylierung zu einer Beendigung des Ins(1,4,5)P₃-Signals.

Die zentrale Bedeutung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase wird auch durch ihr ubiquitäres Vorkommen in tierischen Geweben deutlich. So konnte die Existenz dieses Enzyms in nahezu allen untersuchten Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden (Irvine et al., 1986).

1.4. Metabolisierung und biologische Funktionen der Inositolphosphate

Eine große Anzahl an Inositolphosphaten (InsPs) ist in Zellextrakten unterschiedlichster Herkunft identifiziert worden.

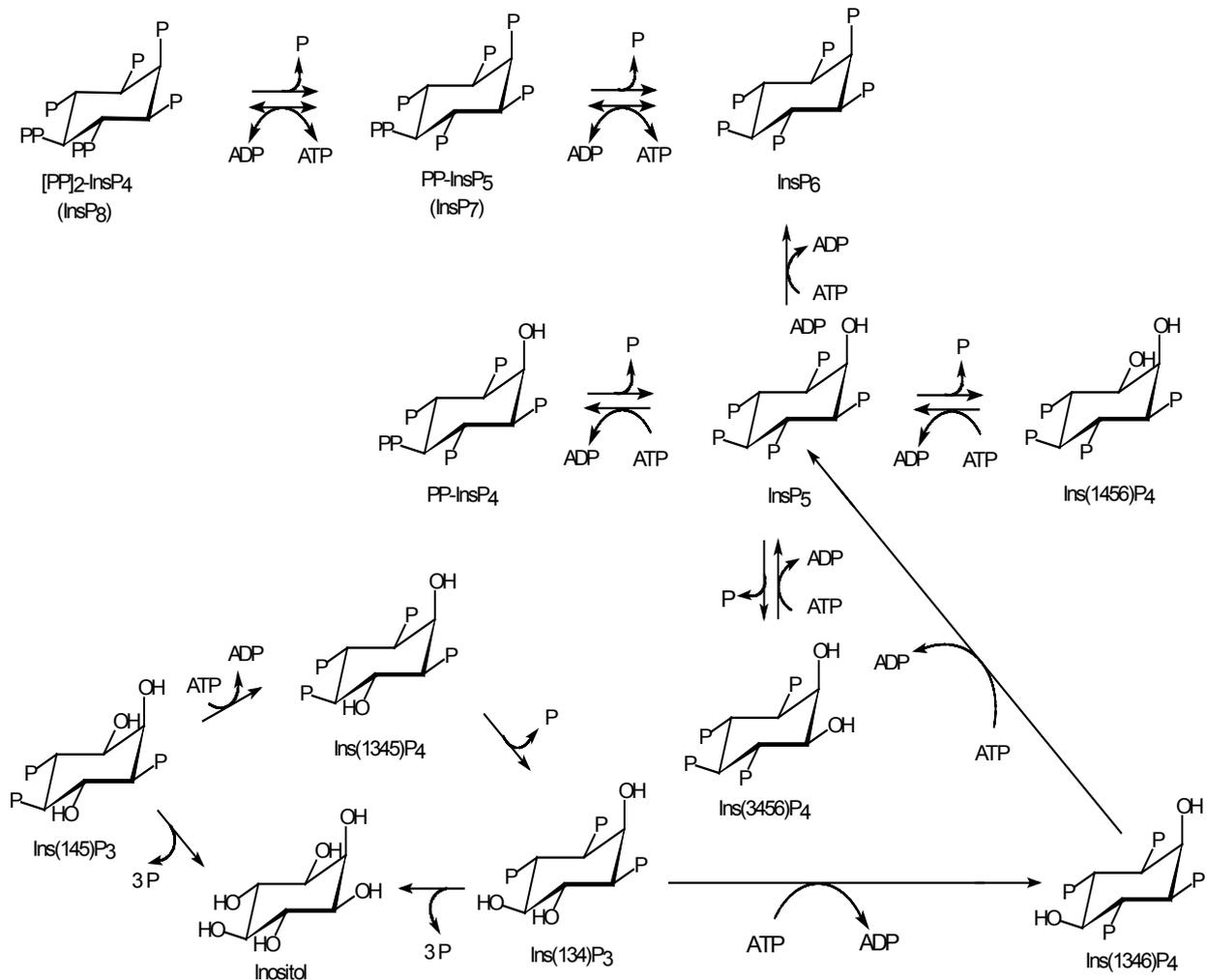
Die Metabolisierung der InsPs scheint drei grundlegende Funktionen zu erfüllen:

- a) die Kontrolle der Konzentration an Ins(1,4,5)P₃,
- b) Recycling der InsPs zur Regeneration der intrazellulären Pools von Inositol,
- c) Synthese von spezifischen InsPs, welche unterschiedliche Funktionen besitzen.

Bekannte Metabolisierungsschritte sind in der Abb. 1.4.1. dargestellt.

Das Produkt der durch die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase katalysierten Reaktion, das Ins(1,3,4,5)P₄, ist ebenfalls an der Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beteiligt. Es reguliert den Ca²⁺-Einstrom durch die Zellmembran und setzt Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern frei (Lückhoff & Clapham, 1992). Hierfür scheint es die gleichzeitige Anwesenheit von einem Ca²⁺-freisetzendem Inositolphosphat (z.B. Ins(2,4,5)P₃) zu benötigen (Irvine & Moor, 1986; Morris et al., 1987). Weiterhin ist Ins(1,3,4,5)P₄ das Substrat für die Biosynthese aller höher phosphorylierten Inositole (Inositoltetrakis-, -pentakis- und hexakisphosphate).

Abb. 1.4.1.: Metabolisierung von Inositolphosphaten (vereinfachte Darstellung nach Shears, 1998)



Es wurden verschiedene Proteine gefunden, die $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ binden. Allerdings ist die Bindungsaffinität dieser Proteine für $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ gering. Dagegen binden sie das höher phosphorylierte Inositol InsP_6 mit einer z.T. höheren Affinität. Hierzu gehören das Membranprotein synaptischer Vesikel Synaptotagmin (Niinobe et al., 1994; Fukuda et al., 1994), die „Clathrin-assembly“-Proteine AP-2 (Timmerman et al., 1992; Voglmaier et al., 1992) und AP-3 (Norris et al., 1995) sowie das Golgi „Coatomer“ Protein (COP) (Fleischer et al., 1994).

Aus Schweinehirn konnte ein hochspezifisches Ins(1,3,4,5)P₄-Bindungsprotein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa aufgereinigt (Donié & Reiser, 1991) und kloniert werden (Stricker et al., 1997). Dieses Protein wird als p42^{IP₄} bezeichnet und kommt in einer zytosolischen und in einer membranassoziierten Form vor. Es zeigt annähernd gleiche Affinitäten für Ins(1,3,4,5)P₄ und für PtdIns(3,4,5)P₃ (K_i = 0.9 nM und 1.6 nM), so daß dieses Protein eine mögliche Verbindung zwischen dem Inositolphosphat- und dem Phosphatidylinositolphosphat-Signalweg darstellt. Weiterhin zeigt die Proteinsequenz des p42^{IP₄} eine hohe Homologie (84 %) zu dem aus Rattenhirn isolierten Centaurin- α (Hammonds-Odie et al., 1996), welches ebenfalls ein Bindungsprotein für PtdIns(3,4,5)P₃ und Ins(1,3,4,5)P₄ ist. Allerdings wurde für Centaurin- α eine wesentlich höhere Affinität zum PtdIns(3,4,5)P₃ (IC₅₀: 120 nM) als zum Ins(1,3,4,5)P₄ gezeigt.

Aus Rattenhirn konnten zwei weitere Bindungsproteine für Ins(1,3,4,5)P₄ isoliert werden. Hierbei handelt es sich zum einen um ein 182 kDa großes Protein (IP₄BP₁), welches einen K_d-Wert von 4 nM für Ins(1,3,4,5)P₄ aufweist. Das Zweite, IP₄BP₂, hat eine Affinität von 1.5 nM und besteht aus zwei Proteinen mit Molekulargewichten von 84 und 174 kDa (Theibert et al., 1992).

Es konnte bislang erst ein Protein, daß alle Kriterien für einen möglichen Ins(1,3,4,5)P₄-Rezeptor erfüllt (isomerspezifische InsP₄-Bindung), identifiziert werden. Dieses Protein, welches ein Molekulargewicht von 104 kDa aufweist, wurde zuerst aus Schweinethrombozyten isoliert (Cullen et al., 1995a). Es bindet Ins(1,3,4,5)P₄ mit hoher Affinität (K_d: 6.3 nM) und Spezifität (Cullen et al., 1995b).

Inzwischen ist die Klonierung und Charakterisierung dieses Proteins aus humanen Blut gelungen (Cullen et al., 1995 c; Lockyer et al., 1997). Hierbei stellte sich heraus, daß es sich um ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) handelt. Das Protein ist aufgrund der 60 %igen Sequenzähnlichkeit zu GAP1 aus Drosophila und der 72 %igen Ähnlichkeit zu GAP1^m aus Rattenhirn ein Mitglied der Familie der GAP1- und GAP1^m-Proteine. Aufgrund seiner Fähigkeit, Ins(1,3,4,5)P₄ zu binden, wurde dieses Protein GAP1^{IP₄BP} genannt.

Northern- und Western-Analysen haben gezeigt, daß dieses Protein ubiquitär expremiert wird. Der größte Anteil an GAP1^{IP₄BP} wurde im Gehirn und in Neuronen gefunden (Cullen, 1998). In humanen Thrombozyten wurde GAP1^{IP₄BP} vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert (Lockyer et al., 1997).

GAP1^{IP4BP} stimuliert in vitro die GTPase-Aktivität von Ras. Diese Ras GAP-Aktivität von GAP1^{IP4BP} wird durch die Anwesenheit von Liposomen inhibiert, die eine ähnliche Phospholipidzusammensetzung wie die Oberfläche der inneren Plasmamembran haben. Die Inhibierung der GAP-Aktivität konnte durch das Hinzufügen von Ins(1,3,4,5)P₄ wieder rückgängig gemacht werden. Hierdurch wird vermutlich eine Verbindung zwischen dem durch PLC initiierten Signalweg und der über Ras-Proteine aktivierten Signalkaskaden hergestellt (Cullen et al., 1995c).

Die Metabolisierung von Ins(1,3,4,5)P₄ erfolgt durch die 5-Phosphatase, durch die es zum Ins(1,3,4)P₃ dephosphoryliert wird (Erneux et al., 1998).

Dieses Inositolphosphat ist ein potenter kompetitiver Hemmstoff der Ins(3,4,5,6)P₄ 1-Kinase (K_i-Wert: 0.2 µM, Yang et al., 1999). Durch die Inhibierung der 1-Kinase und die damit verbundene Störung des Gleichgewichtes von Ins(3,4,5,6)P₄ 1-Kinase / Ins(1,3,4,5,6)P₅ 1-Phosphatase stellt Ins(1,3,4)P₃ eine Verbindung zwischen der Aktivierung der PLC und der Erhöhung der zellulären Ins(3,4,5,6)P₄-Konzentration her (Tan et al., 1997). Letzteres Isomer ist ein weiteres Zellsignal (Vajanaphanich et al., 1994; Yang et al, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Ins(1,3,4)P₃ in intakten AR4-2J-Zellen (Rattenpankreaszellen) einen Anstieg der Mengen an Ins(3,4,5,6)P₄ verursacht, ohne selbst zum Ins(3,4,5,6)P₄ verstoffwechselt zu werden (Yang et al., 1999).

Die Metabolisierung von Ins(1,3,4)P₃ erfolgt über zwei Wege.

Zum einen wird es dephosphoryliert. Hierbei sind zwei Phosphatasen beteiligt: a) die 4-Phosphatase, welche Ins(1,3)P₂ bildet (Bansal et al., 1987), b) die 1-Phosphatase, die zur Bildung von Ins(3,4)P₂ führt (Inhorn & Majerus, 1987). Es folgen weitere Dephosphorylierungen an den Positionen 1, 3 und 4 durch spezifische Phosphatasen, die zur Entstehung von Inositol führen.

Zum anderen wird Ins(1,3,4)P₂ durch die Ins(1,3,4)P₃ 6-Kinase zum Ins(1,3,4,6)P₄ phosphoryliert (Abdullah et al., 1992; Wilson & Majerus, 1997). Ein kompetitiver Hemmstoff dieses Enzyms ist das Ins(3,4,5,6)P₄. Es hemmt die Enzymaktivität mit einem IC₅₀-Wert von 0.1 - 0.2 µM (Hughes et al., 1989).

Das Ins(3,4,5,6)P₄ entsteht durch Dephosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ (Abb. 1.4.1.). Es hemmt die Ca²⁺-abhängige Chloridionensekretion in der Kolonepithelzelllinie T84 und anderen Epithelzellen. Diese Inhibition ist spezifisch für dieses Isomer und kann durch Annexin IV verstärkt werden (Vajanaphanich et al., 1994; Xie et al., 1996).

Da die physiologische Rolle der Chloridionensekretion in der Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes, pH-Gleichgewichts, Osmoregulation und anderen physiologischen Aktivitäten liegt, ist diese Funktion des $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ von besonderer Bedeutung.

Durch die $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ 1-Kinase wird $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ zum $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ phosphoryliert.

Das Vorkommen der höher phosphorylierten Inositate InsP_5 und InsP_6 (Phytinsäure) hielt man längere Zeit auf pflanzliche Zellen beschränkt. Ausnahmen von dieser Annahme stellten die Erythrozyten aus Vögeln, einiger Schildkrötenarten und einer luftatmenden Amazonasfischart dar, in denen das InsP_5 analog dem 2,3-Bisphosphoglycerat in Erythrozyten aus Säugetieren an der Modulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins beteiligt ist (Isaacs & Harkness, 1980). Inzwischen konnte dieses Inositolpolyphosphat, welches als überwiegendes $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -Isomer identifiziert wurde (Johnson & Tate, 1969; Mayr & Dietrich, 1987), in zahlreichen Säugetierzellen nachgewiesen werden. InsP_5 und InsP_6 repräsentieren den Hauptteil des Inositolphosphatanteils in Säugetierzellen. Ihre Konzentrationen variieren zwischen 10 μM und 100 μM (Shamsuddin et al., 1997).

Die Funktion der Inositolpolyphosphate ist noch weitgehend unbekannt.

Jedoch konnte kürzlich für $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ sowie InsP_6 gezeigt werden, daß sie die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen in mikromolaren Konzentrationen inhibieren (Larsson et al., 1997). Aufgrund dieser Eigenschaft kommt es in Insulin-sezernierenden β -Zellen des Pankreas zu einem Anstieg der Calciumkanal-Aktivität.

Weiterhin besitzen InsP_5 und InsP_6 die Fähigkeit, divalente und trivalente Metallkationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{3+}) zu komplexieren (Sasakawa et al., 1995). Vor allem InsP_6 hemmt die durch Fe^{3+} katalysierte Hydroxylradikalbildung und unterdrückt die Lipidperoxidation (Graf et al., 1987; Hawkins et al., 1993). Für diese biologischen Eigenschaften wird die 1,2,3 (äquatorial-axial-äquatorial)-Trisphosphatgruppe im InsP_6 verantwortlich gemacht (Hawkins et al., 1993).

Außerdem wird für InsP_6 eine wichtige Rolle in der Regulierung vitaler Zellfunktionen, wie Signaltransduktion, Zellproliferation sowie Differentiation diskutiert.

Eine der wichtigsten Eigenschaften von InsP_6 ist seine antineoplastische Funktion, die in vivo und in vitro nachgewiesen werden konnte. Anhand oraler Gaben von InsP_6 im Trinkwasser konnte eine Hemmung des Tumorwachstums sowie eine Verminderung der Tumorgroße in Tiermodellen beobachtet werden (Shamsuddin et al., 1997).

Ebenso konnte eine Hemmung des Zellwachstums sowohl humaner als auch tierischer Krebszelllinien durch InsP_6 beobachtet werden. Dieser Effekt wurde an den Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 (Shamsuddin et al., 1996), an der Prostatakrebszelllinie PC-3 (Shamsuddin & Yang, 1995) sowie an der Darmkrebszelllinie HT-29 (Sakamoto et al., 1993) analysiert. Diese Ergebnisse zeigen, daß InsP_6 eine mögliche Verbindung als chemotherapeutisches sowie chemopräventives Agens darstellt.

Der metabolische Endpunkt des Inositolphosphatstoffwechsels wird zur Zeit durch die diphosphorylierten Inositolphosphate dargestellt. Sie werden in Gegenwart von ATP mittels der InsP_6 -Kinase (Voglmaier et al., 1996) aus InsP_6 synthetisiert (Abb. 1.4.1.).

Vor kurzem wurden eine InsP_6 -Kinase aus Hefe sowie zwei Kinasen (Typ 1 und 2) aus Säugetieren kloniert (Saiardi et al., 1999). Diese Enzyme phosphorylieren InsP_6 zu Diphosphoinositolpentakisphosphat (PP-InsP_5). Es wurde berichtet, daß durch Mutation des InsP_6 -Kinase codierenden Gens in *Saccharomyces cerevisiae* die Diphosphoinositolpolyphosphatmengen bis zu 60 - 80 % geringer sind als in den Ursprungszellen. Ebenso weisen diese mutierten Hefezellen ein wesentlich geringeres Wachstum auf (Saiardi et al., 2000a; Saiardi et al., 2000b). Weiterhin enthalten diese Zellen ungewöhnlich kleine und fragmentierte Vakuolen. Die Vakuolen der Hefe ähneln den Lysosomen in tierischen Zellen und entstehen durch Fusion von zytoplasmatischen Vesikeln als auch von Clathrin-umhüllten Vesikeln. PP-InsP_5 bindet fest an Adapterproteine, die die Verschmelzung Clathrin-umhüllter und nicht-umhüllter Vesikel unterstützen. Somit sind vermutlich die Vakuolenbildungsstörungen und die veränderte Morphologie der mutierten Hefezellen auf den verminderten Gehalt an Inositolpolyphosphate zurückzuführen (Saiardi et al., 2000a). Weiterhin konnte beobachtet werden, daß eine drastische Verminderung der InsP_6 -Synthese in *Saccharomyces cerevisiae* einen deutlichen Rückgang des mRNA-Exports aus den Kern verursacht. Der mRNA-Export wird vermutlich durch die Metabolisierung von InsP_6 (z.B. PP-InsP_5 , $[\text{PP}]_2\text{-InsP}_4$) und weniger durch InsP_6 selber reguliert (York et al., 1999; Saiardi et al., 2000a).

Im Zytosol von Amöben (*Dictyostelium discoideum*) wurden zwei dieser Verbindungen (Bis-PP-InsP_4 , PP-InsP_5) entdeckt und gereinigt (Stephens et al., 1993b). Erst kürzlich wurde nachgewiesen, daß das Hauptisomer PP-InsP_5 in *Dictyostelium discoideum* das 6-PPInsP_5 ist (Albert et al., 1997). Außerdem konnte demonstriert werden, daß das 5-PP-InsP_5 das vorherrschende PP-InsP_5 -Isomer in vier verschiedenen Säugetierzelllinien (Swiss 3T3 Fibroblasten, Jurkat T-Zellen, FTC humane Schilddrüsenkrebszellen, Eierstockzellen chinesischer Hamster) ist (Albert et al., 1997).

Diese Inositolpolyphosphate beinhalten energiereiche Pyrophosphatgruppen, die schnell in intakten Zellen metabolisiert werden. Diese Verbindungen könnten eine Rolle als Phosphatdonatoren in Phosphotransferase-Reaktionen spielen (Stephens et al., 1993b). Außerdem bindet PP-InsP₅ an die im Vesikeltransport involvierten Proteine AP-3 (Ye et al., 1995) und an das „coatomer“ Protein (Fleischer et al., 1995) mit hoher Affinität. PP-InsP₅ ist der potenteste bekannte Inhibitor vom AP-3 abhängigen Clathrin-Zusammenschluß (Ye et al., 1995).

1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Diese Arbeit sollte zur Aufklärung der biologischen Rolle der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase sowie der höher phosphorylierten Inositole in der intakten Zelle beitragen.

Hierfür sollte die Biosynthese dieser Verbindungen über einen inhibitorischen Angriff an der der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase gehemmt werden, um zu sehen, welchen Effekt das Fehlen dieser Inositole auf das Zellwachstum hat.

Es wurde zunächst ein umfangreiches Screening von sowohl pflanzlichen als auch synthetischen Verbindungen auf einen Hemmeffekt an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase durchgeführt. Für dieses Screening wurde das rekombinante Enzym aus Vogelerythrozyten, eine A-Isoform, verwendet (Bertsch et al., 1999), da in Vertebratenzellen dieses Enzym den ersten enzymatischen Schritt zur Synthese aller höher phosphorylierten Inositole, einschließlich InsP₆ sowie die Diphosphoinositolphosphate, katalysiert. Für die wirksamsten Inhibitoren wurde anschließend weiterhin der Hemmeffekt auf die rekombinante humane Isoform B untersucht.

Anschließend wurde die Wirkung der effektivsten Inhibitoren auf das Zellwachstum sowie ihre Wirkung auf den Stoffwechsel der höher phosphorylierten Inositole unter Verwendung von zwei verschiedenen Zelllinien (humane Jurkat T-Zelllinie, 3T3-Mäuse-Fibroblasten) analysiert. Hierfür wurden Zellkulturen angelegt, deren Proliferation in An- sowie in Abwesenheit der Hemmstoffe untersucht wurde.

Zur Analyse aller höher phosphorylierten Inositole in diesen inhibierten bzw. nicht-inhibierten Zelllinien wurde das Verfahren der Metal-dye-detection-high-performance-liquid-chromatography (MDD-HPLC) angewendet, da hiermit die Möglichkeit der nicht-radioaktiven Bestimmung der Massen aller in den Zellen gebildeten Inositolphosphaten besteht (Mayr, 1990).

Weiterhin wurde die Substratspezifität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A sowie deren Hemmbarkeit durch Substrat- oder Produktanaloga untersucht. Hierfür wurden eine große Reihe von biologischen Inositolphosphaten und Analoga mit hoher Sensitivität auf ihr Potential als mögliche Substrate oder kompetitive Inhibitoren des Enzyms untersucht. Aus diesen Untersuchungen wurde ein Modell abgeleitet, wie die Anzahl und/oder die Position der Phosphatgruppen am myo-Inositolring die Bindung und die Phosphorylierung der Inositolphosphate durch die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A beeinflusst.

Letzterer Teil der Untersuchungen führte zur Entdeckung einer Reihe von Nebenaktivitäten der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A, welche bei der Biosynthese höherer Inositolphosphate von Bedeutung sein könnten, aber auch für enzymatische in vitro Synthesen eingesetzt werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Autoklav:	GVA 570, Medizin-und Labortechnik F. Gössner, Hamburg
Coulter Counter:	Modell ZM, Coulter Electronics GmbH Krefeld Meßbereich: Teilchengröße von 0.4 µm bis 800 µm Kapillaröffnung: Durchmesser von 15 µm bis 2000 µm
Durchflußzytometer:	FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg Filtersystem: 670 nm long pass Filter Software: - Kalkulation der Zellzyklusverteilung: ModFit, Verity Software House, Topsham, ME, USA - Datenrepräsentation: WinMDI, Joe Trotter, Scripps Institute, La Jolla, USA
Elektrophorese-Zubehör:	Agarose-Gel Kammer, horizontal: MWG-Biotech, Ebersberg SDS-Page Kammer, vertikal: Phase, Power supply: Pharmacia Biotech EPS 200
Elektroporationszubehör:	Gene pulser power supply: BIO-RAD, USA Capacitance extender: BIO-RAD, USA Elektroporationsküvetten: BIO-RAD, USA
Fireboy:	Integra Biosciences, Fernwald
Inverses Fluoreszenzmikroskop:	Zeiss Axiovert 25 Filter: Anregungswellenlänge 450 - 490 nm (blau) Emissionswellenlänge 515 - 565 nm (grün) Lampengehäuse: HBO 50
Inverses Mikroskop:	Olympus CK Leitz Labovert Kameraaufsatz: Leitz Vario-Orthomat Photoautomat MPS 45, Fa. Wild Heerbrugg

2. Material und Methoden

Video-Dokumentationssystem:	Kamera: Kappa CF 8/1 FMC Videoprinter: Sony UP-890 CE Monitor: Panasonic UV-Tisch (312nm): Bachofer
Gefriertrocknungsanlage:	Christ, Osterode
Inkubator (Begasungsbrutschrank):	Heraeus, Hanau
HPLC-Anlage:	
Steuergerät:	computergesteuerte „Smart“-Einheit, Pharmacia LKB, Freiburg
Pumpen A/B:	µ-Precision Pump, hochpräzise Spritzenpumpe, Pharmacia LKB, Freiburg
Pumpe C:	Doppelkolbenhubpumpe, Shimadzu LC10/AD Pulsdämpfung: 1m-Teflon-Kapillare (0.5 mm ID), Pulsdämpfer SSI LP 21 (Scientific Systems Inc.), 2 RP- Vorsäulen (1.: LiChrosob RP8, 5 µM Beads; 2.: GRP-1 R, 7.5 x 4.6 mm zur Filtration des Puffers)
Probengeber:	AS 560, Kontron, Neufahrn
Monitor:	UVM-II, Pharmacia-LKB, Freiburg
Integrator:	„Smart“-Steuereinheit
Meßzelle:	8mm Lichtweg bei einer Wellenlänge von 546nm
Säule:	Mini Q PC 3.2/3, Anionenaustauscher: Styrol-DVB mit quaternären Amininen, 3µM Bead-Material, 32 x 3 mm, Pharmacia LKB, Freiburg
Mixer:	Whirlmixer: MS 2 Minishaker, Ika-Werke, Staufen Thermomixer: 5436, Eppendorf, Hamburg
Schnipptherm:	Schuttron STK, Heidelberg
pH-Meter:	Schott CG 820, mit pH-Standard-Elektrode, NeoLab, Heidelberg
Rotierapparat:	Gerhardt RA 20
Spektralphotometer:	Lambda 5, Perkin-Elmer, Überlingen
Sterilwerkbank:	HS 12, Heraeus, Hanau
Thermostat:	F 10, Julabo, Seelbach
Titertek Multiscan:	MC 11, ICN

2. Material und Methoden

Waagen:	Feinwaage Sauter 404/51 Laborwaage Mettler PM 200
Wasserbäder:	M 3, Lauda, Lauda-Königshofen 12 B, Julabo, Seelbach
Zentrifugen:	Sepatech Varifuge 3.OR, Heraeus, Hanau Tischzentrifugen: Eppendorf Centrifuge 5415 C Heraeus Biofuge pico

2.1.2. Zelllinien

Jurkat T-Zellen: Bei diesen Zellen handelt es sich um humane T-Lymphozyten, die des öfteren auch „JM“ genannt werden. Sie wurden aus dem peripheren Blutkreislauf eines 14-jährigen Jungen, der an akuter lymphatischer Leukämie (ALL) erkrankt war, 1976 durch Schneider et al. (Schneider et al., 1976) etabliert. Diese runden Zellen wachsen einzeln oder traubenförmig in Suspension.

NIH 3T3-Zellen: Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Fibroblasten, die von Mäuseembryonen (Swiss Mäuseembryonen) abstammen und 1968 von Aaronson et al. (Aaronson et al., 1968) etabliert wurden. Sie zeigen Kontaktinhibierung, keine Tumorbildung und sind nicht-transformiert. Diese Zellen bilden adhärent wachsende Monolayer.

2.1.3. Inhibitoren

2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon	Aldrich, Steinheim
2,3,6-Trinitrophenol	Fluka, Neu-Ulm
3,3',5-Triiodo-L-thyronin	Fluka, Neu-Ulm
3',4'-Dihydroxyflavon	Lancaster, Mühlheim am Main
3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon	Lancaster, Mühlheim am Main
3',4',7,8-Tetramethoxyflavon	Lancaster, Mühlheim am Main
3',4',5',5,7-Pentamethoxyflavon	Lancaster, Mühlheim am Main

2. Material und Methoden

5,7-Dihydroxyflavon	Lancaster, Mühlheim am Main
3,5,7-Trihydroxyflavon	Lancaster, Mühlheim am Main
3,5,7-Trihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavon	Lancaster, Mühlheim am Main
4'-Amino-6-hydroxyflavon	Calbiochem, Bad Soden
4,5-Dihydroxyanthrachinon-2-carbonsäure	Fluka, Neu-Ulm
5,8-Dihydroxy-1,4-naphthochinon	Fluka, Neu-Ulm
Acetylsalicylsäure	Fluka, Neu-Ulm
Adriamycin	Fluka, Neu-Ulm
Aesculetin	Fluka, Neu-Ulm
Alloxantin	Fluka, Neu-Ulm
Aloin	Fluka, Neu-Ulm
Amentoflavon	Roth, Karlsruhe
Apigenin	Fluka, Neu-Ulm
Aurintricarbonsäure	Aldrich, Steinheim
Baicalein	Aldrich, Steinheim
Bengalrosa B	Fluka, Neu-Ulm
Biopterin (1'R, 2'S)	Fluka, Neu-Ulm
Bis-Tyrphostin	Calbiochem, Bad Soden
Brompyrogallol Rot	Aldrich, Steinheim
Calphostin C	Calbiochem, Bad Soden
(-)-Catechin	Sigma, Deisenhofen
(+)-Catechin Hydrat	Fluka, Neu-Ulm
(-)-Catechin Gallat	Sigma, Deisenhofen
Chinalizarin	Aldrich, Steinheim
Chlorogensäure	Merck, Darmstadt
Compound-5-Methylester	Calbiochem, Bad Soden
Cromolyn	Sigma, Deisenhofen
Curcumin	Calbiochem, Bad Soden
Cyanidinchlorid	Alexis, Grünberg
Daidzein	Calbiochem, Bad Soden
Daunomycin	Fluka, Neu-Ulm
L-Dopa	Fluka, Neu-Ulm
Doxorubicinol	UKE, Institut für Pharmakologie

2. Material und Methoden

Ecdysteron (β -Ecdyson)	Fluka, Neu-Ulm
Ellagsäure	Fluka, Neu-Ulm
Embonsäure	Fluka, Neu-Ulm
Emodin	Fluka, Neu-Ulm
(-)-Epicatechin	Fluka, Neu-Ulm
(-)-Epicatechin Gallat	Sigma, Deisenhofen
(-)-Epigallocatechin Gallat	Sigma, Deisenhofen
Etoposid (VP-16)	TopoGEN, USA
Fisetin	Aldrich, Steinheim
Fluoresceinisothiocyanat	Fluka, Neu-Ulm
Gallussäure	Fluka, Neu-Ulm
Genistein	Calbiochem, Bad Soden
Gossypol	Sigma, Deisenhofen
Haematein	Fluka, Neu-Ulm
Herbimycin	Calbiochem, Bad Soden
Hypericin	Calbiochem, Bad Soden
Kaempferol	Fluka, Neu-Ulm
KT-5926	Calbiochem, Bad Soden
DL-Laudanosolin	Aldrich, Steinheim
Lavendustin A	Calbiochem, Bad Soden
Leucopterin	Fluka, Neu-Ulm
Luteolin	Alexis, Grünberg
Methoxatin (PQQ)	Fluka, Neu-Ulm
Morin	Fluka, Neu-Ulm
Myricetin	Fluka, Neu-Ulm
Naphthalin-1,4,5,8-tetracarbonsäureanhydrid	Fluka, Neu-Ulm
Naringenin	Aldrich, Steinheim
Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)	Calbiochem, Bad Soden
Pelargonidin	Fluka, Neu-Ulm
Perylentetracarbonsäure	Fluka, Neu-Ulm
Piceatannol	Alexis, Grünberg
Phloretin	Fluka, Neu-Ulm
Pseudohypericin	Calbiochem, Bad Soden

2. Material und Methoden

Purpurin	Aldrich, Steinheim
Pyrogallolrot	Fluka, Neu-Ulm
Quercetin	Fluka, Neu-Ulm
Rapamycin	Calbiochem, Bad Soden
Resveratrol	Cayman, USA
RG-13022	Calbiochem, Bad Soden
Rhein	Aldrich, Steinheim
Robinetin	Roth, Karlsruhe
Rosmarinsäure	Roth, Karlsruhe
Rottlerin	Calbiochem, Bad Soden
Rutin	Fluka, Neu-Ulm
Säurefuchsin	Fluka, Neu-Ulm
ST 638	Calbiochem, Bad Soden
Staurosporin	Calbiochem, Bad Soden
Stigmatellin	Fluka, Neu-Ulm
Taxifolin (Dihydroquercetin)	Sigma, Deisenhofen
Taxol (Paclitaxel)	Alexis, Grünberg
Tetracyclin	Boehringer, Mannheim
Tetrahydroxychinon	Fluka, Neu-Ulm
L-Thyroxin	Calbiochem, Bad Soden
Tyrphostin A51	Calbiochem, Bad Soden
Tyrphostin B42	Calbiochem, Bad Soden
Tyrphostin B46	Calbiochem, Bad Soden
Warfarin	Sigma, Deisenhofen
Wortmannin	Calbiochem, Bad Soden
Zearalenon	Aldrich, Steinheim

2.1.4. Inositolphosphate und Analoga

2.1.4.1. Myo-Inositolphosphate

D-Ins(1,3)P ₂	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(1,4)P ₂	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(4,5)P ₂	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
m-Ins(1,2,3)P ₃	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(1,3,4)P ₃	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
L-Ins(1,3,4)P ₃	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
D-Ins(1,4,5)P ₃	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(1,4,6)P ₃	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
L-Ins(1,4,6)P ₃	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
D/L-Ins(1,5,6)P ₃	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(2,4,5)P ₃	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(3,4,5)P ₃	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
m-Ins(4,5,6)P ₃	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D/L-Ins(1,2,3,4)P ₄	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(1,2,4,5)P ₄	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
L-Ins(1,2,4,5)P ₄	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
D/L-Ins(1,2,4,5)P ₄	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(1,2,4,6)P ₄	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(1,3,4,5)P ₄	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
m-Ins(1,3,4,6)P ₄	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(1,4,5,6)P ₄	C. Schultz, Universität Bremen
D/L-Ins(2,3,4,5)P ₄	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D/L-Ins(2,4,5,6)P ₄	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(3,4,5,6)P ₄	C. Schultz, Universität Bremen
D-Ins(1,2,3,4,5)P ₅	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(1,2,3,4,6)P ₅	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
D-Ins(1,2,4,5,6)P ₅	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr

2. Material und Methoden

2.1.4.2. Substratanaloga

L-chiro-Ins(1,4,6)P ₃	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
L-chiro-Ins(2,3,5)P ₃	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
Glucositoltrisphosphat	Calbiochem, Bad Soden
GroP-Ins(4)P	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
GroP-Ins(4,5)P ₂	Eigene Synthese/Herstellung, Prof.Dr. Mayr
3-Hyms-InsP ₃	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
neo-Ins(1,3,4)P ₃	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
L-scylo-Ins(1,2,4)P ₃	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
scyllo-Ins(1,2,3,5)P ₄	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
scyllo-Ins(1,2,4,5)P ₄	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
SG 43	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
Symm I	B.V.L. Potter, University of Bath, UK
4-Teathered	B.V.L. Potter, University of Bath, UK

2.1.5. Antibiotika

Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml - 10000 µg/ml)	Gibco BRL, Eggenstein
G 418 (Geneticin) (50 mg/ml aktives Geneticin)	Gibco BRL, Eggenstein
Neomycin	Gibco BRL, Eggenstein

2. Material und Methoden

2.1.6. Enzyme

Restriktionsendonuclease Afl II	New England Biolabs, USA
L-Lactatdehydrogenase aus Schweinemuskel	Boehringer Mannheim
Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel	Boehringer Mannheim
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
RNase	Boehringer Mannheim
rekombinante Hühner-Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase A	Eigenherstellung, Dr. Bertsch
rekombinante Humane Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase B	Eigenherstellung, Dr. Bertsch
Humane Topoisomerase II (p170 Form)	TopoGEN, USA

2.1.7. Zellkulturmedien

2.1.7.1. Wachstumsmedium für Jurkat T-Zellen

RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX I 25 mM HEPES 10 % Fötale Rinderserum (FBS, Chargennr.:06F1676K, 06Q4185) 100 units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein Gibco BRL, Eggenstein Gibco BRL, Eggenstein Gibco BRL, Eggenstein
--	--

2.1.7.2. Selektionsmedium für Jurkat T-Zellen

RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX I 25 mM HEPES 10 % FBS (Chargennr.:06F1676K, 06Q4185) 700 µg/ml Aminoglycosid-Antibiotikum Geneticin (G418)	Gibco BRL, Eggenstein Gibco BRL, Eggenstein Gibco BRL, Eggenstein
--	---

2. Material und Methoden

2.1.7.3. Klonierungsmedium für Jurkat T-Zellen

RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX I 25 mM HEPES	Gibco BRL, Eggenstein
10 % FBS (Chargennr.:06F1676K, 06Q4185)	Gibco BRL, Eggenstein
700 µg/ml G418	Gibco BRL, Eggenstein
1 mM Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggenstein
Supplement für Minimal essential medium (MEM)	

2.1.7.4. Minimalmedium für Jurkat T-Zellen

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	1 mM
HEPES	20 mM
NaH ₂ PO ₄	1 mM
D-(+)-Glukose	5.5 mM
pH 7.4	

2.1.7.5. Wachstumsmedium für NIH 3T3-Zellen

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin 4500 mg/l D-Glucose ohne Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggenstein
10 % FBS (Chargennr.:06F1676K, 06Q4185)	Gibco BRL, Eggenstein
100 units/ml Penicillin	Gibco BRL, Eggenstein
100 µg/ml Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein

2. Material und Methoden

2.1.8. Chemikalien

Acrylamid, ultra pure	Bio-Rad, München
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Spezialqualität	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-diphosphat (ADP)	Boehringer, Mannheim
Agarose, Elektrophoresequalität	Gibco BRL, Eggenstein
Ammoniumpersulfat (APS), z.A.	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat, z.A.	Merck, Darmstadt
Benzamidin, z.A.	Fluka, Neu-Ulm
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat, z.A.	Merck, Darmstadt
Calmodulin	Eigene Synthese/Herstellung U. Bertsch (Mayr & Heilmeyer, 1983)
Chloroform, reinst	Merck, Darmstadt
Coomassie Brillantblau R250, z.A.	Biomol, Hamburg
Diethylether, z.A.	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO), für die Spektroskopie	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat, z.A.	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
Essigsäure 100 %, z.A.	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%, reinst	Apotheke, UKE
Ethanol abs., z.A.	Merck, Darmstadt
Ethidumbromidlösung, 1 % in Wasser	Fluka, Neu-Ulm
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Titriplex III	Merck, Darmstadt
Fötales Rinderserum (FBS)	Gibco BRL, Eggenstein
Ficoll	Sigma, Deisenhofen
Fugene	Boehringer, Mannheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin, z.A.	Biomol, Hamburg
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, (HEPES), z.A.	Biomol, Hamburg

2. Material und Methoden

Isoamylalkohol, z.A.	Merck, Darmstadt
Isobutanol, z.A.	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid, z.A.	Merck, Darmstadt
Kalilauge, z.A.	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, z.A.	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, z.A.	Merck, Darmstadt
Methanol, z.A.	Merck, Darmstadt
Methanol, techn.	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol, z.A.	Biomol, Hamburg
N,N-Methylenbisacrylamid, ultrapur	Gibco BRL, Eggenstein
NADH, Qualität I	Boehringer, Mannheim
Natriumchlorid, z.A.	Merck, Darmstadt
Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH ₃), z.A.	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, z.A.	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), z.A.	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid, suprapur	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat MEM 100 mM, flüssig	Gibco BRL, Eggenstein
Norit A	Serva, Heidelberg
OKT-3	Eigene Synthese/Herstellung Dr. A. Guse
Phosphoenolpyruvat	Boehringer, Mannheim
Propidiumjodid 95 %	Sigma, Deisenhofen
4-(2-Pyridyl-(2)-azo)-resorcin Mononatriumsalz (PAR)	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V, fettsäurefrei	Serva, Heidelberg
Salzsäure 37 %, z.A.	Merck, Darmstadt
Stickstoff, flüssiger	Linde, Hamburg
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), z.A.	Bio-Rad, München
Trichloressigsäure (TCA), z.A.	Merck, Darmstadt
Triethanolamin (TEA), z.A.	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), (TRIZMA ^R Base), z.A.	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100, für die Molekularbiologie	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau-Lösung 0.4 %, steril filtriert	Sigma, Deisenhofen

2. Material und Methoden

Trypsin (1:250)	Difco, USA
Xylencyanol, für die Elektrophorese	Merck, Darmstadt
Yttriumchlorid-Hexahydrat, 99.9 %	Janssen, Belgien

2.1.9. Proteinmarker

LMW-Marker / 1mg/ml pro Protein	Gibco BRL, Eggenstein
HMW-Marker / 1mg/ml pro Protein	Gibco BRL, Eggenstein

2.1.10. Angewandte Kits

5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III	Boehringer, Mannheim
Topoisomerase II Drug Screening Kit	TopoGEN, USA
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, München

2.1.11. Weitere Materialien

Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (steril), 25 cm ² und 75 cm ²	Greiner, Solingen
Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (steril), 175 cm ²	Nunc, Wiesbaden
96-Loch-Gewebekulturplatten aus Polystyrol, Füllvolumen je Vertiefung: 380 µl, Kulturfläche je Vertiefung: 0.32 cm ²	Greiner, Solingen
Glasvials 12x32 mm, wide mouth, braun. screw caps	Alltech, Unterhaching
Küvetten: Halb-Mikro, Quarzglas-Suprasil, Schichtdicke 10 mm Typ 104-QS	Hellma, Müllheim/Baden
Halb-Mikro, Polystyrol, Schichtdicke 10 mm	Greiner, Solingen
Pipettenspitzen, passend für Eppendorfpipetten Research, Volumen 1 - 5000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, Model Research, 1 - 10 µl / 10 - 100 µl / 100 - 1000 µl / 1000 - 5000 µl	Eppendorf, Hamburg
Einweg-Pipetten aus Polystyrol, steril	Greiner, Solingen

2. Material und Methoden

Probenröhrchen mit Schraubverschluß aus Polypropylen, Spitzboden, steril, Füllvolumen 50 ml (Falcon Tubes)	Greiner, Solingen
Probenröhrchen mit Schraubverschluß aus Polypropylen, Spitzboden, steril, Füllvolumen 15 ml (Falcon Tubes)	Greiner, Solingen
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 0.5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 1.5 ml	Greiner, Solingen
Reaktionsgefäße aus Polypropylen, Volumen 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg

2.1.12. Rezepturen

2.1.12.1. 10x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)

100 mM NaH₂PO₄

1.54 M NaCl

pH 7.4

2.1.12.2. Trypsin/EDTA-Lösung

1 g Trypsin (0.05 %, 0.5 mg/ml)

0.4 g Titriplex III (EDTA, 0.02 %, 0.54 mM)

200 ml 10x PBS (sterilfiltriert durch Satoriusfilter) pH 7.2

ad 2 l tridest. H₂O

-sterilisieren

-Lagerung bei -20 °C

2.1.12.3. Coomassie-Färbelösung

1.25 g Coomassie Brillantblau

225 ml techn. Methanol

225 ml dest. Wasser

50 ml Eisessig

2.1.12.4. Entfärbelösung

100 ml Eisessig

450 ml techn. Methanol

450 ml dest. Wasser

2.2. Methoden

2.2.1. Expression und Reinigung der rekombinanten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A, der Mutanten und der rekombinanten humanen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B

Die rekombinante Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A aus Huhn und deren Mutanten sowie die rekombinante humane Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. U. Bertsch hergestellt.

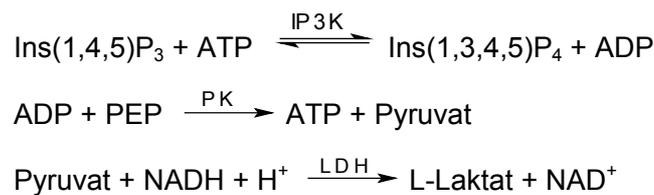
Es wurde ein Fragment von 306 Aminosäuren, welches die C-terminale katalytische Domäne und eine benachbarte Calmodulin-Bindungsdomäne aufweist, in E.coli BL21 (DE3) überexprimiert und durch Phosphocellulose- sowie Calmodulin-Affinitätschromatographie gereinigt (Bertsch et al. 1999).

Ebenso die durch gezielte Mutagenese hergestellten Mutanten der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A wurden anhand dieser Vorgehensweise exprimiert und gereinigt. In diesen Mutanten ist jeweils die Aminosäure Lysin durch eine andere Aminosäure (Arginin, Glutamin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure) ausgetauscht worden (Bertsch et al., 2000).

Die rekombinante humane Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B wurde aus humanen myeloischen TF 1-Zellen mittels einer Total-RNA-Präparation isoliert. Die cDNA für diese Isoform wurde von der Poly-A⁺ RNA mittels RT-PCR kloniert. Anschließend wurde ein Fragment von 976 Basenpaaren, welches die Calmodulin-Bindungsdomäne und die katalytische Domäne enthält, in E.coli BL21 (DE3) überexprimiert. Die Aufreinigung des Enzyms erfolgte mit Hilfe einer P11-Phosphocellulose- und einer Calmodulin-Sepharose-Säule analog der Methode in Bertsch et al., 1999.

2.2.2. Charakterisierung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Die Enzymaktivitätsbestimmungen wurden mit Hilfe eines gekoppelten optischen Tests, in dem die Bildung von ADP aus ATP durch Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A mit dem Verbrauch an NADH mittels der Pyruvatkinase- und Lactatdehydrogenasereaktionen gekoppelt wurde, durchgeführt.



ADP, ein Produkt der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Katalysereaktion, reagierte unter Mitwirkung von Pyruvatkinase (PK) mit Phosphoenolpyruvat (PEP) zu ATP und Pyruvat. Die Lactatdehydrogenase (LDH) reduzierte in Gegenwart von NADH das entstandene Pyruvat zum Laktat. Die Abnahme an NADH wurde in einem thermostatisierten Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 339 nm und einer Temperatur von 30 °C gemessen. Für die Messungen wurden Quarzküvetten oder Plastiküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Der Standardreaktionsmix hatte die folgende Zusammensetzung: 0.2 mM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 10 mM Triethanolamin-HCl pH 7.5, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 500 µM ATP, 5 U/ml L-Lactatdehydrogenase, 2.5 U/ml Pyruvatkinase. Das Endvolumen des Testmixes betrug 800 µl. Zu diesem Mix, der bei 30 °C für 10 Minuten vorinkubiert wurde, wurde die in 10 mM Triethanolamin-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT vorverdünnte Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A mit einer Endkonzentration von 4.8 nM (maximal 10 µl) pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation von 10 Minuten bei 30 °C und Messung des basalen Umsatzes von ATP in Abwesenheit des zweiten Substrats (herrührend von der Kontamination der Kopplungsenzympräparation mit ATPasen) wurde die maximale Enzymaktivität durch Zugabe von 25 µM D-Ins(1,4,5)P₃ (8 µl einer 2.5 mM Stocklösung) gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für NADH ($\epsilon = 6.3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) aus den Steigungen der Kurven ermittelt.

2. Material und Methoden

Zur Bestimmung des apparenten K_m -Wertes ($K_{m,app}$) für D-Ins(1,4,5) P_3 wurden die jeweiligen Ansätze durch Zugabe unterschiedlicher Endkonzentrationen von D-Ins(1,4,5) P_3 (2, 3, und 5 μ M, 6.4 - 16 μ l aus einer 0.25 mM Stocklösung; 10, 15 und 25 μ M, 3.2 - 8 μ l aus einer 2.5 mM Stocklösung) gestartet und bis zur kompletten Substratumsetzung verfolgt („single transient“, Gutfreund 1971). Die ATP-Konzentration wurde innerhalb einer Meßreihe konstant gehalten, variierte aber von Meßreihe zu Meßreihe (125 -1000 μ M).

Zur Bestimmung der apparenten K_m -Werte für ATP wurde dessen Konzentration zwischen 62.5 und 1000 μ M variiert und die Reaktion mit jeweils 25 μ M D-Ins(1,4,5) P_3 gestartet.

2.2.3. Inhibierung der Aktivität der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A

Zur Herstellung von Stocklösungen wurden die Hemmstoffe unter Lichtausschluß mit einer Konzentration von 3 - 20 mM in DMSO gelöst und bei - 20 °C gelagert. Vor Gebrauch wurden Aliquots dieser Stocklösungen bis zu einer Konzentration von 0.05 - 1 mM mit DMSO verdünnt. Die Enzymaktivitäten wurden unter Anwendung eines gekoppelten optischen Tests (Kap. 2.2.2.) gemessen, indem die Reaktion mit 25 μ M D-Ins(1,4,5) P_3 gestartet wurde. In Abwesenheit eines Hemmstoffes und bei einer Enzymkonzentration von 4.8 nM verblieb die Enzymaktivität für 10 bis 15 Minuten bei der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) von 1 μ M/min. In dieser Periode wurden die Hemmstoffe unter Lichtausschluß in Volumina von 1 - 2 μ l stufenweise bis zum Erreichen des maximalen Hemmeffekts oder einer Konzentration von 100 μ M dazupipettiert. Die Endkonzentration von DMSO betrug maximal 3 % (v/v) und hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivität, wie Kontrollmessungen ergaben.

Diese Messungen wurden ebenfalls mit der humanen Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase B durchgeführt, die in einer Konzentration von 16.88 nM vorlag.

2. Material und Methoden

2.2.3.1. Messung der Hemmeigenschaft von Hypericin unter Bestrahlung

Da es sich bei Hypericin um einen stark lichtempfindlichen und „photoaktivierbaren“ Hemmstoff handelt, wurde die Inhibierung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität nach Bestrahlung des Inhibitor-Enzym-Komplexes mit Laborlicht gemessen. Hierzu wurde zu dem jeweils bei 30 °C vorinkubierten Reaktionsmix Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A bis zu einer Endkonzentration von 6.8 nM und Hypericin, gelöst in DMSO, in unterschiedlichen Endkonzentrationen (0.05 µM bis 0.5 µM) pipettiert. Die Reaktionsansätze wurden anschließend bei 30 °C 15 Minuten mit dem Licht einer Schreibtischlampe, die eine Osram Circolux 18 W Glühbirne enthielt, bestrahlt. Der Abstand zwischen der Lampe und der Probenküvette betrug ca. 40 cm.

Anschließend erfolgten die Messungen der Enzymaktivitäten unter Anwendung eines gekoppelten optischen Tests (Kap. 2.2.2.), indem die Reaktionen mit 25 µM D-Ins(1,4,5)P₃ gestartet und die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten gemessen wurden. Gleichzeitig wurden sowohl Kontrollmessungen unter Lichtausschluß als auch mit entsprechenden DMSO-Konzentrationen in Abwesenheit des Hemmstoffs durchgeführt.

2.2.4. Test auf Einfluß der Hemmstoffe auf die Kopplungsenzyme

Der Standardreaktionsmix wurde bei 30 °C für 10 Minuten sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Hemmstoff und ohne Zugabe von Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A inkubiert. Anschließend wurde ADP in einer Endkonzentration von 10 µM zum Reaktionsmix pipettiert und der schnelle Verbrauch an NADH gemessen. Bei keinem der getesteten Hemmstoffe konnte eine Hemmung der Aktivität der Kopplungsenzyme (Pyruvatkinase, L-Lactatdehydrogenase) beobachtet werden.

2.2.5. Test auf Einfluß des Photometerlichtes auf lichtempfindliche Hemmstoffe

Für jede Verbindung wurden vier Reaktionsansätze bei 30 °C für 15 Minuten unter Bestrahlung mit Photometerlicht ($\lambda = 339 \text{ nm}$), zwei in Gegenwart und zwei in Abwesenheit von einem Hemmstoff, inkubiert. Die Hemmstoffkonzentration betrug das 3-fache des IC_{50} -Wertes. Von jedem Paar der Reaktionsansätze enthielt einer nur D-Ins(1,4,5) P_3 , während der andere nur ATP enthielt. Nach der Bestrahlung wurde bei jedem Paar der Reaktionsansätze jeweils ein Testmix entweder mit 500 μM ATP oder mit 25 μM D-Ins(1,4,5) P_3 gestartet. Zusammen mit dem zweiten Substrat wurde der Hemmstoff in die Reaktionsansätze gegeben, die in Abwesenheit des Hemmstoffes bestrahlt wurden.

2.2.6. Messung des Hemmstoffeinflusses auf den $K_{m,app}$ -Wert für ATP

Die Messungen wurden wie in Kap. 2.2.2. beschrieben durchgeführt. Die initiale Konzentration von D-Ins(1,4,5) P_3 wurde mit 25 μM bei V_{max} für dieses Substrat gehalten, während sowohl die Hemmstoffkonzentrationen variierten als auch die Anfangskonzentrationen von ATP, die in einem Bereich von 25 μM bis 800 μM verändert wurden.

2.2.7. Messung des Hemmstoffeinflusses auf den K_m -Wert für D-Ins(1,4,5) P_3

Die Messungen wurden wie in Kap. 2.2.2. beschrieben, durchgeführt. Die Konzentration von ATP wurde mit 500 μM (ca. das 4-fache des $K_{m,app}$ -Wertes für ATP) konstant gehalten, während die Konzentration für Ins(1,4,5) P_3 in den einzelnen Messungen mit Hilfe von „single transients“ (Gutfreund, 1971) zwischen 10 μM und 0 μM variierten.

2.2.8. Messung des Calmodulineinflusses auf die Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase

Es wurde zunächst der Standardreaktionsmix (Kap. 2.2.2.) mit einer ATP-Konzentration von 500 µM bei 30 °C für 10 Minuten vorinkubiert. Zu diesem Mix wurde die in 10 mM Triethanolamin-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT vorverdünnte Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A mit einer Endkonzentration von 6.8 nM pipettiert und für weitere 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 25 µM D-Ins(1,4,5)P₃ gestartet und die maximale Enzymaktivität gemessen. Danach wurde der Hemmstoff mit einer Endkonzentration des 5-fachen IC₅₀-Wertes und nach 5 Minuten CaCl₂ mit einer Endkonzentration von 550 µM dazupipettiert. Hieraus ergab sich eine freie [Ca²⁺] von 50 µM. Anschließend wurde CaM aus einer konzentrierten Stocklösung in Wasser (c = 100 µM) stufenweise bis zu einer Endkonzentration von 1 µM und 4 µM hinzugefügt. Eine Kontrollmessung ohne Hemmstoff wurde durchgeführt, um den inhibitorischen Effekt von CaCl₂ und dessen Reversibilität durch CaM zu detektieren.

2.2.9. Messung der Reversibilität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Hemmung durch Triton X-100

Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A wurde wie in Kap. 2.2.8. beschrieben, in Gegenwart von 500 µM ATP und in Abwesenheit des Hemmstoffes inkubiert. Die Messung wurde mit 25 µM D-Ins(1,4,5)P₃ gestartet und die maximale Enzymaktivität gemessen. Anschließend wurde der Hemmstoff mit einer Endkonzentration des 5-fachen IC₅₀-Wertes hinzugefügt.

Nach 5 bzw. 20 Minuten wurde peroxidfreies Triton X-100 stufenweise bis zu Endkonzentrationen von jeweils 0.01 %, 0.1 % und 0.2 % pipettiert.

2.2.10. Differenzspektroskopische Untersuchung der Hemmstoff / Triton X-100 Interaktion

Zur Durchführung dieser Messung wurden 1 ml einer 20 μ M bzw. 50 μ M Hemmstoff-Lösung jeweils in eine Proben- und Referenzküvette (Quarzküvetten) gegeben. In eine dritte Küvette (Lösungsmittelküvette) wurde Wasser mit dem gleichen prozentualen Anteil an DMSO wie in der Hemmstoff-Lösung pipettiert. Nun wurden stufenweise in die Probe- und Lösungsmittelküvette kleine Volumina einer 10 %igen Stocklösung von Triton X-100 (Endkonzentration: 0 % - 0.2 %) und gleiche Volumina an Wasser in die Referenzküvette gegeben. Nach jeder Zugabe wurde ein Spektrum in einem Wellenlängenbereich von 300 nm bis 500 nm aufgenommen. Anschließend wurde das Spektrum des Lösungsmittels vom Spektrum der Probenlösung subtrahiert und mit dem Spektrum der Referenzlösung verglichen.

2.2.11. Untersuchung der Bindungsstelle der Hemmstoffe unter Verwendung von Punktmutanten der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Die Untersuchungen wurden wie in Kap. 2.2.3. beschrieben, durchgeführt. Die Punktmutanten der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A wurden in einem Konzentrationsbereich von 2.4 nM bis 7.5 nM eingesetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit der Mutante im Reaktionsmix bei 30 °C wurde der sehr wirksame Hemmstoff 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon stufenweise in Volumina von 1 - 2 μ l bis zum Erreichen des maximalen Hemmeffektes oder einer Konzentration von 100 μ M dazupipettiert. Es wurden Kontrollreaktionen mit dem Wildtyp der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durchgeführt.

2.2.12. Versuch des Cross-linkings von Gossypol an die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Aus einer 1 mM Stocklösung von Gossypol wurde ein Aliquot bis zu einer Konzentration von 40 µM mit DMSO verdünnt. Zunächst wurde ein Teil dieses Hemmstoffes mit Hilfe von frisch gelöstem NaCNBH₃ (Endkonzentration: 100 µM) durch 30-minütiges Erhitzen bei 30 °C reduziert. Anschließend wurde die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A im cross-linking-Puffer (0.1 M Na₂PO₄ pH 7.5) mit einer Endkonzentration von 1 µM aufgenommen. Die Reaktion (Reaktionsvolumen: 100 µl) wurde durch Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an Gossypol (0.5 µM - 4 µM) gestartet, wobei in einem Kontrollansatz das vorher reduzierte Gossypol mit einer Endkonzentration von 1 µM eingesetzt wurde. Als Kontrollen für das cross-linking wurden sowohl nur die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A als auch das Enzym in Gegenwart von entsprechender Konzentration an DMSO verwendet. Die Reaktionsansätze wurden 10 Minuten bei 30 °C im cross-linking-Puffer inkubiert. Anschließend wurde frisch gelöstes NaCNBH₃ bis zu einer Endkonzentration von 50 mM dazupipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation von 15 Minuten bei 30 °C. Anschließend wurden 20 µl aus den jeweiligen Reaktionsansätzen entnommen, mit 10 µl Laemli-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 100 °C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10 % Polyacrylamidgel).

2.2.13. Hemmung der Topoisomerase II

Zur Untersuchung der Topoisomerase-Hemmung wurde der Topoisomerase II Drug Screening Kit der Firma TopoGEN, USA verwendet.

10 x Topoisomerase II Probenpuffer: 500 mM Tris-HCl, pH 8.0
 1200 mM KCl
 100 mM MgCl₂
 5 mM ATP
 5 mM DTT

Gel-Auftragspuffer: 0.25 % Bromphenolblau
 50 % Glycerol

2. Material und Methoden

Laufpuffer: 50 x TAE

242 g Tris-Base
57.1 ml Eisessig
100 ml 0.5 M EDTA
ad 1000 ml Wasser

Die Hemmstoffe wurden unter Lichtausschluß mit einer Konzentration von 3 - 20 mM in DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch wurden Aliquots dieser Stocklösungen mit Wasser bis zu einer Konzentration von 0.25 - 200 µM verdünnt, aus denen wiederum die weiteren Verdünnungen der jeweiligen Testsubstanzen mit einer Mischung von DMSO:Wasser, die dem im Aliquot vorhandenen Mischungsverhältnis entsprach, angefertigt wurden. Da für jeden Reaktionsansatz eines Hemmstoffes immer das gleiche Volumen pipettiert wurde, wurde die Konzentration an DMSO konstant gehalten. Die Endkonzentration von DMSO betrug 0.2 - 1 % (v/v) und hatte keinen Einfluß auf die Topoisomerase II-Aktivität wie Kontrollmessungen ergaben.

Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis in Mikrozentrifugentubes zusammenpipettiert. Hierbei wurde folgende Reihenfolge eingehalten:

- 1) H₂O
- 2) 2 µl des 10 x Topoisomerase Probenpuffer
- 3) 1 µl superspiralisierte DNA (= 0.25 µg)
- 4) 4 µl Testsubstanz (Endkonzentration von 0.05 - 40 µM)
- 5) 4 Units Topoisomerase II

Die Kontrollansätze wurden sowohl ohne Testsubstanz als auch mit einem Kontrollhemmstoff (VP-16, 0.1 mM) durchgeführt. Der Testansatz wurde nach der Zugabe des Enzyms 30 Minuten in einem Heizblock bei 37 °C inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion durch den Zusatz von 2 µl 10 %igem SDS und dem Hinzufügen von 50 µg/ml Proteinase K erfolgte eine weitere Inkubation von 15 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurden 2 µl des Auftragspuffers sowie 20 µl eines Gemisches von Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) zum Testansatz pipettiert, kurz gewirrt und 5 Sekunden zentrifugiert. 20 µl der blaugefärbten oberen Phase wurden auf ein 1 %iges Agarosegel, welches 0.5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 2 Volt/cm über 18 Stunden in 1 x TAE-Puffer, 0.5 µg/ml Ethidiumbromid enthaltend, durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in Wasser entfärbt und im UV-Durchlicht photographiert.

2. Material und Methoden

2.2.14. Substratspezifität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Die Enzymaktivitäten wurden wie in Kap. 2.2.2. beschrieben, gemessen. Zu dem bei 30 °C 10 Minuten vorinkubierten Reaktionsmix wurde die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A bis zu einer Endkonzentration von 6.8 nM, 100 nM oder 500 nM pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach der Messung des basalen Umsatzes von ATP in Abwesenheit des zweiten Substrats wurde die maximale Enzymaktivität durch Zugabe 25 µM eines Inositolphosphatisomers oder Analogons gemessen. Diese Messungen wurden mit unterschiedlich zusammengesetzten Reaktionsmixturen durchgeführt.

1) Standardbedingung: 0.2 mM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 10 mM Triethanolamin-HCl (TEA) pH 7.5, 500 µM ATP, 5 U/ml L-Lactatdehydrogenase, 2.5 U/ml Pyruvatkinase, pH 7.5

2) Physiologische Bedingung: entsprechend der Standardbedingung, aber 5 mM ATP, 6 mM MgCl₂, 100 mM KCl statt der unter 1) angegebenen Konzentrationen

3) Hohes freies Mg²⁺: entsprechend der Standardbedingung, aber 5 mM ATP, 10 mM MgCl₂ statt der unter 1) angegebenen Konzentrationen

2.2.15. HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte der umgesetzten Isomere bzw. Analoga mittels der Metal-Dye-Detection-Methode (MDD)

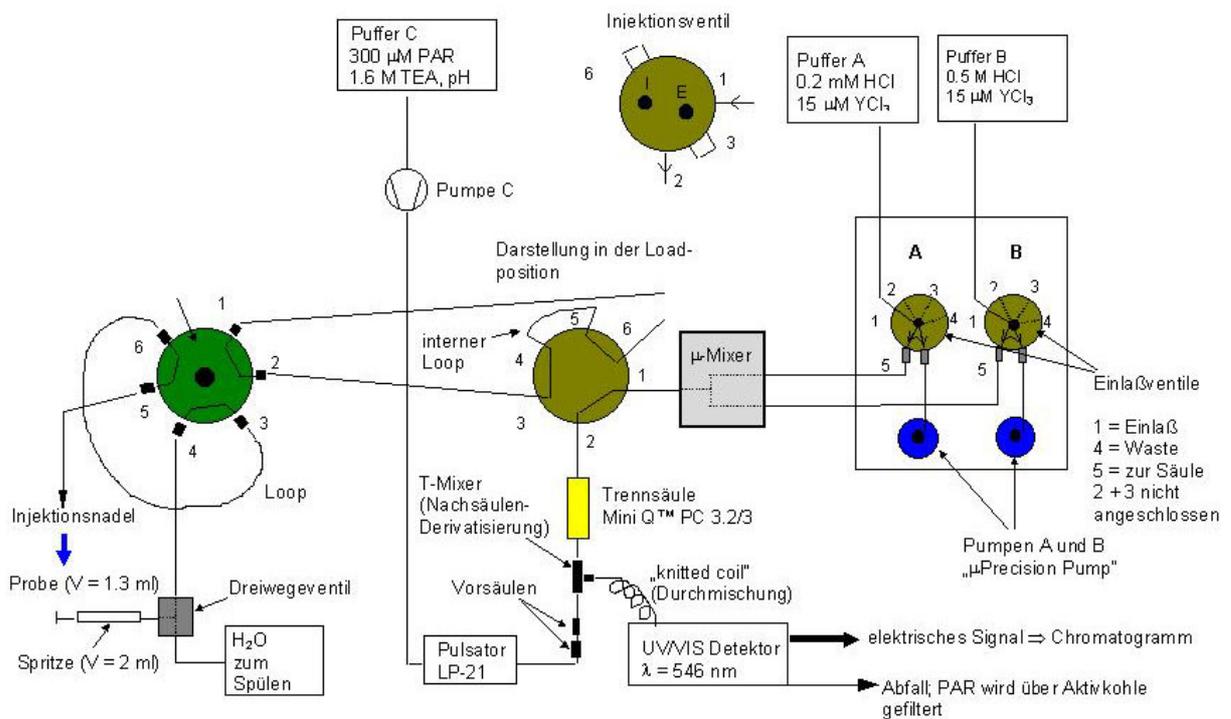
Die MDD-Methode (Mayr, 1990) ermöglicht die Analyse von Inositolphosphaten ohne den Einsatz von Radioaktivität und die Detektion von Inositolphosphatmengen im Pikomolbereich. Sie beruht auf einem Ligandenaustausch in einem ternären System, welches als Komponenten den metallbindenden Farbstoff 4-(2-Pyridyl)-(2-azo)-resorcin (PAR), das dreiwertige Übergangsmetallkation Yttrium und die zu analysierenden metallbindenden Inositolphosphate beinhaltet. Die Basisabsorption des Farbstoffes PAR bei 520 - 550 nm wird durch die Komplexierung in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 mit Yttrium erhöht. Sind Inositolphosphate vorhanden, nimmt die Konzentration des Metall-Farbstoffkomplexes ab, da die Inositolphosphate Yttrium an ihre Phosphomonoestergruppen binden. Die K_d-Werte für diese Bindung liegen im nanomolaren Bereich, wodurch die Affinität der Inositolphosphate zu Yttrium um ein bis zwei Größenordnungen höher ist als die des Farbstoffes PAR.

2. Material und Methoden

Die auftretenden negativen Peaks können durch eine Spannungsumkehr am Monitor als positive Signale aufgezeichnet werden.

Der schematische Aufbau der HPLC-Anlage zur Analyse der Inositolphosphate ist in Abb. 2.1. dargestellt.

Abb. 2.1.: Schematischer Aufbau der MDD-HPLC realisiert mittels eines SMARTTM Systems mit dritter HPLC-Pumpe



2. Material und Methoden

2.2.15.1. Umsatz und HPLC-Analyse der als Substrat eingesetzten Inositolphosphatisomere bzw. Analoga und ihrer Produkte

Reaktionsmix: 10 mM TEA pH 7.5
500 μ M ATP
5 mM MgCl₂
1 mM DTT

Zu dem bei 30 °C 10 Minuten vorinkubierten Reaktionsmix wurde die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A bis zu einer Endkonzentration von 500 nM pipettiert. Das Endvolumen des Testmixes betrug 150 μ l. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 25 μ M InsPs oder Analogon gestartet und nach einer 15 minütigen Inkubation bei 30 °C mit TCA in einer Endkonzentration von 10 % gestoppt. Nach der Proteinpräzipitation von 4 Minuten auf Eis wurde 10 Minuten bei 4 °C und 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde 3 x mit 1 ml wassergesättigtem Diethylether extrahiert und der Ether mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Um den restlichen Ether zu entfernen, wurde die Probe auf 55 °C für kurze Zeit erhitzt. Anschließend erfolgte die HPLC-Analytik der Inositolphosphate mit Hilfe der MDD-Methode.

Die Proben wurden mittels eines computergesteuerten Probengebers off-line mit einer Flußrate von 500 μ l/min in eine 1 ml Probenschleife eines Injektionsventils gegeben. Die Trennung der Inositolphosphate erfolgte an einem Anionenaustauscher Mini Q (Partikelgröße 3 μ m) mittels eines ansteigenden HCl-Gradientensystems (Puffer A/B) und einer Flußrate von 500 μ l/min. Die Puffer A und B wurden mit Spritzenkolbenpumpen des SMART-Systems, die den Puffer zunächst durch einen on-line Filter (0.2 μ m Titan oder PEEK) in eine μ -Mischkammer (V = 30 μ l) förderten, auf die Säule gepumpt. Hinter der Säule erfolgte mittels der C-Pumpe, einer Shimadzu LC10 HPLC-Doppelkolbenhubpumpe, mit einer Flußrate von 250 μ l/min eine Zumischung des den Farbstoff PAR enthaltenden Puffers C in eine gestrickte Kapillare (Totvolumen: 150 μ l). Hier erfolgte durch die pH-Wert Erhöhung auf > 7 die Komplexbildung von PAR mit Yttrium bzw. der Inositolphosphate mit Yttrium, wobei die Absorptionsabnahme des ersteren Komplexes bei 546 nm in Gegenwart des letzteren Komplexes abnimmt und mittels eines UV/Vis-Detektors des SMART-Systems gemessen wurde.

2. Material und Methoden

Gradientenprotokoll:	0.00 LOOP	30
	0.01 FILL	A, 1, 10, 15000
	0.01 FILL	B, 1, 5, 15000
	0.02 AUXILLARY_OUTPUT	
	0.05 FLOW	500
	0.10 CONC_B	1
	0.40 NEW_CHROMATOGRAM	
	1.00 FLOW	500.00
	1.50 AUXILLARY_OUTPUT	
	1.60 INJECT	
	4.00 LOAD	
	4.00 CONC_B	1.0
	7.50 CONC_B	4
	10.00 CONC_B	7.3
	12.50 CONC_B	12.5
	14.50 CONC_B	18
	15.60 CONC_B	23.5
	16.50 CONC_B	29
	17.00 CONC_B	35
	17.50 CONC_B	44
	18.30 CONC_B	69
	18.70 CONC_B	79
	19.10 CONC_B	85
	20.00 CONC_B	94
	20.70 CONC_B	99
	21.00 CONC_B	100
	21.50 CONC_B	100
	21.50 CONC_B	0
	22.00 FLOW	500.00
	22.00 CONC_B	0
	23.50 FLOW	10
	25.00 CONC_B	0.0
	25.10 END_LOOP	

2. Material und Methoden

Pufferlösungen: A: 0.2 mM HCl, 15 μ M YCl_3
 B: 0.5 M HCl, 15 μ M YCl_3
 C: 1.6 M TEA, 300 μ M PAR, pH 9.0 (eingestellt mit HCl)

Die Puffer wurden durch einen Filter mit einer Porengröße von 0.45 μ m filtriert und anschließend entgast. In der Vorratsflasche erfolgte eine Begasung der Puffer mit Helium und eine Entnahme durch Teflon-Fritten.

2.2.16. Bestimmung von K_m -Werten für substrataktive InsPs und Analoga

Die Messungen wurden unter Standardbedingungen wie in Kap. 2.2.2. beschrieben durchgeführt, wobei aktive Substrate stufenweise bis zum Erreichen der maximalen Umsatzgeschwindigkeit dazupipettiert wurden. Infolge der Produkthemmung durch Anreicherung phosphorylierter InsPs während der Reaktion wurde die präzise Bestimmung in einem zweiten Messdurchgang mit einzelnen Ansätzen mit jeweils steigenden Substratkonzentrationen durchgeführt.

2.2.17. Bestimmung von K_i -Werten für substratinaktive InsPs und Analoga

Die Messungen wurden unter Standardbedingungen wie in Kap. 2.2.2. beschrieben, mit gering substrataktiven und inaktiven InsPs und Analoga durchgeführt. Zu dem bei 30 °C für 10 Minuten vorinkubierten Reaktionsmix wurde die Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A bis zu einer Endkonzentration von 6.8 nM und das Inositolphosphatisomer oder Analogon in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen (aus konzentrierter Stammlösung, max. 20 μ l) pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach der Messung des basalen Umsatzes von ATP in Abwesenheit des zweiten Substrates wurde die maximale Enzymaktivität durch Zugabe von 10 μ M D-Ins(1,4,5) P_3 gemessen.

2.2.18. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad *DC* Protein Assay Kit.

Reagenz A: alkalische Kupfertartrat - Lösung

Reagenz B: verdünntes Folin-Reagenz

Reagenz S: 10 %ige Natriumdodecylsulfat-Lösung

Zur Herstellung des Arbeitsreagenzes A' wurden zunächst 20 µl Reagenz S zu 1 ml Reagenz A pipettiert. Anschließend wurden unterschiedlich konzentrierte Standardlösungen (0 - 1.5 mg/ml) aus Rinderserumalbumin angefertigt. 5 µl der Standard- bzw. der Probelösung wurden in die einzelnen Löcher einer Mikrotiterplatte pipettiert und 25 µl des angesetzten Arbeitsreagenzes A' dazugegeben. Anschließend wurden 200 µl des Reagenzes B in jedes Loch pipettiert. Durch leichtes Schütteln der Mikrotiterplatte wurden die Reagenzien gemischt. Nach 15 Minuten wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen.

2.2.19. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngelpuffer: 1.5 M Tris-HCl pH 8.8
0.4 % SDS

Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8
0.4 % SDS

Acrylamid-Lösung: 30 % Acrylamid
0.8 % N,N-Methylbisacrylamid
in H₂O

1 x Laemmli-Laufpuffer: 0.025 M Tris
0.192 M Glycin
0.1 % SDS

2. Material und Methoden

	<u>Trenngel (10 %ig)</u>	<u>Sammelgel (5 %ig)</u>
H ₂ O	4.115 ml	3.47 ml
Trenngelpuffer	2.5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1.5 ml
Acrylamid-Lösung	3.33 ml	1.0 ml
10 % APS	50 µl	25 µl
10 % TEMED	5 µl	5 µl
6-fach Probenpuffer:	Sammelgelpuffer	15 ml
	SDS	1.2 g
	β-Mercaptoethanol	1.2 ml
	2 % Bromphenolblau	1.8 ml
	dest. H ₂ O	ad 20 ml

Es wurde jeweils ein 1 mm dickes Polyacrylamid-Gel bestehend aus 10 %igem Trenngel und 5 %igem Sammelgel hergestellt. Das in den Trägerplatten polymerisierte Gel wurde nach vollständiger Polymerisation in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die anschließend mit 1 x Laemmli-Laufpuffer gefüllt wurde. 30 µl der Probenlösung wurden mit 10 µl Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 100 °C inkubiert. Die Probenlösungen wurden anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zunächst wurde eine Spannung von 100 V für ca. 0.5 h angelegt, um die Proteine im Sammelgel zu fokussieren. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte über einen Zeitraum von 1.5 - 2 h bei einer Spannung von 120 V. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Brillantblau 20 Minuten gefärbt, danach mittels der Entfärbelösung über Nacht entfärbt.

2.2.20. Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurde die Methode der photometrischen Messung des von den Basen absorbierten eingestrahlten UV-Lichtes angewendet. Die Quantifizierung der DNA erfolgte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm, wobei der bei 260 nm gemessene Wert zur Berechnung der DNA-Konzentration verwendet wurde. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Zur Berechnung wurde folgende Formel angewendet:

$$C_{\text{Probe}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 50 \mu\text{g} \times \text{OD}_{260}$$

Der bei 280 nm gemessene Wert zeigte eine mögliche Verunreinigung der Probe mit Proteinen an. Die reine DNA sollte ein Verhältnis (260 nm/280 nm) von ca. 1.8 aufweisen. Kleinere Werte deuteten auf eine Verunreinigung hin.

2.2.21. Zellbiologische Methoden

2.2.21.1. Allgemeine Methoden der Zellbiologie

2.2.21.1.1. Aseptisches Arbeiten

Ein Problem in der Zellkultur trotz Anwendung von Antibiotika sind Kontaminationen mit Pilzen, Bakterien sowie Mykoplasmen. Um diese zu vermeiden, wurden alle verwendeten Materialien vor Beginn von zellbiologischen Arbeiten durch Autoklavieren (PBS, Wasser, Pipettenspitzen), Heißluftsterilisation bei 180 °C (Glaspipetten, Bechergläser) und Sterilfiltration (hitze-labile Lösungen) sterilisiert. Um eine Kontamination mit Luftkeimen auszuschließen, erfolgten alle zellbiologischen Arbeiten an einer sterilen Arbeitsbank.

2. Material und Methoden

2.2.21.1.2. Subkultivierung von Suspensionszellen (Jurkat T-Zellen)

Für die Subkultivierung von Jurkat T-Zellen wurden die Zellen zunächst durch mikroskopische Begutachtung auf eine eventuelle mikrobiologische Kontamination überprüft. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzahlbestimmungsgerätes (Coulter Counter, Kap. 2.2.21.1.4.) bestimmt. Die Zellen wurden dann in einer Dichte von $2 \times 10^5/\text{ml}$ in 25 cm^2 - bzw. 75 cm^2 - oder $3 \times 10^5/\text{ml}$ in 175 cm^2 -Kulturflaschen mit Wachstumsmedium (2.1.7.1.) verdünnt. Diese Subkultivierung ist nach 2 - 3 Tagen wieder erforderlich, wenn die Substrate des Mediums von den Zellen metabolisiert sind.

2.2.21.1.3. Subkultivierung von adhärennten Zellen (NIH 3T3)

Nach mikroskopischer Begutachtung auf Kontaminationsfreiheit wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Oberfläche der Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erfolgte durch Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung (2.1.12.2.). Anschließend wurde ein 10-faches Volumen an serumhaltigen Medium dazugegeben, wodurch das Trypsin inaktiviert wird. Danach wurde die Zellzahl mit Hilfe des Coulter Counters (Kap. 2.2.21.1.4.) bestimmt. Die Zellen wurden dann in einer Dichte von $1 \times 10^5/\text{ml}$ in 25 cm^2 - oder in 75 cm^2 -Kulturflaschen ausgesät.

2.2.21.1.4. Zellzahlbestimmung mittels Coulter Counter

100 μl der homogenen Zellsuspension werden in einen Zählbecher in 20 ml isotonischer Kochsalzlösung (0.9 % NaCl) suspendiert und in einem Meßbecher auf die Meßbecherplatte gestellt. Die Kapillare des Coulter Counters wird in die Flüssigkeit getaucht. Elektroden, von denen sich eine geerdete in der Meßkapillare befindet und die stromführende in die Probelösung taucht, leiten einen Meßstrom. Ein Quecksilbermanometer ist direkt mit der Meßkapillare verbunden. Das Manometer regelt das Probenvolumen (500 μl), das während der Zählung durch die Kapillaröffnung fließt. Eine Vakuumpumpe erzeugt den Unterdruck, der nötig ist, um die Flüssigkeit durch die Kapillare zu ziehen.

2. Material und Methoden

Zunächst wird der COUNT-Schalter auf RESET gestellt, wodurch an die Meßkapillare und das Manometer ein Unterdruck angelegt wird. Das andere Ende des Manometers ist offen, und zu zählende Zellsuspension wird durch die Kapillaröffnung in die Kapillare gesaugt. Das Quecksilber im Manometer fällt, bis es zwischen Ausgleichskammer und Startkontakt zur Ruhestellung kommt. Fällt das Quecksilber unter den Startkontakt, wird der „Kapillarstrom“ zwischen den Meßelektroden eingeschaltet. Nach Einschalten des Kapillarstromes wird eine konstante Spannung durch die Kapillaröffnung angelegt. Passiert eine Zelle die Kapillaröffnung, so ändert sich der Widerstand und es entsteht ein ableitbarer und verstärkbarer Spannungsimpuls, dessen Höhe eine Funktion des Teilchenvolumens ist. Sobald die Zählanzeige Null anzeigt, wird der COUNT-Schalter auf COUNT gestellt, wodurch der Unterdruck von Meßkapillare und Manometer getrennt wird. Das Quecksilber im Manometer steigt, und die Probelösung wird durch die Meßkapillare gezogen. Erreicht das Quecksilber den Startkontakt, wird die Schaltung geerdet. Hiernach wird die Zählung durchgeführt, bis das Quecksilber den gewählten Volumenkontakt erreicht und der Stopkontakt geerdet wird. Die Anzeige gibt den Zählwert der Teilchen in 500 µl Probelösung an.

2.2.21.1.5. Bestimmung der Vitalität von Zellen

200 µl der homogenen Zellsuspension wurden in ein Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) pipettiert und mit 200 µl einer 0.4 %igen Trypanblau-Lösung (in 0.81 % NaCl, 0.06 % KCl) versetzt. Anschließend wurde der Testansatz mit einer Pipette durchmischt und in der Neubauer-Zählkammer (Fa. Greiner) ausgezählt. Es wurden sowohl die ungefärbten (lebend) als auch die blau angefärbten (tot) Zellen gezählt, wobei die schwach blau angefärbten Zellen als tot betrachtet wurden.

Der Prozentsatz an lebenden Zellen wurde nach folgendem Schema berechnet:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

2.2.22. Spezielle Methoden der Zellbiologie

2.2.22.1. Proliferationshemmung von Jurkat T-Zellen

Die exponentiell wachsenden Zellen wurden in einer Dichte von $2 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ Wachstumsmedium in 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde zunächst eine Anwachskontrolle durchgeführt, indem die Zellzahl mittels eines Zellzahlbestimmungsgerätes (Coulter Counter, Kap. 2.2.21.1.4.) sowie der prozentuale Anteil an lebenden Zellen mittels Trypanblau-Färbung (Kap. 2.2.21.1.5.) bestimmt wurde. Zur Analyse des Hemmstoffeffektes auf die Zellproliferation wurden die Jurkat T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz für 72 Stunden sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle im Dunkeln inkubiert, wobei nach 24 Stunden ein Mediumwechsel und die Zugabe an frischem Hemmstoff erfolgte. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellzahl (Kap. 2.2.21.1.4.) sowie die Überlebensrate der Zellen (Kap. 2.2.21.1.5.) ermittelt.

Für diese Analyse wurden zunächst die Hemmstoffe unter Lichtausschluß mit einer Konzentration von 3 - 20 mM in DMSO gelöst und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Vor Gebrauch wurden Aliquots dieser Stocklösungen mit Wasser bis zu einer Konzentration von 2 - 2000 μM verdünnt, aus denen wiederum die weiteren Verdünnungen der jeweiligen Testsubstanzen mit einer Mischung von DMSO:Wasser, die dem im Aliquot vorhandenen Mischungsverhältnis entspricht, angefertigt wurden. Da für jeden Reaktionsansatz eines Hemmstoffes immer das gleiche Volumen pipettiert wurde, wurde die Konzentration an DMSO konstant gehalten. Die Endkonzentration von DMSO betrug maximal 0.5 % (v/v) und hatte keinen Einfluß auf die Proliferation der Zellen wie Kontrollmessungen ergaben.

Da Hypericin unter sichtbarem Lichteinfluß ein wesentlich besserer Hemmstoff laut Literaturangaben ist, wurde dieser Versuch auch unter Bestrahlung durchgeführt.

Hierzu wurden die mit Hypericin versetzten Zellen als auch die Kontrollzellen nach 24 Stunden 15 Minuten mit dem Licht einer Schreibtischlampe, die eine Osram Circolux 18 W Glühbirne enthielt, bestrahlt. Der Abstand zwischen der Lichtquelle und der Platte betrug ca. 40 cm. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 im Dunkeln inkubiert und danach mittels des Coulter Counters gezählt (Kap. 2.2.21.1.4.).

2. Material und Methoden

2.2.22.2. Proliferationshemmung von NIH 3T3-Zellen

Die Analyse wurde wie in Kap. 2.2.22.1. beschrieben durchgeführt. Die NIH 3T3-Zellen wurden in einer Dichte von $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ Wachstumsmedium in 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte bei dieser Zelllinie kein Mediumwechsel sowie keine Zugabe an frischer Testsubstanz. Die Proliferationshemmung mit Hypericin wurde sowohl im Dunkeln als auch unter Bestrahlung mit Laborlicht (Kap. 2.2.22.1.) durchgeführt.

2.2.22.3. Einfluß der Hemmstoffe auf den Zellzyklus von Jurkat T-Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von $5 \times 10^6/25 \text{ ml}$ Wachstumsmedium in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz versetzt. Das entsprechende Volumen an DMSO wurde auf die Kontrollzellen pipettiert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel sowie die Zugabe von frischem Hemmstoff. Nach einer insgesamt 48-stündigen Inkubationszeit wurden 1×10^6 Zellen entnommen, bei 2000 Upm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das alte Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in $200 \mu\text{l}$ gekühltem PBS resuspendiert, in 1 ml bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühltem Methanol pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden die Zellen bei 2000 Upm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das PBS/Methanol-Gemisch wurde abgegossen, die Zellen in $500 \mu\text{l}$ kaltem PBS resuspendiert und mit $5 \mu\text{l}$ einer 5 mg/ml Rnase (Endkonzentration: $50 \mu\text{g/ml}$) sowie mit $25 \mu\text{l}$ einer 1 mg/ml Propidiumiodid-Lösung (Endkonzentration: $50 \mu\text{g/ml}$) versetzt. Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln. Die Verteilung der DNA wurde mittels eines Durchflußzytometers (Fa. Becton Dickinson) gemessen, wobei 20000 Zellen pro Messung verwendet wurden. Die DNA-Verteilung wurde anschließend mit Hilfe des Computerprogramms ModFit kalkuliert.

2. Material und Methoden

2.2.22.4. 5-Bromo-2'-deoxy-uridin-Einbau in Jurkat T-Zellen

1000 x BrdU labeling solution:	10 mM BrdU Stocklösung ad 5 ml PBS, pH 7.4
Fixierlösung:	70 % Ethanol 0.5 M HCl
Inkubationspuffer:	66 mM Trispuffer 0.66 mM MgCl ₂ 1 mM 2-Mercaptoethanol
Nuclease working solution:	25 µl Nuclease 2475 µl Inkubationspuffer
Anti-BrdU-POD stock solution:	20 U/ml Anti-BrdU-POD in H ₂ O
Anti-BrdU-POD working solution:	25 µl Anti-BrdU-POD stock solution 2475 µl PBS, 10 mg/ml BSA
Peroxidase substrate solution:	1 mg/ml ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulfonat (6)]-diammoniumsalz

Die exponentiell wachsenden Zellen wurden in einer Dichte von $2 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ RPMI 1640 Medium, 10 % FBS, in einer 96-Loch-Platte in einem Volumen von $100 \mu\text{l}/\text{Loch}$ ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte sowohl die Zugabe des Hemmstoffs in unterschiedlichen Konzentrationen als auch die Zugabe an entsprechendem Volumen DMSO als Kontrolle. Die Zellen wurden bei 37°C in einer wassergesättigten, 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre für 48 Stunden inkubiert, wobei nach 24 Stunden ein Mediumwechsel und die Zugabe an frischen Hemmstoff erfolgte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden $10 \mu\text{l}$ einer $110 \mu\text{M}$ BrdU labeling solution auf die Zellen pipettiert (Endkonzentration $10 \mu\text{M}$).

2. Material und Methoden

Die Zellen wurden über 16 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Hiernach wurde 10 Minuten bei 1500 Upm zentrifugiert und das Medium vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden dann 2 Stunden bei 60 °C getrocknet, mit 200 µl/Loch einer bei -20 °C vorgekühlten Fixierlösung fixiert und anschließend 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Hiernach wurden die Zellen 3 x mit je 250 µl/Loch RPMI 1640 Medium, 10 % FBS gewaschen, mit 100 µl/Loch Nuclease working solution versetzt und 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder 3 x mit je 250 µl/Loch RPMI 1640 Medium, 10 % FBS gewaschen, mit 100 µl/Loch einer Anti-BrdU-POD working solution (Endkonzentration: 200 mU/ml) versetzt und für weitere 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit je 250 µl/Loch PBS gewaschen, mit 100 µl/Loch einer Peroxidase substrate solution (Konzentration: 1mg/ml) versetzt und bei Raumtemperatur bis zur Grünfärbung (2 - 30 Minuten) inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte bei 405 nm und 492 nm im Mikrotiterplatten-Reader.

2.2.22.5. Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase Aktivität in Jurkat T-Zellen

Die Jurkat T-Zellen wurden in einer Dichte von jeweils 4 x 10⁷/200 ml Wachstumsmedium in 175 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde eine bestimmte Konzentration des Hemmstoffes, gelöst in DMSO, auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden die Zellen einem entsprechenden Volumen an DMSO ausgesetzt. Die Endkonzentration an DMSO betrug maximal 0.1 % und hatte keinen Einfluß sowohl auf das Wachstum der Zellen als auch auf die Aktivität der endogenen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase wie Kontrollmessungen ergaben. Die Zellen wurden anschließend über 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C und in einer 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre in einem Brutschrank inkubiert.

Vor Zugabe des Hemmstoffes sowie nach 24 und 48 Stunden unter Hemmstoff- bzw. DMSO-Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe eines Coulter Counters (Kap. 2.2.21.1.4.) gezählt, die Anzahl an lebenden Zellen mittels Trypanblau-Färbung (Kap. 2.2.21.1.5.) ermittelt und anschließend für die HPLC-Analyse der Inositolphosphate aufgearbeitet (Kap. 2.2.22.6.).

2. Material und Methoden

2.2.22.6. Aufarbeitung der Hemmstoff- bzw. DMSO- ausgesetzten Jurkat T-Zellen für die HPLC-Analyse von Inositolphosphaten

- 1) Waschen der Zellen: Die 200 ml Zellsuspension wurde auf 4 vorgekühlte Bluecaps verteilt, für 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend bei 4 °C und 1500 Upm über 2 Minuten zentrifugiert. Auf die jeweiligen Zellpellets wurden 25 ml gekühltes Minimalmedium (2.1.7.4.) pipettiert, die Zellen wurden resuspendiert und die Inhalte zweier Bluecaps vereinigt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C, 1500 Upm über 2 Minuten. Hiernach wurden 10 ml vorgekühltes Minimalmedium auf ein Zellpellet gegeben, die Zellen resuspendiert und die Zellsuspension auf das zweite Zellpellet überführt, welches darin resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15 ml graduiertes Röhrchen pipettiert und 20 Minuten auf Eis stengelassen. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C und 4000 Upm für 2 Minuten zentrifugiert.

- 2) Extraktion der Inositolphosphate: Bestand das Zellpellet aus 5×10^7 Zellen, wurden 10 µl 0.2 M EDTA, 10 µl 0.1 M NaF und 1 ml 8 %ige TCA zu dem Pellet pipettiert. Bei höheren Zellzahlen wurden entsprechend größere Volumina dazugegeben. Hiernach wurde kurz gevortext und das Röhrchen bis zum Gefrieren des Inhaltes in flüssigen Stickstoff gestellt. Danach wurde der Inhalt durch das Halten des Röhrchens in der Hand aufgetaut, erneut gevortext, bis zum Gefrieren wieder in flüssigen Stickstoff gestellt und erneut in der Hand aufgetaut. Anschließend wurde bei 4 °C und 4000 Upm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 15 ml graduiertes Röhrchen überführt. Dieser wurde in einem Wasserbad bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Hierdurch wurde vorhandenes Kreatinphosphat sauer hydrolysiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte durch dreimalige Extraktion des Überstandes mit Diethylether ein Großteil der TCA entfernt werden. Die verbleibende TCA wurde durch Einstellen des pH-Wertes auf 6 - 7 neutralisiert. Die Entfernung des restlichen Ethers erfolgte in einer Gefriertrocknungsanlage durch Anlegen eines Vakuums.

2. Material und Methoden

3) Entfernung der Nukleotide: Zunächst wurden 25 µl einer gut durchgemischten 20 %igen Norit A-Lösung (säuregewaschen, in 0.1 M NaCl, 50 mM Natriumacetat, pH 4.0) zu jeder Probe pipettiert. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten über Kopf geschüttelt und 5 Minuten bei 20 °C und 13000 Upm mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und weitere 2 x mit Norit A-Lösung behandelt. Das Pellet wurde mit 100 µl Waschlösung (0.1 M NaCl, 25 mM NaF, 0.5 mM EDTA) versetzt, gevortext und bei 20 °C, 13000 Upm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde danach auf das zweite und dann auf das dritte Pellet überführt, und es wurde wie oben beschrieben jeweils weiterverfahren. Anschließend wurden alle Überstände vereinigt, mit demineralisiertem Wasser auf ein Volumen von 1.1 ml eingestellt, durch einen Einmalfilter mit einer Porengröße von 0.45 µm in ein Glasvial filtriert und in den Probengeber der HPLC-Anlage gestellt.

2.2.22.7. Stabile Transfektion von Jurkat T-Zellen mittels Elektroporation

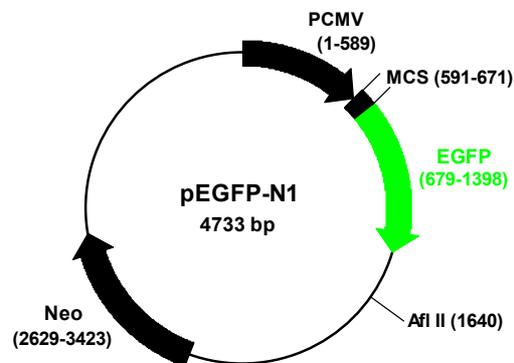
2.2.22.7.1. Präparation der Plasmid-DNA für die Transfektion

Die für die Transfektion benötigte Plasmid-DNA wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Bertsch präpariert. Hierzu wurde zunächst aus dem Vektor pIRES-EGFP die „internal ribosome entry site“ (IRES) sowie die codierende Region des „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) ausgeschnitten und in den Vektor pEGFP-N1 (Abb. 2.2.), aus dem die codierende Region des EGFP geschnitten worden ist, im Anschluß an die „multiple cloning site“ (MCS) eingebaut. In die MCS wurde die codierende Sequenz der Mutante der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A, K272D, mit vorgeschaltetem Strep-Tag kloniert (Abb. 2.3.). Als Kontrolle wurde der Vektor ohne die codierende Sequenz der Mutante verwendet.

Für die Transfektion der Jurkat T-Zellen wurde die Plasmid -DNA mittels Afl II zur Herstellung einer linearisierten DNA geschnitten, da hiermit eine stabile Transfektion erfolgreicher durchzuführen ist.

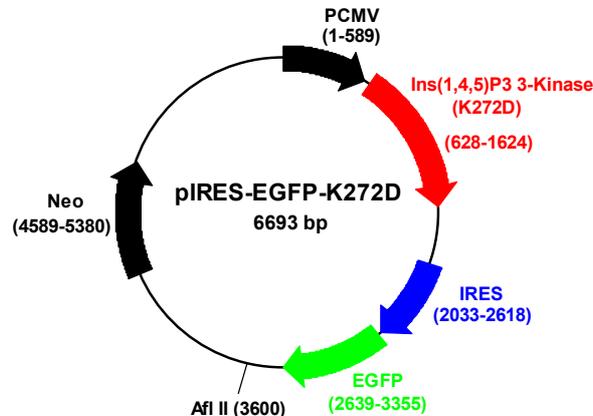
Für die Selektion der stabil transfizierten Jurkat T-Zellen wurde das neo-Gen als dominant selektionierbarer Marker verwendet, so daß die nicht-transfizierten Zellen unter dem Einfluß des Antibiotikums Geneticin (G418) nicht überlebten.

Abb. 2.2.: Darstellung des Vektors pEGFP-N1



Aus dem Vektor pEGFP-N1 wurde zunächst die codierende Region des EGFP geschnitten. Hiernach wurde im Anschluß an die „multiple cloning site“ (MCS) die aus dem Vektor pIRES-EGFP geschnittene Region IRES sowie die codierende Region des EGFP eingebaut.

Abb. 2.3.: Darstellung des Vektors pIRES-EGFP K272D



Aus dem Vektor pIRES-EGFP wurde sowohl die „internal ribosome entry site“ (IRES) sowie die codierende Region des „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) ausgeschnitten und in den Vektor pEGFP-N1 (Abb. 2.2.) eingebaut. In die „multiple cloning site“ (MCS) des pEGFP-N1-Vektors wurde die codierende Sequenz der Punktmutante der Ins(1,4,5)P3 3-Kinase A, K272D, mit vorgeschaltetem Strep-Taq kloniert.

2.2.22.7.2. Transfektion von Jurkat T-Zellen

24 Stunden vor der Ausführung der Transfektion wurden die Jurkat T-Zellen in einer Dichte von 3×10^5 /ml Wachstumsmedium in 175 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Tag der Elektroporation wurde das entsprechende Volumen von 2×10^7 bzw. 8×10^6 Zellen entnommen und 5 Minuten bei 1500 Upm und 20 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, in 200 µl Wachstumsmedium resuspendiert und in eine sterile Elektroporationsküvette überführt. Hiernach wurden 50 µg (Versuch mit 2×10^7 Zellen) bzw. 25 µg (Versuch mit 8×10^6 Zellen) der Plasmid-DNA hinzugefügt. Die Elektroporation wurde mit 200 Volt und einer Kapazität von 960 µF durchgeführt. Die Zellen wurden danach für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Küvette inkubiert, in 10 ml warmes Wachstumsmedium in einer 25 cm²-Zellkulturflasche überführt und für 2 - 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der prozentuale Anteil an lebenden Zellen durch Trypanblau-Färbung und die Transfektionseffizienz mittels eines Fluoreszenzmikroskopes bestimmt (Kap. 2.2.22.8.3.).

2.2.22.7.3. Auswertung der Transfektion durch Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leitz Orthoplan.

Die Effizienz der Transfektion wurde durch Auszählen der grün fluoreszierenden Zellen sowie aller im Bildausschnitt sichtbaren Zellen ermittelt. Hierbei wurden 5 Bildausschnitte berücksichtigt. Der daraus gebildete Mittelwert ergab allerdings nur eine grobe Schätzung der Effizienz, da diese Methode ein hohes Maß an Ungenauigkeit besaß.

% Effizienz = grünfluoreszierende Zellen x 100 / Gesamtzellzahl

2. Material und Methoden

2.2.22.7.4. Selektion der transfizierten Jurkat T-Zellen

Zur Isolierung der stabil transfizierten Jurkat T-Zellen wurde das neo-Gen als dominant selektionierbarer Marker verwendet (Abb. 2.3.). Zum Festlegen der Bedingungen für eine neo-Selektion wurde zunächst die minimale G418-Konzentration, bei der kein Wachstum der parentalen Zellen zu erkennen war, mittels einer Verdünnungsreihe ermittelt. Dies konnte bei einer Konzentration an G418 von 600 µg/ml beobachtet werden. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen bei 1500 Upm, 20 °C für 5 Minuten zentrifugiert, das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen in Selektionsmedium mit einer G418-Konzentration von 700 µg/ml resuspendiert und selektioniert.

2.2.22.7.5. Klonierung der transfizierten Jurkat T-Zellen

Zunächst wurde die Zellzahl der zur Klonierung vorgesehenen Zellen mittels des Coulter Counters bestimmt (Kap. 2.2.21.1.4.). Die Zellsuspension wurde danach auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen in 10 ml Klonierungsmedium (1×10^5 Zellen/ml) verdünnt. Von diesem Ansatz wurde 1 ml Zellsuspension entnommen und mit 9 ml Medium verdünnt. Hieraus resultierte eine Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen/ml. Von diesem Ansatz wurde wiederum 1 ml entnommen und mit 9 ml Medium auf 10 ml aufgefüllt (1000 Zellen/ml). Eine darauffolgende 1:10-Verdünnung ergab eine Zellkonzentration von 100 Zellen/ml. Eine weitere 1:10-Verdünnung führte zu einer Zellkonzentration von 10 Zellen/ml. Von diesem Ansatz wurden jeweils 100 µl in die Vertiefungen zweier 96-Loch-Platten pipettiert, so daß in jeder Vertiefung im Schnitt 1 Zelle enthalten ist. Weiterhin wurden in die jeweiligen Vertiefungen zusätzlich 100 µl Medium dazugegeben.

Von dem letzten Ansatz wurden anschließend 6 ml Zellsuspension entnommen und mit 14 ml Medium verdünnt. Hieraus ergab sich eine Zellkonzentration von 3 Zellen/ml. Hiervon wurden 100 µl in jede Vertiefung von weiteren zwei 96-Loch-Platten pipettiert, wodurch sich in jeder Vertiefung im Schnitt 0.3 Zellen befanden. Zu diesen 100 µl Zellsuspension wurden weitere 100 µl Medium dazugegeben.

Die 96-Loch-Platten wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ über 10 Tage inkubiert. Über diesen Zeitraum erfolgte kein Mediumwechsel.

2. Material und Methoden

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Klonierungseffizienz bestimmt. Hierzu wurden die Platten unter dem Mikroskop auf das Vorhandensein von Klonen überprüft.

% Klonierungseffizienz = Anzahl der Klone * 100 / Anzahl der Vertiefungen

Sobald die Kolonien erkennbar waren, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu wurden 100 µl der Zellsuspension entnommen und durch 100 µl frisches Medium ergänzt.

Zum Expandieren der Klone wurde der Inhalt jeder Vertiefung zunächst in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte überführt und mit 1 ml Klonierungsmedium (2.1.7.3.) versetzt. War das Medium innerhalb weniger Tage verbraucht, wurde die Hälfte der zu expandierenden Kolonie (0.5 ml) aus der Vertiefung in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte pipettiert und mit 2 ml Klonierungsmedium verdünnt. Das anschließende Umsetzen der Kolonie erfolgte durch eine Entnahme von 2 ml Zellsuspension, deren Überführung in eine 25 cm²-Zellkulturflasche und Verdünnung mit 6 ml Klonierungsmedium.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung enzymatischer Eigenschaften der rekombinanten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A aus Vogelerthrozyten

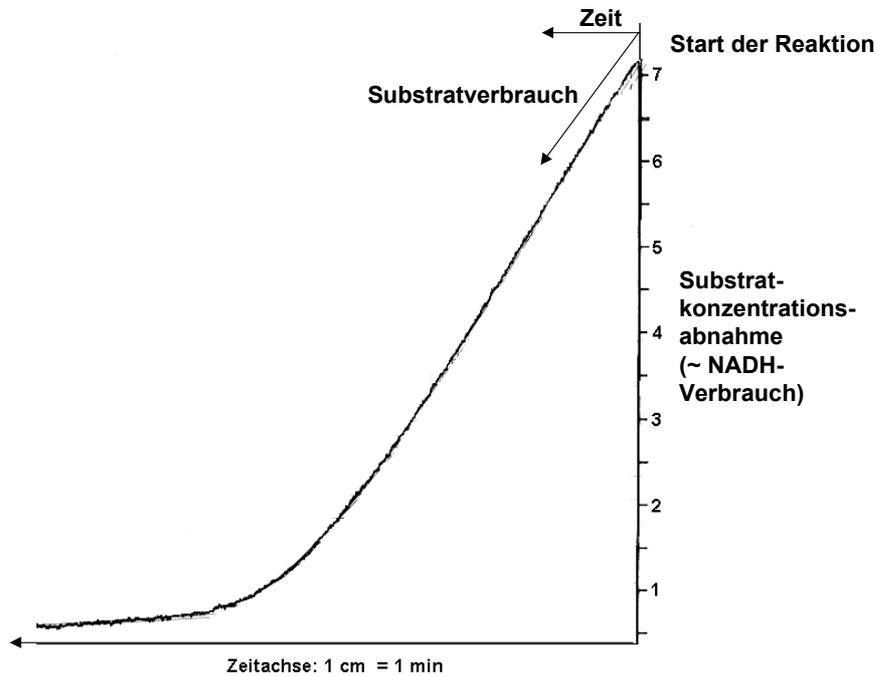
Die in dieser Arbeit verwendete rekombinante Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase aus Hühnererythrozyten stellt die katalytische Domäne mit sich N-terminal anschließender CaM-Bindungsdomäne der Isoform A dieser Spezies dar, welche in ihren enzymatischen Eigenschaften nicht vom aus Erythrozyten isolierten Enzym unterscheidet. Dieses Enzym weist in der Aminosäuresequenz des rekombinanten Polypeptides eine 79 %ige Homologie zur humanen Isoform A auf. Sie besitzt in der Vollängenform auch einen sehr ähnlichen N-Terminus, während die Homologien zu anderen Isoformen signifikant niedriger liegen (Bertsch et al., 1999).

3.1.1. Bestimmung des $K_{m,app}$ -Wertes für D-Ins(1,4,5)P₃ in Gegenwart von variiertem Produkt Ins(1,3,4,5)P₄ und von variablem ATP

Die Bestimmung des apparenten K_m -Wertes ($K_{m,app}$) für D-Ins(1,4,5)P₃ erfolgte mit Lösungen des Isomers verschiedener Konzentrationen (2 - 25 μ M). Weiterhin wurde die ATP-Konzentration (125 - 1000 μ M) in jedem Testansatz variiert (Kap. 2.2.2.). Die Messungen bei variiertem Ins(1,4,5)P₃ erfolgten jeweils durch die Analyse sogenannter „single-transients“ (Gutfreund, 1971), bei denen die mit unterschiedlichen Konzentrationen an D-Ins(1,4,5)P₃ gestarteten Reaktionen bis zur kompletten Substratumsetzung verfolgt wurden (Abb. 3.1.).

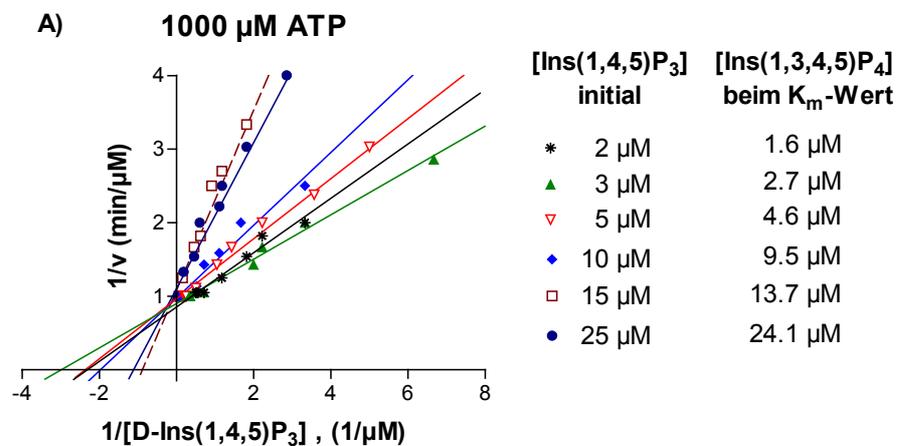
In Abb. 3.2. sind die resultierenden Ergebnisse der Analysen der Umsatzgeschwindigkeiten bei bestimmten Ins(1,4,5)P₃-Konzentrationen mittels doppelt-reziproker Auftragung nach Lineweaver-Burk dargestellt.

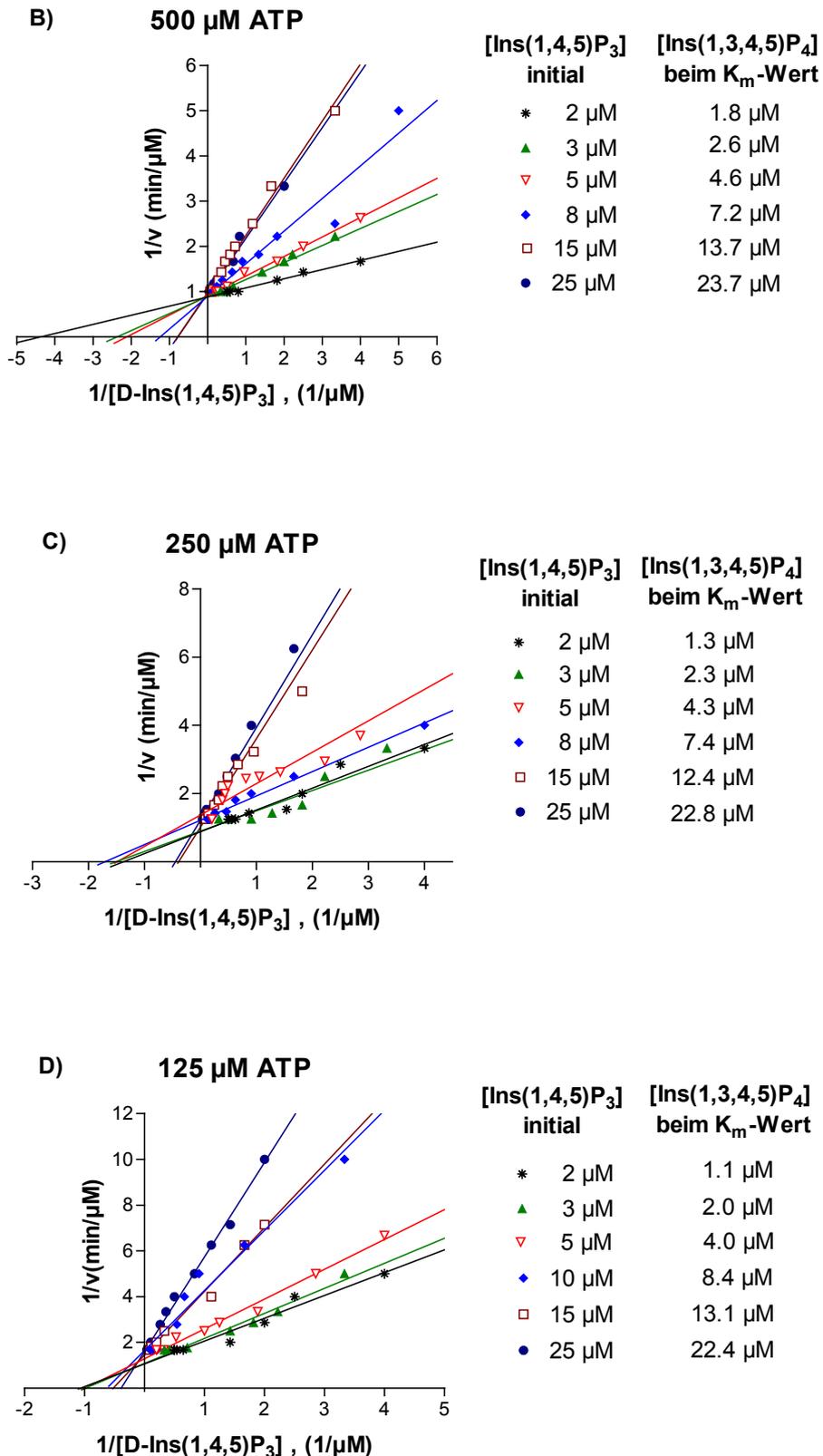
Abb. 3.1.: Darstellung einer Messung zur Bestimmung des $K_{m,app}$ -Wertes für D-Ins(1,4,5)P₃ mittels „single-transient“



Die Reaktion wurde mit 7 μM des Substrates D-Ins(1,4,5)P₃ gestartet und bis zur vollständigen Substratumsetzung verfolgt (Kap. 2.2.2.). Die Auswertung erfolgte durch die Anlegung einer Tangente an einzelnen Punkten der Kurve, die eine bestimmte Substratkonzentration darstellen. Mit Hilfe des Steigungsdreiecks der Tangente wird die Umsatzgeschwindigkeit bei der jeweiligen Substratkonzentration erhalten.

Abb. 3.2.: A-D: $K_{m,app}$ -Werte für D-Ins(1,4,5)P₃ in Abhängigkeit von der ATP- sowie der initialen D-Ins(1,4,5)P₃-Konzentrationen (Darstellung nach Lineweaver-Burk)





Die Messungen wurden im jeweiligen Testansatz bei konstanten ATP-Konzentrationen (125 μM - 1000 μM) und variierenden initialen D-Ins(1,4,5)P₃-Konzentrationen durchgeführt (Kap. 2.2.2.). Die Darstellung zeigt die Abhängigkeit des K_{m,app}-Wertes von Ins(1,4,5)P₃ sowohl von der eingesetzten ATP-Konzentration als auch von der am K_{m,app}-Wert vorhandenen Ins(1,3,4,5)P₄-Konzentration.

Die linearen Regressionsgeraden (Abb. 3.2.) und die Abzisse bilden einen Schnittpunkt. Der Betrag des reziproken Wertes dieses Punktes liefert die apparente Michaelis-Menten-Konstante ($K_{m,app}$ -Wert, $|1/-x| = K_m$).

Bei geringen initialen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentrationen (2 - 5 μM) liegt ein apparenter K_m -Wert von 0.37 +/- 0.07 μM vor. Unter Verwendung höherer initialer Substratkonzentrationen (10 - 25 μM) wurde eine 2 - 3-fache Erhöhung des apparenten K_m -Wertes auf 0.81 - 1.28 μM verzeichnet. Dieser Anstieg resultiert aus der Produkthemmung durch $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, das während der Umsetzung gebildet wird und im Bereich der Substratkonzentration um den K_m -Wert eine Konzentration von 50 - 95 % der initialen Substratkonzentration aufweist. Es handelt sich hier offensichtlich um eine kompetitive Produkthemmung durch $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, bei der das Produkt um die Substratbindungsstelle am aktiven Zentrum des Enzyms konkurriert. Das zum $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ umgesetzte D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ verhindert dadurch die Anlagerung eines neuen Substratmoleküls.

Geringe ATP-Konzentrationen (125 - 250 μM) führten wegen Untersättigung der ATP-Bindungsstelle phänomenologisch zum gleichen Effekt wie höhere Substratkonzentrationen. Der apparente K_m -Wert für D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ stieg um Faktor 2 - 3 auf Werte von 0.94 μM bis 2.60 μM .

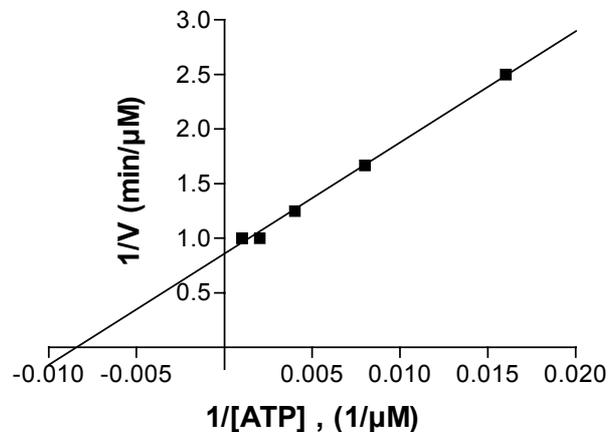
Die Bestimmung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) der Reaktion erfolgte mittels einer optimalen Enzymkonzentration (4.8 nM) und einer initialen sättigenden Konzentration an Substraten. Die Anfangskonzentrationen von D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und ATP betragen 25 μM sowie 1000 μM . Unter Zuhilfenahme der ermittelten V_{max} (1 $\mu\text{M}/\text{min}$) wurden die sog. spezifische Aktivität (4.3 U/mg) und die katalytische Konstante (k_{cat} , 208 min^{-1}) berechnet.

3.1.2. Bestimmung des $K_{m,app}$ -Wertes für ATP

Zur Bestimmung des apparenten K_m -Wertes der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A für ATP wurden die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten (V_{max}) bei variierenden ATP-Konzentrationen (125 - 1000 μM) und einer initialen sättigenden Konzentration an D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ von 25 μM gemessen.

In Abb. 3.3. werden die Ergebnisse mittels doppelt-reziproker Auftragung nach Lineweaver-Burk dargestellt.

Abb. 3.3.: Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität in Abhängigkeit der ATP-Konzentration (Darstellung nach Lineweaver-Burk)



Der apparente K_m -Wert der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A für ATP wurde unter Substratsättigung für D-Ins(1,4,5)P₃ (25 μM) gemessen (Kap.2.2.2.). Die reziproken Werte der daraus resultierenden Umsatzgeschwindigkeiten wurden gegen die jeweiligen reziproken Werte der ATP-Konzentrationen aufgetragen.

Mittels des Schnittpunktes der linearen Regressionsgeraden und der Abzisse (Abb. 3.3.) konnte ein apparenter K_m -Wert für ATP von 125 μM berechnet werden.

Die maximale spezifische Aktivität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A betrug 4.9 U/mg.

3.2. Screening nach Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität

Zur Aufklärung der Rolle der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A sowie der höher phosphorylierten Inositole in der intakten Zelle wurde ein umfangreiches Screening von chemischen und pflanzlichen Verbindungen auf einen Hemmeffekt am Enzym durchgeführt.

Die Inhibierung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität wurde aufgrund von Veröffentlichungen über Proteinkinase-, Phospholipase C- sowie Phosphatidylinositol 3-Kinasehemmstoffe (Matter et al., 1992; Ruckstuhl et al., 1979; Sanger et al., 1977; Srivastava, 1985) mit zahlreichen Substanzen aus der Gruppe der Flavonoide (Tab. 3.1.) durchgeführt.

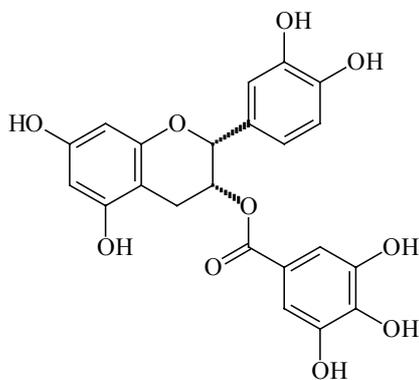
Anhand der unter Substratsättigung durchgeführten Messungen (Kap. 2.2.3.), bei denen der Hemmstoff stufenweise bis zum Erreichen des maximalen Hemmeffekts bzw. einer Konzentration von 100 μM dazupipettiert wurde, konnten aus der Gruppe der Flavonoide fünf Verbindungen mit submikromolaren IC₅₀-Werten identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um Quercetin, Myricetin, Myricetintrimethylether, Amentoflavon und 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon (Tab. 3.1.).

Im Gegensatz zu Quercetin hemmten Catechin und Epicatechin (Flavan-3-ol-Derivate) die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A in einem deutlich geringeren Maße (IC₅₀: > 100 µM). Die Catechin-Derivate, die am C3-Atom des Chromonringsystems einen Gallussäuresubstituenten tragen, Epicatechingallat (ECG, Abb. 3.4.) und Epigallocatechingallat (EGCG, Abb. 3.4.), verursachten einen starken Hemmeffekt der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität. Die IC₅₀-Werte des ECG sowie EGCG betragen 94 nM und 120 nM.

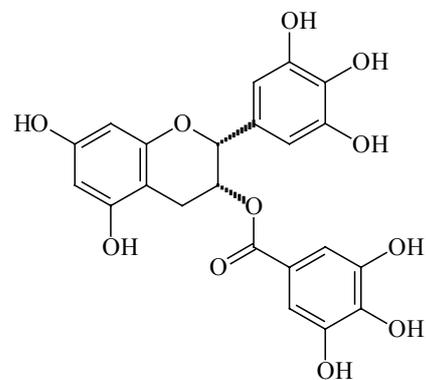
Das Stereoisomer des ECG's (-)-Catechin-3-gallat zeigte einen um den Faktor 500 erhöhten IC₅₀-Wert.

Abb. 3.4.: Strukturen von a) ECG und b) EGCG

a)



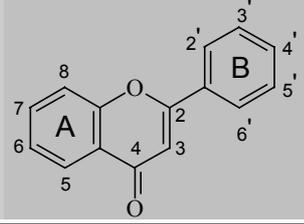
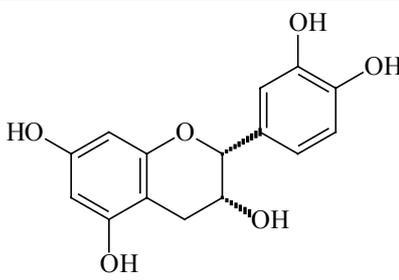
b)



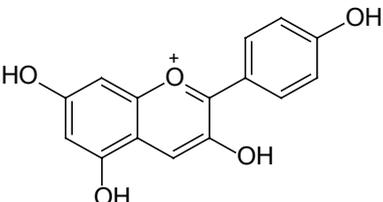
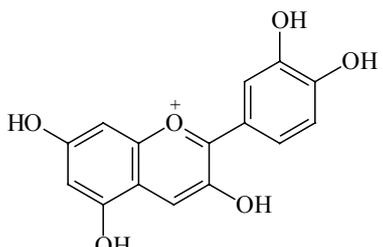
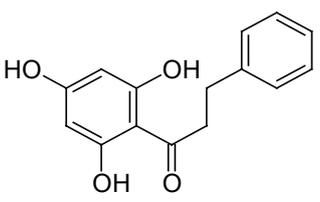
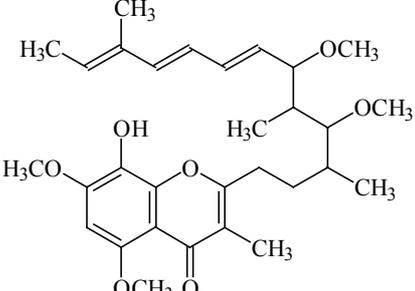
Aus der Gruppe der Isoflavone wurden Genistein und Daidzein (Tab. 3.1.), potente Tyrosinkinasehemmstoffe (Akiyama et al., 1987; Spinozzi et al., 1994; Tamaoki & Nakano, 1990), getestet. Diese Substanzen besitzen in Bezug auf die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität eine schwache Hemmwirkung (IC₅₀: 116 µM und 131 µM).

3. Ergebnisse

Tab. 3.1.: Flavonoide als Hemmstoffe der Ins(1,4,5)₃ 3-Kinaseaktivität

Grundkörper	Verbindung											IC ₅₀ [μM]
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	
Flavonol	Quercetin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	0.18
	Myricetin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	0.54
	Myricetintrimethylether	OH	OH	H	OH	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	0.75
	Fisetin	OH	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	1.9
	Galangin	OH	OH	H	OH	H	H	H	H	H	H	2.3
	Robinetin	OH	H	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	2.3
	Kaempferol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	3.9
	Morin	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	H	10.3
	Rutin	= Quercetin-3-O-(6-O-rhamnosyl) glucosid										32.1
Flavon	3',4',7,8-(OH) ₄ -flavon	H	H	H	OH	OH	H	OH	OH	H	H	0.29
	Amentoflavon	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	8-Apigenin	H	0.50
	Luteolin	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	3.0
	Chrysin	H	OH	H	OH	H	H	H	H	H	H	3.1
	Baicalein	H	OH	OH	OH	H	H	H	H	H	H	7.0
	Apigenin	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	8.3
	3',4'-(OH) ₂ -flavon	H	H	H	H	H	H	OH	OH	H	H	17.7
	3',4',7,8-(OCH ₃) ₄ -flav.	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	> 50
	3',4',5',5',7-(OCH ₃) ₅ -flav.	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	> 50
	4'-NH ₂ -6-OH-flavon	H	H	OH	H	H	H	H	NH ₂	H	H	75.0
Flavanon	(±)-Naringenin	= 2,3-Dihydroapigenin										18.0
Flavanonol	(±)-Taxifolin	= 2,3-Dihydroquercetin										58.0
Isoflavon	Genistein	C ₆ H ₅	OH	H	OH	H	2 = H					116
	Daidzein	C ₆ H ₅	H	H	OH	H	2 = H					131
Flavan-3-ol	(-)-Epicatechin											>200
	(+)-Catechin	H,OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	110

Tab. 3.1.: Fortsetzung

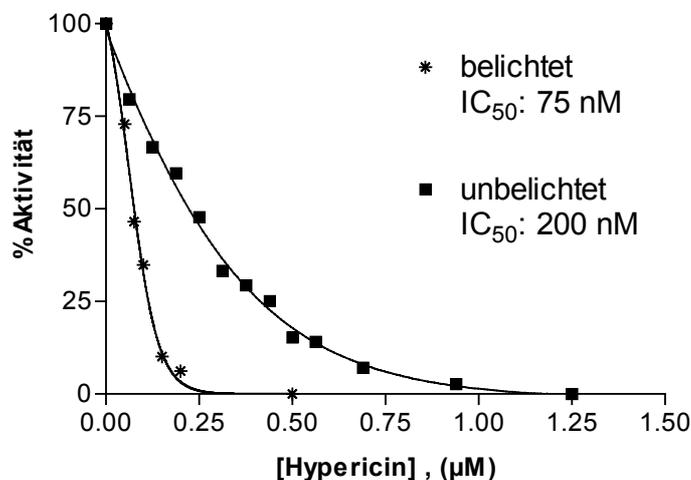
Grundkörper	Verbindung	Struktur	IC ₅₀ [μM]
Anthocyanidin	Pelargonidin		8.6
	Cyanidin		9.9
Chalkon	Phloretin		19.0
andere Flavonoide	Stigmatellin		31.4

Die Substanzen Hypericin (Abb. 3.10.) und Pseudohypericin zeigen Hemmeffekte an Proteinkinasen (Takahashi et al., 1989). Aufgrund dessen wurde der Einfluß dieser Proteinkinasehemmstoffe bezüglich der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität untersucht.

Das Hypericin besitzt eine photodynamische Aktivität. Deswegen wurden die Messungen sowohl im Dunkeln als auch nach vorheriger Bestrahlung der Probe mit Laborlicht durchgeführt (Kap. 2.2.3.1.).

Aus diesen Messungen (Abb. 3.5.) stellt sich Hypericin als weiterer potenter Hemmstoff der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A dar {IC₅₀: 200 nM (Dunkelheit), 75 nM (Bestrahlung)}.

Abb. 3.5.: Hemmeffekte von Hypericin in An- und Abwesenheit von Laborlicht

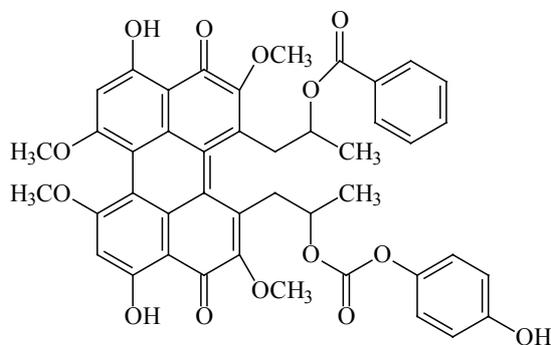


Die Hemmeigenschaften von Hypericin an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A wurden wie im Kap. 2.2.3.1. beschrieben durchgeführt. Der Hypericin-Enzym-Komplex wurde mit Laborlicht 15 Minuten bestrahlt. Anschließend erfolgten die Messungen der Enzymaktivitäten unter Anwendung eines gekoppelten optischen Tests (Kap. 2.2.2.), indem die Reaktionen mit 25 µM D-Ins(1,4,5)P₃ gestartet und die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten gemessen wurden.

Dagegen konnte für Pseudohypericin nur ein deutlich höherer IC₅₀-Wert von 2.4 µM gemessen werden.

Ebenso wurde Calphostin C (Abb. 3.6.), ein Perylenchinonanalogon des Hypericins (Kobayashi et al., 1989; Bruns et al., 1991), getestet und ein IC₅₀-Wert von 1.0 µM gemessen. Die Messungen mit Calphostin C und mit Pseudohypericin wurden unter Lichtausschluß durchgeführt.

Abb. 3.6.: Struktur von Calphostin C

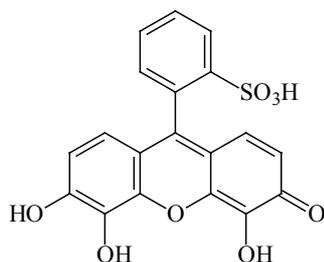


Aus der Gruppe der Triphenylmethane als entfernte Strukturanaloga von ECG konnten Pyrogallolrot (Abb. 3.7.) sowie Brompyrogallolrot als spezifische Inhibitoren des Enzyms mit IC_{50} -Werten von $0.90 \mu\text{M}$ bzw. $1.04 \mu\text{M}$ identifiziert werden.

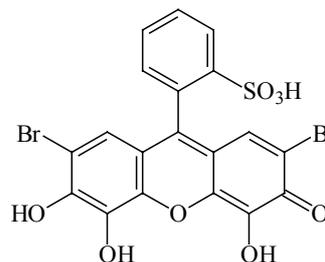
Der beste Triphenylmethanhemmerstoff war jedoch Aurintricarbonsäure (ATA) mit einem IC_{50} -Wert von $0.15 \mu\text{M}$ (Tab. 3.2., Abb. 3.10.).

Abb. 3.7.: Strukturen von a) Pyrogallolrot und b) Brompyrogallolrot

a)



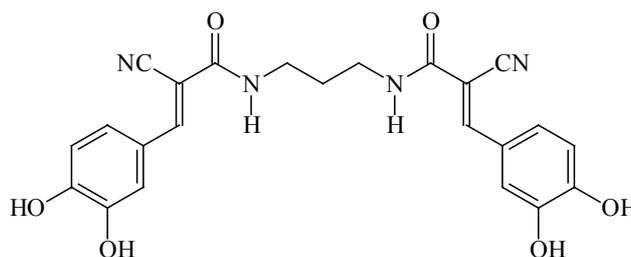
b)



Anthrachinone, die in der Literatur als Hemmstoffe der Topoisomerase II (Lee et al., 1996) beschrieben wurden, wurden ebenfalls auf einen Hemmeffekt am Enzym analysiert (Tab. 3.2.). Von diesen Verbindungen wurde Chinalizarin als der potenteste Hemmstoff (IC_{50} : $2.40 \mu\text{M}$) identifiziert. Adriamycin, in der Literatur als ein potenter Inhibitor der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase (da Silva et al., 1994) beschrieben, wurde auch analysiert. Allerdings zeigte diese Substanz weder als Aglykon (IC_{50} : $62 \mu\text{M}$), hergestellt durch eine Säurehydrolyse, noch als Glykosid (IC_{50} : $> 200 \mu\text{M}$) gute Hemmeigenschaften.

Aus der Gruppe der Tyrphostine, die als Proteintyrosinkinase-Inhibitoren bekannt sind (Gazit et al., 1991), konnte das Bis-Tyrphostin als ein guter Hemmstoff der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A identifiziert werden (Abb. 3.8., IC_{50} : $0.7 \mu\text{M}$).

Abb. 3.8.: Struktur des Bis-Tyrphostins



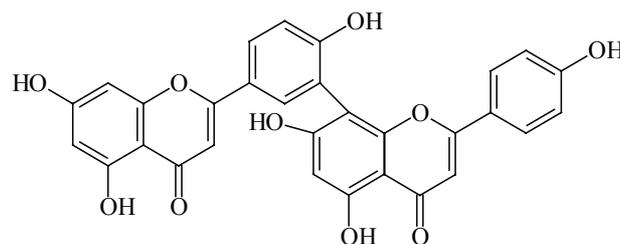
Weiterhin wurde Wortmannin, ein sehr potenter Hemmstoff der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-Kinase) (Sarkaria et al., 1998) auf einen Hemmeffekt untersucht. Diese Verbindung zeigte an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A bei weitem keine so stark ausgeprägte Hemmung (IC₅₀: 2.3 µM) wie an der PI 3-Kinase (IC₅₀: 5 nM).

Basierend auf der für Flavonoide ermittelten Struktur-Funktionsbeziehung wurden die Verbindungen Gossypol (polyphenolisches Binaphthalin) und Ellagsäure (phenolisches Bislakton) auf einen Hemmeffekt untersucht (Abb. 3.10.). Die beiden Substanzen erwiesen sich als sehr potente Inhibitoren des Enzyms, wobei Gossypol und Ellagsäure von allen bisher untersuchten Stoffen die höchst potenten Hemmstoffe darstellten (IC₅₀: Gossypol: 58 nM, Ellagsäure: 36 nM).

Da die meisten der als Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A identifizierten Verbindungen strukturell eine Art von Symmetrie von phenolischen Carbonylgruppen-tragenden Substrukturen („Zweihändigkeit“) aufweisen, wurden weiterhin Biflavonoide auf einen Hemmeffekt an diesem Enzym untersucht.

Apigenin, als Monomer ein schwacher Hemmstoff der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A (IC₅₀: 8.3 µM), weist als Dimer, wie im daraus resultierenden Amentoflavin (Abb. 3.9.), eine um den Faktor 10 erhöhte Potenz (IC₅₀: 0.50 µM) auf.

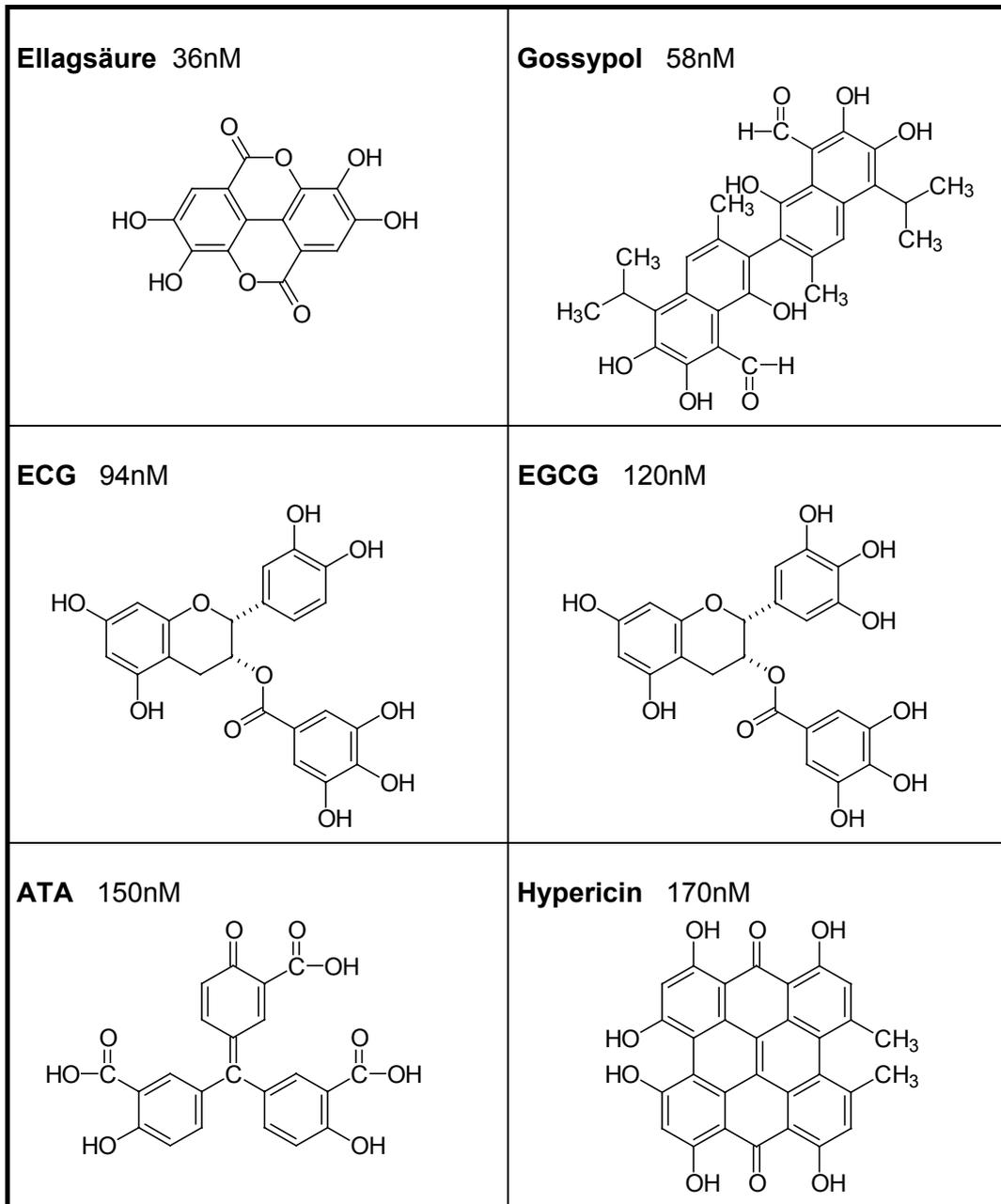
Abb. 3.9. Struktur des Amentoflavons



Tab. 3.2.: Verbindungen aus weiteren Stoffklassen als Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

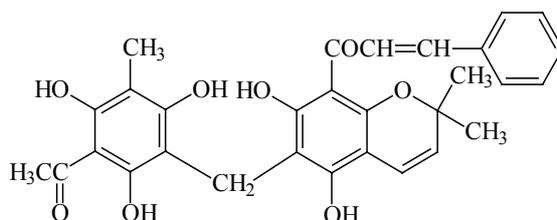
Stoffklassen	Inhibitoren	IC ₅₀ [µM]
Triphenylmethane	Aurintricarbonsäure (ATA)	0.15
	Pyrogallolrot	0.90
	Brompyrogallol Rot	1.04
	Bengalrosa B	3.12
	Fluoresceinisothiocyanat	3.80
	Säurefuchsin	6.00
Anthrachinone	Chinalizarin	2.50
	Rhein	6.20
	Purpurin	9.50
	Aloin	21.50
	Emodin	54.40
	Adriamycin-Adlvkon	62.00
	Daunomycin	93.50
	Doxorubicinol	>100
Cumarine	Warfarin	>200
	Aesculetin	>200
Tyrphostine	Bis-Tyrphostin Phase I (biphasische Hemmung) Phase I	0.70 1.89
	Tyrphostin A 51	15.40
	Tyrphostin B 46	24.40
	Tyrphostin B 42	41.80
Phenylacrylsäuren	Rosmarinsäure	90
	Chlorogensäure	100
Naphthodianthron	Hypericin	0.20
	Calphostin C	1.00
	Pseudohypericin	2.40
Stilbene	Piceatannol	15.30
	Resveratrol	100
andere Substanzen	Rottlerin	1.21
	Wortmannin	2.30
	Haematein	3.10
	NDGA (Larrea divaricata)	7.60
	Curcumin	8.20
	KT 5926	9.40
	Embonsäure	15.40
	Staurosporin	23.90
	L-Thyroxin	27.00
	ST 638	29.90
	Lavendustin A	31.50
	Taxol (Paclitaxel)	> 50
	Ecdysteron	72.30
	Zearalenon	> 100
	D/L-Laudanosolin	101
	Compound-5-Methyl Ester	190
	Tetracyclin	200
	Etoposid (VP-16)	> 200
	Biopterin	> 200
	Herbimycin A	> 200
Rapamycin	> 200	

Abb. 3.10.: Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A mit IC₅₀-Werten ≤ 200 nM



Ein weiterer Proteinkinasehemmer, das Rottlerin (Abb. 3.11., Gschwendt et al., 1994), welches ebenfalls eine „Zweihändigkeit“ aufweist, konnte ebenso als ein potenter Hemmstoff (IC_{50} : 1.21 μ M) identifiziert werden.

Abb. 3.11.: Struktur des Rottlerins

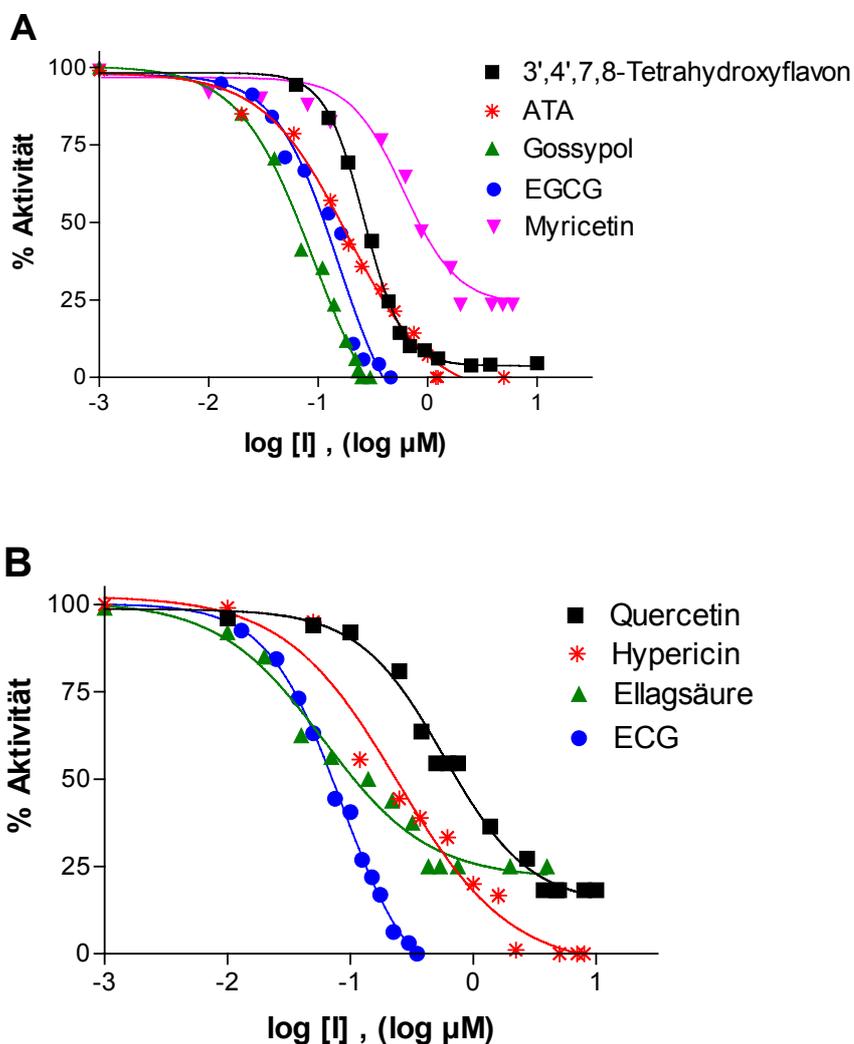


Nicht alle der hoch potenten Inhibitoren zeigten eine komplette Inaktivierung der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinaseaktivität unter hohen Hemmstoffkonzentrationen. Eine vollständige Hemmung der Enzymaktivität ($\geq 97\%$) konnte für Gossypol, ECG, EGCG, Hypericin; ATA und 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon gemessen werden. Dagegen hemmte Ellagsäure die $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A bis zu 75 %, Quercetin zu 80 % und Myricetin zu 85 %. Es gab hierbei keine Korrelation zwischen Hemmstoffpotenz und Vollständigkeit der Hemmung.

Basierend auf diesen umfangreichen Messungen konnten insgesamt neun sehr potente Hemmstoffe (IC_{50} : $< 0.6 \mu$ M) der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A gefunden werden (Abb. 3.12. A,B).

Die meisten von diesen Inhibitoren wurden weiterhin auf ihren Hemmeffekt an der humanen $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase B getestet. Diese Isoform ist ubiquitärer als die Isoform A, die nur in Neuronen und Testis und zumindest bei Vögeln auch in Erythrozyten exprimiert wird. Deshalb sollte die Frage geklärt werden, ob die Inhibitoren der A-Form auch die Aktivität der weiter verbreiteten B-Isoform hemmen können.

Abb. 3.12. A,B: Hemmeffekte der potentesten Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A



Die Inhibierung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität wurde unter Substratsättigung für D-Ins(1,4,5)P₃ durchgeführt. Die Hemmstoffe wurden während der Periode der maximalen Umsatzgeschwindigkeit stufenweise dazupipettiert (Kap. 2.2.3.). Der Prozentsatz der Aktivität wurde gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration ([I]) aufgetragen.

Bei diesen Messungen stellte sich heraus, daß Hypericin, ATA und Chinalizarin ähnliche oder niedrigere IC₅₀-Werte im Vergleich zum rekombinanten Enzym aus Hühnererythrozyten aufwiesen (Tab. 3.3.).

Tab. 3.3.: Hemmeffekte der potentesten Inhibitoren an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A aus Vogelerythrozyten und an der humanen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B

Inhibitor	Vogel-A-Isoform		Humane B-Isoform	
	IC ₅₀ [nM]	% max.	IC ₅₀ [nM]	% max.
Ellagsäure	36	75	220	92
Gossypol	58	100	340	100
ECG	94	100	560	100
EGCG	120	100	2750	100
ATA	150	100	110	100
Hypericin	170	100	210	100
Quercetin	180	80	1250	97
3',4',7,8-(OH) ₄ -flavon	290	97	3400	79
Myricetin	540	85	4200	61
Chinalizarin	2500	100	1690	100

Die Messungen der Hemmeffekte an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A aus Vogelerythrozyten und an der humanen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B erfolgten wie in Kap. 2.2.3. beschrieben. Es wurden sowohl die IC₅₀-Werte als auch die maximalen Hemmeffekte (% max.) der potentesten Inhibitoren analysiert.

3.3. Hemmstoffeinflüsse auf die Kopplungsenzyme

Da der Standardreaktionsmix als Kopplungsenzyme L-Lactatdehydrogenase sowie Pyruvatkinase enthält, wurden alle sehr potenten Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A auf einen Hemmeffekt an diesen Enzymen untersucht (Kap. 2.2.4.).

Bei keinem der getesteten Hemmstoffe konnte eine Hemmung der Aktivität der Kopplungsenzyme beobachtet werden.

3.4. Einfluß des Photometerlichtes ($\lambda = 339$ nm) auf lichtempfindliche Hemmstoffe

Um den Einfluß des Photometerlichtes (Wellenlängenmaximum: 339 nm \pm 2 nm) auf die Aktivität der lichtempfindlichen Hemmstoffe festzustellen, wurden Kontrollmessungen mit drei Inhibitoren durchgeführt (Kap. 2.2.5.).

Wurde die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A mit Hypericin in einem Reaktionsansatz, der als Substrat 500 μ M ATP enthielt, für 15 Minuten mit dem Photometerlicht bestrahlt, zeigte das Enzym nach dem Start der Reaktion mit 25 μ M D-Ins(1,4,5)P₃ eine Aktivität von 50.4 %.

Wurde Hypericin erst nach der Zugabe von D-Ins(1,4,5)P₃ zum vorher bestrahlten Testansatz pipettiert, konnte eine Enzymaktivität von 52.7 % gemessen werden. Der Grad der Hemmung ist demnach unabhängig von der Bestrahlung mit Photometerlicht ($\lambda = 339 \text{ nm}$, Tab. 3.4.).

Dieses Ergebnis konnte auch für ATA festgestellt werden.

Wurde hingegen Ellagsäure in einem Testansatz mit dem Enzym und ATP für 15 Minuten bestrahlt, wurde ein stärkerer Hemmeffekt gemessen als im Reaktionsmix, der nur die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A und ATP aber keinen Hemmstoff enthielt. Dieses deutet auf eine signifikante „Photoaktivierung“ von Ellagsäure durch das Photometerlicht bei 339 nm hin. Dagegen scheint Hypericin leichter durch sichtbares Neonröhrenlicht (Lablight) aktiviert zu werden (Abb. 3.5.).

Erfolgte die Bestrahlung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A mit Hypericin im Testansatz, der das Substrat D-Ins(1,4,5)P₃ enthielt, konnte nach dem Start der Reaktion mit 500 μM ATP eine Enzymaktivität von 68.6 % gemessen werden. Wurde dieser Inhibitor erst nach der Bestrahlung des Enzyms zum Testansatz pipettiert, konnte nur eine um 2.5 % geringere Aktivität beobachtet werden. Der Grad der Hemmung ist auch in diesem Fall unabhängig von der Bestrahlung mit Photometerlicht (Tab. 3.4.).

Dagegen konnte durch die Bestrahlung des Ellagsäure/Enzym-Komplexes eine um 13.8 % geringere Kinaseaktivität analysiert werden als im Reaktionsmix, der nur die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A und D-Ins(1,4,5)P₃ enthielt. Dieses deutet abermals auf eine signifikante Photoaktivierbarkeit der Ellagsäure durch das Photometerlicht hin.

Wurde ATA im Testansatz, der D-Ins(1,4,5)P₃ und das Enzym enthielt, vor dem Start der Reaktion bestrahlt, wurde ein um 6.7 % geringerer Hemmeffekt gemessen als im bestrahlten Reaktionsmix, der nur die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A und ATP enthielt. ATA wird scheinbar durch das Photometerlicht „photoinaktiviert“.

Tab. 3.4.: Einfluß des Photometerlichtes ($\lambda = 339 \text{ nm}$) auf die Hemmeffekte von lichtempfindlichen Inhibitoren

Inhibitor	Testansatz (500 μM ATP)		Testansatz (25 μM InsP ₃)	
	Bestrahlung von:		Bestrahlung von:	
	Inhibitor/Enzym-Komplex	Enzym	Inhibitor/Enzym-Komplex	Enzym
	% d. max. Enzymaktivität		% d. max. Enzymaktivität	
Hypericin	50.4	52.7	68.6	66.1
ATA	8.8	6.8	26.6	19.9
Ellagsäure	19.3	61.4	50.0	63.8

Die Analyse des Einflusses des Photometerlichtes auf die Hemmeigenschaften lichtempfindlicher Verbindungen wurde wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben durchgeführt. Es wurden zwei Testansätze, die den Inhibitor, die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A sowie ATP bzw. D-Ins(1,4,5)P₃ oder nur die Kinase und ein Substrat enthielten, mit Photometerlicht für 15 Minuten bestrahlt. Nach dem Start der Reaktion wurde der prozentuale Anteil der maximalen Enzymaktivität gemessen.

3.5. Einfluß der potenten Hemmstoffe auf den $K_{m,app}$ -Wert für ATP und Ins(1,4,5)P₃

Alle hoch potenten Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A (Ellagsäure, Gossypol, Hypericin, ATA, Quercetin, ECG, EGCG, Myricetin) wurden auf ihr mögliches kompetitives Verhalten gegenüber den Substraten ATP und D-Ins(1,4,5)P₃ untersucht (Kap. 2.2.6. und Kap. 2.2.7.).

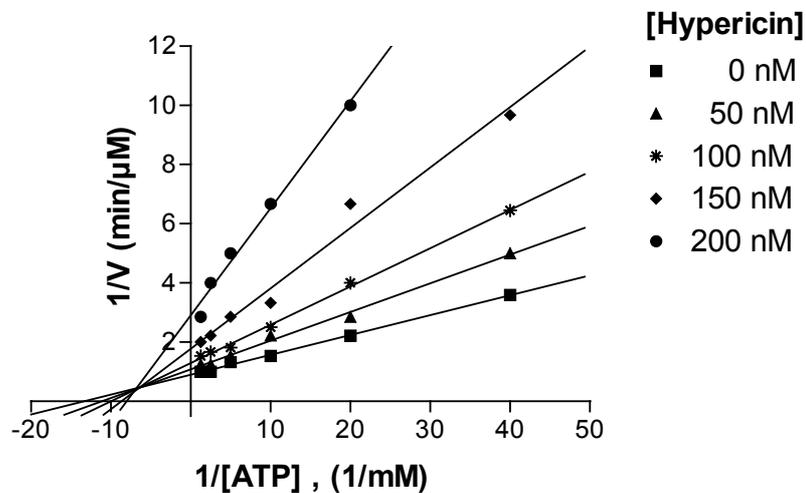
3.5.1. Effekte auf den $K_{m,app}$ -Wert für ATP

Zur Bestimmung der Hemmstoffeinflüsse auf den apparenten K_m -Wert für ATP wurde die Konzentration von D-Ins(1,4,5)P₃ mit 25 μM konstant gehalten. Die ATP-Konzentration (25 μM - 800 μM) sowie die Hemmstoffkonzentration wurden variiert (Kap. 2.2.6).

Die Ergebnisse dieser kinetischen Analyse zeigen, daß alle getesteten Inhibitoren die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max} , 1.16 $\mu\text{M}/\text{min}$) erniedrigten als auch den $K_{m,app}$ -Wert für ATP (125 μM) erhöhten.

Keine dieser Verbindungen ist ein reiner kompetitiver Inhibitor gegenüber dem ATP, sondern es zeigen alle den Typ einer gemischten Hemmung, wie es am Beispiel von Hypericin in Abb. 3.13. dargestellt ist.

Abb. 3.13.: Effekte der potenten Hemmstoffe auf den $K_{m,app}$ -Wert für ATP (Darstellung nach Lineweaver-Burk)

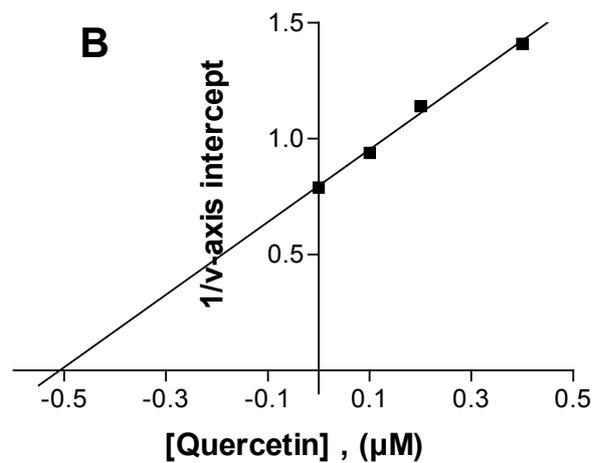
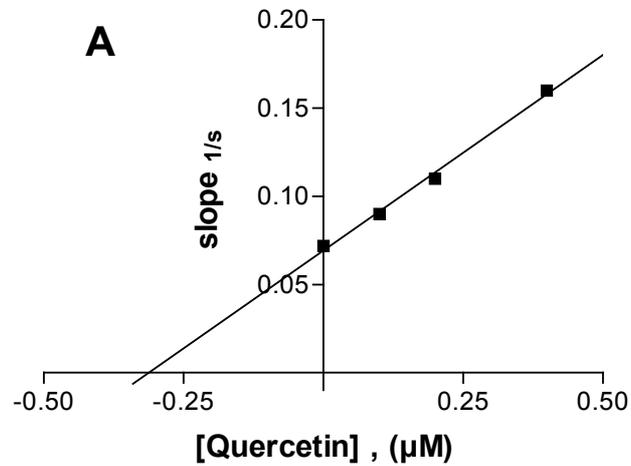


Die Analyse des Hemmstoffeinflusses auf den $K_{m,app}$ -Wert für ATP wurde wie in Kap. 2.2.6. beschrieben durchgeführt. Die Hemmstoffkonzentration sowie die Anfangskonzentration von ATP (25 μM - 800 μM) wurden in den jeweiligen Testansätzen variiert. Die jeweiligen Reaktionen wurden mit 25 μM D-Ins(1,4,5) P_3 gestartet und die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten gemessen.

Zur Bestimmung des linearen oder hyperbolischen Hemmtyps der gemischten Hemmung, wurden in einer Sekundärauftragung nach Segel (Segel, 1993) die Steigungen (slope $_{1/s}$) sowie die Ordinaten Schnittpunkte ($1/v$ -axis intercept), die aus dem Lineweaver-Burk Diagramm erhalten wurden, gegen die zugehörigen Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Wegen der hierbei erhaltenen linearen Abhängigkeiten handelte es sich bei allen getesteten potenten Hemmstoffen um den linearen Typ einer gemischten Hemmung, wie es in Abb. 3.14. am Beispiel von Quercetin dargestellt ist.

Aus den jeweiligen Sekundärauftragungen der potentesten Hemmstoffe wurden weiterhin die Hemmkonstanten (K_i -Werte) sowie der Faktor α ermittelt (Tab. 3.5.).

Abb. 3.14.: A,B: Ermittlung des Hemmtyps der gemischten Hemmung anhand von Sekundärauftragungen der Steigungen (A) und der Ordinatenschnittpunkte (B) am Beispiel von Quercetin



3.5.2. Effekte auf den $K_{m,app}$ -Wert für D-Ins(1,4,5)P₃

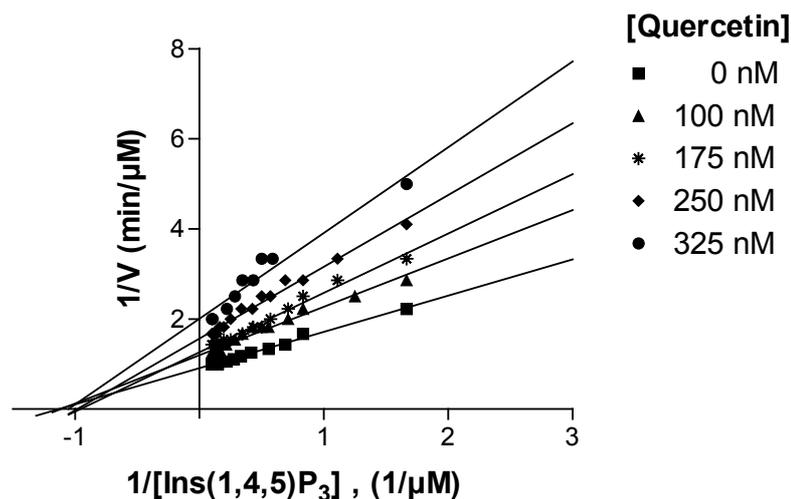
Um den $K_{m,app}$ -Wert für D-Ins(1,4,5)P₃ in Gegenwart eines Hemmstoffes zu bestimmen, wurden die Messungen mit Hilfe von „single-transients“ durchgeführt (Kap. 3.1.1.).

Obwohl es während des Reaktionsablaufes zu einer Akkumulierung des Produktes Ins(1,3,4,5)P₄ und damit zu einer Erhöhung des $K_{m,app}$ -Wertes für D-Ins(1,4,5)P₃ ($K_m' = \text{ca. } 1 \mu\text{M}$) durch Produkthemmung kam, waren diese Messungen geeignet, um rasch zu zeigen, ob ein Inhibitor mit der Bindung von D-Ins(1,4,5)P₃ am Enzym konkurriert.

Zur Bestimmung der Hemmstoffeinflüsse auf D-Ins(1,4,5)P₃ wurde sowohl die initial vorhandene Konzentration von D-Ins(1,4,5)P₃ mit $10 \mu\text{M}$ als auch die ATP-Konzentration ($500 \mu\text{M}$) konstant gehalten, während die Hemmstoffkonzentration variiert wurde (Kap. 2.2.7).

Alle der getesteten potenten Hemmstoffe zeigten einen nichtkompetitiven Hemmtyp in Bezug auf D-Ins(1,4,5)P₃. Sie beeinflussten den K_m' -Wert ($1.01 \mu\text{M}$) nicht, sondern erniedrigten nur die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max} , $1.23 \mu\text{M}/\text{min}$). Dieser Hemmtyp ist am Beispiel von Quercetin in Abb. 3.15. dargestellt.

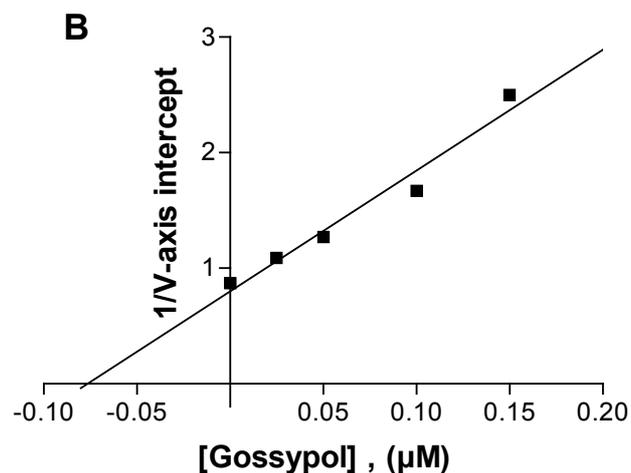
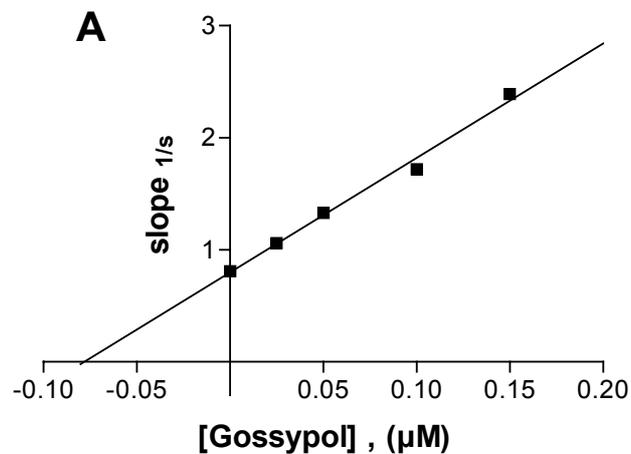
Abb. 3.15.: Einfluß von Quercetin auf den $K_{m,app}$ -Wert für D-Ins(1,4,5)P₃ (Darstellung nach Lineweaver-Burk)



Die Analyse des Hemmstoffeinflusses auf den $K_{m,app}$ -Wert für D-Ins(1,4,5)P₃ wurde wie in Kap. 2.2.7. beschrieben durchgeführt. Die Hemmstoffkonzentration wurde in den jeweiligen Testansätzen variiert, während die Konzentration von ATP mit $500 \mu\text{M}$ konstant gehalten wurde. Die Konzentration für D-Ins(1,4,5)P₃ variierte in den einzelnen Messungen mit Hilfe von „single-transients“ zwischen $10 \mu\text{M}$ und $0 \mu\text{M}$.

Zur Bestimmung eines linearen oder hyperbolischen Hemmtyps der nichtkompetitiven Hemmung wurden in einer Sekundärauftragung die Steigungen (slope $1/s$) sowie die Ordinatenschnittpunkte ($1/v$ -axis intercept), die aus dem Lineweaver-Burk Diagramm erhalten wurden, gegen die zugehörigen Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Aufgrund der hierbei erhaltenen linearen Abhängigkeiten handelte es sich bei allen getesteten potenten Hemmstoffen um den linearen Typ einer nichtkompetitiven Hemmung, wie es in Abb. 3.16. am Beispiel von Gossypol dargestellt ist.

Abb. 3.16.: A,B: Ermittlung des Hemmtyps der nichtkompetitiven Hemmung anhand von Sekundärauftragungen der Steigungen (A) und der Ordinatenschnittpunkte (B) am Beispiel von Gossypol



3. Ergebnisse

Aus diesen jeweiligen Sekundärdiagrammen wurden weiterhin die K_i -Werte der potentesten Hemmstoffe ermittelt (Tab. 3.5.). Die linearen Regressiongeraden und die Abzisse bilden einen Schnittpunkt, der den negativen K_i -Wert signifiziert.

Alle obengenannten kinetischen Inhibitoranalysen wurden mit den in Tab. 3.5. aufgeführten Hemmstoffen durchgeführt. Die Ergebnisse sind dort tabelliert.

Tab. 3.5.: Hemmstoffeinflüsse gegenüber den Substraten D-Ins(1,4,5)P₃ und ATP

Hemmparameter		Nichtkompetitiv in Bezug auf Ins(1,4,5)P ₃		Gemischte Hemmung in Bezug auf ATP			
Hemmstoff	IC ₅₀ ¹ (nM)	K _i ² (nM)	Replots	K _i ³ (nM)	slope replot ^{1/s}	α ⁴	1/v-axis intercept replot
Ellagsäure	36	60	linear	43	linear	3.2	linear
Gossypol	58	77	linear	61	linear	2.8	linear
ECG	94	43	linear	20	linear	4.0	linear
EGCG	120	59	linear	59	linear	3.1	linear
ATA	150	100	linear	96	linear	1.7	linear
Quercetin	180	197	linear	312	linear	1.6	linear
Hypericin	200	156	linear	74	linear	2.0	linear

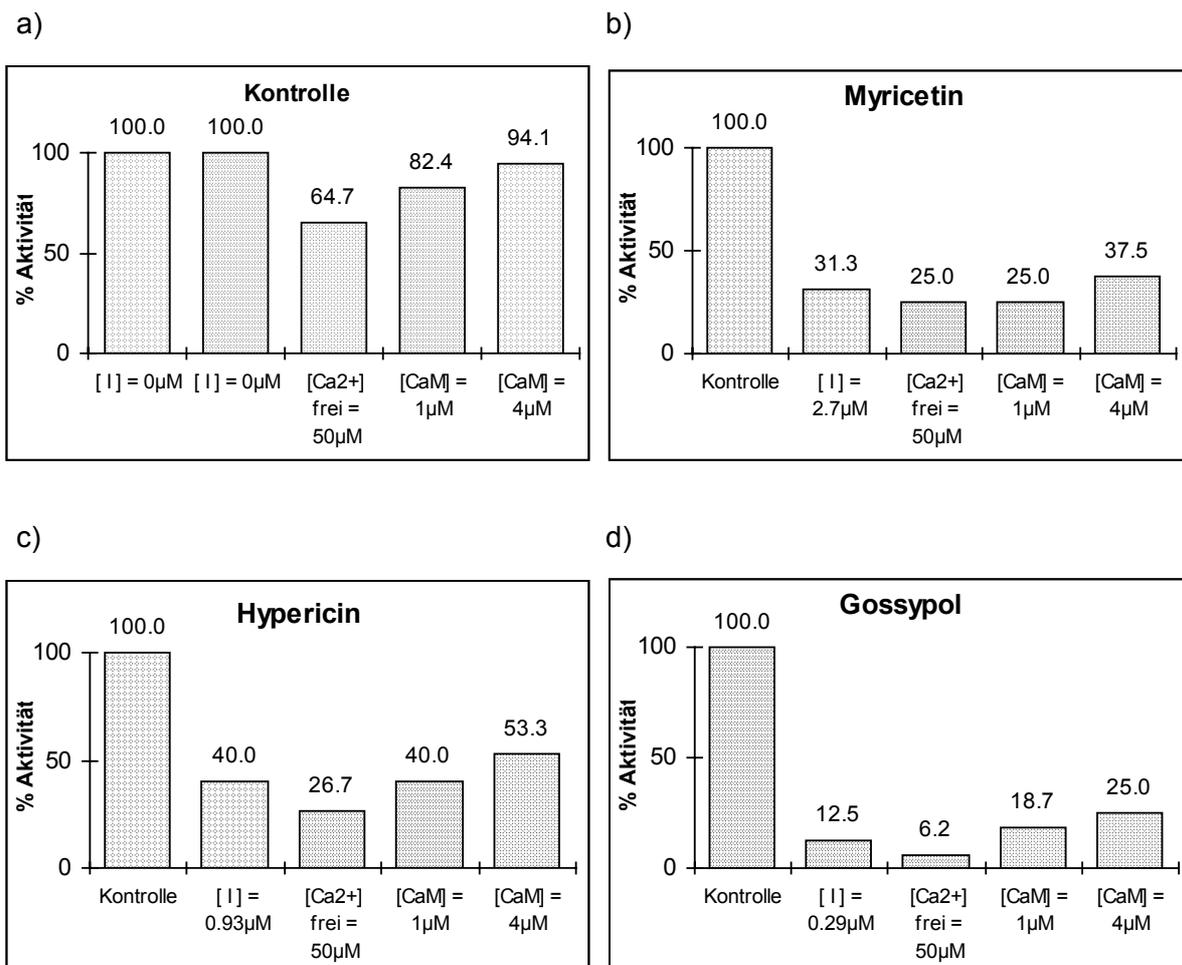
- 1) analysiert unter Substratsättigung für Ins(1,4,5)P₃ (25 μM) und 500 μM ATP (nahezu Substratsättigung für ATP)
- 2) erhalten aus der Sekundärauftragung der Steigungen bzw. der Ordinatenschnittpunkte, resultierend aus der Lineweaver-Burk-Darstellung, gegen die zugehörigen Hemmstoffkonzentrationen (Abb. 3.8.)
- 3) analysiert aus der Sekundärauftragung der Steigungen, resultierend aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm, gegen die zugehörigen Hemmstoffkonzentrationen
- 4) Faktor, um den sich K_i verändert, wenn ATP an den Enzym-Hemmstoff-Komplex bindet. K_i wurde aus der Sekundärauftragung der Steigungen gegen die zugehörigen Inhibitorkonzentrationen erhalten. α wurde bestimmt aus der Sekundärauftragung der Ordinatenschnittpunkte, erhalten aus Lineweaver-Burk-Diagramm, gegen die zugehörigen Inhibitorkonzentrationen (Segel, in Enzyme Kinetics, Kap. Mixed-Type-Inhibition, 1993)

3.6. Einfluß von Calmodulin auf die Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität

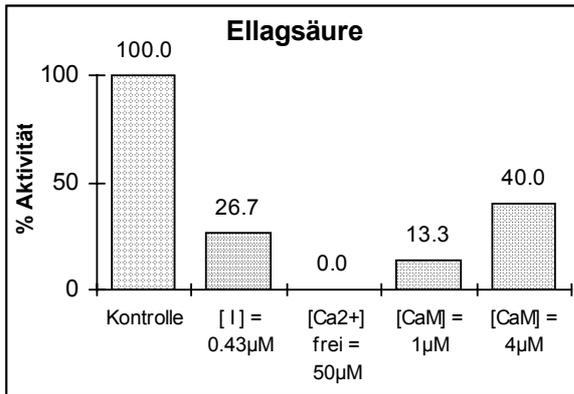
Da alle bisherigen Hemmversuche in Abwesenheit von Calmodulin (CaM) durchgeführt wurden, wurden mögliche Interferenzen der Hemmwirkung mit der CaM-Aktivierung analysiert. Für in vivo Hemmversuche oder Versuche an Zellkulturen wären diese Wechselwirkungen relevant.

Hierzu wurde der Einfluß des Aktivators CaM auf die Hemmung der Enzymaktivität unter Verwendung des Standardreaktionsmixes, einer Hemmstoffkonzentration des ca. 5-fachen IC₅₀-Wertes sowie einer freien [Ca²⁺] von 50 µM untersucht (Kap. 2.2.8.). Die Messungen wurden mit den potentesten Inhibitoren durchgeführt.

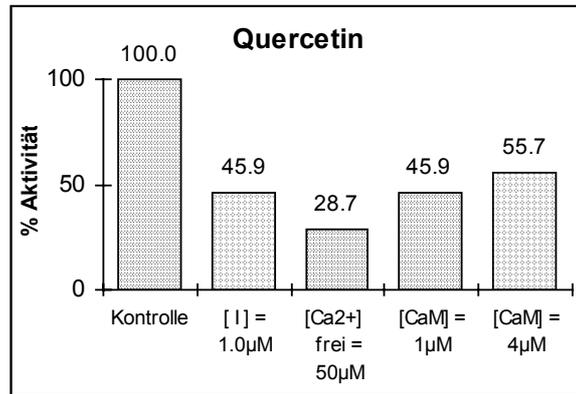
Abb. 3.17. a-i: Einfluß von Calmodulin auf die Hemmeffekte der potenten Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A



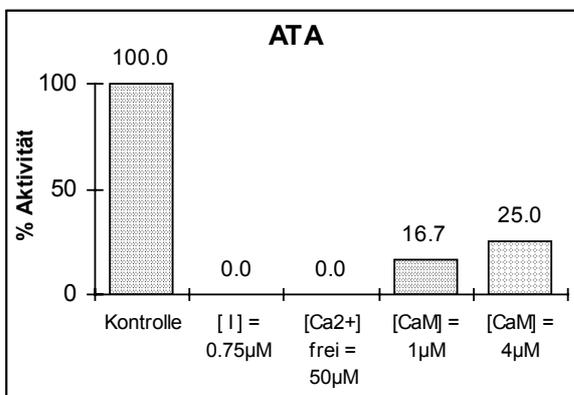
e)



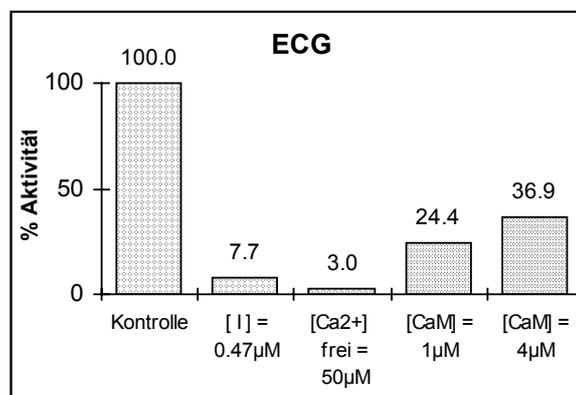
f)



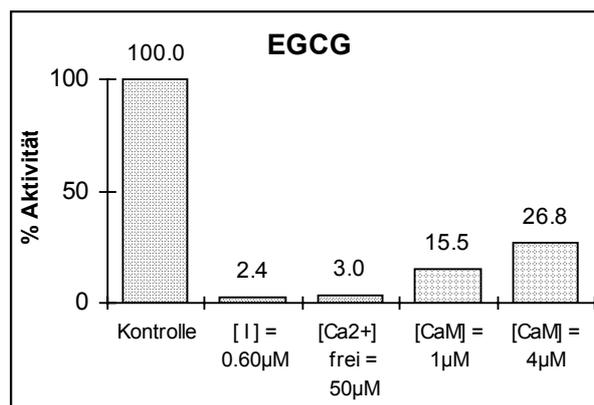
g)



h)



i)



Der Einfluß von Calmodulin auf die Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität wurde wie in Kap. 2.2.8. beschrieben durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit 25 μ M D-Ins(1,4,5)P₃ gestartet. Die jeweiligen Hemmstoffe wurden mit einer Endkonzentration ihres 5-fachen IC₅₀-Wertes nach der Messung von V_{max} dazupipettiert.

Durch die Zugabe von Ca^{2+} konnte eine Verstärkung der Hemmung, die durch den Inhibitor hervorgerufen wurde, beobachtet werden. Dieser zusätzlicher Hemmeffekt wird wahrscheinlich durch die Bindung von Ca^{2+} an eine schwach affine Bindungsstelle, die bislang noch nicht genauer identifiziert werden konnte, hervorgerufen. Entsprechend ist diese auch in Abwesenheit eines Hemmstoffes zu beobachten (35.3 %).

Die Kontrollreaktion läßt erkennen, daß in Abwesenheit eines Inhibitors nach Zugabe von 50 μM Ca^{2+} eine schwache Aktivierung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A durch die Zugabe von Calmodulin erfolgt.

Der durch die Zugabe eines Inhibitors hervorgerufene Hemmeffekt an der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A konnte bei allen Hemmstoffen durch Calmodulinzugabe partiell antagonisiert werden, am effektivsten bei den Inhibitoren ATA, ECG und EGCG (Abb. 3.17.), welche das Enzym zuvor am stärksten gehemmt hatten. Eine noch höhere als die hier eingesetzte Calmodulinkonzentration hatte keine weiteren Effekte mehr.

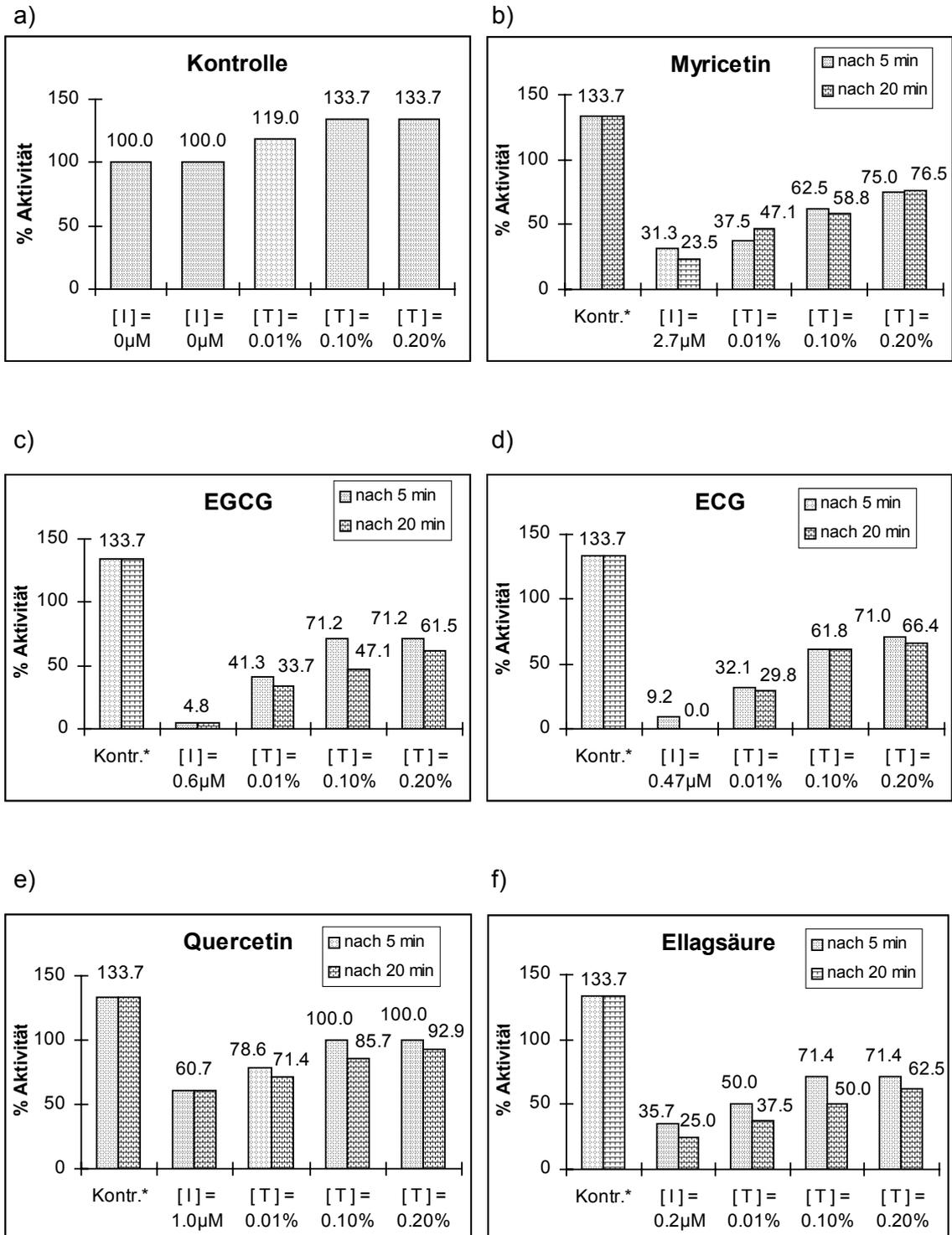
Die prozentuale Reversibilität der Hemmung scheint vom Ausmaß der durch die Hemmstoffzugabe erreichten Hemmung abzuhängen. Bei nahezu hundertprozentiger Hemmung ist die Reversibilität zwischen 25 % und 30 %, bei geringerer Hemmung erreicht sie über 50 %. Außerdem ist die irreversible Hemmkomponente bei allen getesteten Inhibitoren sehr groß, da der Hemmstoff die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinaseaktivität über einen Zeitraum von ca. 15 - 20 Minuten bis zur letzten Zugabe an CaM inhibierte.

3.7. Einfluß von Triton X-100 auf die Hemmung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinaseaktivität

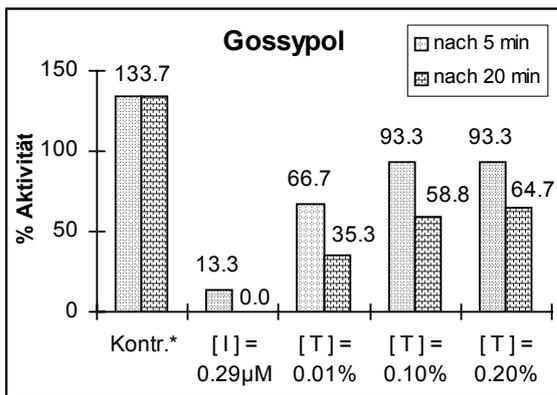
Triton X-100 ist ein Aktivator der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A und kann zumindest partiell den aktivierenden Effekt von Ca^{2+} -CaM imitieren.

Der Einfluß von Triton X-100 auf die Hemmung der Enzymaktivität wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Inhibitors mit dem Enzym unter Verwendung des Standardreaktionsmixes und einer Hemmstoffkonzentration des 5-fachen IC_{50} -Wertes gemessen (Kap. 2.2.9.). Die Messungen wurden mit den potentesten Inhibitoren durchgeführt.

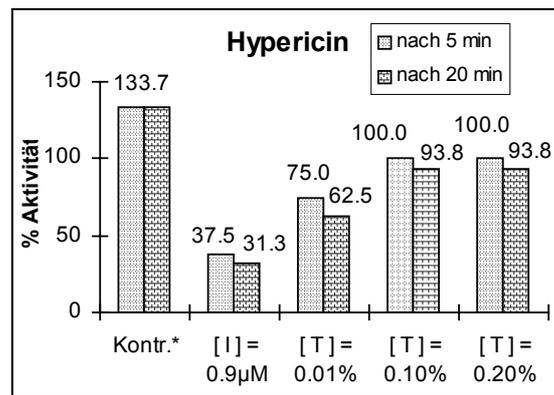
Abb. 3.18. a-j: Einfluß von Triton X-100 auf die Hemmeffekte der potenten Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A



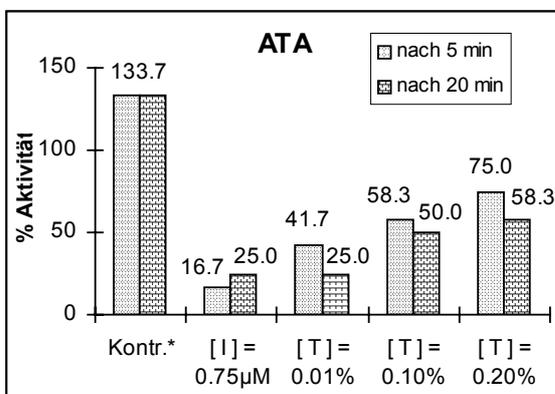
g)



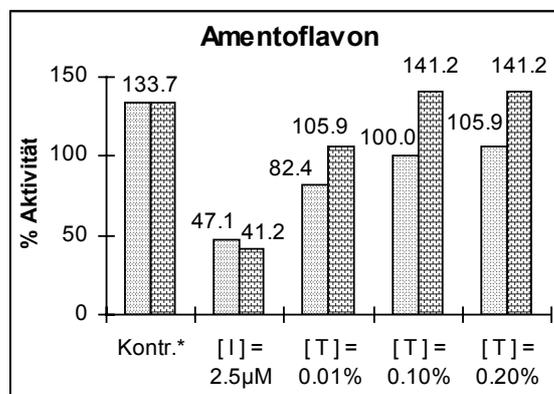
h)



i)



j)



Der Einfluß von Triton X-100 auf die Hemmung der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinaseaktivität wurde wie in Kap. 2.2.9. beschrieben durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit 25 μ M D-Ins(1,4,5) P_3 gestartet. Die jeweiligen Hemmstoffe wurden mit einer Endkonzentration ihres 5-fachen IC_{50} -Wertes nach der Messung von V_{max} dazupipettiert.

Kontr.*: maximale Aktivierbarkeit der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase durch Triton X-100 in der Kontrollreaktion

Die Kontrollreaktion zeigte, daß die Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A durch Triton X-100 geringfügig (um ca. 33 %) aktivierbar war. Eine höhere als die hier verwendete Konzentration an Triton X-100 hatte keinen weiteren Einfluß auf die Kinaseaktivität.

Triton X-100 konnte als eine Verbindung identifiziert werden, die den Effekt der potentesten Inhibitoren der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A partiell, beim Amentoflavin fast vollständig antagonisiert (Abb. 3.17.). Wenn diese zum Reaktionsmix, der einen entsprechenden Hemmstoff enthielt, pipettiert wurde, konnte eine sofort einsetzende Reversibilität der Hemmung in einem Umfang von 43.6 % - 100 % beobachtet werden.

Der Grad der Reversibilität war abhängig vom Hemmstoff sowie vom Zeitpunkt der Zugabe von Triton X-100. Wurde das Detergens nach einer 5-minütigen Inkubationszeit des Inhibitors mit dem Enzym dazugegeben, konnte bei Amentoflavon (79.2 %), Hypericin (74.8 %) und Quercetin (74.8 %) eine fast komplette Reversibilität der Hemmung beobachtet werden. Bei allen anderen Hemmstoffen lag die Reversibilität unter 60 % (Abb. 3.17.).

Erfolgte dagegen die Zugabe von Triton X-100 erst nach einer 20-minütigen Inkubationszeit, konnte bei Amentoflavon eine vollständige Antagonisierung der Hemmung beobachtet werden, bei Hypericin, Quercetin und Myricetin veränderte diese sich nicht signifikant. Bei allen anderen Inhibitoren dagegen stellte sich heraus, daß die Inhibition der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität durch die Zugabe von Triton X-100 deutlich geringer antagonisierbar war.

Die „bessere“ Antagonisierbarkeit der Amentoflavonhemmung nach 20 Minuten Inkubation ist mit Hemmstoff durch eine Photoinaktivierung dieser Substanz nach dieser Zeit zu erklären.

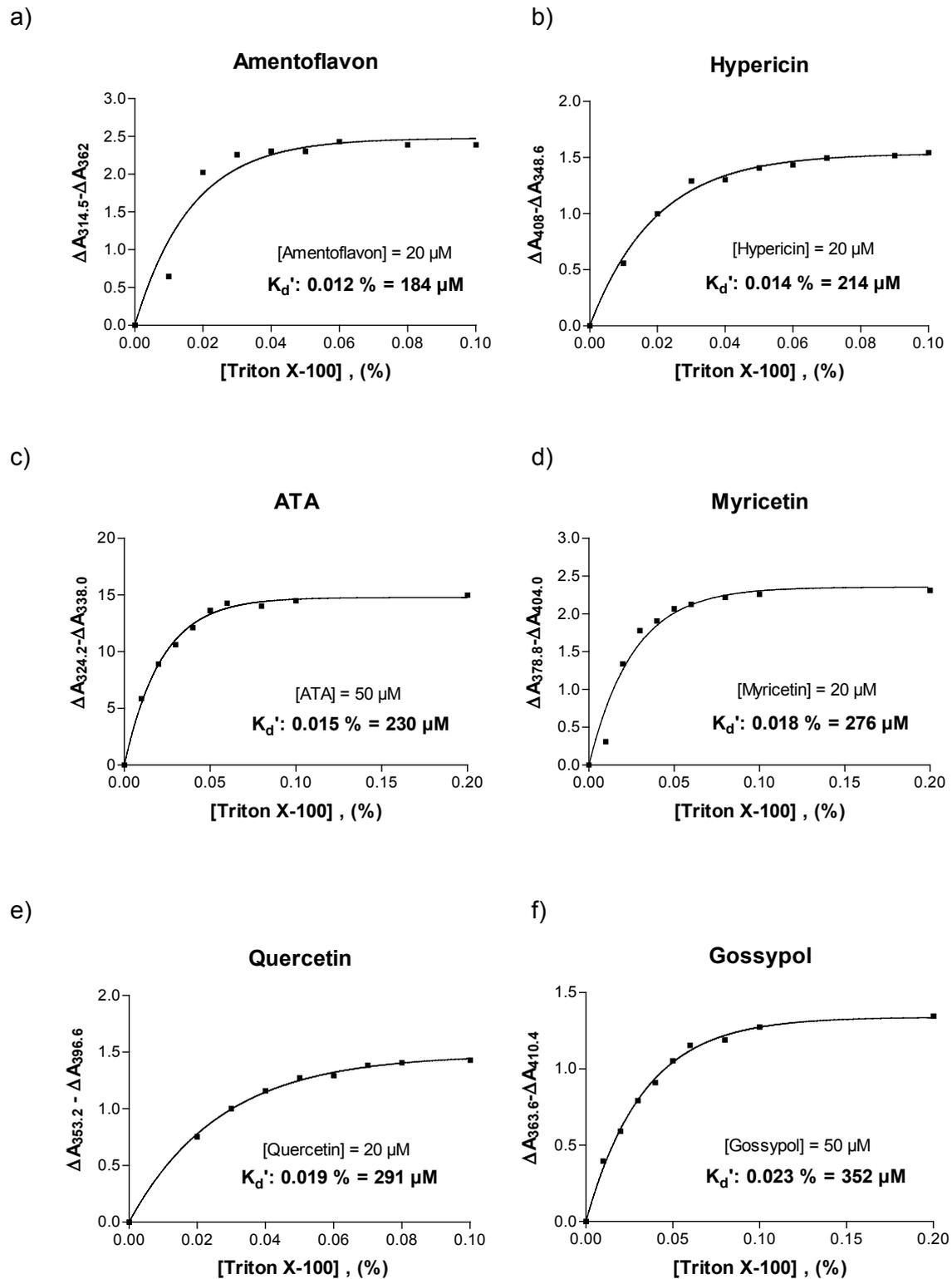
3.8. Differenzspektroskopische Untersuchung der Hemmstoff / Triton X-100 Interaktion

Um eine mögliche direkte Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Triton X-100 zu analysieren, wurde diese Untersuchung mittels der differenzspektroskopischen Titration wie im Kapitel 2.2.10. beschrieben durchgeführt.

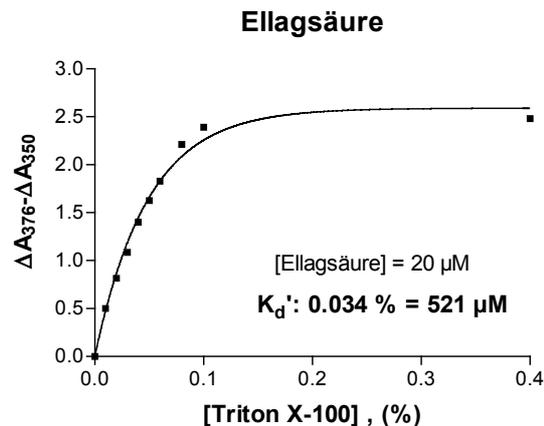
Die Messungen wurden mit einer Hemmstoffkonzentration von 20 µM oder 50 µM sowie mit steigenden Triton X-100-Konzentrationen (0 % - 0.20 %) durchgeführt. Eine höhere als die hier eingesetzte Triton X-100-Konzentration hatte keine weiteren Effekte mehr. Die Analysen wurden mit den wirksamsten Inhibitoren durchgeführt.

Zur Ermittlung der apparenten Dissoziationskonstanten K_d' für die Bindung des Inhibitors an das Detergens wurde die Konzentration an Triton X-100 gegen die Absorptionsdifferenzen, erhalten aus dem jeweiligen Differenzspektrum, aufgetragen (Abb. 3.19.a - g).

Abb. 3.19. a-g: Differenzspektroskopische Bindungskurven zur Ermittlung der apparenten Dissoziationskonstanten K_d'



g)



Die Analyse einer möglichen direkten Interaktion von Inhibitor und Triton X-100 mittels differenzspektroskopischer Titration wurde wie in Kap. 2.2.10. beschrieben durchgeführt. Es wurde die Konzentration an Triton X-100 gegen die Absorptionsdifferenzen (resultierend aus den Differenzspektren) aufgetragen.

Zur Ermittlung von K_d' wurden die Bindungskurven nach folgender Formel angeglichen: $\Delta A \sim \Delta A_{\max} * [\text{Triton X-100}] / K_d' + [\text{Triton X-100}]$, Voraussetzung: $[\text{Triton X-100}] \gg [\text{Inhibitor}]$.

Die ermittelten apparenten Dissoziationskonstanten K_d' für die Interaktion der Hemmstoffe mit Triton X-100 lagen im Bereich von 184 μM (Amentoflavon) bis 521 μM (Ellagsäure).

Für den Hemmstoff ATA wurden weiterhin Messungen zur Ermittlung der Bindungsstöchiometrie durchgeführt. Hierfür wurde ein Differenzspektrum bei einer Konzentration an ATA (300 μM) oberhalb des K_d' -Wertes und bei ansteigenden Konzentrationen an Triton X-100 aufgenommen. Hieraus konnte eine Titrationskurve ermittelt werden, die eine Stöchiometrie von 1.4 mol ATA/mol Triton X-100 ergab.

Die Daten zeigen, daß die Reaktivierung des gehemmten Enzyms durch Triton X-100 sehr gut mit einer direkten Interaktion zwischen Triton X-100 und dem Hemmstoff, d.h. mit einer hierdurch bedingten Reduzierung der freien Hemmstoffkonzentration korreliert.

3.9. Identifizierung einer Bindungsstelle von Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Hemmstoffen im Polypeptid

Zur Identifizierung der Bindungsstelle der Hemmstoffe an das Enzym wurden Mutanten der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A, hergestellt durch gezielte Mutagenese durch Dipl. Phys. C. Deschermeier (Kap. 2.2.1.), verwendet. Bei diesen Mutanten wurden basische Reste (z.B. Argininreste) zu anderen basischen, vor allem Lysinresten, oder nicht-basischen Resten mutiert. Die verwendeten Mutanten zeigten mit Ausnahme der von R276L und R276K keinen deutlich veränderten $K_{m,app}$ -Wert für D-Ins(1,4,5)P₃ im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

Eine Bindungsstelle für Hemmstoffe wurde unter Verwendung des sehr guten Hemmstoffes 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon analysiert (Tab. 3.6.).

Tab. 3.6.: Hemmung der Enzymaktivität von Mutanten der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durch 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon

Mutante	K_m -Wert [Ins(1,4,5)P ₃] μM	K_m -Wert (ATP) μM	IC ₅₀ μM
Wildtyp	0.40	74.0	0.29
K176L	0.40	140	0.95
K255R	0.63	103	1.05
K268E	0.47	n.d.	13.0
R270L	0.36	73.3	0.20
K272D	0.54	105.4	84.3
K272R	0.63	126.9	0.42
K274Q	0.30	115.0	0.54
R276L	7.71	85.8	0.31
R276K	1.60	106.0	0.45
K277Q	0.35	116.1	0.80
K282L	0.80	76.0	0.56
K327Q	0.30	186.4	0.76
K328L	0.47	124.0	0.91

Es konnte bei Verwendung von 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon gezeigt werden, daß die Inhibitoren, die als gemeinsames Strukturelement eine oder mehrere Carbonylgruppen aufweisen, vermutlich eine kovalente Bindung mit ϵ -NH₂-Gruppen von Lysinen unter Ausbildung einer Schiff'schen Base in einem speziellen Segment des Polypeptids eingehen.

Der Hemmstoff 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon zeigte bei den Mutanten K268E und K272D, in denen in diesem speziellen Segment die Aminosäure Lysin (K) gegen Glutaminsäure (E) bzw. Asparaginsäure (D) ausgetauscht wurde, einen um den Faktor 45 - 260 verringerten Inhibitionseffekt der Enzymaktivität. Durch Austausch der Aminosäure Lysin gegen Arginin (K272R) an dieser Stelle im Segment, konnte dagegen nur ein um Faktor 1.5 verringerter Inhibitionseffekt ermittelt werden. Die zwar bei den Versuchen zur Reversibilität der Hemmung gefundene irreversible Komponente der Hemmung könnte auf die Ausbildung einer solchen relativ stabilen Schiff'schen Base zurückzuführen sein.

3.10. Cross-linking von Gossypol an die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Die potenten Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A weisen als gemeinsame Strukturelemente neben komplexen Ringsystemen eine oder mehrere Carbonylfunktionen auf, über die sie eine vermutlich kovalente Bindung mit der ϵ -NH₂-Gruppe von Lysinen (Schiff'sche Basen) eingehen und so mit dem Enzym interagieren (Kap. 3.9.).

Aufgrund von Strukturmodellen, die mit dem Programm MOBY entwickelt wurden, konnte weiterhin gezeigt werden, daß einige der komplexen Ringsysteme der Inhibitoren (Gossypol, ATA, Flavonoide) Winkel bis zu 60° zwischen den Ringebenen besitzen, d.h. keine planaren Ringsysteme sind. Dadurch ergibt sich eine Art von zweihändiger Molekülstruktur bezogen auf die polyphenolischen Strukturanteile.

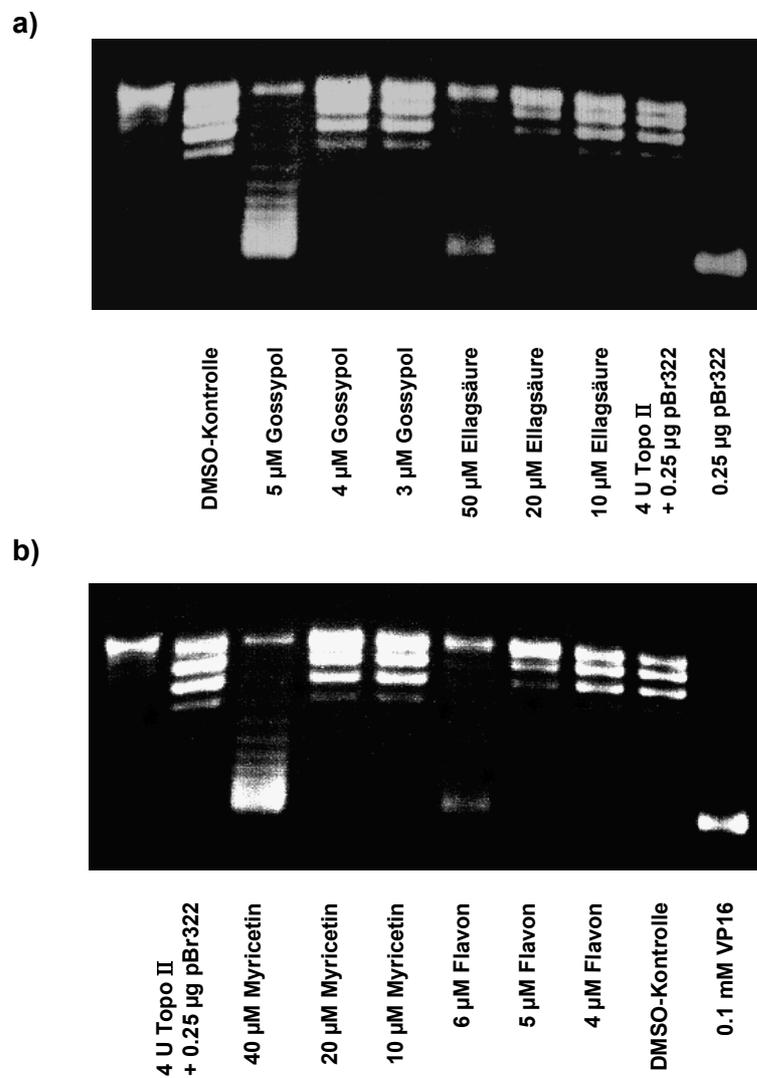
Wegen dieser besonderen strukturellen „Symmetrie“ wurde am Beispiel von Gossypol, welches zwei Aldehydfunktionen (Abb. 3.10.) besitzt, untersucht (Kap. 2.2.12.), ob dieser Hemmstoff durch Bindung an zwei Polypeptidmoleküle die Bildung von stabilen Enzymdimeren verursacht.

In dem SDS-Polyacrylamid-Gel konnte die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A in Abwesenheit von Gossypol als eine 36 kDa-Bande detektiert werden. Wurde das Enzym in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an Hemmstoff bei 30 °C inkubiert, konnte keine zusätzliche Bande bei einem Molekulargewicht von 72 kDa detektiert werden. Gossypol verursacht demzufolge keine Bildung von Dimeren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A.

3.11. Hemmung der Topoisomerase II

Aufgrund von verschiedenen Veröffentlichungen, in denen einige der potentesten Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A als Inhibitoren der Topoisomerase II beschrieben werden (Constantinou et al., 1995; Catchpoole et al., 1994;), wurden diese Effekte auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase II anhand der Relaxation von superspiralierter DNA unter für alle diese Hemmstoffe exakt gleichen Bedingung nochmals untersucht (Kap. 2.2.13.).

Abb. 3.20.: Darstellung der Topoisomerase II - Hemmung am Beispiel von
a) Gossypol und Ellagsäure
b) Myricetin und 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon



3. Ergebnisse

Anhand der ermittelten IC_{50} -Werte (Tab. 3.7.) konnte gezeigt werden, daß mit Ausnahme von ECG alle getesteten Hemmstoffe deutlich spezifischer die $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A hemmten als die Topoisomerase II.

Die Ellagsäure zeigte sogar eine um den Faktor 1389 bessere Inhibition der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A (Abb. 3.20. a).

Der IC_{50} -Wert von ECG dagegen lag nur um das 1.6 fache höher als der bei den Hemmversuchen der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinaseaktivität ermittelte Wert.

Alle anderen potenten Hemmstoffe der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A hemmten die Topoisomerase II um das 3.3 bis 69-fache weniger als die $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A.

Tab. 3.7.: Inhibierung der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinaseaktivität im Vergleich zur Inhibierung der Aktivität der Topoisomerase II

Inhibitor	$Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A IC_{50} (nM)	Topoisomerase II IC_{50} (nM)
Ellagsäure	36	50000
Gossypol	58	5000
ECG	94	150
EGCG	120	400
ATA	150	500
Quercetin	180	10000
Hypericin	200	4500
3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon	290	6000
Myricetin	540	40000

3.12. „Active site mapping“ der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durch Verwendung von Substratanaloga

Eine Reihe von InsPs-Isomeren sowie Analoga von Ins(1,4,5)P₃ wurden als mögliche Substrate der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A untersucht.

Die Messungen wurden unter Standardreaktionsbedingungen, physiologischen Bedingungen und unter „Hoch-MgCl₂“-Bedingung durchgeführt.

Die maximale Enzymaktivität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A wurde durch Zugabe von 25 µM eines Inositolphosphatisomeres oder Analogons in Gegenwart von 6.8 nM, 100 nM oder 500 nM Enzym gemessen (Kap. 2.2.14.).

Die Isomerie der Reaktionsprodukte der aktiven Verbindungen wurden mittels MDD-HPLC analysiert (Kap. 2.2.15.).

Durch diese Versuche wurde aufgeklärt, wie die Anzahl und/oder Position der Phosphatgruppen am Inositolring die Phosphorylierung durch die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A beeinflussen.

Der natürlich vorkommende sekundäre Botenstoff D-Ins(1,4,5)P₃ war das beste Inositolphosphatsubstrat. Die Selektivität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A für dieses Substrat änderte sich mit den Reaktionsbedingungen. Unter physiologischen Reaktionsbedingungen (5 mM ATP, 6 mM MgCl₂, 100 mM KCl) war die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität 2.0 fach höher als unter Standard- und „Hoch-MgCl₂“-Bedingungen.

Die Aktivitäten der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A für alle getesteten InsPs-Isomere und Analoga sind in der Tab. 3.8. und 3.9. aufgeführt.

3.12.1. Gute alternative Substrate unter den InsP₂-, InsP₃- und InsP₄-Isomeren mit Phosphatgruppen an Position D-(4,5)

Die aktivsten alternativen Substrate waren: D-Ins(4,5)P₂, D-Ins(1,4,5)P₃ und D-Ins(2,4,5)P₃ und D-Ins(1,2,4,5)P₄ (Tab. 3.8.).

Das beste Substrat, D-Ins(1,4,5)P₃, war unter Standardreaktionsbedingungen um Faktor 120 aktiver als D-Ins(4,5)P₂.

Die Anwesenheit einer zusätzlichen Phosphatgruppe an Position D-2 in D-Ins(2,4,5)P₃ erhöhte unter Standardreaktionsbedingungen die Aktivität des Enzyms gegenüber D-Ins(4,5)P₂ nur um das 3-fache, unter physiologischen Bedingungen jedoch um Faktor 7.

Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß unter den „low salt“-Bedingungen Ins(1,4,5)P₃ besser gebunden wird als unter physiologischen Bedingungen.

Dagegen erniedrigte die Addition einer Phosphatgruppe an Position D-1 im D-Ins(2,4,5)P₃ {D-Ins(1,2,4,5)P₄} die Enzymaktivität um den Faktor 13 (Standardbedingung) bzw. um Faktor 14 (physiologische Bedingung).

Die Anwesenheit einer Phosphatgruppe an Position D-3 {D-Ins(3,4,5)P₃} setzte die Aktivität gegenüber D-Ins(4,5)P₂ nur um den Faktor 5.7 bei Standardbedingung und um Faktor 39 unter physiologischen Bedingungen herab.

Die Addition einer D-1-Phosphatgruppe an das inaktive Isomer m-Ins(4,5,6)P₃ führte zu einem sehr geringfügigen aktiven Substrat des Enzyms {D-Ins(1,4,5,6)P₄}, wobei zusätzliche Phosphatgruppen an den Positionen D-1 und D-2 {D-Ins(1,2,4,5,6)P₅} die Enzymaktivität vollständig unterdrückten.

3.12.2. Alternative InsP₂-, InsP₃- und InsP₄-Substrate ohne Phosphatgruppen an Position D-(4,5)

Das aktivste InsP ohne Phosphatgruppen an der Position D-(4,5) war L-Ins(1,3,4)P₃ (Tab. 3.8.). Dieses Isomer war unter Standardbedingungen nur um den Faktor 3.5 geringer aktiv als das D-Ins(1,4,5)P₃. Unter physiologischen Bedingungen zeigte L-Ins(1,3,4)P₃ allerdings eine um das 11-fache niedrigere Aktivität im Vergleich zum D-Ins(1,4,5)P₃. Dagegen wurde das D-Ins(1,3,4)P₃ unter beiden Reaktionsbedingungen nicht durch die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A phosphoryliert.

Ein Fehlen der Phosphatgruppe an Position D-5 {D-Ins(1,4)P₂} führte zu einer drastischen Erniedrigung der Enzymaktivität im Vergleich zum D-Ins(1,4,5)P₃.

Die Verbindungen D/L-Ins(1,5,6)P₃, D-Ins(1,2,4,6)P₄ und L-Ins(1,4,6)P₃, die das zum D-(4,5)-bisphosphat äquivalente Phosphatgruppenpaar D-(1,6) aufweisen, zeigten wie das D-Ins(1,4,5,6)P₄ eine schwache Substrateigenschaft (Tab. 3.8.), wobei das L-Ins(1,4,6)P₃ unter physiologischen Reaktionsbedingungen kein Substrat der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A war. Für das D-Ins(1,4,6)P₃ konnte unter Standardbedingungen eine um das 6.5-fache höhere Aktivität im Vergleich zum L-Ins(1,4,6)P₃ gemessen werden.

Es wurden ebenfalls Inositolphosphatanaloga als mögliche Substrate der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A getestet, um weitere Aufschlüsse zur Substratbindungsselektivität zu erhalten. Außerdem wurden inaktive Analoga auf ihren Hemmeffekt an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A untersucht. Diese Substanzen wurden von Prof. B.V.L. Potter von der University of Bath, England zur Verfügung gestellt.

Tab. 3.8.: Umsatz von InsPs-Isomere mit Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A im optischen Test

Konfiguration	Phosphat- position	Standard- bedingung mU/mg	Physiolog. Bedingung mU/mg
D	1,3	inaktiv	n.b.
D	1,4	5.9	2.6
D	4,5	125	58
m	1,2,3	inaktiv	n.b.
D	1,3,4	inaktiv	inaktiv
L	1,3,4	2157	1412
D	1,4,5	7600	15800
D	1,4,6	15	12
L	1,4,6	2.3	inaktiv
D/L	1,5,6	2.4	2.8
D	2,4,5	382	419
D	3,4,5	22	1.5
m	4,5,6	inaktiv	inaktiv
D/L	1,2,3,4	inaktiv	inaktiv
D	1,2,4,5	29	29
D/L	1,2,4,5	9	8
D	1,2,4,6	1.8	1.7
D	1,3,4,5	inaktiv	inaktiv
m	1,3,4,6	inaktiv	inaktiv
D	1,4,5,6	2	4
D/L	2,3,4,5	inaktiv	inaktiv
D/L	2,4,5,6	inaktiv	inaktiv
D	3,4,5,6	inaktiv	n.b.
D	1,2,3,4,5	inaktiv	inaktiv
D	1,2,3,4,6	Inaktiv	inaktiv
D	1,2,4,5,6	inaktiv	inaktiv

Der Umsatz der InsPs-Isomere wurde wie in Kapitel 2.2.14. beschrieben gemessen. Die Enzymkonzentration im eingesetzten Reaktionsmix betrug 6.8 nM, 100 nM oder 500 nM. Die maximale Enzymaktivität wurde durch Zugabe von 25 µM eines Inositolphosphatisomers gemessen. Diese Messungen wurden mit unterschiedlich zusammengesetzten Reaktionsmixturen durchgeführt (Kap. 2.2.14.). Bei der Standardbedingung ist weniger ATP (0.5 mM) und weniger KCl (30 mM) im Assay als unter physiologischen Bedingungen (5 mM ATP, 100 mM KCl).

n.b.*: nicht bestimmt

3.12.3. Substraktive InsP_2 -, InsP_3 - und InsP_4 -Analoga mit Phosphatgruppen an Position D-(4,5)

Die aktivsten Analoga waren GroP- $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ und 3-Hyms- InsP_3 (Tab.3.9.).

Das GroP- $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ zeigte sogar unter Standardreaktionsbedingungen eine 1.3-fache höhere Umsatzgeschwindigkeit als das D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, unter physiologischen Bedingungen dagegen war diese um den Faktor 1.7 erniedrigt. Eine sterische Hinderung der Bindung von Substraten bzw. Analoga, die durch Substituenten an der Position D-1 hervorgerufen wird, scheint somit gering zu sein oder gar nicht vorzuliegen.

3-Hyms- InsP_3 , ein InsP_3 -Analogon, welches einen äquatorialen Hydroxymethylrest an Position D-3 trägt, zeigte nur eine 16-fache geringere Substrataktivität als D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

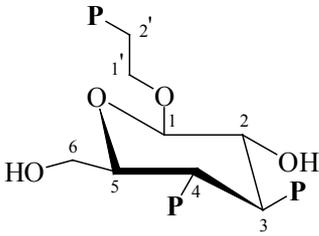
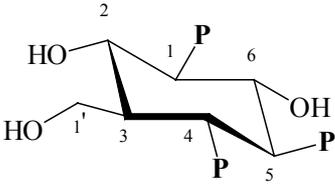
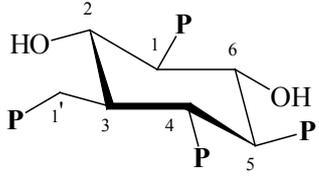
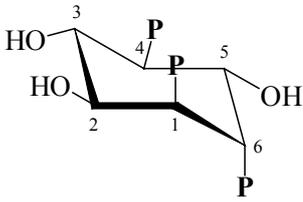
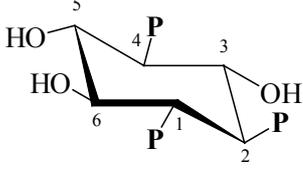
Das scyllo- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$, welches an der Position D-2 die Phosphatgruppe in äquatorialer Stellung trägt, war unter Standardreaktionsbedingungen um Faktor 112 und unter physiologischen Bedingungen um das 182-fache weniger substraktiv als D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Weiterhin wies dieses Analogon im Vergleich zum D- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ eine 2.3-fache höhere Enzymaktivität auf.

Tab. 3.9.: Umsatz von InsP -Analoga mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A im optischen Test

Analogon	Phosphat-position	Standard-bedingung mU/mg	Physiolog. Bedingung mU/mg
3-Hyms- InsP_3	1,4,5	480	460
SG 43	1,1',4,5	inaktiv	inaktiv
Glucositol- P_3	2',3,4	114	51
GroP- $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$	1,4,5	10105	9160
L-chiro- $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$	1,4,6	76	87
L-chiro- $\text{Ins}(2,3,5)\text{P}_3$	2,3,5	6.0	5.3
scyllo- $\text{Ins}(1,2,4)\text{P}_3$	1,2,4	1935	2153
scyllo- $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$	1,2,3,5	inaktiv	n.b.
scyllo- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$	1,2,4,5	68	87

Der Umsatz der InsP -Analoga wurde wie in Kap. 2.2.14. beschrieben gemessen. Die Enzymkonzentration im eingesetzten Reaktionsmix betrug 6.8 nM, 100 nM oder 500 nM. Die maximale Enzymaktivität wurde durch Zugabe von 25 μM eines Analogons gemessen. Diese Messungen wurden mit unterschiedlich zusammengesetzten Reaktionsmixturen durchgeführt (Kap. 2.2.14.). Bei der Standardbedingung ist weniger ATP (0.5 mM) und weniger KCl (30 mM) im Assay als unter physiologischen Bedingungen (5 mM ATP, 100 mM KCl).
n.b.*: nicht bestimmt

Tab. 3.10.: Strukturen von InsP -Analoga

Analogon	Struktur
Glucositol-P ₃	 <p>The structure shows a six-membered ring with an oxygen atom at the top. The carbons are numbered 1 to 6. Carbon 1 is bonded to an oxygen atom that is part of a phosphate group (P) attached to carbon 2'. Carbon 2 is bonded to a hydroxyl group (OH). Carbon 3 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 4 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 5 is bonded to a hydroxyl group (HO). Carbon 6 is bonded to a hydroxyl group (HO).</p>
3-Hyems-InsP ₃	 <p>The structure shows a six-membered ring with an oxygen atom at the top. The carbons are numbered 1 to 6. Carbon 1 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 2 is bonded to a hydroxyl group (HO). Carbon 3 is bonded to a hydroxyl group (HO) and a phosphate group (P). Carbon 4 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 5 is bonded to a hydroxyl group (OH). Carbon 6 is bonded to a hydroxyl group (OH).</p>
SG 43	 <p>The structure shows a six-membered ring with an oxygen atom at the top. The carbons are numbered 1 to 6. Carbon 1 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 2 is bonded to a hydroxyl group (HO). Carbon 3 is bonded to a phosphate group (P) and a hydroxyl group (HO). Carbon 4 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 5 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 6 is bonded to a hydroxyl group (OH).</p>
L-chiro-Ins(1,4,6)P ₃	 <p>The structure shows a six-membered ring with an oxygen atom at the top. The carbons are numbered 1 to 6. Carbon 1 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 2 is bonded to a hydroxyl group (HO). Carbon 3 is bonded to a hydroxyl group (HO). Carbon 4 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 5 is bonded to a hydroxyl group (OH). Carbon 6 is bonded to a phosphate group (P).</p>
L-scylo-Ins(1,2,4)P ₃	 <p>The structure shows a six-membered ring with an oxygen atom at the top. The carbons are numbered 1 to 6. Carbon 1 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 2 is bonded to a hydroxyl group (OH). Carbon 3 is bonded to a hydroxyl group (OH). Carbon 4 is bonded to a phosphate group (P). Carbon 5 is bonded to a hydroxyl group (HO). Carbon 6 is bonded to a hydroxyl group (HO).</p>

3.12.4. Substraktive InsP_2 -, InsP_3 - und InsP_4 -Analoga ohne Phosphatgruppen an Position D-(4,5)

Das aktivste Analogon war das L-scylo- $\text{Ins}(1,2,4)\text{P}_3$ (Tab. 3.10.), welches im Vergleich zum D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ eine nur um den Faktor 3.9 (Standardbedingung) und 7.3 (physiologische Bedingung) erniedrigte Aktivität aufwies (Tab. 3.9.).

Eine zusätzliche Phosphatgruppe am C-Atom 5 {scylo- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ } führte zu einer Erniedrigung der Enzymaktivität um das 28-fache (Standardbedingung).

Das myo- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Analogon Glucositoltrisphosphat (2-Hydroxyethyl- α -D-glucopyranosid-2',3,4-trisphosphat), welches Phosphatgruppen an den Positionen D-2', D-3 und D-4 trägt (Tab. 3.10.), zeigte unter Standardreaktionsbedingungen eine um das 67-fache und unter physiologischen Bedingungen um das 310-fache geringere Potenz als Substrat als D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Dieses Analogon wies die gleiche Substraktivität wie D- $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ auf.

L-chiro- $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$ (Tab. 3.10.) wurde im Gegensatz zum D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mit einer um den Faktor 100 (Standardbedingung) sowie Faktor 182 (physiologische Bedingung) geringeren Enzymaktivität phosphoryliert. Im Vergleich zum L- $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$ wies das Analogon unter Standardbedingung ein 33-fach höheres Substratpotential auf. Unter physiologischen Bedingungen war das L- $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$ dagegen inaktiv, während das L-chiro- $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$ die gleiche Aktivität aufwies wie unter Standardbedingungen.

Das L-chiro- $\text{Ins}(2,3,5)\text{P}_3$ zeigte unter beiden Reaktionsbedingungen nur eine schwache Substrateigenschaft.

3.12.5. Inaktive InsP_2 -, InsP_3 - und InsP_4 -Isomere und Analoga

Sechzehn InsP_2 -, InsP_3 - und InsP_4 -Isomere wurden nicht von der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A phosphoryliert (Tab. 3.8. und 3.9.).

Die Einführung einer zusätzlichen Phosphatgruppe entweder an Position D-6 und/oder an der Position D-3 in das Isomer D- $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ oder D- $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ hatte eine Aufhebung der Substrateigenschaft zur Folge. m- $\text{Ins}(4,5,6)\text{P}_3$, D/L- $\text{Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$, D/L- $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$, D- $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$, D- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ und D- $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ zeigten keine Substrateigenschaft.

D- $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$, m- $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ und m- $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$, welche nicht das Strukturelement D-(4,5)-bisphosphat oder eine analoge äquatoriale trans-Bisphosphatgruppierung aufweisen, waren unter allen getesteten Reaktionsbedingungen inaktiv.

Ebenso konnte keine Enzymaktivität bei der Verwendung von D-Ins(1,3,4,5)P₄ sowie m-Ins(1,3,4,6)P₄ als Substrate, die die inhibitorisch wirkende D-3- bzw. D-6-Phosphatgruppe besitzen, nachgewiesen werden.

Das SG 43 (Tab. 3.10.), ein InsP₄-Analogon von 3-Hyems-InsP₃, besitzt einen sperrigen Phosphomethylsubstituenten an der D-3-Position, welcher die Phosphorylierung durch die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A behindert.

Ebenfalls konnte keine Substrataktivität für das Analogon scyllo-Ins(1,2,3,5)P₄, welches statt einer axialen Phosphatgruppe in Position D-2 eine äquatoriale besitzt, gemessen werden.

3.12.6. HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte der substrataktiven Isomere und Analoga

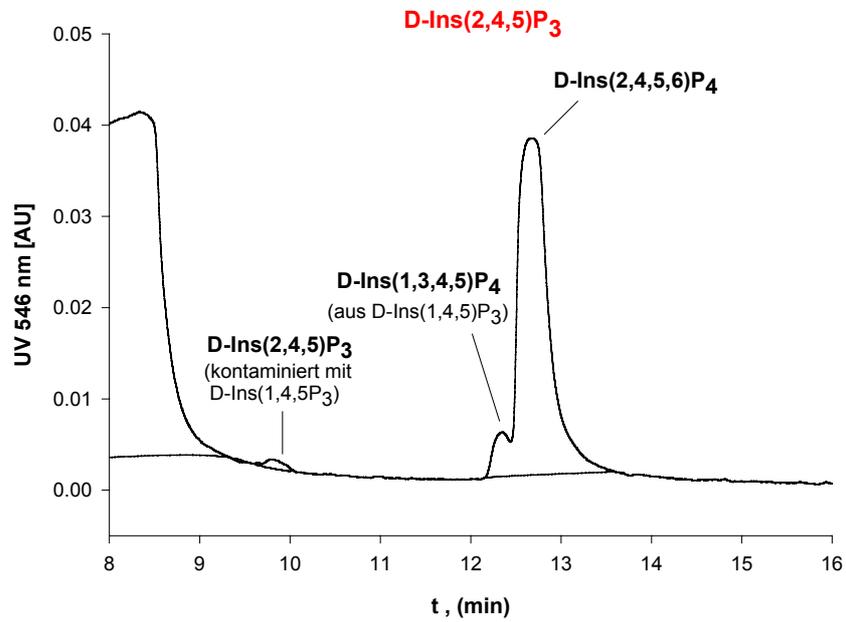
Unter Anwendung des Verfahrens der High-performance-liquid-chromatography (HPLC) zur Analyse der Inositolphosphate wurden die Produkte einiger aktiver Substrate analysiert (Kap. 2.2.15.).

Abbildung 3.21. zeigt eine Auswahl von Chromatogrammen zur Produktanalyse der im Test umgesetzten Inositolphosphate und Analoga.

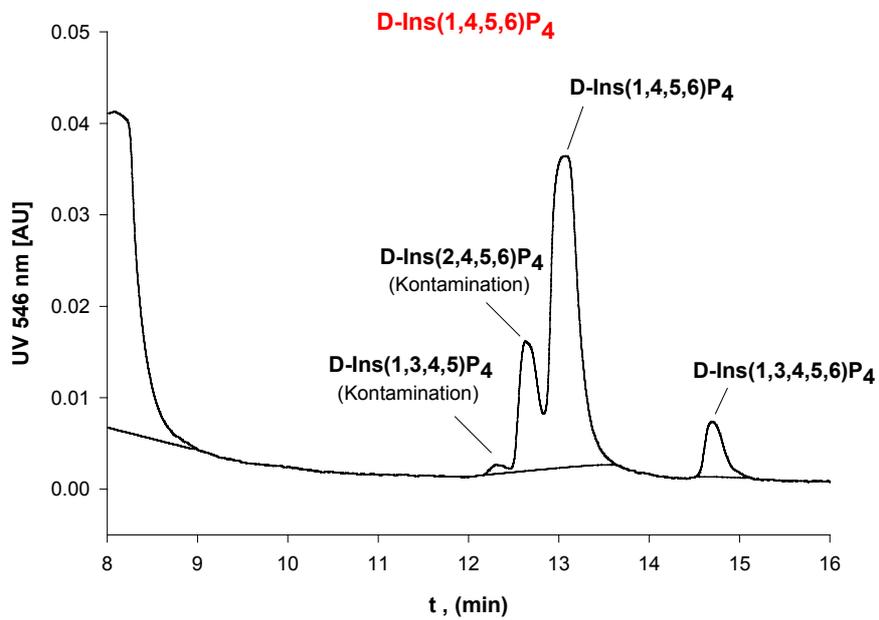
Tabelle 3.11. gibt einen Überblick über die Produkte der von der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A umgesetzten Inositolphosphate und Analoga.

Abb. 3.21.: Chromatogramme zur Produktanalyse umgesetzter Inositolphosphate bzw. Analoga

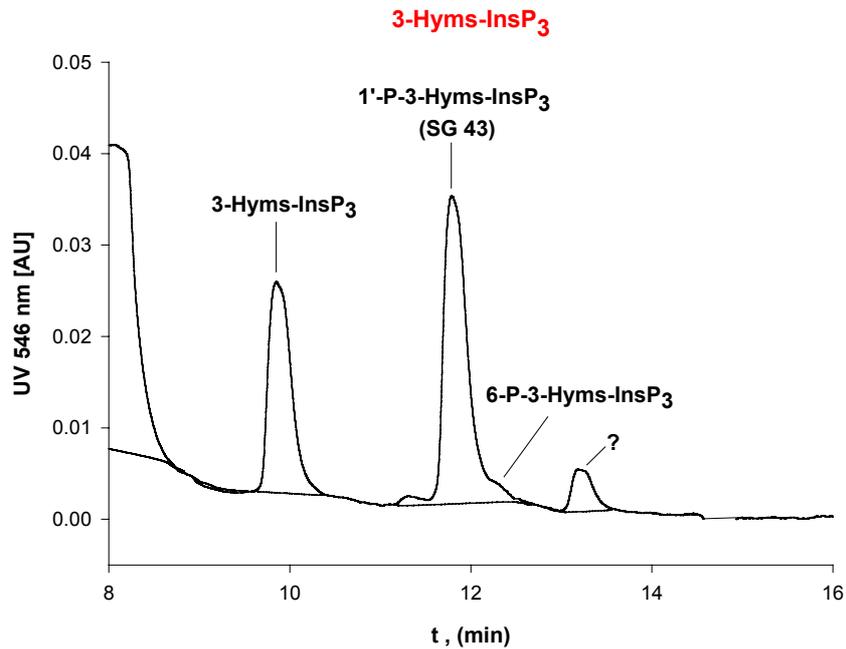
a)



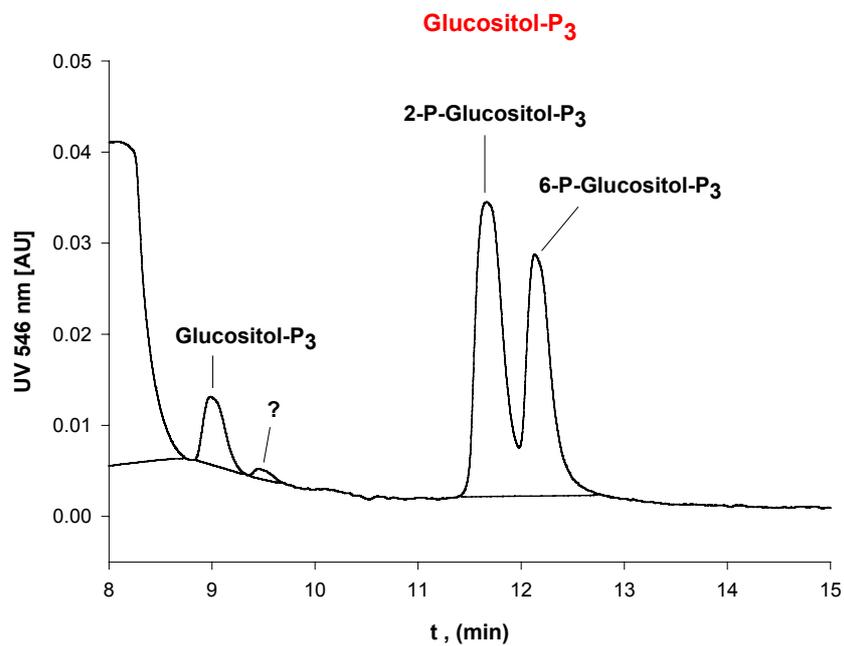
b)



c)



d)



Die Produktanalyse der von der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase umgesetzten Inositolphosphate (InsPs) bzw. Analoga wurden unter Anwendung der High-performance-liquid-chromatography (HPLC) wie in Kap. 2.2.15. beschrieben durchgeführt. Die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase wurde in einer Endkonzentration von 500 nM eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 25 µM InsPs oder Analogon gestartet und nach einer 15 minütigen Inkubation bei 30 °C mit Trichloressigsäure (TCA) in einer Endkonzentration von 10 % gestoppt. Nach der Proteinpräzipitation auf Eis wurde der Überstand mit wassergesättigtem Diethylether extrahiert. Anschließend erfolgte die HPLC-Analytik der InsPs oder Analoga mit Hilfe der Metal-Dye-Detection-Methode (MDD) (Mayr, 1990).

Tab. 3.11.: Übersicht der Produkte aktiver InsPs-Isomere und Analoga

Isomer /Analogon	Konfiguration	Phosphatposition	Produkt(e)
InsPs-Isomere	D	1,4	1,3,4
	D	4,5	3,4,5 > 4,5,6 (2:1)
	L	1,3,4	L-1,3,4,5
	D	1,4,5	1,3,4,5
	D	1,4,6	1,4,5,6
	D/L	1,5,6	D/L-3,4,5,6
	D	2,4,5	2,4,5,6
	D	3,4,5	3,4,5,6
	D	1,2,4,5	n.b.*
	D/L	1,2,4,5	1,2,4,5,6 < 1,2,3,4,5 (1:4)
	D	1,2,4,6	1,2,3,4,6
	D	1,4,5,6	1,3,4,5,6
	Analoga	3-Hyms-InsP ₃	1,4,5
Glucositol-P ₃		2',3,4	6-P-GluP ₃ < 2-P-GluP ₃ (1:1.2)
GroP-Ins(4,5)P ₂		4,5	Gro1PIns3,4,5

3.12.7. Bestimmung der $K_{m,app}$ -Werte für potente InsPs und Analoga

Um den Einfluß von Substituenten sowie der Anzahl und/oder Position der Phosphatgruppen am Inositolring auf die Substrateigenschaften zu untersuchen, wurden weiterhin die $K_{m,app}$ -Werte der potentesten Isomere und Analoga im optischen Test unter Standardreaktionsbedingungen (Kap. 2.2.16.) gemessen.

In Tab. 3.12. sind die Ergebnisse im Vergleich zu den für D-Ins(1,4,5)P₃ dargestellt.

Tab. 3.12.: Spezifische Aktivitäten und apparente K_m -Werte für substrataktive InsPs-Isomere und Strukturanaloga (gemessen unter Standardbedingungen)

Substrat	spezifische Aktivität mU/mg	$K_{m,app}$ [μ M]
D-Ins(4,5) P_2	125	95.5
D-Ins(1,4,5) P_3	7600	0.37
L-Ins(1,3,4) P_3	2157	2.7
D-Ins(1,4,6) P_3	15	0.19
D-Ins(2,4,5) P_3	382	3.9
GroP-Ins(4,5) P_2	10105	4.1
3-Hyms-Ins P_3	480	2.8
Glucositol- P_3	114	26.8
L-chiro-Ins(1,4,6) P_3	76	7.7
L-scylo-Ins(1,2,4) P_3	1935	0.36
scyllo-Ins(1,2,4,5) P_4	68	1.4

Das Fehlen der Phosphatgruppe an Position D-1 im D-Ins(1,4,5) P_3 erniedrigte die Substrataffinität um den Faktor 239, während die Einführung eines sperrigen Substituenten an dieser Position [GroP-Ins(4,5) P_2] die Affinität nur um das 10-fache senkte. Trotz dieser Erniedrigung der Substrataffinität zeigte das GroP-Ins(4,5) P_2 sogar eine um den Faktor 1.3 höhere Enzymaktivität als das D-Ins(1,4,5) P_3 (Tab. 3.12.).

Das Analogon L-scylo-Ins(1,2,4) P_3 besaß die gleiche Substrataffinität wie das D-Ins(1,4,5) P_3 , zeigte aber eine um den Faktor 3.9 geringere Enzymaktivität.

Für das D-Ins(1,4,6) P_3 dagegen konnte sogar eine 2-fach höhere Substrataffinität gemessen werden als für das D-Ins(1,4,5) P_3 . Allerdings wurde dieses Isomer von der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A nur mit einer sehr geringen Aktivität umgesetzt, das wahrscheinlich auf die sterische Hinderung der Phosphorylierung durch die Phosphatgruppe in Position D-6 zurückzuführen ist.

Bei allen anderen getesteten Isomeren und Analoga konnten sowohl deutlich erniedrigte Substrataffinitäten als auch geringere Enzymaktivitäten gemessen werden.

3.12.8. InsPs-Isomere und Analoga als Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Auf ihre Eigenschaft als Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität wurden inaktive InsPs-Isomere sowie schwach substrataktive Analoga untersucht.

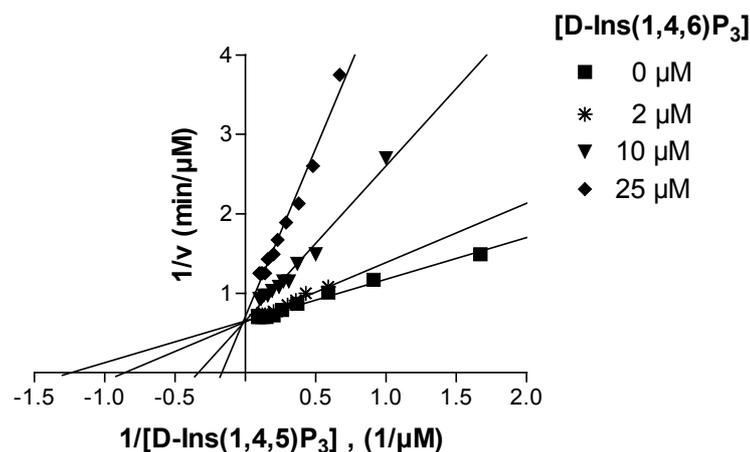
Die Hemmstoffe wurden im optischen Test in einem Konzentrationsbereich von 2 µM - 50 µM und bei einer Anfangskonzentration von 10 µM D-Ins(1,4,5)P₃ eingesetzt (Kap. 2.2.17.).

Alle getesteten Isomere und Analoga erwiesen sich in der Lineweaver-Burk-Auftragung als kompetitive Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A bezüglich des D-Ins(1,4,5)P₃. Sie erhöhten den K_{m,app}-Wert für D-Ins(1,4,5)P₃, wobei V_{max} unverändert blieb.

In Abb. 3.22. ist dieses Hemmverhalten am Beispiel von D-Ins(1,4,6)P₃ dargestellt.

Durch Auftragung der apparenten K_m-Werte bzw. der Steigungen (slope) aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm gegen die Inhibitorkonzentrationen kann die apparente Hemmkonstante K_{i,app} ermittelt werden (Abb. 3.22.).

Abb. 3.22.: Kompetitive Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A am Beispiel von D-Ins(1,4,6)P₃ (Darstellung nach Lineweaver-Burk)



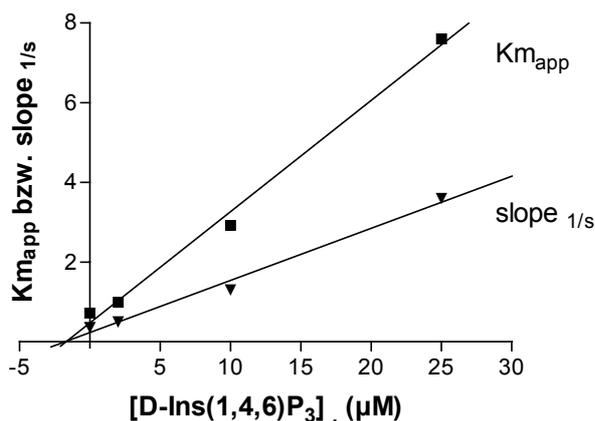
Die Analyse des Hemmstoffeffektes einiger Inositolphosphate und Analoga auf die Aktivität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A wurde wie in Kap. 2.2.17. beschrieben durchgeführt. Die Inositolphosphat- bzw. Analogkonzentration wurde in den jeweiligen Testansätzen variiert, während die Konzentration von ATP mit 500 µM konstant gehalten wurde. Die Konzentration für D-Ins(1,4,5)P₃ variierte in den einzelnen Messungen mit Hilfe von „single-transients“ zwischen 10 µM und 0 µM.

Wie aus Tab. 3.13. zu entnehmen ist, erwies sich D-Ins(1,4,6)P₃ mit einem K_{i,app}-Wert von 2.62 μM als potentester Hemmstoff der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A unter den getesteten Analoga und InsPs-Isomeren.

Dagegen konnte für das Isomer L-Ins(1,4,6)P₃ ein um Faktor 11 erhöhter K_{i,app}-Wert (28.9 μM) bestimmt werden.

Da einige Hemmstoffe schwache substrataktive Eigenschaften besitzen, kann die gewählte Analyse nur Anhaltspunkte für die realen K_{i,app}-Werte geben, welche bei solchen Verbindungen niedriger sein sollten. Korrekte Auswertungen dieser Untersuchungen in Gegenwart eines zweiten schwachen Substrates können laut Segel nicht durchgeführt werden (Segel, 1993).

Abb. 3.22.: Bestimmung der Hemmkonstante K_{i,app} am Beispiel von D-Ins(1,4,6)P₃



Tab. 3.13.: InsPs-Isomere und Analoga als Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Isomer / Analogon		K _i [μM]
InsP₂-Isomere	D-Ins(1,3)P ₂	72
	D-Ins(4,5)P ₂	152*
InsP₃-Isomere	m-Ins(1,2,3)P ₃	37.9
	D-Ins(1,3,4)P ₃	86.8
	D-Ins(1,4,6)P ₃	2.62*
	L-Ins(1,4,6)P ₃	28.9*
	D-Ins(3,4,5)P ₃	97.6*
	m-Ins(4,5,6)P ₃	>300
InsP₄-Isomere	D/L-Ins(1,2,3,4)P ₄	73.3
	D-Ins(1,3,4,5)P ₄	19.4
	m-Ins(1,3,4,6)P ₄	99.9
	D-Ins(1,4,5,6)P ₄	75.7*
	D/L-Ins(2,4,5,6)P ₄	278
	D-Ins(3,4,5,6)P ₄	78.7
Analoga	scyllo-Ins(1,2,3,5)P ₄	16.7
	3-Hyms-InsP ₃	83.9*
	Glucositol-P ₃	272*

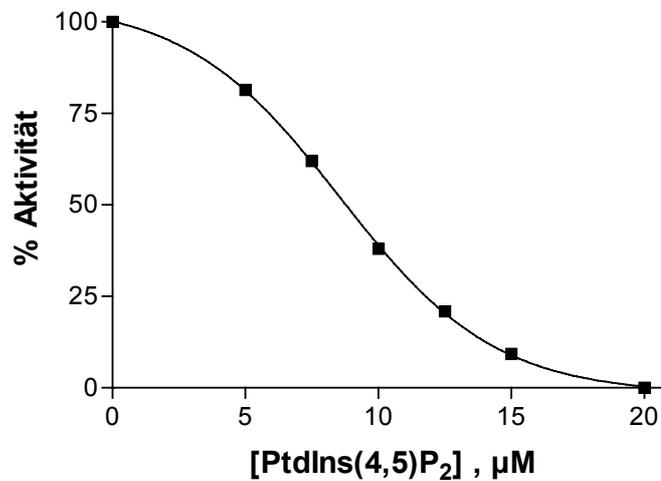
Daten mit *: K_{i,app} falsch zu hoch, da Verbindung ein schwach aktives Substrat ist

3.12.9. Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität durch PtdIns(4,5)P₂

Die Aktivität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A konnte durch den Einsatz von PtdIns(4,5)P₂ in mikromicellärer Form mit einem IC₅₀-Wert von 8 μM gehemmt werden (Abb. 3.24.). Hierbei zeigte das Phosphoinositid eine komplette Inaktivierung der Enzymaktivität bei einer Konzentrationen von 20 μM.

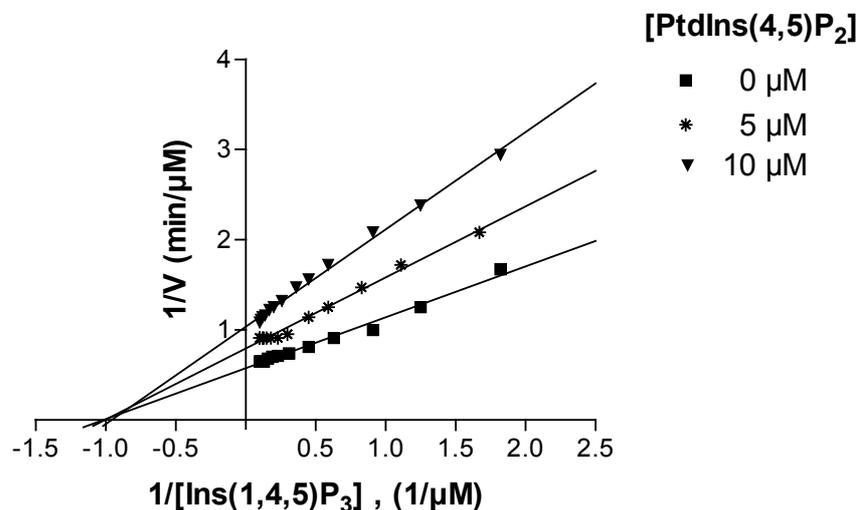
Das PtdIns(4,5)P₂ wurde auf das Verhalten gegenüber dem Substrat D-Ins(1,4,5)P₃ untersucht (Kap. 2.2.7.). Das Phosphoinositid zeigte einen nichtkompetitiven Hemmtyp (Abb. 3.25.). Es beeinflusste den K_m'-Wert für D-Ins(1,4,5)P₃ nicht und erniedrigte V_{max} (1.20 μM/min). Hieraus ist ersichtlich, daß die Bindungsstelle von PtdIns(4,5)P₂ nicht in der katalytischen Domäne liegt, sondern in einem anderen Segment des Polypeptids vorkommt. Hierfür spricht auch der Befund, daß PtdIns(4,5)P₂ nicht von der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A phosphoryliert wird (Daten nicht gezeigt), so daß die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase keine PtdIns(4,5)P₂ 3-Kinaseaktivität aufweist.

Abb. 3.24.: Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität durch PtdIns(4,5)P₂



Die Inhibierung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität durch PtdIns(4,5)P₂ wurde unter Substratsättigung für D-Ins(1,4,5)P₃ durchgeführt. Das Phosphoinositid wurde während der Periode der maximalen Umsatzgeschwindigkeit stufenweise bis zum Erreichen des maximalen Hemmeffekts dazupipettiert (Kap. 2.2.3.).

Abb. 3.25.: Effekte von PtdIns(4,5)P₂ auf den K_m-Wert von D-Ins(1,4,5)P₃ (Darstellung nach Lineweaver-Burk)



Die Analyse des Hemmstoffeffekts von PtdIns(4,5)P₂ auf den K_{m,app}-Wert der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A wurde wie in Kap. 2.2.7. beschrieben durchgeführt. Die Phosphoinositidkonzentration wurde in den jeweiligen Testansätzen variiert, während die Konzentration von ATP mit 500 μM konstant gehalten wurde. Die Konzentration für D-Ins(1,4,5)P₃ variierte in den einzelnen Messungen mit Hilfe von „single-transients“ zwischen 10 μM und 0 μM.

3.13. Hemmung des Zellwachstums durch die im Screening optimierten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Inhibitoren

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten sehr spezifischen Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A eignen sich zur Aufklärung der Rolle der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase sowie der hieraus gebildeten höher phosphorylierten Inositole im Prozeß des Zellwachstums, sofern sie in die Zellen aufgenommen werden.

Da einige der effektivsten Hemmstoffe bereits als Inhibitoren des Zellwachstums (Agullo et al., 1996; Ahmad et al., 1997; Band et al., 1989; Chen et al., 1998; Kang et al., 1997; Okabe et al., 1997; Rodgers et al., 1998) bekannt sind, wurde die Wirkung aller Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Hemmstoffe auf das Zellwachstum unter einheitlichen Bedingungen an zwei verschiedenen Zelllinien (Jurkat T-Zellen, NIH 3T3-Zellen) analysiert.

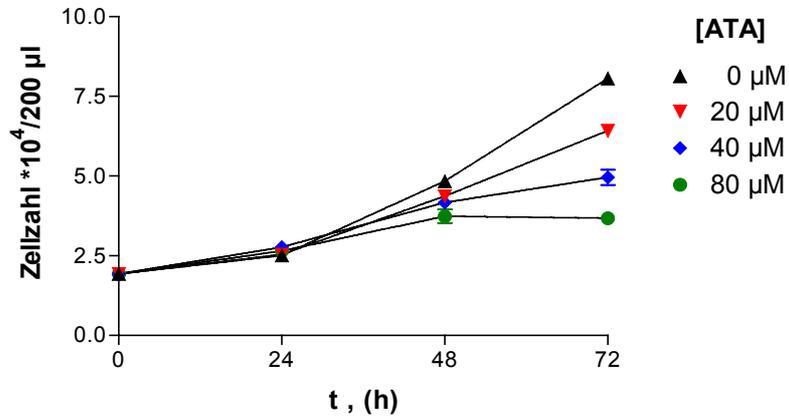
3.13.1. Jurkat T-Zellen

Zur Analyse des Hemmstoffeffekts auf die Zellproliferation wurden die Jurkat T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Inhibitor über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert (Kap. 2.2.22.1.). Nach jeweils 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels des Coulter Counters (Kap. 2.2.21.1.4.). Diese Analytik wurde mit den potentesten Hemmstoffen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durchgeführt.

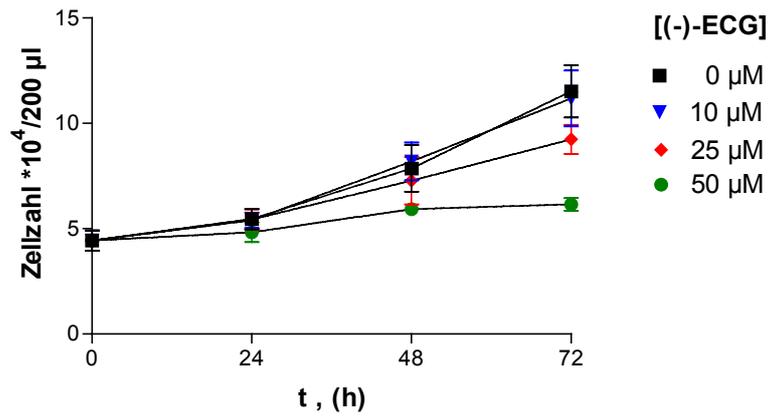
Für alle getesteten Verbindungen konnte eine Proliferationshemmung der Jurkat T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.26. a-h).

Abb. 3.26. a - h.: Proliferationshemmung von Jurkat T-Zellen durch potente Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

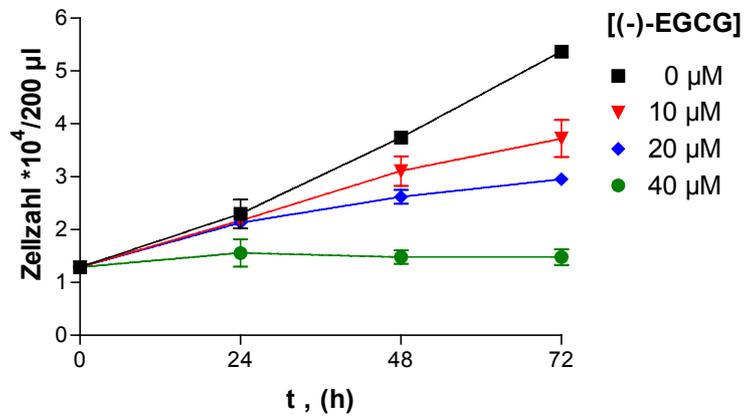
a)



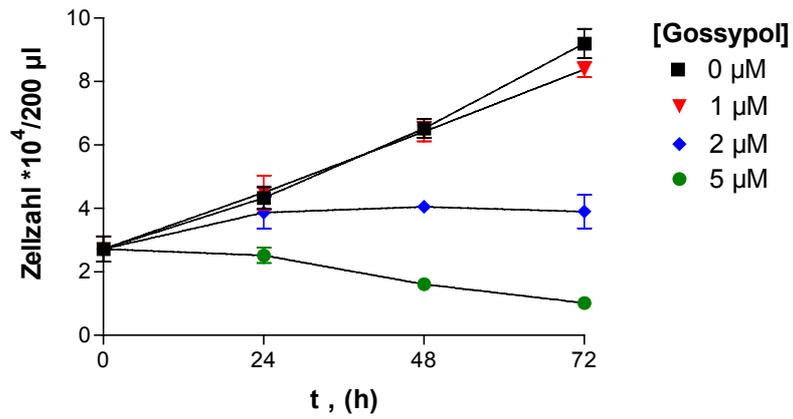
b)



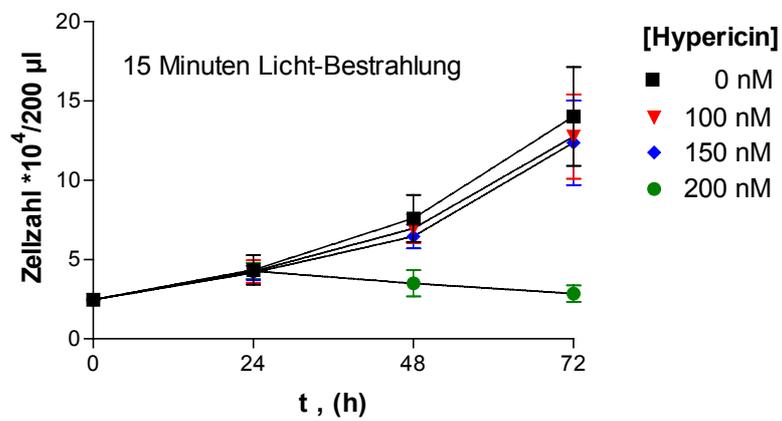
c)



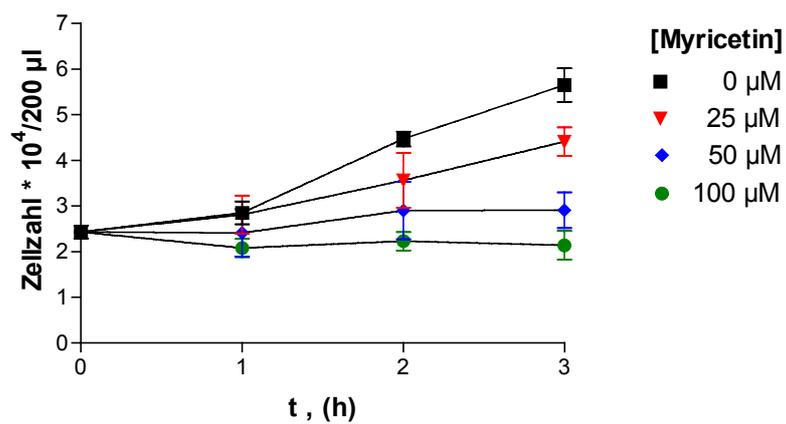
d)



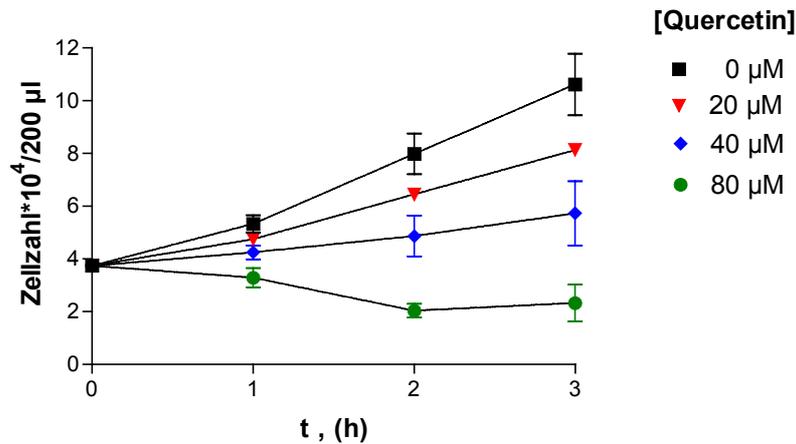
e)



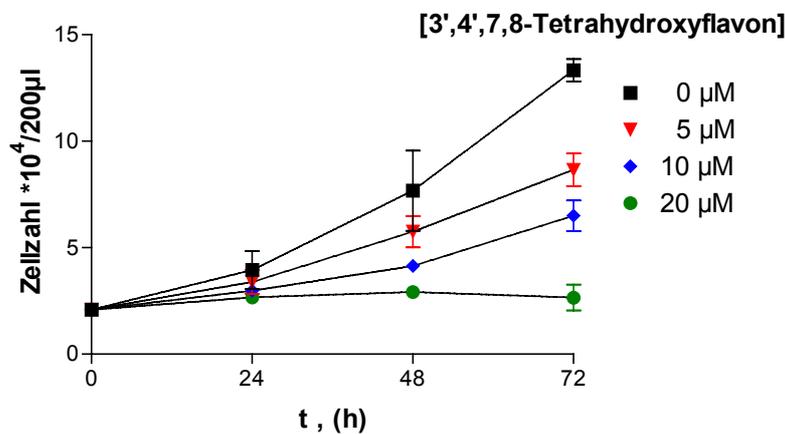
f)



g)



h)



Zur Analyse des Hemmstoffeffekts auf die Zellproliferation (Kap. 2.2.22.1.) wurden die Jurkat T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz für 72 Stunden sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle im Dunkeln inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe an frischem Hemmstoff. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellzahl (Kap. 2.2.21.1.4.) ermittelt.

Gossypol und Hypericin stellten sich als Inhibitoren mit dem stärksten Hemmeffekt heraus, wobei Gossypol (IC_{50} : 1.6 µM) allerdings eine sehr geringe „therapeutische Breite“ (Dosisverhältnis zwischen antiproliferativen und zelltötenden Effekt, siehe unten) zeigte. Bei Konzentrationsunterschieden von bereits 0.5 µM konnten sehr unterschiedlich ausgeprägte Hemmeffekte beobachtet werden.

Da laut Literaturangaben Hypericin (Agostinis et al., 1995) unter Lichteinfluß ein wesentlich effektiverer Hemmstoff ist, wurde die Analyse des Hemmeffektes auf die Proliferation auch unter Bestrahlung durchgeführt (Kap. 2.2.22.1.). Hierbei konnte ein IC_{50} -Wert von $0.17 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Wurden die Versuche unter Lichtausschluß durchgeführt, zeigte Hypericin erst bei einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ einen schwach ausgeprägten Effekt auf das Zellwachstum.

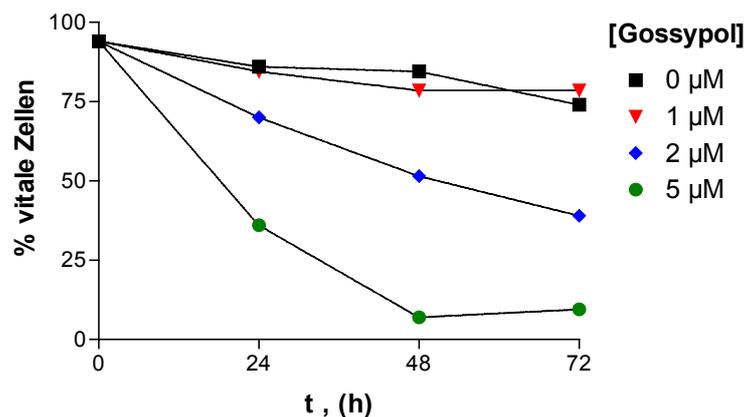
ATA erwies sich von allen getesteten Hemmstoffen als der schwächste Inhibitor des Zellwachstums von Jurkat T-Zellen. Für diese Verbindung konnte ein IC_{50} -Wert von $60.3 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

Zur Ermittlung der Zytotoxizität der Inhibitoren wurde der Anteil an lebenden Zellen unter Verwendung der Trypanblau-Färbemethode (Kap. 2.2.21.1.5.) durchgeführt.

Hierbei stellte sich heraus, daß in Gegenwart von Gossypol (Abb. 3.27.), (-)-EGCG und Hypericin in einer Konzentration des 2- bis 3-fachen IC_{50} -Wertes des Hemmers des Zellwachstums über eine Inkubationszeit von 72 Stunden nur bis zu 10 % der Zellen überlebten. Dieses deutet auf eine Aktivierung der Apoptose hin.

Bei allen anderen getesteten Inhibitoren konnte eine Vitalität von 49 % (Myricetin) bis 89 % (ECG) bestimmt werden.

Abb. 3.27.: Effekt von Gossypol auf die Vitalität von Jurkat T-Zellen



Zur Ermittlung des Hemmstoffeffekts auf die Überlebensrate der Jurkat T-Zellen wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz für 72 Stunden sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle im Dunkeln inkubiert (Kap. 2.2.22.1.). Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe an frischem Hemmstoff. Die Anzahl der vitalen Zellen wurde nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt (Kap. 2.2.21.1.5.).

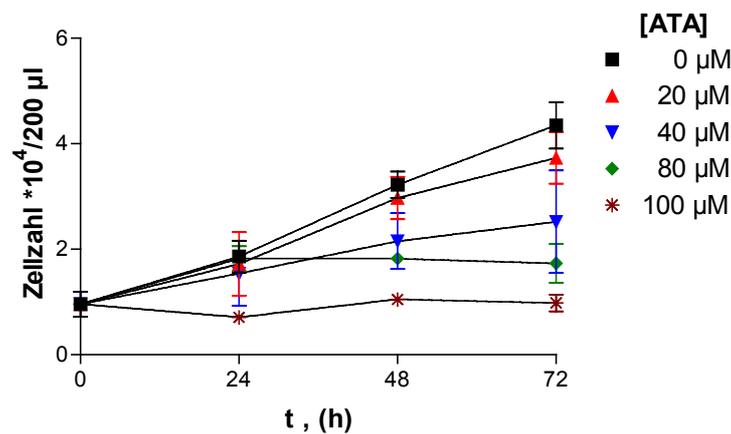
3.13.2. NIH 3T3-Zellen

Zur Bestimmung der Hemmstoffeffekte auf die Zellproliferation von NIH 3T3-Zellen wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen an Inhibitor über einen Zeitraum von 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Kap. 2.2.22.2.). Diese Versuche wurden mit den an Jurkat T-Zellen getesteten Hemmstoffen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durchgeführt.

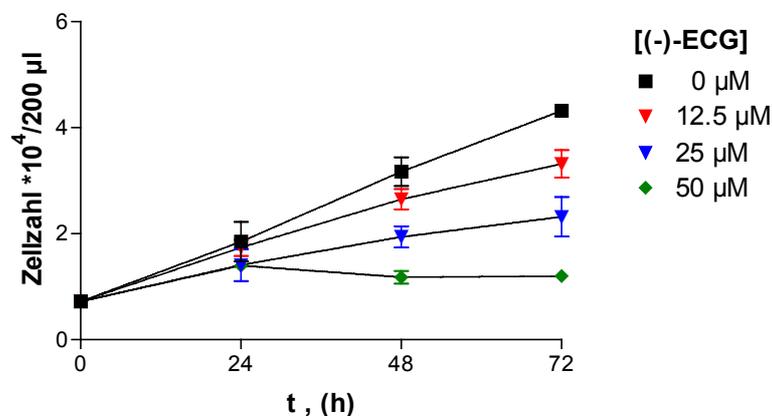
Für alle getesteten Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase konnte auch bei dieser Zelllinie eine Proliferationshemmung der NIH 3T3-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.28.a -h).

Abb. 3.28. a - h: Proliferationshemmung von NIH 3T3-Zellen durch potente Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

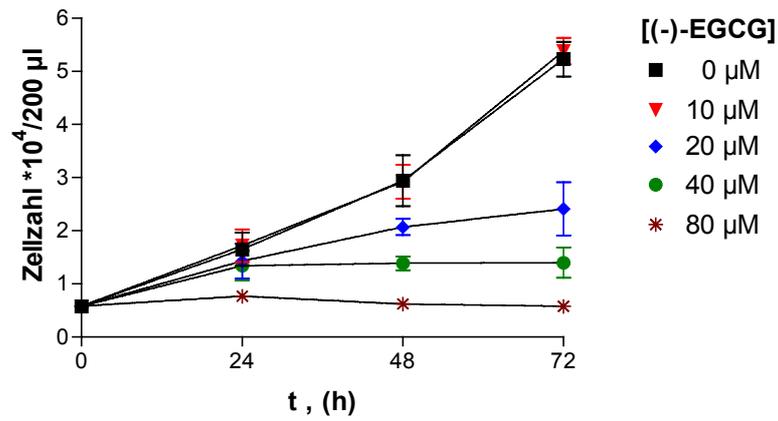
a)



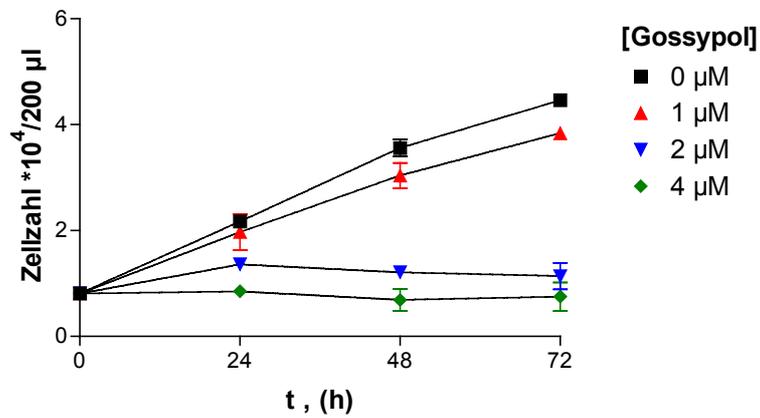
b)



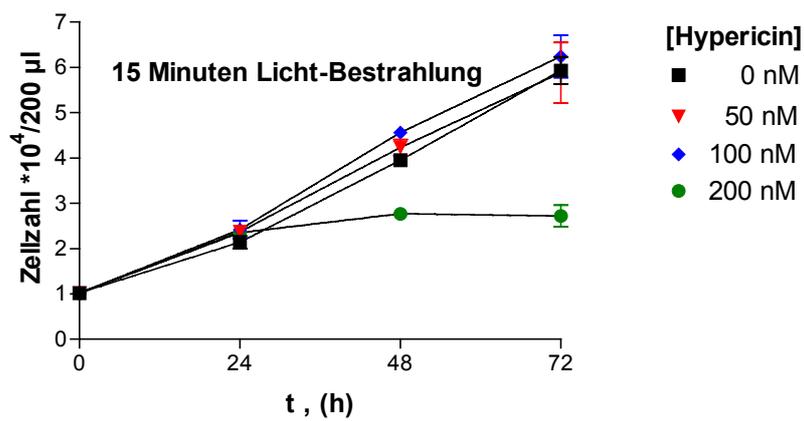
c)



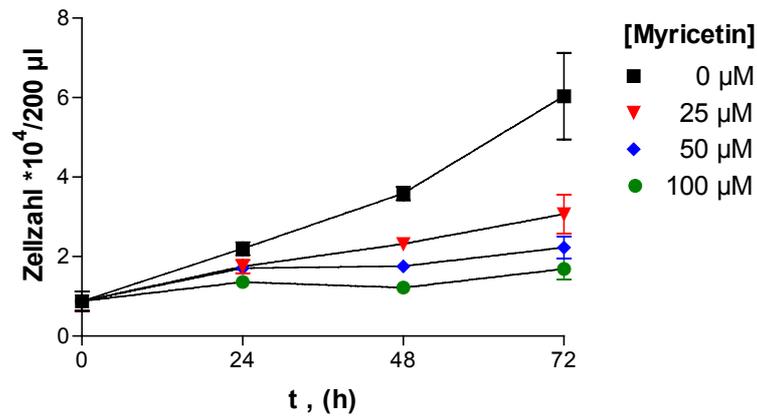
d)



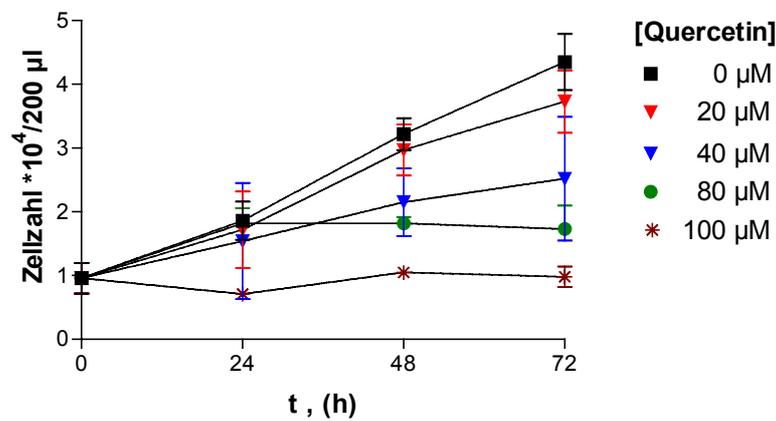
e)



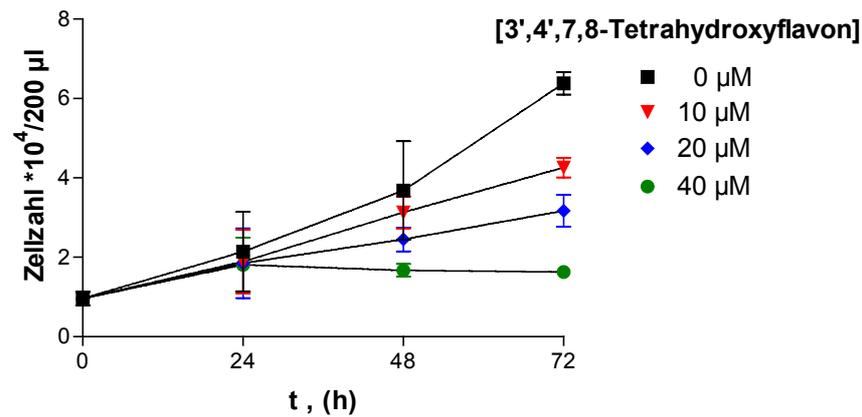
f)



g)



h)



Zur Analyse des Hemmstoffeffekts auf die Zellproliferation (Kap. 2.2.22.1.) wurden die NIH 3T3-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz für 72 Stunden sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle im Dunkeln inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellzahl (Kap. 2.2.21.1.4.) ermittelt.

Gossypol zeigte wie bei den Jurkat T-Zellen den stärksten Effekt (IC_{50} : 1.14 μ M), wobei diese Verbindung auch bei diesen Zellen eine sehr geringe „therapeutische Breite“ (Dosisverhältnis zwischen antiproliferativen und zelltötenden Effekt) besaß.

Für (-)-ECG konnte ein um Faktor 1.7 niedrigerer IC_{50} -Wert (21.1 μ M) im Vergleich zu den Jurkat T-Zellen bestimmt werden.

Dagegen hemmte Quercetin die Proliferation der NIH 3T3-Zellen um Faktor 2 geringer (IC_{50} : 52.5 μ M).

Hypericin zeigte nach 15-minütiger Bestrahlung mit Laborlicht bei einer Konzentration von 200 nM eine deutliche Hemmung der Proliferation, die allerdings nicht so stark ausgeprägt war wie bei den Jurkat T-Zellen. Wurde der Versuch unter Lichtausschluß durchgeführt, konnte ein sehr geringfügiger Hemmeffekt (7% Proliferationshemmung) bei einer Konzentration von 300 nM festgestellt werden.

ATA hemmte die Proliferation der NIH 3T3-Zellen um Faktor 10 stärker (IC_{50} : 6.25 μ M) als diejenige der Jurkat T-Zellen.

Die IC_{50} -Werte aller anderen getesteten Hemmstoffe unterscheiden sich nicht signifikant von den bei den Jurkat T-Zellen analysierten Werten.

Bei der Ermittlung der Zytotoxizität der Inhibitoren (Kap. 2.2.21.1.5.) stellte sich heraus, daß bei (-)-ECG, Quercetin und 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon in einer Konzentration des 2- bis 3-fachen IC_{50} -Wertes des Zellwachstums über eine Inkubationszeit von 72 Stunden bis zu 70 % der Zellen überlebten.

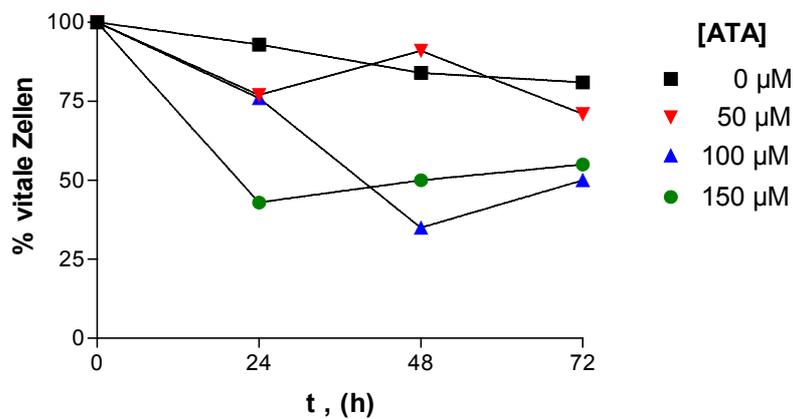
Für Hypericin konnte bei einer Konzentration von 200 nM nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden eine Überlebensrate der Zellen von 51 % gemessen werden.

Bei (-)-EGCG und Myricetin wurden bei einer Konzentration des 4-fachen IC_{50} -Wertes des Zellwachstums nach 72 Stunden 50 % bzw. 34 % vitale Zellen analysiert.

Die geringste Zytotoxizität besaß ATA, die auch den schwächsten Hemmeffekt auf die Proliferation aufwies. Bei einer Konzentration des 24-fachen IC_{50} -Wertes des Zellwachstums überlebten 55 % der Zellen (Abb. 3.29.).

Bei Gossypol dagegen starben alle Zellen bei einer Konzentration des 3.5-fachen IC_{50} -Wertes des Zellwachstums ab.

Abb. 3.29.: Effekt von ATA auf die Vitalität von NIH 3T3-Zellen



Zur Ermittlung des Hemmstoffeffekts auf die Überlebensrate der NIH 3T3-Zellen wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz für 72 Stunden sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle im Dunkeln inkubiert (Kap. 2.2.22.2.). Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt (Kap. 2.2.21.1.5.).

3.14. Einfluß der Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase auf den Zellzyklus von Jurkat T-Zellen

Zur weiteren Analyse der antiproliferativen und zelltötenden Hemmstoffeffekte auf den Zellzyklus von Jurkat T-Zellen wurde das Verhältnis von Zellen in G₀/G₁-, S und G₂/M- Phase bei steigenden Hemmstoffkonzentrationen bestimmt. Hierbei wurde die Verteilung der mit Propidiumjodid gefärbten DNA mittels der Durchflußzytometrie (Kap. 2.2.22.3.) gemessen. 20000 Zellen wurden hierbei analysiert. Die Resultate wurden als prozentuale Verteilung der Zellen in jeder Phase des Zellzyklus dargestellt.

Diese Versuche wurden mit den Inhibitoren (-)-EGCG, Quercetin, Gossypol und 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon durchgeführt.

3.14.1. Effekte von (-)-EGCG

Die Ergebnisse zeigen, daß die Behandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen an (-)-EGCG (0 - 40 µM) über einen Zeitraum von 48 Stunden eine Anhäufung der Zellen in der S-Phase des Zellzykluses hervorrief (Abb. 30 A - D). Der prozentuale Anteil der Zellen in dieser Phase stieg von 36 % ± 0.6 % in der Kontrolle auf 55 % ± 3.5 % unter einer Konzentration von 40 µM (-)-EGCG an.

Gleichzeitig nahm der prozentuale Anteil der Zellen in der G₀/G₁-Phase von 52 % ± 0.9 % (Kontrolle) auf 35 % ± 4.2 % (40 µM) ab.

Der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase veränderte sich unter dem Einfluß des Hemmstoffes nicht.

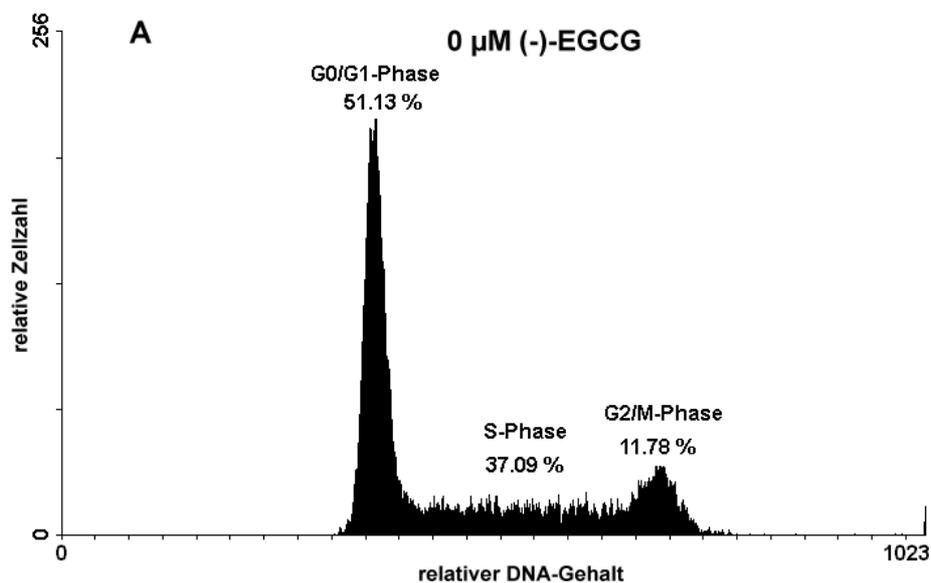
3.14.2. Effekte von Gossypol

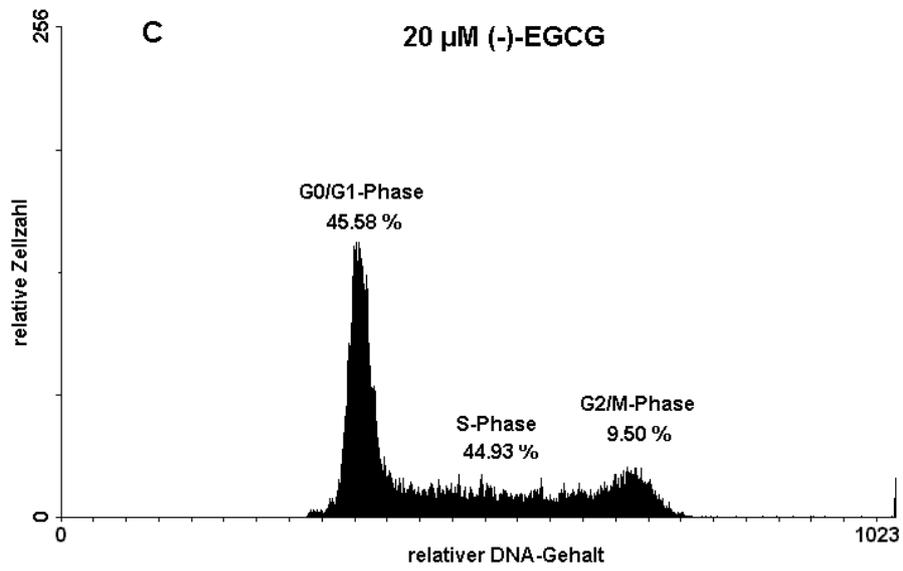
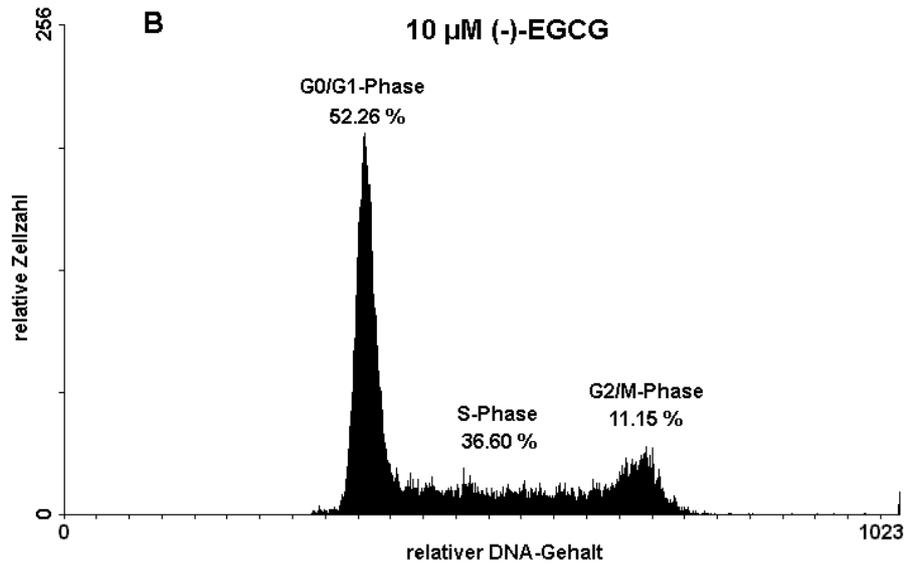
Unter dem Einfluß von Gossypol (0 - 2 µM) wurde der Zellzyklus der Jurkat T-Zellen ebenfalls bevorzugt in der S-Phase geblockt. Der Prozentsatz der Zellen in dieser Phase stieg von 37 % ± 3.5 % in der Kontrolle auf 48 % ± 4.0 % unter einer Gossypol-Konzentration von 2 µM.

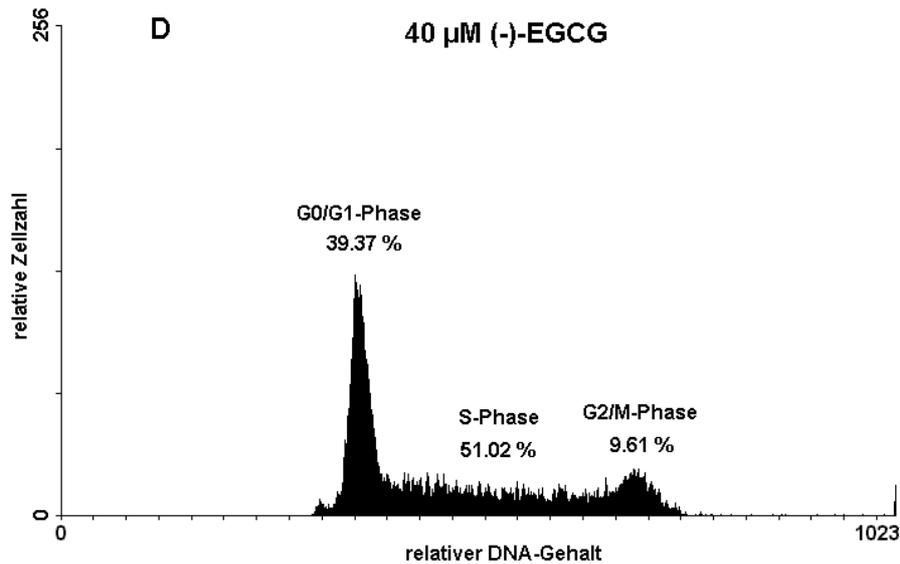
Parallel hierzu konnte eine Abnahme der Zellen in der G₀/G₁-Phase von 52 % ± 2.9 % (0 µM) auf 46 % ± 2.2 % (2 µM) analysiert werden.

Der prozentuale Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase blieb unverändert.

Abb. 3.30. A - D: DNA-Histogramme von Jurkat T-Zellen unter dem Einfluß von (-)-EGCG







Zur Analyse des Hemmstoffeffekts auf den Zellzyklus der Jurkat T-Zellen (Kap. 2.2.22.3.) wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz für 72 Stunden sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle versetzt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel sowie die Zugabe von frischem Hemmstoff. Nach einer insgesamt 48-stündigen Inkubationszeit wurde die Verteilung der DNA mittels eines Durchflußzytometers (Fa. Becton Dickinson) gemessen, wobei 20000 Zellen pro Messung verwendet wurden. Die Analysen wurden in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Die Abbildungen zeigen die DNA-Histogramme einer Untersuchung.

3.14.3. Effekte von 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon

Dieser Hemmstoff, der in einem Konzentrationsbereich von 0 µM bis 20 µM eingesetzt wurde, bewirkte abermals einen Anstieg des Prozentsatzes der Zellen in der S-Phase (0 µM: 42 % ± 1.4 %, 20 µM: 66 % ± 4.0 %).

Zugleich konnte eine Abnahme des Zellanteils in der G₀/G₁-Phase von 51 % ± 2.9 % (0 µM) auf 22 % ± 2.1 % (20 µM) festgestellt werden.

In der G₂/M-Phase konnte bei einer Inhibitorkonzentration von 20 µM zusätzlich ein leichter Anstieg des prozentualen Anteils der Zellen gemessen werden (0 µM: 11 % ± 0.7 %, 20 µM: 16 % ± 0.4 %), der bei einer Konzentration von 10 µM noch nicht detektiert wurde (12 % ± 0.3 %).

3.14.4. Effekte von Quercetin

Deutlich komplexer als bei den obigen Hemmstoffen waren die Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin auf den Zellzyklus von Jurkat T-Zellen.

Tab. 3.14.: Einfluß von Quercetin auf den Zellzyklus von Jurkat T-Zellen

Quercetin (μM)	G ₀ /G ₁ -Phase (%)	G ₂ /M-Phase (%)	S-Phase (%)
0	49 \pm 1.0	11 \pm 0.4	40 \pm 1.4
5	31 \pm 5.1	36 \pm 2.3	35 \pm 5.3
10	19 \pm 3	21 \pm 2.5	61 \pm 3.5
20	10 \pm 2	50 \pm 5.3	41 \pm 1.5

Unter dem Einfluß von 5 μM Quercetin verminderte sich zunächst der Anteil an Zellen in der S-Phase von 40 % \pm 1.4 % (0 μM) auf 35 % \pm 5.3 % (5 μM). Bei einer Konzentration von werden, der sich bei 20 μM Quercetin wieder auf 41 % \pm 1.5 % verringerte (Tab. 3.14.). Gleichzeitig konnte eine Abnahme des Anteils an Zellen in der G₀/G₁-Phase von 49 % \pm 1.0 % in der Kontrolle über 31 % \pm 5.1 % bei 5 μM auf 10 % \pm 2 % bei einer Hemmstoffkonzentration von 20 μM analysiert werden.

In der G₂/M-Phase erfolgte zunächst eine prozentuale Zunahme der Zellen von 11 % \pm 0.4 % (0 μM) auf 36 % \pm 2.3 % (5 μM). Dagegen erniedrigte sich der Anteil der Zellen bei einer Konzentration von 10 μM Quercetin auf 21 % \pm 2.5 %. Bei einer Dosis von 20 μM des Flavonols erhöhte sich wiederum der prozentuale Zellanteil auf 50 % \pm 5.3 %.

Die unterschiedlichen Prozentwerte in den einzelnen Kontrolluntersuchungen basieren auf der Verwendung verschiedener Zellkulturansätze.

3.14.5. Vitalität und Apoptose

Parallel zu den Zellzyklusuntersuchungen wurde der Anteil an lebenden Zellen unter Verwendung der Trypanblau-Färbemethode (Kap. 2.2.21.1.5.) durchgeführt. In den Kontrollen konnte eine Vitalität von 81 - 85 % analysiert werden.

Unter dem Einfluß von (-)-EGCG wurden bei einer Konzentration von 10 μM 80 %, bei 20 μM 81 % und bei 40 μM 68 % vitale Zellen nachgewiesen.

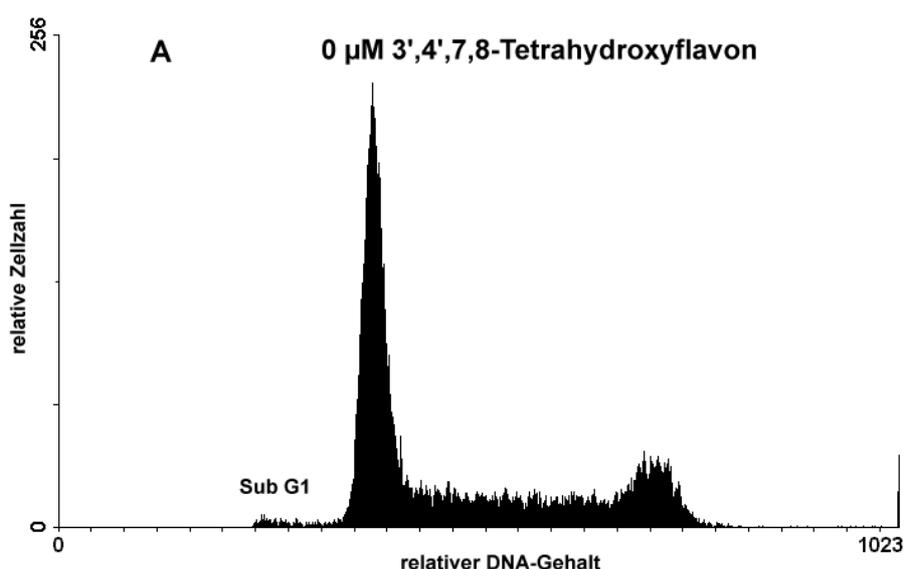
In Gegenwart von 5 μM 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon haben sich 74 % der Zellen, bei einer Konzentration von 10 μM 68 % und bei 20 μM 52 % als vital erwiesen.

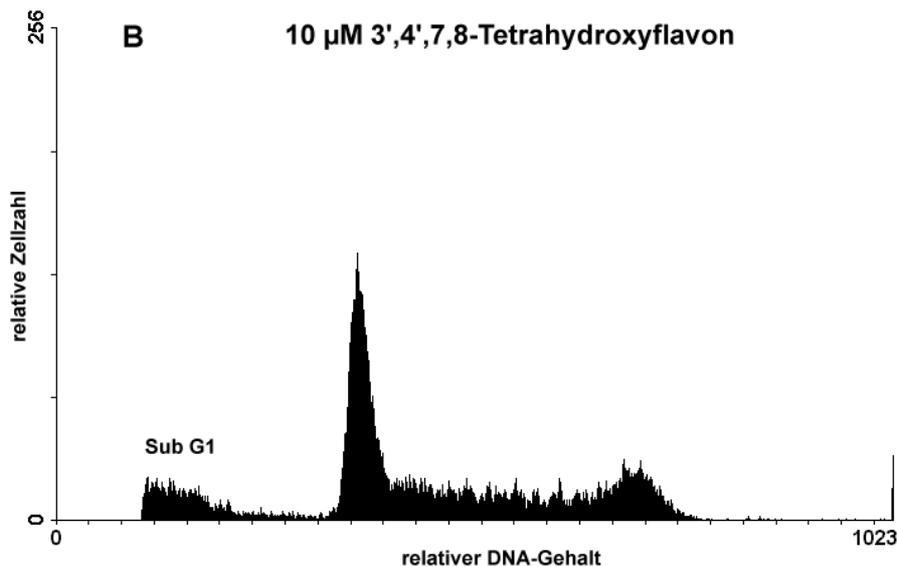
In Anwesenheit von 5 μM Quercetin waren noch 70 %, bei 10 μM 59 % und unter 20 μM 45 % der Zellen vital.

Wurden die Zellen mit dem Hemmstoff Gossypol versetzt, konnte bei Anwesenheit von 1 μM eine 82 %ige, bei 2 μM eine 70 %ige und unter 4 μM Gossypol eine 14 %ige Vitalität bestimmt werden.

Anhand der Ergebnisse der Zellzyklusuntersuchung konnte ebenfalls aufgezeigt werden, daß die Jurkat T-Zellen unter dem Einfluß der getesteten Hemmstoffe in Apoptose gehen. Apoptotische Zellen bilden eine hypoploide Zellpopulation, die allgemein als Sub G₁-Peak bezeichnet wird. Dieser Sub G₁-Peak konnte bei den mit Hemmstoff behandelten Jurkat T-Zellen analysiert werden (Abb. 3.31. a,b).

Abb. 3.31. A,B: DNA-Histogramm von Jurkat T-Zellen zur Darstellung von Apoptose





3.15. 5-Bromo-2'-deoxy-uridin-Einbau in Jurkat T-Zellen

Da die Ergebnisse der Durchflußzytometrie zeigten, daß alle Hemmstoffe der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A den Zellzyklus der Jurkat T-Zellen in der S-Phase blockierten, wurde anhand des 5-Bromo-2'-deoxy-uridin-Einbaus (BrdU) die DNA-Synthese der Zellen überprüft. Diese Analyse diente zur Klärung der Frage, ob die Blockade in der S-Phase auf eine Hemmung der DNA-Synthese zurückzuführen ist.

Die Jurkat T-Zellen wurden in einer Dichte von $2 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ ausgesät und für 48 Stunden in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Hemmstoffes bei 37°C in einer 5 % CO_2 -haltigen Atmosphäre inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Vitalität der Jurkat T-Zellen mit Hilfe der Trypanblau-Färbemethode (Kap. 2.2.21.1.5.) und der BrdU-Einbau (Kap. 2.2.22.4.) untersucht. Als Hemmstoffe wurden Gossypol, ATA, (-)-EGCG sowie 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon eingesetzt.

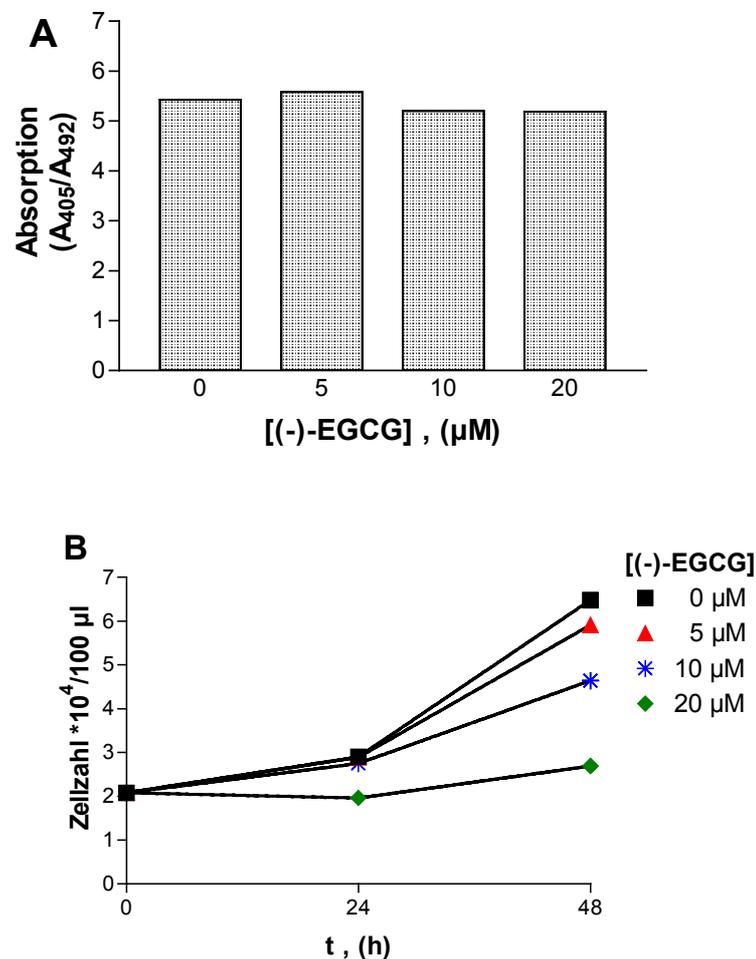
(-)-EGCG, welches den Zellzyklus in der S-Phase blockiert, beeinflusst die DNA-Synthese bei der maximal eingesetzten Konzentration von $20 \mu\text{M}$ nicht signifikant (Abb. 3.32. A). Bei dieser Konzentration konnte eine deutliche Hemmung der Proliferation (Abb. 3.32. B) sowie mittels der Trypanblau-Färbemethode 50 % vitale Zellen ermittelt werden.

Ebenso wurde durch 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon die DNA-Synthese nicht signifikant beeinflusst.

Dagegen konnte eine leichte Hemmung der Synthese durch Gossypol ermittelt werden. Bei einer Konzentration von 1 μM und einem prozentualen Anteil von 66 % lebenden Zellen wurde die DNA-Synthese um 16 % erniedrigt. Bei der maximal eingesetzten Konzentration an Gossypol (3 μM) wurde eine 21 %ige Inhibition der DNA-Synthese analysiert.

Wurden die Jurkat T-Zellen für 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an ATA inkubiert, konnte eine Stimulierung der DNA-Synthese um 17 % beobachtet werden.

Abb. 3.32.: A: BrdU-Einbau in Jurkat T-Zellen
B: Hemmung des Zellwachstums der Jurkat T-Zellen unter dem Einfluß von (-)-EGCG



Der BrdU-Einbau in Jurkat T-Zellen wurde unter dem Einfluß der Testsubstanz wie in Kap. 2.2.22.4. beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Hemmstoffs sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle versetzt. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden, wobei nach 24 Stunden ein Mediumwechsel und die Zugabe an frischen Hemmstoff erfolgte. Die Messung des BrdU-Einbaus erfolgte bei 405 nm und bei der Referenzwellenlänge von 492 nm im Mikrotiterplatten-Reader.

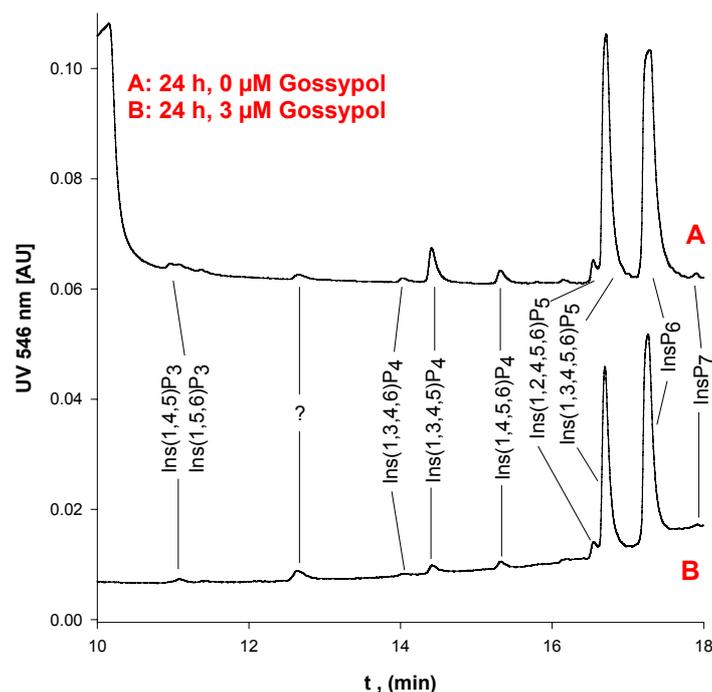
3.16. Hemmstoffeffekte auf den Inositolpolyphosphat-Metabolismus

Da der beobachtete Block des Zellwachstums durch $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase-Hemmstoffe in der S-Phase ganz offensichtlich nicht mit dieser Hemmung der DNA-Synthese korreliert ist, wurde nun die Möglichkeit näher analysiert, daß der antiproliferative Effekt wie auch der S-Phasenblock mit einer Hemmung des Inositolmetabolismus korrelieren und vielleicht kausal zusammenhängen könnte. Es wurde also untersucht, ob die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase-Hemmstoffe in den intakten Zellen über die Inhibition dieses Enzyms die Biosynthese der höheren Inositolphosphate hemmt.

Die Effekte von Quercetin und Gossypol auf die Konzentrationen der höher phosphorylierten Inositle in humanen Jurkat T-Zellen wurden mittels der MDD-HPLC-Analytik (Mayr, 1990) analysiert.

Zunächst wurden die Zellen in An- und Abwesenheit von $30\ \mu\text{M}$ Quercetin bzw. $3\ \mu\text{M}$ Gossypol über 48 Stunden inkubiert (Kap. 2.2.22.5.). Anschließend wurden diese für die HPLC-Analyse der Inositolphosphate aufgearbeitet (Kap. 2.2.22.6.) und die zellulären Inositolphosphate gemessen (Kap. 2.2.22.7.). In Abbildung 3.33. sind zwei Chromatogramme abgebildet, die die Verteilung der Inositolphosphate in Jurkat T-Zellen in An- und Abwesenheit von $3\ \mu\text{M}$ Gossypol darstellen.

Abb. 3.33.: HPLC-Chromatogramme der Inositolphosphatverteilung in Jurkat T-Zellen



3.16.1. Wirkung von Quercetin

Im Vergleich zu den Kontrollen konnte unter Behandlung der Jurkat T-Lymphozyten mit 30 μM Quercetin ein Rückgang der Konzentration an $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$, des Dephosphorylierungsproduktes des Produktes der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase {D- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ }, um 49 % nach 48 Stunden Inkubation analysiert werden (Abb. 34.A).

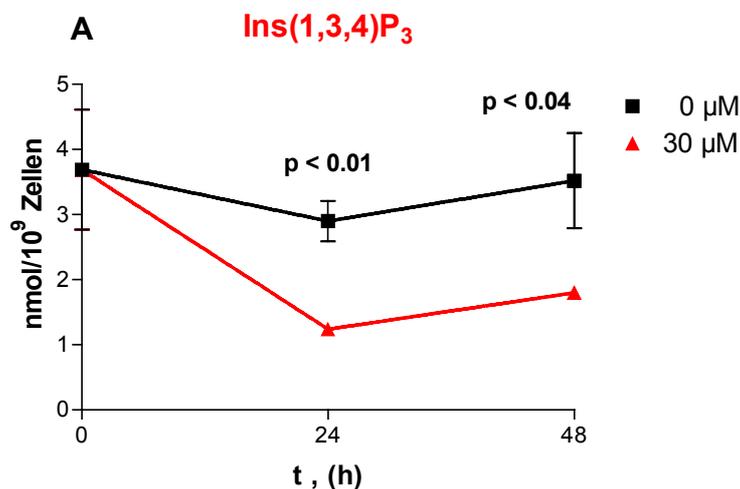
Parallel hierzu wurde wie erwartet eine Abnahme der Konzentration an $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ um 68 % und an $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ um 77 % gemessen (Abb. 3.34.B).

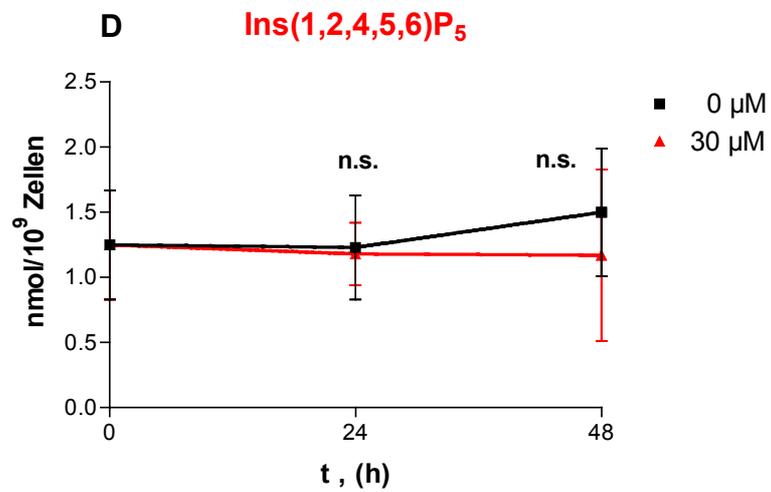
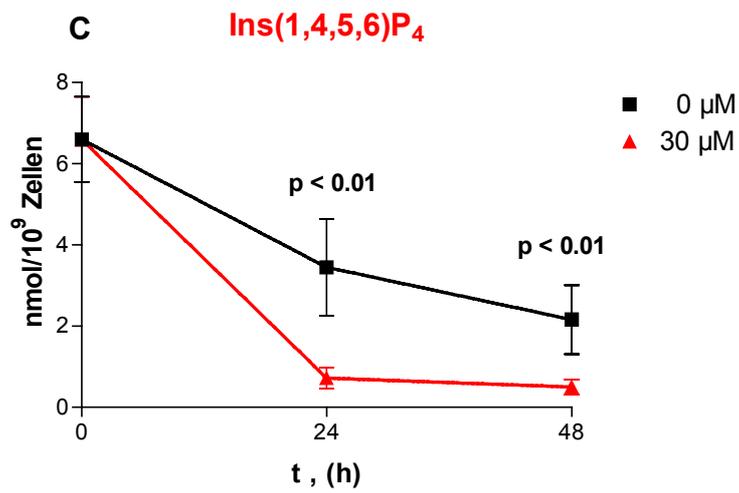
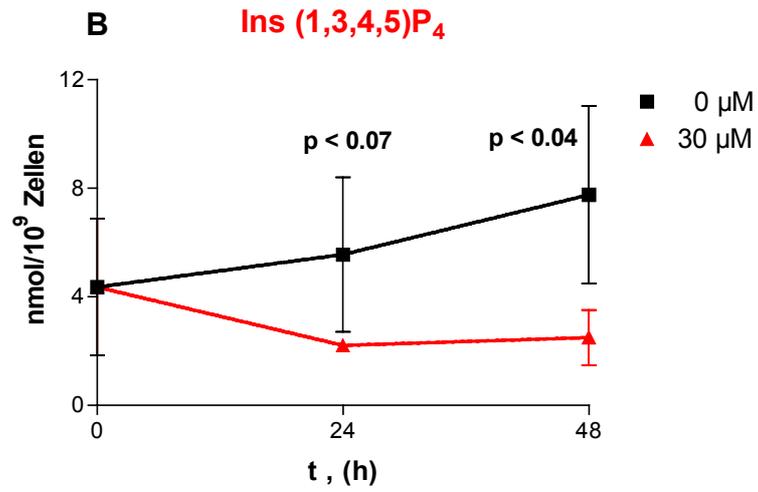
Ebenso wurde eine Verringerung in der Konzentration an InsP_5 -Isomeren beobachtet. Insbesondere bei $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ konnte ein Rückgang um 68 % ermittelt werden (Abb. 3.34.E). Bei dem Isomer $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ wurde dagegen nur eine nicht signifikante Abnahme analysiert (Abb. 3.33.D).

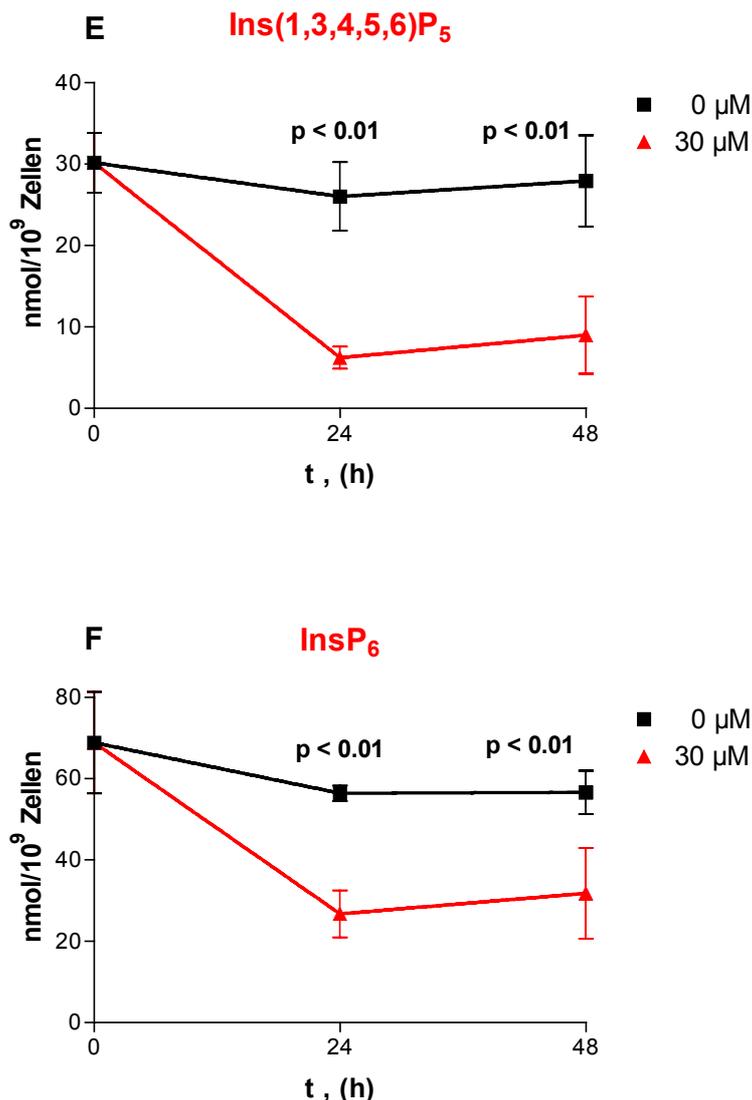
Auch die Konzentrationen an noch höher phosphorylierten Inositolen nahmen unter dem Einfluß von Quercetin ab (InsP_6 : 44 %, InsP_7 : 19 %).

In der Menge an $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$ konnte kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden.

Abb. 3.34. A - G: Abnahme der Stoffmenge verschiedener Inositolphosphat-Isomere nach der Zugabe von Quercetin



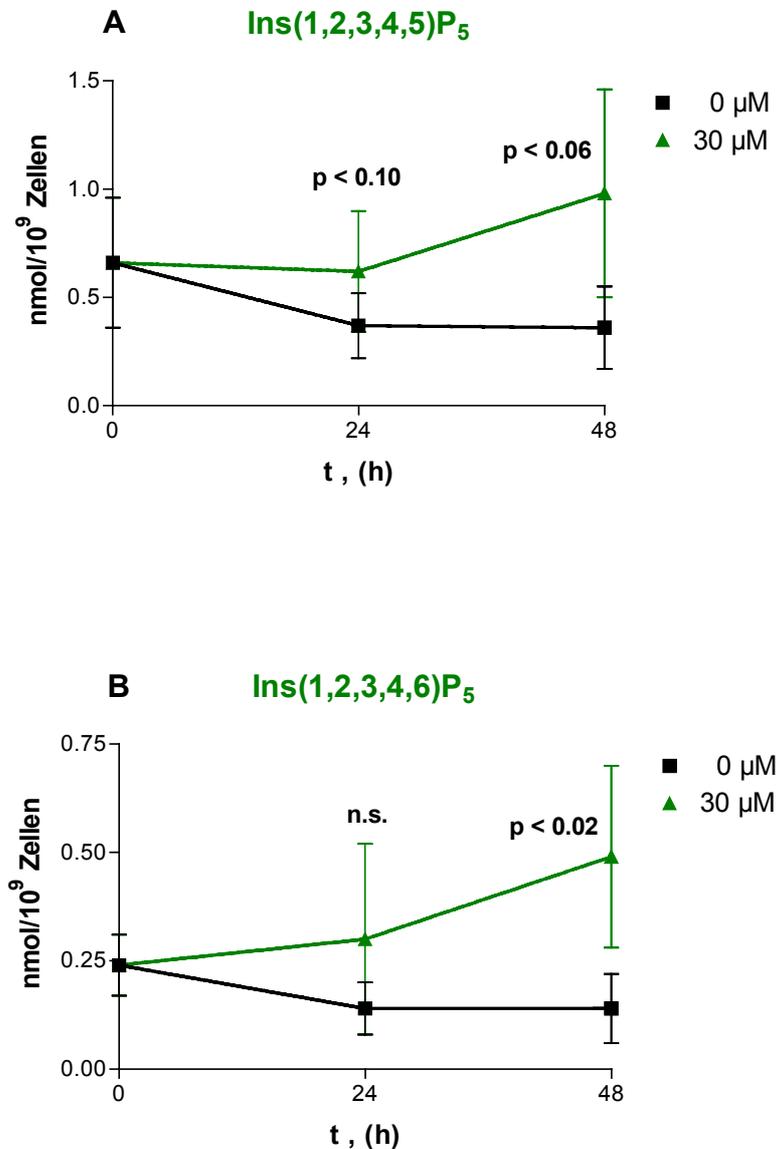




Die Effekte von Quercetin auf den Inositolphosphat-Metabolismus wurden wie in Kap. 2.2.22.5. beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Quercetin sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle versetzt. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Hiernach erfolgte die Aufarbeitung der Zellen für die HPLC-Analytik (Kap. 2.2.22.6.) und gemessen (Kap. 2.2.22.7.). Die statistische Analyse wurde anhand eines t-Test für ungepaarte Proben durchgeführt.
n.s.: nicht signifikant

Gleichzeitig konnte eine deutliche Zunahme in der Konzentration an den InsP₅-Isomeren Ins(1,2,3,4,6)P₅ und Ins(1,2,3,4,5)P₅ im Vergleich zur Kontrolle unter dem Einfluß von Quercetin festgestellt werden (Abb. 3.35. A,B).

Abb. 3.35. A,B: Zunahme der Stoffmenge verschiedener Inositolphosphat-Isomere nach der Zugabe von Quercetin



Die Effekte von Quercetin auf den Inositolphosphat-Metabolismus wurden wie in Kap. 2.2.22.5. beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Quercetin sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle versetzt. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Hiernach erfolgte die Aufarbeitung der Zellen für die HPLC-Analytik (Kap. 2.2.22.6.) und gemessen (Kap. 2.2.22.7.). Die statistische Analyse wurde anhand eines t-Test für ungepaarte Proben durchgeführt.

n.s.: nicht signifikant

3.16.2. Wirkung von Gossypol

Unter der Behandlung von Jurkat T-Zellen mit 3 μM Gossypol konnte eine Abnahme der Konzentration an $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ um 35 % nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden detektiert werden (Abb. 3.35.A).

Ebenso nahmen die Konzentrationen an $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ um 39 %, an $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ um 33 % und an $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ um 61 % ab (Abb. 3.36.B-D).

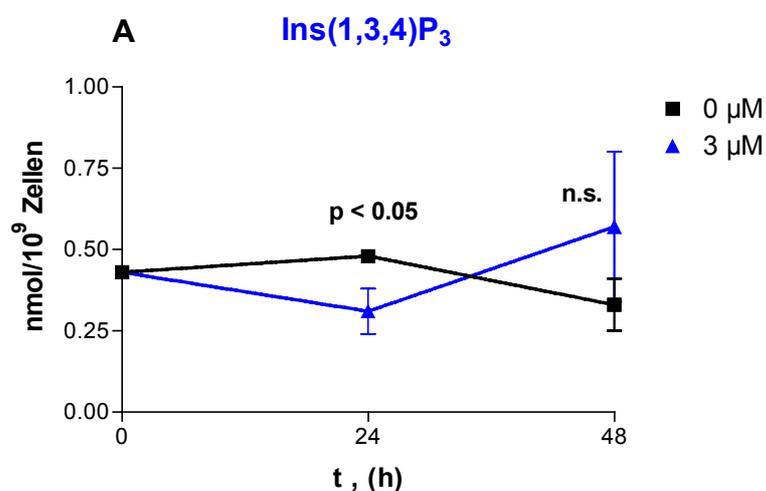
Parallel hierzu wurde auch eine Verringerung der Konzentration der InsP_5 -Isomeren $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ um 28 % sowie $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ um 24 % analysiert (Abb. 3.36.F), die sich aber aufgrund einer statistischen Analyse (t-Test) nicht als signifikant herausstellte.

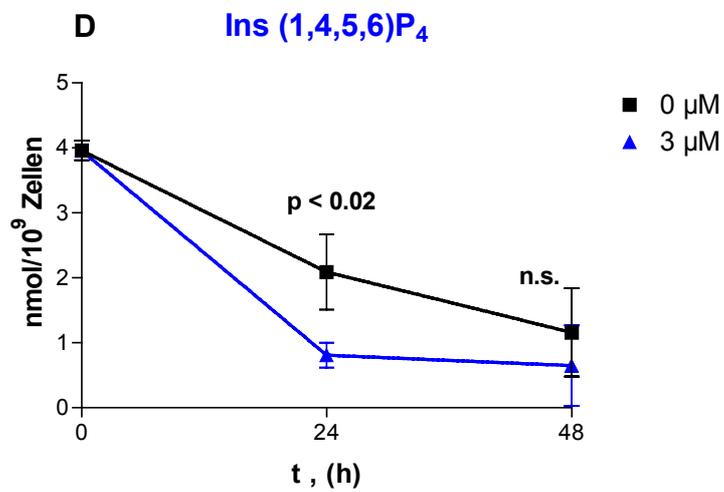
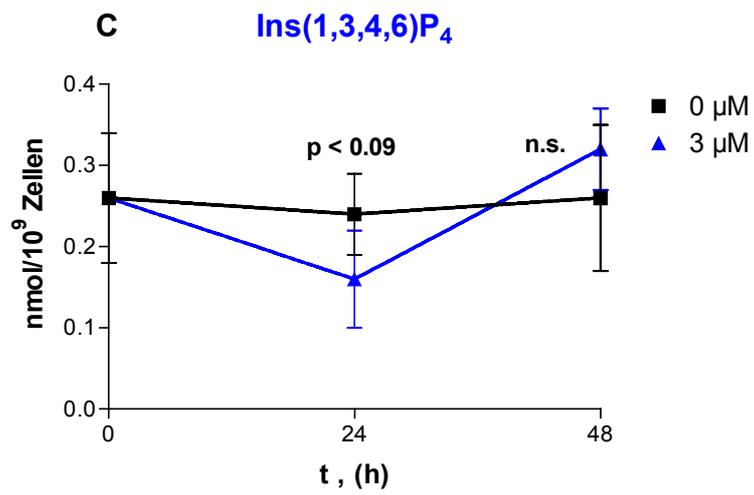
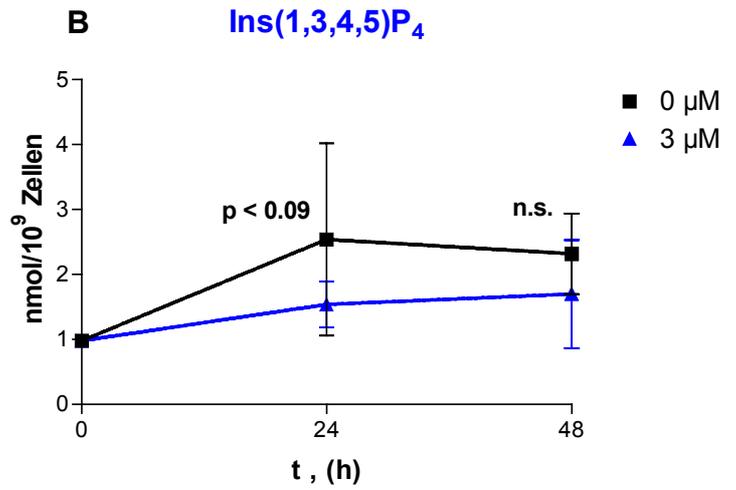
Die Konzentrationen der höherphosphorylierten InsPs verringerten sich ebenfalls unter dem Einfluß von Gossypol (InsP_6 : 25%, InsP_7 : 35%).

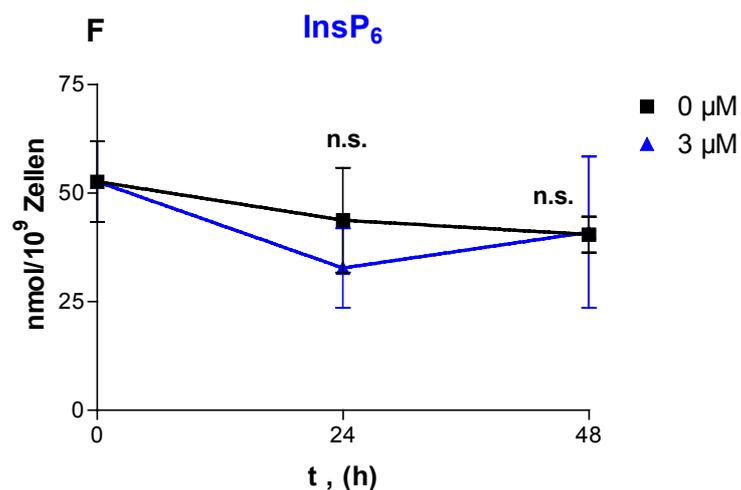
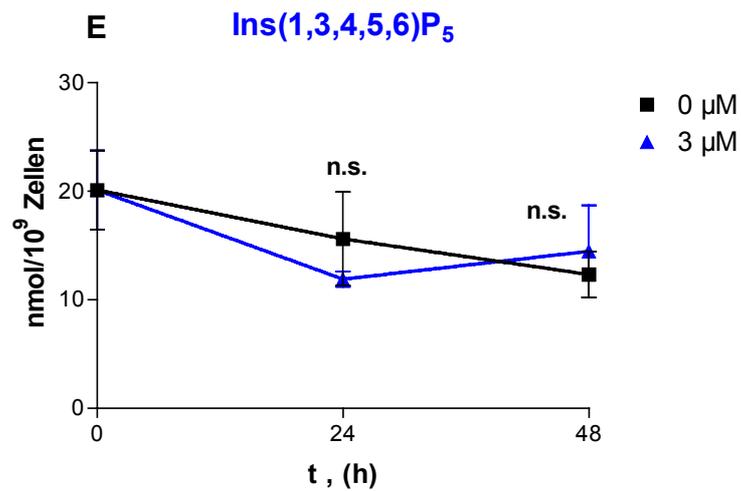
Keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen konnte in der Konzentration der Isomeren $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ und $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ ermittelt werden.

Bei allen InsP -Isomeren {Ausnahme $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ } konnte nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden kein Rückgang der Konzentrationen der jeweiligen Isomeren im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß während des Versuchs keine Zugabe an frischem Gossypol erfolgte, so daß nach 24 Stunden der Hemmstoff vollständig von den sehr dicht gewachsenen Zellen abgebaut oder z.B. über eine Multi-Drogen-Resistenz-Transportprotein (MDR)-Expression eliminiert wurde und somit keinen Effekt mehr auf den Inositolphosphatstoffwechsel hatte.

Abb. 3.36. A - F: Abnahme der Stoffmenge verschiedener Inositolphosphat-Isomere nach der Zugabe von Gossypol







Die Effekte von Gossypol auf den Inositolphosphat-Metabolismus wurden wie in Kap. 2.2.22.5. beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gossypol sowie mit dem entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle versetzt. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Hiernach erfolgte die Aufarbeitung der Zellen für die HPLC-Analytik (Kap. 2.2.22.6.) und gemessen (Kap. 2.2.22.7.). Die statistische Analyse wurde anhand eines t-Test für ungepaarte Proben durchgeführt.
n.s.: nicht signifikant

3.17. Versuch der stabilen Überexpression einer hemmstoffsensitiven Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase mutante in Jurkat T-Zellen

Die sehr wirksamen Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase zeigten einen deutlichen antiproliferativen Effekt auf das Wachstum von Jurkat T-Zellen sowie NIH 3T3-Zellen. Da es sich einerseits um sehr spezifische, auch in intakten Zellen wirksame Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase handelt (IC₅₀-Werte im submikromolaren Bereich), andererseits keine signifikante Hemmung der DNA-Synthese bei den antiproliferativ wirkenden Konzentrationen der Hemmstoffe nachzuweisen war, könnte dieser antiproliferative Effekt in der Tat direkt mit der Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase und somit mit einem Block der Biosynthese der höher phosphorylierten Inositole (InsP₄, InsP₅ und InsP₆) zusammenhängen.

Um zu klären, ob dieser Hemmeffekt kausal auf die Inhibierung der Aktivität der endogenen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase zurückzuführen ist, sollten Zellen mit einer hemmstoffunempfindlichen Form der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase generiert werden. Wären diese trotz der Hemmstoffunempfindlichkeit der exprimierten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase wachstumsgehemmt, so wäre dieser vermutete Zusammenhang widerlegt, wären sie nicht mehr wachstumsgehemmt, so wäre hierfür der Beweis erbracht.

Dieses Experiment sollte durch die stabile Überexpression einer mutierten Enzymform, welche nicht mehr hemmstoffsensitiv ist, in Jurkat T-Zellen erreicht werden. Hierfür wurde die codierende Sequenz der hemmstoffunempfindlichen Mutante K272D des aus Vogelerythrozyten isolierten Enzyms in den Vektor pEGFP-N1 cloniert. Als Kontrolle wurde der Vektor ohne diese Sequenz verwendet (Kap. 2.2.22.7.1.). Anschließend wurde diese Plasmid-DNA mittels Elektroporation in die Jurkat T-Zellen eingebracht (Kap. 2.2.22.7.2.).

24 Stunden nach der Elektroporation wurde anhand der Trypanblau-Färbemethode (Kap. 2.2.21.1.5.) die Vitalität der elektroporierten Zellen überprüft. Die Kontrollzellen wiesen eine Vitalität von 54 %, die Jurkat T-Zellen mit dem die codierende Sequenz der Mutante enthaltenden Vektor eine Vitalität von 63 % auf. Die Transfektionseffizienz, die mit einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt wurde (Kap. 2.2.22.7.3.), betrug 3 - 5 %.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen in das Selektionsmedium mit einer G418-Konzentration von 700 µg/ml überführt (Kap. 2.2.22.7.4.). Zunächst reduzierte sich die Zellzahl der transfizierten Zellen von $4.26 \cdot 10^5/\text{ml}$ (Kontrolle) bzw. $6.53 \cdot 10^5/\text{ml}$ (Mutante) auf $2.17 \cdot 10^5/\text{ml}$ (Kontrolle) bzw. $2.14 \cdot 10^5/\text{ml}$ (Mutante). Nach 10 Tagen konnte ein Zellwachstum sowohl der Kontrollzellen als auch der Mutanten-Zellen wieder beobachtet werden. Allerdings konnte keine Fluoreszenz der transfizierten Zellen mehr beobachtet werden.

Daraufhin wurde trotzdem eine Zellklonierung durchgeführt (Kap. 2.2.22.7.5.). Diese ergab bei der Aussaat der Kontrollzellen, die den Vektor pEGFP-N1 exprimieren sollten, in einer Konzentration von 0.3 Zellen/Loch eine Klonierungseffizienz von 11.7 %. Wurden die Kontrollzellen in einer Dichte von 1 Zelle/Loch ausgesät, konnte eine Effizienz von 40.8 % ermittelt werden. Die Klonierung der Jurkat T-Zellen, die die Mutante K272D überexprimieren sollten, zeigten nach der Aussaat in einer Konzentration von 0.3 Zellen/Loch eine Klonierungseffizienz von 7.5 %, und von 30.0 % bei einer Zelldichte von 1 Zelle/Loch.

Ob diese Klone tatsächlich die Mutante der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase exprimieren, muß noch in naher Zukunft mittels eines Western Blots untersucht werden.

4. Diskussion

Zwei Formen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase konnten in Vogelerythrozyten nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um eine lösliche, Ca²⁺ /CaM-insensitive und um eine membrangebundene Ca²⁺ /CaM-sensitive Form der Kinase (Morris et al., 1987).

Die cytosolische, Ca²⁺ /CaM-insensitive Form konnte gereinigt, kloniert und prokaryontisch exprimiert werden (Bertsch et al., 1999). Diese hochaktive, enzymkinetisch wie das Wildtyp-Enzym funktionierende Form der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase, eine A-Isoform des Enzyms, wurde in dieser Arbeit überwiegend für die zahlreichen Versuche verwendet. Sie bestand aus einem Fragment von 306 Aminosäuren, das die C-terminale katalytische Domäne und eine benachbarte Calmodulin-Bindungsdomäne aufweist.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der rekombinanten Inositol(1,4,5)P₃ 3-Kinase A zeigen, daß dieses Enzym sehr spezifisch und mit hoher Affinität Ins(1,4,5)P₃ bindet. Dieses wird durch den sehr niedrigen K_{m,app}-Wert von 0.37 µM für dieses Substrat verdeutlicht.

4.1. Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Mit Hilfe eines einen hohen Durchsatz an zu testenden Substanzen erlaubenden gekoppelten optischen Tests wurden polyphenolische Verbindungen aus den Stoffklassen der Flavonoide, Anthrachinone, Cumarine, Triphenylmethane, Tyrphostine, Perylenequinone und Staurosporinderivate sowie viele weitere biologische Wirkstoffe auf einen Inhibitionseffekt am Enzym getestet.

Die tatsächliche Entdeckung von potenten Hemmstoffen kann interessante Informationen über kleine Moleküle, die mit diesem Typ von Substrat-Kinasen interagieren, liefern. Da einige dieser Verbindungen bereits als Inhibitoren des Zellwachstums (Agullo et al., 1996; Kang et al., 1997; Okabe et al., 1997) bekannt sind, ist es möglich, mittels dieser Hemmstoffe die Rolle der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase oder ihrer Produkte in diesem Prozeß zu klären.

4.1.1. Quercetin

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinaseaktivität durch Verbindungen aus der Gruppe der Flavonoide gehemmt werden konnte. Innerhalb der Flavonol-Untergruppe ist Quercetin der potenteste Hemmstoff (Tab. 3.1., IC_{50} : 0.18 μM).

Molekulare pharmakologische Studien haben ergeben, daß dieses Flavonoid die Aktivitäten weiterer zahlreicher Enzyme hemmt. Hierzu gehören die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase) (IC_{50} : 3.8 - 10 μM ; Matter et al., 1992; Agullo et al., 1997), ein in der Wachstumsfaktor-abhängigen Signaltransduktion involviertes Enzym, die 1-Phosphatidylinositol 4-Kinase (PIK) (IC_{50} : 4 - 6 μM ; Prajda et al., 1995; Singhal et al., 1995; Weber et al., 1996), die Topoisomerase II (IC_{50} : >20 μM ; Austin et al., 1992), cAMP-Phosphodiesterase (IC_{50} : 3.6 - 23 μM ; Beretz et al., 1978; Ruckstuhl et al., 1979), cGMP- Phosphodiesterase (IC_{50} : 15 μM ; Ruckstuhl et al., 1979), Aldolase Reduktase (IC_{50} : 1 μM ; Varma et al., 1975), Lipoxygenase (IC_{50} : 5 μM ; Gschwendt et al., 1984) und Zyclooxygenase (IC_{50} : 35 μM ; Gschwendt et al., 1984) sowie Calcium- und Phospholipid-abhängige Proteinkinasen (IC_{50} : 10 μM ; Gschwendt et al., 1983).

Außerdem inhibiert Quercetin die Phosphorylasekinase (K_i : 1 μM ; Srivastava, 1985), eine partiell gereinigte Tyrosinproteinkinase aus Rattenlunge (K_i : 10 μM ; Srivastava, 1985), die Xanthindehydrogenase (IC_{50} : 0.2 μM ; Bindoli et al., 1985) und Xanthinoxidase (IC_{50} : 5 μM ; Bindoli et al., 1985; Nagao et al., 1999), die DNA-Polymerase β (IC_{50} : 0.8 μM ; Ono et al., 1990), die RNA-Polymerase aus E.Coli (IC_{50} : 1.5 μM ; Ono et al., 1990), die membrangebundene Tyrosinkinase von HL-60 Zellen (IC_{50} : 20.1 μM ; Kang & Liang, 1997) und die Proteinkinase C (IC_{50} : 20 μM ; Hofman et al., 1988; Nakadate et al., 1988). Weiterhin hemmt es die Aktivität der Tyrosinkinase pp60^{src} (IC_{50} : 6 μM - 11 μM ; Graziani et al., 1983).

Zusätzlich weist Quercetin antivirale Effekte gegen Herpesviren (Béládi et al., 1965) sowie gegen Parainfluenzavirus auf (Molnár et al., 1981).

Weitere biologische Effekte, die für Quercetin beschrieben wurden, sind antitumorale Aktivitäten (Molnár et al., 1981, Deschner et al., 1991), antiproliferative Eigenschaften (Kang & Liang, 1997; Yoshida et al., 1990), Induktion der Differenzierung von HL-60 Zellen (Kawaii et al., 1999), mutagene Aktivitäten in Säugetierzellsystemen (Nakayasu et al., 1986; Ogawa et al., 1986), Induktion von Apoptose (Wie et al., 1994; Balabhadrapathruni et al., 2000), vasodilatorische Wirkung (Duarte et al., 1993), antioxidative Eigenschaften (Fraga et al., 1987), Induktion des Phase II - Enzyms Chinonreduktase in Hepatomazellen (Uda et al., 1997), protektiver Effekt gegen die durch den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) induzierte Zytotoxizität in der Fibroblastenzelllinie L-929 (EC_{50} : 20 μ M; Habtemariam, 1997), Hemmung der DNA-Synthese in der Leber, Milz und im Hoden von Ratten (Wong & McLean, 1999) und die Hemmung der Proteinsynthese in humanen und Mäuse-Leukämiezellen (Ito et al., 1999).

Klinische Studien der Phase I wurden mit Quercetin aufgrund seiner antitumoralen Effekte durchgeführt (Ferry et al., 1996).

Ebenso wurde infolge der antiinflammatorischen Wirkungen von diesem Flavonol eine prospektive, randomisierte und Plazebo-kontrollierte Doppelblindstudie an männlichen Probanden mit einer chronischen Prostatitis der Kategorie III durchgeführt (Shoskes et al., 1999). Hierbei konnte beobachtet werden, daß Quercetin signifikant die Symptomatik dieser Krankheit verbessert und gut verträglich ist.

Das hier entdeckte makromolekulare Target von Quercetin, die Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase, ist ganz offensichtlich das höchst affine bisher beschriebene intrazelluläre Target, welches gleichzeitig wichtige Signaltransduktionsfunktionen erfüllt. Auf Grund der hier jeweils unter gleichen, kontrollierten Bedingungen durchgeführten Zellversuche ist es keineswegs auszuschließen, daß die Hemmung des Enzyms den eigentlichen antiproliferativen Effekt der Substanz bedingt.

Ein Vergleich der Molekülstrukturen und der Hemmeffekte der Flavonole in dieser Studie läßt erkennen, daß die Intensität der Hemmung der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinaseaktivität durch die Position und der Anzahl der Hydroxylgruppen am B-Ring beeinflusst wird (Tab. 3.1.).

Fehlt eine dieser Hydroxylgruppen oder sind zusätzliche vorhanden, erfolgt eine Abnahme des Hemmeffektes. In dem Flavonol Myricetin ist am B-Ring an der Position 5' eine zusätzliche Hydroxylgruppe vorhanden (IC_{50} : 0.54 μ M), während im Kämpferol an der 3'-und 5'-Position ein H-Atom vorkommt (IC_{50} : 3.9 μ M).

Ebenfalls führt eine Substitution der Hydroxylgruppen durch Methoxygruppen an diesem Ring zu einer Abnahme des IC_{50} -Wertes, wie es im Myricetintrimethylether der Fall ist (IC_{50} : 0.75 μ M).

Ein Rückgang des Hemmeffektes kann auch beobachtet werden, wenn der B-Ring durch einen langkettigen Substituenten ersetzt wird (Stigmatellin, IC_{50} : 31.4 μ M). Auch eine Verschiebung dieses Ringes von der Position 3 auf die Position 2 des Chromonringsystems, wie es im Genistein der Fall ist, führt zu einer Erhöhung des IC_{50} -Wertes um den Faktor 50.

4.1.2. 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon

Innerhalb der Flavon-Untergruppe der Flavonoide konnte 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon als ein sehr potenter Hemmstoff der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A identifiziert werden (IC_{50} : 0.29 μ M). Diese Verbindung unterscheidet sich vom Quercetin durch das Fehlen von Hydroxylgruppen an den Positionen 3 und 5 sowie durch das Vorhandensein einer OH-Gruppe an der Position 8 am A-Ring (Tab. 3.1.).

Bislang liegen keine Veröffentlichungen über pharmakologische Eigenschaften dieser Verbindung vor.

Durch die zahlreichen hier untersuchten Flavonoide kann bereits jetzt eine recht präzise Leitstrukturvorhersage für diese Gruppe von Hemmstoffen erfolgen.

Werden diese funktionellen Gruppen alle durch Methoxygruppen substituiert (3',4',7,8-Tetramethoxyflavon), erhöht sich der IC_{50} -Wert signifikant (IC_{50} : > 50 μ M). Das Fehlen der Hydroxylgruppen in Position 7 und 8, wie im 3',4'-Dihydroxyflavon, führt ebenfalls zu einer Abnahme des Hemmeffektes (IC_{50} : 17.7 μ M).

Entscheidend für einen starken Hemmeffekt aller getesteten Flavonoide scheint die Hydroxylgruppe an der Position 5 des Pyronringsystems zu sein. Ist diese Gruppe nicht vorhanden, nimmt der IC_{50} -Wert deutlich ab (Fisetin, Robinetin).

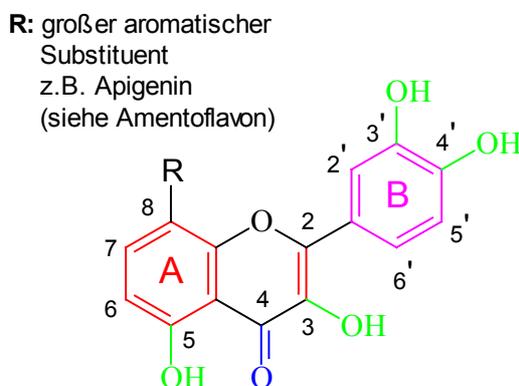
Ebenso ist eine Abnahme des Hemmeffektes zu beobachten, wenn die OH-Gruppe an der Position 3 in diesem Ringsystem fehlt. Das Luteolin zeigt im Vergleich zum Quercetin einem um den Faktor 17 verringerten Effekt.

Ebenfalls hat die Sättigung der C2 - C3-Bindung im Pyronring einen deutlich negativen Einfluß auf den Hemmeffekt der Flavonoide an der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A, wie es bei Naringenin (IC_{50} : 18 μ M) und Taxifolin (IC_{50} : 18 μ M) zu beobachten ist.

Eine weitere strukturelle Voraussetzung für die potente Hemmung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinaseaktivität ist die Anwesenheit der Carbonylfunktion im Pyronring benachbart zu einer oder mehreren Hydroxylgruppen. Fehlt diese Carbonylgruppe (Cyanidin), steigt der IC_{50} -Wert im Vergleich zum Quercetin um das 55-fache an.

Anhand dieser Beobachtungen läßt sich ein in Abb. 4.1.1. dargestelltes Strukturmodell für einen potenten Hemmstoff der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A ableiten.

Abb. 4.1.1.: Strukturelemente potenter Hemmstoffe der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A



4.1.3. (-)-ECG, (-)-EGCG

Die Catechinderivate Epicatechingallat (ECG) und Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Inhaltsstoffe des grünen Tees, sind sehr potente Inhibitoren der Enzymaktivität, obwohl in diesen Verbindungen die Carbonylfunktion und die C2 - C3-Doppelbindung nicht vorhanden sind (Abb. 3.4.). In diesen Fällen kann der starke Hemmeffekt auf die Substitution der Hydroxylgruppe an Position 3 durch einen Galloylrest, der diese Strukturmerkmale enthält, zurückzuführen sein.

Untersuchungen an Tiermodellen haben gezeigt, daß grüner Tee (*Camellia sinensis*) sowohl die Tumorbildung als auch das Tumorwachstum hemmen kann (Wang et al., 1992a; Wang et al., 1992b; Yang et al., 1997; Yang et al., 1998). Die Gabe von einem Wasserextrakt des grünen Tees zum Trinkwasser von SKH-1 Mäusen hemmte die durch Ultraviolett-B (UVB) Strahlung hervorgerufene Induktion des Tumorwachstums, welches mittels 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA) initiiert wurde (Wang et al., 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß durch eine topische Applikation von Polyphenolen des grünen Tees die 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) induzierte Entzündung in der Epidermis von Mäusen gehemmt wurde (Huang et al., 1992).

Der Hauptinhaltsstoff des grünen Tees ist das (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG). Weitere Inhaltsstoffe sind die Tee-Polyphenole (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallat (ECG) und (-)-Epicatechin (EC).

Das EGCG ist das am meisten untersuchte Catechinderivat des grünen Tees. Die biologischen Aktivitäten dieser Verbindung sind neben seiner antioxidativen Eigenschaft (Xu et al., 1992; Fiala et al., 1996) die antiproliferativen Effekte (Okabe et al., 1997; Asano et al., 1997; Chen et al., 1998; Lyn-Cook et al., 1999) und die Induktion von Apoptose in Prostatakrebszellen (Paschka et al., 1998), in den Lungentumorzellen H661 (Yang, G.Y. et al., 1998), in HL-60 Zellen (Zhao et al., 1997) sowie in einer ganzen Reihe von humanen und Mäuse-Karzinomazellen (Ahmad et al., 1997).

Ebenso besitzt dieses Polyphenol antivirale Aktivitäten (Nakayama et al., 1993) und hemmt die DNA-Synthese in Rattenhepatom- und in Erythroleukämiezellen von Mäusen (Lea et al., 1993).

EGCG ist außerdem ein potenter Hemmstoff zahlreicher Enzyme. Hierzu gehören das Androgen-umformende Enzym 5 α -Reduktase (Liao & Hiipakka, 1995a), die für das Krebswachstum benötigte Urokinase (IC₅₀: 3 mM; Jankun et al., 1997) und die gastrische H⁺, K⁺-ATPase (IC₅₀: 69 nM; Murakami et al., 1992).

Weiterhin hemmen EGCG und ECG die „human immunodeficiency virus“ (HIV) reverse Transkriptase (K_i: 7.2 nM (EGC), 2.8 nM (EGCG); Nakane & Ono, 1990), die DNA-Polymerase α (K_i: 181 nM (EGC), 116 nM (EGCG)) und β (K_i: 23.7 nM (EGC), 71.1 nM (EGCG)) (Nakane & Ono, 1990; Umekawa et al., 1999) sowie die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 (IC₅₀: 5 μ M (EGCG), 15 μ M (EGC); Chung et al., 1999).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine topische Applikation von EGCG in die Haut von Mäusen die spezifische Bindung von [³H] 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) an einzelne Hautfraktionen der Maus hemmt. Diese Aktivität des EGCG könnte durch eine Blockade der Interaktion eines Tumorpromoters mit seinem Rezeptor hervorgerufen werden. Dieses ist der sog. „sealing effect“ des EGCG (Okabe et al., 1997). In Anlehnung an diesen Effekt wurde berichtet, daß diese polyphenolische Verbindung ebenso das Estrogen-abhängige Wachstum von MCF-7 Zellen spezifisch durch eine Blockade der Rezeptorbindung des Estrogens hemmt (Komori et al., 1993).

Versuche mit basophilen Leukämiezellen von Ratten (RBL-2H3), die in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an Tee-Polyphenolen (EGCG, EGC, ECG) inkubiert wurden, zeigten eine Inhibition der Histaminfreisetzung. Hierbei besteht eine Beziehung zwischen der Struktur der Catechinderivate und dem beobachteten Hemmeffekt, indem die Triphenolstruktur eine zentrale Rolle spielt (Matsuo et al., 1997).

In letzter Zeit steigerte sich weltweit das Interesse an grünem Tee, diesen als ein krebsvorbeugendes Mittel für den Menschen zu verwenden. Gründe hierfür sind die fehlende Toxizität der Inhaltsstoffe, die Effektivität in zahlreichen Organen und die inhibitorischen Effekte auf Krebszelllinien.

Der hier aufgezeigte Hemmeffekt auf die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität könnte zu der antiproliferativen und antientzündlichen Wirkungen beitragen, da die IC₅₀-Werte vergleichbar mit den niedrigsten bisher beschriebenen sind.

4.1.4. Hypericin

Aus der Gruppe der Naphthodianthrone konnte Hypericin, ein Inhaltsstoff des Johanniskrauts (*Hypericum perforatum*), als ein sehr potenter Hemmstoff der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A mit einem IC₅₀-Wert von 0.20 µM identifiziert werden (Abb. 3.10.). Der Hemmeffekt dieser Verbindung konnte durch Bestrahlung der Probe mit Laborlicht verstärkt werden, da Hypericin ein photosensitives Agens ist.

Aufgrund der Bestrahlung geht Hypericin aus dem Grundzustand (HYP) in den „Singlett-Zustand“ ($^1\text{HYP}^*$) über. Es erfolgt ein „Intersystem-crossing“ und eine Spin-Umkehr des Elektrons, wodurch der energieärmere und längerlebige „Triplett-Zustand“ ($^3\text{HYP}^*$) eingenommen wird. Durch den Übergang aus diesem Triplett-Zustand zurück in den Grundzustand, bei dem freie radikalische Zwischenprodukte (HYP^\cdot) gebildet werden, könnten die biologischen Effekte des Hypericins vermittelt werden (Typ 1 - Mechanismus).

Ebenso könnten Sauerstoffmoleküle im „Singlett-Zustand“ ($^1\text{O}_2$) gebildet werden, wenn die Anregungsenergie des $^3\text{HYP}^*$ auf Sauerstoffmoleküle im Triplett-Grundzustand übertragen werden (Typ 2 - Mechanismus) (Agostinis et al., 1995; Fernandez et al., 1997).

In den letzten Jahren wurde das Interesse für Hypericin immer größer, da für diese Verbindung antivirale als auch antineoplastische Eigenschaften beschrieben wurden. Es zeigt gegen viele Typen von Viren viruzide Aktivität. Hierzu gehören das „human immunodeficiency virus“ (HIV) (Meruelo et al., 1988), das Herpes simplex Virus Typ 1 (Hudson et al., 1997) sowie das humane Zytomegalievirus (Barnard et al., 1992). Die antivirale Aktivität des Hypericins ist strikt abhängig von der Anwesenheit von sichtbarem Licht. Erst bei einer zytotoxischen Konzentration dieser Verbindung tritt ein licht-unabhängiger antiviraler Effekt auf (Carpenter & Kraus, 1991; Hudson et al., 1993).

Weiterhin ist Hypericin ein Hemmstoff der Proteinkinasen A und C (IC_{50} : $3\ \mu\text{M}$ - $> 80\ \mu\text{M}$; Takahashi et al., 1989) sowie der durch Wachstumsfaktoren regulierten Tyrosinkinasen (IC_{50} : $0.02\ \mu\text{M}$ - $0.10\ \mu\text{M}$; De Witte et al., 1993, Agostinis et al., 1996) und der mitogenaktivierten Protein- (MAP-) Kinase (IC_{50} : $4\ \text{nM}$; Agostinis et al., 1995). Außerdem wird die mitochondriale Succinoxidase durch diese Verbindung in vitro gehemmt (Thomas et al., 1992).

Ebenso zeigt Hypericin antiproliferative Aktivitäten gegen zahlreiche Tumorzellen (Zhang et al., 1997; Hamilton et al., 1996) und induziert Apoptose (Hamilton et al., 1996; Harris et al., 1996) oder Nekrose (Vantieghem et al., 1998; Lavie et al., 1999) in diesen Zellen.

Es konnte nachgewiesen werden, daß mikromolare Konzentrationen an Hypericin die TPA- und Tumornekrosefaktor (TNF) $-\alpha$ induzierte Aktivierung von NF-kappa B in HeLa Zellen und TC10 Zellen inhibiert (Bork et al., 1999).

Weiterhin wird Hypericin in vivo sehr gut von Tumorzellen aufgenommen und bleibt in den Tumoren für einen längeren Zeitraum als im gesunden Gewebe aktiv (Chung et al., 1994). Die antitumorale Aktivität des Hypericins konnte an Nacktmäusen, denen A 431-Zellen zur Tumorentstehung unter die Haut gespritzt wurden, gezeigt werden (Vandenbogaerde et al., 1996).

Alle diese beobachteten Eigenschaften des Hypericins wurden unter Bestrahlung mit Laser- oder Laborlicht erzielt. Aufgrund dieser Daten könnte Hypericin klinisch als ein Antitumoragens in der photodynamischen Therapie (PDT) gegen Haut- und Schleimhautkrebs eingesetzt werden. Bei dieser Art von Therapie werden Photosensitizer verwendet, die durch Bestrahlung aktiviert werden und reaktive Sauerstoffmoleküle oder Radikale bilden. Diese reaktiven Teilchen führen zum Absterben der Tumorzellen.

Die hier gefundene Hemmwirkung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A ist abermals hinsichtlich der IC₅₀-Werte mit den affinsten bisher identifizierten Targets vergleichbar.

Basierend auf den ermittelten Struktur-Funktionsbeziehungen wurden weitere Verbindungen mit einem polyphenolischen Ringsystem auf einen Hemmeffekt an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A getestet.

4.1.5. Gossypol

Unter den getesteten Verbindungen konnte Gossypol, ein Inhaltsstoff der Baumwollpflanze (*Gossypium* sp.) als ein sehr potenter Hemmstoff der Enzymaktivität ermittelt werden (Abb. 3.10., IC₅₀: 58 nM).

Diese Verbindung, ein polyphenolisches Binaphthalindialdehyd, wurde zuerst in China als ein bei Männern die Fertilität hemmendes Agens identifiziert. Nach peroraler Gabe an männliche Probanden führt es zu langandauernder, aber reversibler Hemmung der Spermienreifung (Nadakavuken et al., 1979) sowie zu einer Hemmung der Spermienmotilität (Tanphaichitr et al., 1989).

Weiterhin hemmt Gossypol eine Reihe von Enzymen, wie die Lactatdehydrogenase-X von Rinder- (IC_{50} : 200 μ M; Olgiati & Toscano, 1983) und Mäusehoden (IC_{50} : 1 μ M; Kim et al., 1987). Dieses Enzym ist ein Isozym der Lactatdehydrogenase, welches nur in den Gameten von Säugetierhoden gefunden wurde (Blanco & Zinkham, 1963). Ebenso hemmt Gossypol die Aldose-Reduktase aus humaner Plazenta (K_i : 0.5 μ M; Deck et al., 1991), die membrangebundene und die lösliche Adenylatzyklase (IC_{50} : 75 μ M - 250 μ M; Olgiati et al., 1984) sowie die Proteinkinase C (IC_{50} : 100 μ M; Nakadate et al., 1988).

Gossypol zeigt ebenso inhibitorische Effekte an Enzymen, die in der DNA-Synthese und DNA-Reparatur involviert sind. Hierzu gehören die Ribonukleotidreduktase (IC_{50} : 10 μ M; McClarty et al., 1985), die DNA-Polymerase α (Rosenberg et al., 1986) und die Topoisomerase II (IC_{50} : 5 μ M; Zhao et al., 1997, Adlakha et al., 1989).

In Leberzellen von Ratten, die mit verschiedenen Konzentrationen an Gossypol inkubiert wurden, konnte beobachtet werden, daß dieses Agens die interzelluläre Kommunikation über die sog. „gap junctions“ unterdrückt (Barhoumi & Burghardt, 1996).

Die Stereospezifität spielt bei einigen Effekten von Gossypol eine große Rolle. Z.B. wurde beobachtet, daß das (-)-Enantiomer des in einem razemischen Gemisch vorliegenden Gossypols für die kontrazeptiven Eigenschaften in Ratten und Hamstern verantwortlich ist (Qian & Wang, 1984; De Peyster & Wang, 1993), das größere Antitumorpotential besitzt (Band et al., 1989; Shelley et al., 1999) und die HIV-Replikation des Typs 1 selektiver inhibiert als das (+)-Enantiomer (Royer et al., 1991).

Einige Untersuchungen haben gezeigt, daß Gossypol antiproliferative Effekte in vitro gegen eine Reihe von Krebszelllinien besitzt (Hu et al., 1993; Shidaifat et al., 1997; Shelley et al., 1999).

Außerdem konnte in einigen Tiermodellen demonstriert werden, daß diese Substanz das Wachstum von Tumoren hemmt (Tso, 1984; Rao et al., 1985; Wu et al., 1989; Coyle et al., 1994). Auf Grund dieses Effektes wurde Gossypol in einer klinischen Studie als eine mögliche therapeutische Verbindung zur Behandlung von Nebennierenkrebs bei humanen Patienten verwendet (Flack et al., 1993). In einer weiteren Studie wurde dieses Agens an Patienten mit glialen Tumoren getestet (Bushunow et al., 1999). Gossypol stellte sich als gut verträglich und nicht signifikant myelosuppressiv heraus (Bushunow et al., 1999).

Abermals ergibt der Vergleich der EC₅₀-Werte, daß die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase wohl das beste identifizierte Target des Wirkstoffes darstellt.

4.1.6. Ellagsäure

Als ein weiterer sehr potenter Hemmstoff der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A konnte Ellagsäure (Abb. 3.10.) identifiziert werden (IC₅₀: 36 nM).

Ellagsäure ist ein phenolisches Bislacton und gehört der Gruppe der Gerbstoffe an. Diese Säure kommt in Früchten, Nüssen (Walnuß) sowie in Himbeeren und Erdbeeren vor.

Es konnte gezeigt werden, daß dieser Gerbstoff effektiv in der Hemmung der Mutagenese ist, die durch polyzyklische aromatische Hydrocarbone, aromatische Amine, N-Nitrosamine und Aflatoxine induziert wurde (Dixit & Gold, 1986; Perchellet et al., 1992; Barch et al., 1996; Stoner & Morse, 1997; Khanduja et al., 1999). Auch in *Salmonella typhimurium* wurde Ellagsäure als ein Inhibitor von Benzo[a]pyren-dihydrodiolepoxid- (BPDE) Mutagenität analysiert (Josephy et al., 1990).

Weiterhin wurde berichtet, daß diese Verbindung das Wachstum von Krebszelllinien hemmt und Apoptose induziert (Narayanan et al., 1999).

Die Bindung von Ellagsäure an die DNA von Explantaten der Luftröhre, des Darmes, der Gallenblase und der Speiseröhre wird als ein möglicher Mechanismus für die antimutagenen und antikarzinogenen Eigenschaften postuliert (Teel, 1986).

Ellagsäure zeigte inhibitorische Effekte an der DNA-Topoisomerase I und II (IC₅₀: 1.8 µM (I), 2.0 µM (II); Constantinou et al., 1995) und an der Glutathion S-Transferase (IC₅₀: 83 µM; Das et al., 1984).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß dieses Agens als ein Aktivator des intrinsischen Blutkoagulationsystems agiert (Bock et al., 1981).

Der Vergleich der EC₅₀-Werte ergibt erneut, daß die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase das beste bisher identifizierte Target des Wirkstoffes ist.

4.1.7. ATA

Ein weiterer potenter Inhibitor der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A ist die Aurintricarbonsäure (ATA). Es konnte ein IC_{50} -Wert von 150 nM für diese Verbindung gemessen werden (Abb. 3.10.).

ATA ist ein polycarboxyliertes Triphenylmethan-Derivat, welches den Janustyrosinkinase- (Jak) und „signal transducer and activator of transcription“- (Stat) Signalweg (Jak2-Stat5) zusätzlich zur Stimulierung der Serinkinasen ERK1/2 in Nb2-Lymphozyten aktiviert (Rui et al., 1998).

Weiterhin wird berichtet, daß dieses Agens in einigen Zelltypen einen anti-apoptotischen Effekt besitzt (Lavoie & Witorsch, 1995; Okada & Koizumi, 1995; Andrew et al., 1999; Bai et al., 1999). Es wurde ebenfalls gezeigt, daß ATA Phäochromozytomzellen von Ratten (PC12), die in Hungermedium gehalten wurden, vor dem Zelltod schützt (Batistatou & Greene, 1991).

In einer weiteren Studie konnte ermittelt werden, daß dieses Agens in PC12-Zellen die Tyrosinphosphorylierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), von PI 3-Kinase und von PLC- γ induziert. Dieser Effekt wurde aber nicht in NIH 3T3-Zellen beobachtet (Okada & Koizumi, 1995). Ebenfalls konnten diese Effekte in den Neuroblastomazellen SH-SY5Y analysiert werden (Okada & Koizumi, 1997). Zusätzlich wurde beobachtet, daß in diesen Zellen erbB4, ein Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren, unter dem Einfluß von ATA tyrosin-phosphoryliert wurde (Okada & Koizumi, 1997).

Außerdem wurde berichtet, daß ATA die durch Fibroblasten-Wachstumsfaktoren- (FGF) vermittelte autokrine Transformation von NIH 3T3-Zellen sowie die Proliferation von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, die ein Target der FGF-mitogenen Aktivität sind, hemmt (Benezra et al., 1992, 1994). Ebenso konnte demonstriert werden, daß diese Verbindung an FGF mit einer Affinität ähnlich der von Heparin bindet, wodurch die mitogene Aktivität von FGF erniedrigt wird (Lozano et al., 1997).

ATA ist ein genereller Inhibitor der Nukleaseaktivität in vitro (IC_{50} : 2 - 50 μ M). Ebenfalls inhibiert diese Säure sowohl die Aktivität der DNA-Topoisomerase II in vitro (IC_{50} : 75 nM; Catchpole & Stewart, 1994; Benchokroun et al., 1995) als auch die Topoisomerase in den intakten Fibrosarkomazellen von chinesischen Hamstern (Benchokroun et al., 1995).

Weitere biologische Effekte von ATA sind die Stimulierung von RNA- und Proteinsynthese in mitochondrialen Lysaten von Ehrlich-Aszites-Zellen (Kulkarni et al., 1987), antivirale Effekte gegen HIV in vitro (Balzarini et al., 1986) sowie humanes Herpesvirus Typ 7 (Zhang et al., 1999), Hemmung von Protein-Nukleinsäure-Interaktionen (González et al., 1980), Inhibierung der reversen Transkriptaseaktivität (Givens & Manly, 1976), Hemmung der RNA-Polymerase und der Replikase (IC_{50} : 2 - 50 μ M; Blumenthal & Landers, 1973) und Verhinderung der Bindung von messenger RNA (mRNA) von Bakteriophagen an Ribosomen (Stewart et al., 1971).

Gerade daß auch für diese letzten der bisher aufgespürten potenten Hemmstoffe der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinaseaktivität bereits antiproliferative Effekte aufgezeigt sind, führt hier zu der Hypothese, daß die Hemmung des einzigen gemeinsamen Targets, der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase, vielleicht eine zentrale Rolle bei den antiproliferativen Effekten aller dieser Polyphenole spielt.

Gemäß Molekülmodellen (moduliert mit dem Programm MOBY Vers. 1.5; Springer Verlag 1992) sind einige der komplexen Ringsysteme (Gossypol, Flavonoide, ATA) bis zu Winkeln von 60° zwischen den Ringebenen stark verdreht. Hierdurch entstehen sog. „zweihändige“ Moleküle. Eine zusätzliche strukturelle Symmetrie in solchen Molekülen scheint ebenso eine starke Interaktion mit der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase zu begünstigen.

4.2. Hemmtypen der getesteten Inhibitoren an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

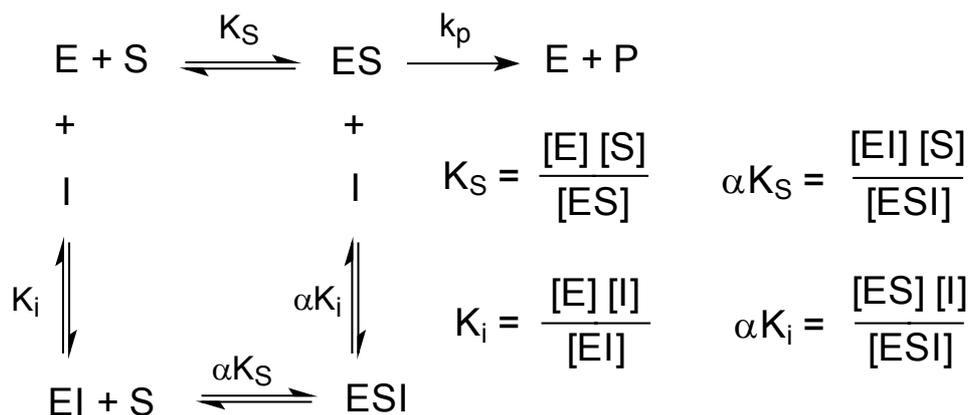
4.2.1. Hemmtyp in Bezug auf das Substrat ATP

Alle getesteten Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A zeigen in Bezug auf das Substrat ATP einen gemischten Hemmtyp (Abb. 3.12.). Dieser Hemmtyp setzt sich aus einer kompetitiven und einer nicht-kompetitiven Hemmung zusammen (Abb. 4.2.1.1.).

Der Inhibitor (I) bindet an das Enzym (E) und an den Enzym-Substrat-Komplex (ES). In diesem System hat der resultierende Enzym-Inhibitor-Komplex (EI) eine geringere Affinität als das Enzym gegenüber dem Substrat. Der Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex (ESI) besitzt keine enzymatische Aktivität.

In Gegenwart des Inhibitors wird ein Teil der Enzymmenge in Form des nicht-aktiven ESI-Komplexes vorliegen. Dadurch verringert sich V_{max} ($V_{max'} < V_{max}$). Ebenfalls wird ein Teil der Enzymmenge als der geringer affine EI-Komplex existieren, wodurch sich der Wert der Dissoziationskonstanten des Substrats (K_S) vergrößert ($K_{S\ app} > K_S$).

Abb. 4.2.1.1.: Modell der linearen gemischten Hemmung



Die reziproke Form der Geschwindigkeitsgleichung für die gemischte Hemmung ist:
 $1/v = K_m / V_{max} (1 + [I]/K_i) 1/[S] + 1/V_{max} (1 + [I]/\alpha K_i)$

Aus dieser Gleichung ist ersichtlich, daß die Steigung (K_m / V_{max}) vom Faktor $(1 + [I]/K_i)$ und der Ordinatenschnittpunkt ($1/V_{max}$) vom Faktor $(1 + [I]/\alpha K_i)$ abhängig ist. Mit steigender Hemstoffkonzentration erhöhen sich die Werte dieser Faktoren, wodurch die Abzissenschnittpunkte $1/[S]$ der resultierenden Geraden sich unterscheiden. Der Betrag des reziproken Wertes dieses Punktes, der den K_m -Wert signifiziert, verändert sich dadurch.

Bei diesem Hemmtyp wird angenommen, daß der Inhibitor an Stellen des Enzyms bindet, die sowohl an der Substratbindung als auch an der Katalyse beteiligt sind.

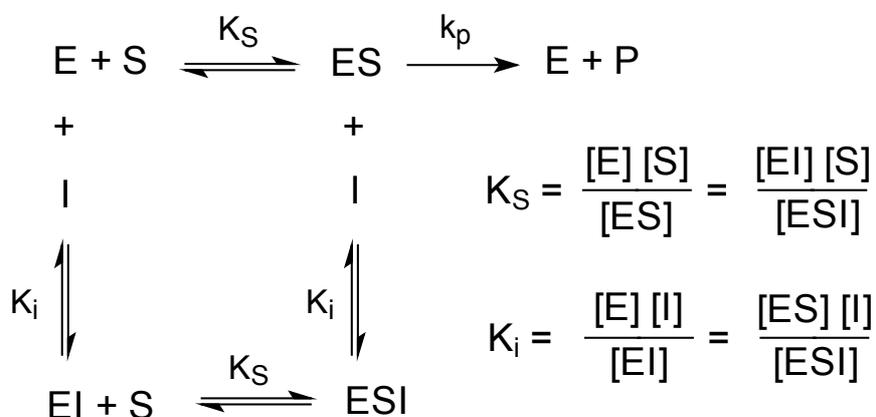
Da die getesteten Hemmstoffe ein aromatisches Ringsystem besitzen, sind diese in der Lage, das hydrophobe Puringerüst des Nukleotids zu imitieren. Dadurch kommt es vermutlich zu einer partiellen Konkurrenz um die Bindungsstelle vom ATP.

4.2.2. Hemmtyp in Bezug auf Ins(1,4,5)P₃

Alle Kinasehemmstoffe sind nicht-kompetitive Hemmstoffe in Bezug auf das Substrat Ins(1,4,5)P₃ (Abb. 3.14.). Demzufolge haben diese Verbindungen keinen Einfluß auf die Bindung dieses Substrates. Sie konkurrieren nicht mit Ins(1,4,5)P₃ um die Bindung an der katalytischen Domäne, so daß die Bindung des einen Liganden keinen Effekt auf die Dissoziationskonstante des anderen Liganden hat.

Ein Modell für die nicht-kompetitive Hemmung ist in Abb. 4.2.2.1. dargestellt.

Abb. 4.2.2.1.: Modell der nicht-kompetitiven Hemmung



Der Inhibitor (I) bindet an das Enzym (E) sowie an den Enzym-Substrat-Komplex (ES). Es wird angenommen, daß der Inhibitor eine Konformationsänderung der katalytischen Domäne induziert. Dadurch besitzt der Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex (ESI) keine enzymatische Aktivität (Segel, 1993).

Aus der Abb. 4.2.2.1. ist ersichtlich, daß bei steigender Inhibitorkonzentration eine immer kleinere Enzymmenge als aktiver ES-Komplex vorliegt. Der Rest des Enzyms liegt in Form des inaktiven ESI-Komplexes vor. Folglich ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit in Gegenwart eines nicht-kompetitiven Hemmstoffes ($V_{max'}$) geringer, als die in Abwesenheit des Inhibitors gemessene V_{max} ($V_{max'} < V_{max}$). Der K_m -Wert wird durch diese Art von Inhibitor nicht beeinflusst. Das Enzym sowie der EI-Komplex haben unabhängig von der Inhibitorkonzentration gleiche Affinitäten zum beobachteten Substrat, in diesem Fall zum D-Ins(1,4,5)P₃.

Die reziproke Form der Geschwindigkeitsgleichung für die nicht-kompetitive Hemmung ist:
$$1/v = K_m / V_{max} (1 + [I]/K_i) 1/[S] + 1/V_{max} (1 + [I]/K_i).$$

Die Gleichung zeigt, daß die Steigung (K_m / V_{max}) und der Ordinatenschnittpunkt ($1/V_{max}$) der Sekundärauftragung um den gleichen Faktor ($1 + [I]/K_i$) erhöht wird. Dadurch bleibt der Abzissenschnittpunkt $1/[S]$ mit steigender Hemmstoffkonzentration der gleiche. Der Betrag des reziproken Wertes dieses Punktes, der den K_m -Wert signifiziert, bleibt hierdurch unverändert.

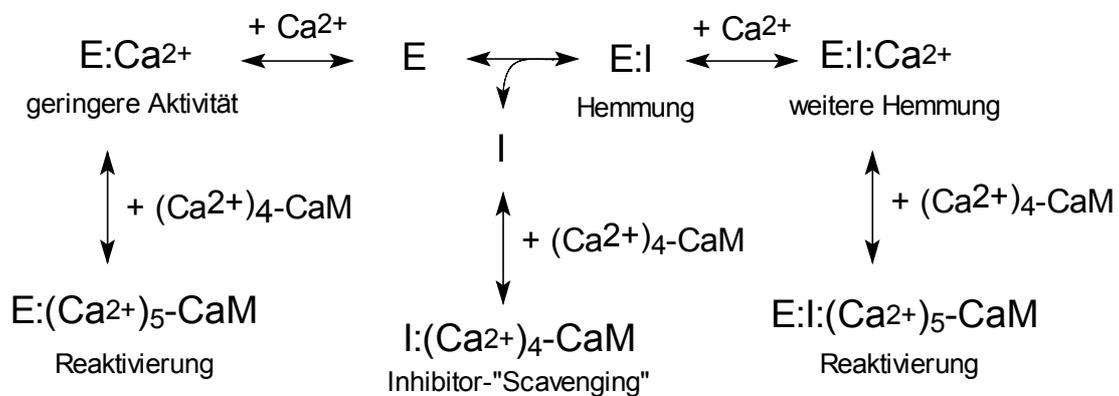
Anhand der Sekundärauftragungen der Steigungen und der Ordinatenschnittpunkte, die aus dem Lineweaver-Burk Diagramm erhalten wurden, kann zwischen einer reinen und einer partiellen nicht-kompetitiven Hemmung unterschieden werden. Im Gegensatz zur reinen Form dieses Hemmtyps besitzt der ESI-Komplex in dem partiellen Typ enzymatische Aktivität.

Hierbei wurden lineare Abhängigkeiten für alle getesteten potenten Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase erhalten, so daß es sich um eine reine nicht-kompetitive Hemmung der Enzymaktivität handelt (Abb. 3.16.).

4.3.: Antagonistischer Effekt von Calmodulin auf die Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität

Die Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A kann mittels Calmodulin partiell antagonisiert werden (Abb. 3.17. a-i). Dieses ist auf eine mögliche Interaktion des Calmodulins mit dem Inhibitor oder mit dem Enzym-Inhibitor-Komplex, wie es im Modell in Abb. 4.3.1. dargestellt ist, zurückzuführen.

Abb. 4.3.1.: Modell der Interaktion Calmodulin/Enzym/Inhibitor



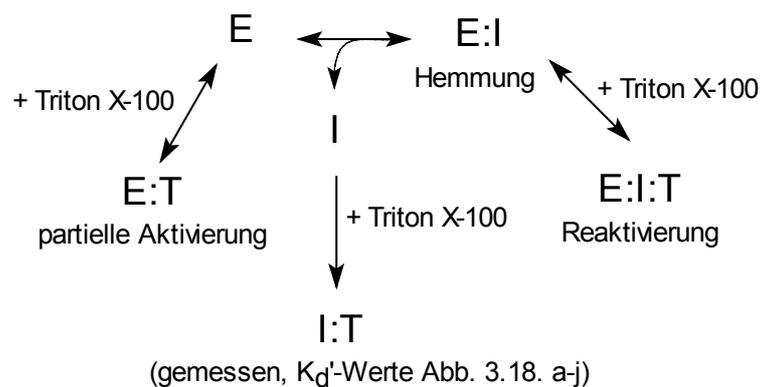
Die Hemmung der Enzymaktivität durch Ca²⁺ in Abwesenheit des Inhibitors könnte durch die Wechselwirkung dieser Ionen mit einer schwach affinen, noch nicht genauer identifizierten Bindungsstelle für Ca²⁺ erfolgen. Durch anschließende Zugabe von Calmodulin konnte nur eine schwache Reaktivierung der Kinaseaktivität beobachtet werden, da die Versuche mit der rekombinanten Ca²⁺/CaM-insensitiven Form der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durchgeführt wurden.

Die in Gegenwart des Hemmstoffes erzielte Antagonisierung durch Calmodulin kann zum einen durch dessen Konkurrenz um die Inhibitorbindungsstelle erklärt werden. Zum anderen könnte Calmodulin mit dem Hemmstoff einen Komplex eingehen, so daß zwar ein Teil der eingesetzten Calmodulinmenge nicht mehr für die Reaktivierung zur Verfügung steht, daß andererseits aber hierdurch die freie Inhibitorkonzentration gesenkt würde.

4.4. Antagonistischer Effekt von Triton X-100 auf die Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität

Triton X-100, ein Aktivator der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität, kann den antagonisierenden Effekt des Calmodulins partiell imitieren. Die möglichen Interaktionen sind in Abb. 4.4.1. dargestellt.

Abb. 4.4.1.: Modell der Interaktion Triton X-100/Enzym/Inhibitor



Triton X-100 geht mit dem Hemmstoff einen Komplex (I:T) ein, so daß ein kleinerer Teil der eingesetzten Tritonmenge nicht mehr für die Reaktivierung zur Verfügung steht.

Bedeutsamer ist aber, daß hierdurch die freie Inhibitorkonzentration signifikant gesenkt wird.

Die ermittelten apparenten Dissoziationskonstanten (Abb. 3.19.) (K_d') für die Interaktion Inhibitor/Detergens zeigen, daß die Reaktivierung des Enzyms durch Triton X-100 sehr gut mit der direkten Wechselbeziehung zwischen Triton X-100 und dem Hemmstoff erklärt werden kann.

Die Abhängigkeit des reaktivierenden Effektes von der Zeit der Zugabe des Triton X-100 (Abb. 3.18. a-j) deutet daraufhin, daß die meisten Inhibitoren nach einer schnellen physikalischen Assoziation deutlich langsamer eine starke, möglicherweise kovalente Bindung mit dem Enzym ausbilden. Alle Molekülstrukturen der potenten Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A beinhalten eine oder mehrere Carbonylgruppen. Diese Carbonylfunktionen können mit primären Aminogruppen des Enzyms, hauptsächlich ε-NH₂-Gruppen der Aminosäure Lysin, unter Ausbildung einer Schiff'schen Base (Azomethin) reagieren. Alle getesteten Verbindungen, deren Molekülstruktur dieses Strukturmerkmal nicht aufweisen, zeigten an der Kinase einen signifikant geringeren Hemmeffekt.

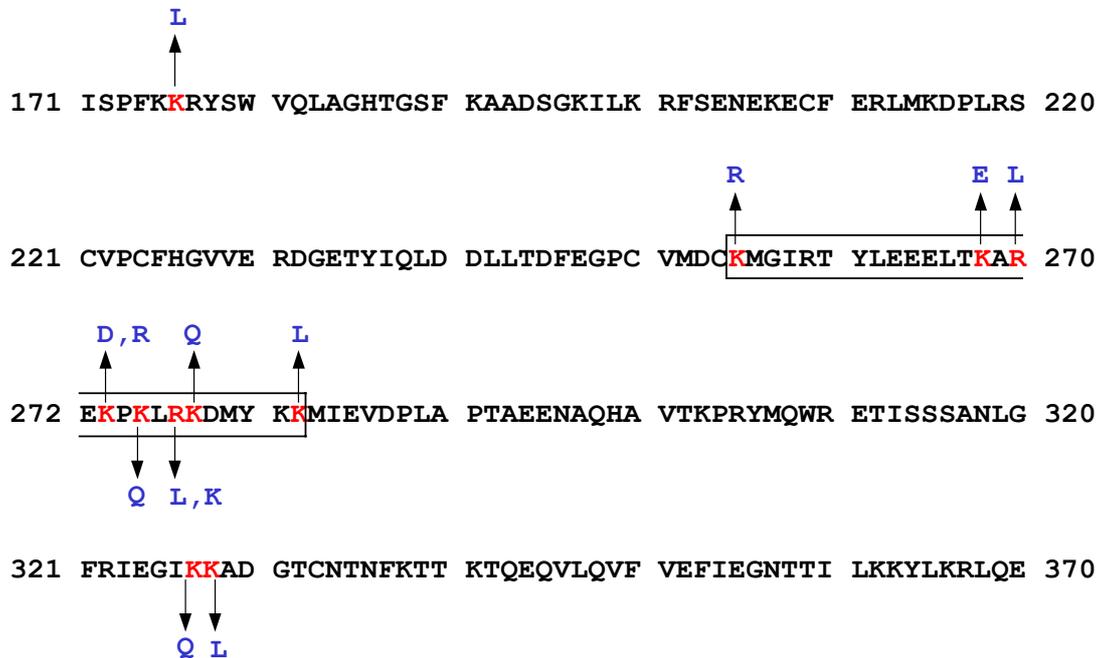
4.5. Analyse der Hemmstoffbindungsstelle

Zur Analyse der Hemmstoff-Bindungsstelle und des Hemmmechanismus wurden Mutanten der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A verwendet, die durch gezielte Mutagenese (Kap. 2.2.1.) hergestellt wurden. In diesen Mutanten wurde jeweils die Aminosäure Lysin (K) durch eine andere Aminosäure {Arginin (R), Glutamin (Q), Leucin (L), Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E)} ausgetauscht.

Die Enzymaktivitäten der Mutanten K268E und K272D wurden mittels des Hemmstoffes 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon um den Faktor 45 bzw. 260 im Vergleich zum Wildtyp der Kinase geringer gehemmt. In diesen Mutanten wurde in diesem speziellen Segment (Abb. 4.5.1.) die Aminosäure Lysin gegen Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure ausgetauscht, wodurch ihre Affinität zu dem Substrat Ins(1,4,5)P₃ allerdings nicht beeinträchtigt wurde.

Durch den Austausch der Aminosäure Lysin durch Arginin an der Position 272 in diesem Polypeptid (Abb. 4.5.1.) konnte allerdings nur ein um den Faktor 1.5 verringerter Inhibitionseffekt detektiert werden. Der Grund hierfür könnte sein, daß Arginin und Lysin im Gegensatz zur Asparaginsäure bei einem physiologischem pH-Wert positiv geladen sind. Das Flavonoid kann hinsichtlich seiner hohen Elektronendichte mit dem Arginin durch elektrosstatische Anziehungen in Wechselwirkung treten. Dadurch ist ein Hemmeffekt zu beobachten, der signifikant größer ist als beim Austausch der Aminosäure Lysin gegen Asparagin- oder Glutaminsäure.

Abb. 4.5.1.: Schematische Übersicht der durchgeführten Mutationen im speziellen Segmentabschnitt des Polypeptids



Die in einem Rahmen befindliche Aminosäuresequenz stellt das spezielle an der Katalyse beteiligte Segment der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase dar, in dem die Inhibitoren offensichtlich binden.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Inhibitoren in diesem speziellen an der Katalyse beteiligten Segment des Polypeptids (Abb. 4.5.1.) binden. Weiterhin unterstützt es die Annahme, daß die Hemmstoffe durch die Bildung einer Schiff'schen Base die Aktivität der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A hemmen. Für Gossypol konnte bereits gezeigt werden, daß es die Aktivität der Phospholipase A_2 des Pankreas vom Schwein durch die Formation einer Schiff'schen Base hemmt (Yu et al., 1997).

Vor kurzem konnte ein Segment der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A, welches für die Bindung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ verantwortlich ist, identifiziert werden (Bertsch et al., 2000). Dieses Segment umfaßt eine Region von 35 Aminosäuren (Glu-271 bis Arg-305) und ist nach Bindung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ gegenüber einem tryptischen Verdau resistent. Weiterhin inhibieren monoklonale Antikörper, deren Epitope diese Region erkennen, die Kinaseaktivität und beeinflussen die Bindung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ am Enzym.

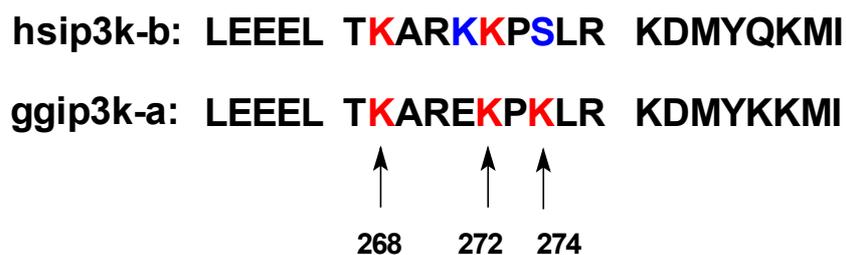
Die hier nachgewiesene Inhibitorbindungsstelle (K-272) liegt innerhalb der Region des Polypeptids, die für diese Substratbindung verantwortlich ist. Allerdings konnte nachgewiesen werden, daß die Inhibitoren einen nicht-kompetitiven Hemmtyp am Enzym für D-Ins(1,4,5)P₃ zeigten. Die Aminosäure K-272 liegt am äußeren Rand dieser Region, so daß vermutlich K-272 nicht direkt an der Bindung von D-Ins(1,4,5)P₃ sondern eher an der Konkurrenz mit der ATP-Bindung (gemischter Hemmtyp) beteiligt ist.

4.6. Hemmung der humanen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B

An der humanen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B zeigten die meisten der getesteten Hemmstoffe einen um das 6 - 23-fache geringeren Effekt (Tab. 3.3.). Nur Hypericin, ATA und Chinalizarin wiesen ähnliche oder niedrigere IC₅₀-Werte im Vergleich zum rekombinanten Enzym aus Hühnererythrozyten auf.

Die humane Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B unterscheidet sich in dem hemmstoffbindenden Segment nur an den Positionen 271 und 274 von der Aminosäuresequenz der Isoform A. An diesen Positionen liegen anstelle von Glutaminsäure die Aminosäure Lysin sowie anstelle von Lysin Serin vor (Abb. 4.6.1.).

Abb. 4.6.1.: Gegenüberstellung der Sequenzen des hemmstoffbindenden Segments der humanen (hsip3k-b) und der aus Vogelerthrozyten klonierten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase (ggip3k-a)



In rot sind die Lysinreste dargestellt, die für die Hemmstoffbindung eine zentrale Rolle spielen. In blau sind die Aminosäurereste gekennzeichnet, in denen sich beide Isoformen im für die Hemmstoffbindung spezifischen Segment unterscheiden.

Der geringere Hemmeffekt der Agenzien an der humanen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B ist vermutlich auf das zusätzliche Vorhandensein der Aminosäure Lysin an der Position 271 zurückzuführen. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, daß der Inhibitor entweder mit diesem Lysin oder an dem benachbarten Lysin, welches die hemmstoffbindende Aminosäure der Isoform A aus Vogelerythrozyten ist, eine kovalente Bindung ausbildet. Hierdurch bindet möglicherweise ein Teil der eingesetzten Hemmstoffmenge nicht an der korrekten Inhibitorbindungsstelle, wodurch der Hemmeffekt reduziert werden könnte.

Das Serin an der Position 274 in der humanen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B wird vermutlich keinen Einfluß auf den geringeren Hemmeffekt der getesteten Agenzien an diesem Enzym haben. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß ein Austausch des Lysins an dieser Position in der Isoform A aus Vogelerythrozyten nur eine Reduzierung des Effektes um Faktor 1.9 zur Folge hatte. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß diese Position nicht an der Hemmstoffbindung beteiligt ist.

Da die Inhibitoren neben einer Art von „zweihändiger“ Molekülstruktur zusätzlich eine strukturelle Symmetrie aufweisen, wurde die mögliche Bildung von Proteindimeren durch Bindung an zwei Peptidmolekülen untersucht. Es konnte aber am Beispiel von Gossypol keine Bildung von Proteindimeren nachgewiesen werden (Kap. 3.10.). Da aber das Vorhandensein dieser Symmetrie eine starke Interaktion mit dem Enzym zu begünstigen scheint, ist es möglich, daß es innerhalb eines Polypeptidmoleküls zur Ausbildung von zwei kovalenten Bindungen oder zusätzlichen ionischen Wechselwirkungen kommt.

4.7. Wirkung der Inhibitoren auf das Zellwachstum

Die im umfangreichen in-vitro Screening entdeckten Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A wurden auf ihre Wirkung in Bezug auf das Zellwachstum unter Verwendung von zwei verschiedenen Zelllinien (Jurkat T-Zellen, NIH 3T3-Zellen) analysiert. Der Grund hierfür war vor allem, daß für alle entdeckten Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A bereits wachstumshemmende Effekte an verschiedenen Krebszelllinien beschrieben wurden. Dies stellt eine gemeinsame zellphysiologische Wirkung aller dieser Stoffe dar. Hierfür sollten nochmals unter Vergleichsbedingungen die IC₅₀-Werte in Kulturzellen ermittelt werden.

4.7.1. Quercetin

Quercetin hemmt das Wachstum von promyelozytischen Leukämiezellen HL-60 (Kang & Liang, 1997), von humanen Darmkrebszellen (Yoshida et al., 1990; Kuntz et al., 1999), von Ehrlich Aszites Tumorzellen (Suolinna et al., 1975), von Adenokarzinomazellen HT29 (Agullo et al., 1996), von humanen Brustkrebszellen MCF7 (Rodgers & Grant, 1998) und MDA-MB-468 (Balabhadrapathruni et al., 2000).

4.7.2. (-)-EGCG, (-)-EGCG

(-)-EGCG und (-)-EGCG besitzen antiproliferative Effekte an einer ganzen Reihe von verschiedenen Krebszelllinien, wie die Brustkrebszellen MCF-7 (Komori et al., 1993; Valcic et al., 1996), Darmkrebszellen HT-29 (Valcic et al., 1996), Lungenkrebszellen (Valcic et al., 1996; Okabe et al., 1997), Melanomazellen (Valcic et al., 1996), Prostatakrebszellen (Liao et al., 1995b; Lyn-Cook et al., 1999), Lungentumorzellen (Yang; G.Y. et al., 1998), Pankreastumorzellen (Lyn-Cook et al., 1999), Magenkrebszellen (Okabe et al., 1999) sowie Erythroleukämiezellen (Asano et al., 1997).

4.7.3. Hypericin

Hypericin zeigt antiproliferative Aktivitäten gegen zahlreiche Tumorzellen, wie Gliomazellen (Couldwell et al., 1994; Zhang et al., 1997), Adenomazellen (Hamilton et al., 1996), Mammakarzinomazellen (Thomas & Pardini, 1992) sowie gegen squamosus Karzinomazellen (Richter & Davies, 1995).

4.7.4. Gossypol

Einige Untersuchungen haben gezeigt, daß Gossypol antiproliferative Effekte in vitro gegen eine Reihe von Krebszelllinien besitzt, wie Brust- (Hu et al., 1993), Eierstock- (Wang & Rao, 1984), Prostata- (Shidaifat et al., 1997) und Darmkrebszelllinien (Tuszynski & Cossu, 1984) sowie Erythroleukämiezellen (Haspel et al., 1984) und Melanomazellen (Band et al., 1989; Shelley et al., 1999).

4.7.5. ATA

ATA besitzt einen anti-apoptotischen Effekt (Lavoie & Witorsch, 1995; Okada & Koizumi, 1995; Andrew et al., 1999; Bai et al., 1999). Ebenso konnte gezeigt werden, daß ATA Phäochromozytomzellen von Ratten (PC12), die in Hungermedium gehalten wurden, vor dem Zelltod schützt (Batistatou & Greene, 1991). Diese Effekte wurden auch in Neuroblastomazellen SH-SY5Y beobachtet (Okada & Koizumi, 1997). Außerdem wurde berichtet, daß ATA die durch Fibroblasten-Wachstumsfaktoren- (FGF) vermittelte autokrine Transformation von NIH 3T3-Zellen sowie die Proliferation von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, die ein Target der FGF-mitogenen Aktivität sind, hemmt (Benezra et al., 1992, 1994).

4.7.6. Proliferationshemmung der Jurkat T-Zellen und NIH 3T3-Zellen

Für alle getesteten Inhibitoren konnte eine Proliferationshemmung der Jurkat T-Zellen (Abb. 3.26.a - h) und der NIH 3T3-Zellen (3.28.a - h) nachgewiesen werden.

Alle Verbindungen zeigten an beiden Zelllinien gleiche oder ähnliche Hemmeffekte mit Ausnahme von ATA. Dieses Agens zeigte einen um Faktor 11 stärkeren Hemmeffekt auf das Wachstum der NIH 3T3-Zellen (Tab. 4.7.6.1.).

Tab. 4.7.6.1.: Proliferationshemmung der Jurkat T-Zellen und NIH 3T3-Zellen

Inhibitor	Jurkat T-Zellen IC ₅₀ (µM)	NIH 3T3-Zellen IC ₅₀ (µM)
ATA	60.3	6.25
(-)-ECG	36.8	21.1
(-)-EGCG	15.9	22.2
Gossypol	1.56	1.14
Hypericin*	0.17	0.20
Myricetin	16.9	23.4
Quercetin	25.9	52.5
3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon	8.5	14.4

*: Bestrahlung mit Laborlicht (Kap. 2.3.2.1.)

Dieses könnte auf eine vermehrte Expression des Multi-Drogen-Resistenz-Transportproteins (MDR) in Jurkat T-Zellen zurückzuführen sein. Die Überexpression dieses Proteins, eine Transport-ATPase, in menschlichen Krebszellen führt dazu, daß die Zellen gleichzeitig gegenüber einer Reihe von chemisch nicht verwandten zytotoxischen Arzneimitteln, die in der Chemotherapie angewandt werden, unempfindlich werden. Das MDR pumpt die zytotoxischen Substanzen aus der Zelle heraus, wodurch ihre Wirkung verringert wird.

Ob eine Transport-ATPase in den Jurkat T-Zellen exprimiert wird, kann durch das Agens Dexniguldipin (DNIG) aufgeklärt werden. Es handelt sich hierbei um einen Hemmstoff des MDR. Diese Verbindung wurde bereits in klinischen Studien der Phase I-II als ein Modulator des durch das P-Glykoprotein 170 (pgp 170) gesteuerten MDR getestet (Neumann et al., 1992; Reymann et al., 1993).

Die in diesen Zellversuchen detektierten IC_{50} -Werte der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinasehemmstoffe (Tab. 4.7.6.1.) liegen alle im Rahmen der bisher für diese Verbindungen an unterschiedlichen Zelllinien analysierten und veröffentlichten Daten zur Hemmung des Zellwachstums. Allerdings liegen keine Veröffentlichungen von Studien über einen antiproliferativen Effekt des 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavons bislang vor.

Im Vergleich der IC_{50} -Werte, die mittels der Zell- und der „in vitro“-Hemmversuche an der rekombinanten Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A ermittelt wurden, sind die im Rahmen der Zellversuche ermittelten IC_{50} -Werte um Faktor 29 - 402 erhöht. Diese Abnahme der Hemmeffekte der eingesetzten Verbindungen ist vermutlich auf eine Bindung an Serumproteine sowie auf eine limitierte Membrangängigkeit der Hemmstoffe zurückzuführen.

Sowohl für Gossypol (Royer & Vander-Jagt, 1983; Haspel et al., 1984) als auch für Quercetin (Boulton et al., 1998) wurde berichtet, daß diese Stoffe mit hoher Affinität an Serumalbumin binden. Dadurch wird die freie effektive Konzentration dieser Agenzien reduziert, wodurch eine Abnahme der zellulären Verfügbarkeit resultiert. Derartige Serumbindungen müssen in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.7.7. Vitalitätsrate/Apoptose der Jurkat T-Zellen unter dem Einfluß der Kinaseinhibitoren

Unter dem Einfluß der Inhibitoren konnte eine Überlebensrate der Jurkat T-Zellen in einem Bereich von 10 % {Gossypol, Hypericin, (-)-EGCG} bis 89 % {(-)-ECG} festgestellt werden. Die Vitalität der NIH 3T3-Zellen betrug 0 % - 70 % je nach eingesetztem Inhibitor. Hierbei können die Zellen entweder durch die Induktion von Apoptose (programmierter Zelltod) oder durch Nekrose sterben.

Es ist bereits bekannt, daß diese Verbindungen Apoptose in verschiedenen Zelllinien induzieren (Wie et al., 1994; Hamilton et al., 1996; Zhao et al., 1997).

Die morphologischen und biochemischen Merkmale der Apoptose sind ausführlich beschrieben worden (Wyllie et al., 1980; Kerr et al., 1972).

Die Induktion der Apoptose stimuliert auf einem komplexen Signalweg eine Endonuklease. Dieses DNA-hydrolysierende Enzym ist an der Initiation von Doppelstrangbrüchen in der DNA beteiligt. Dadurch entstehen DNA-Fragmente, die ein typisches Muster einer DNA-Leiter in der Agarose-Gel-Elektrophorese ergeben. Weiterhin kommt es zur Kondensation und Fragmentierung von nuklearem Chromatin, der Zusammenlagerung von zytoplasmatischen Organellen und zur Ausdehnung des endoplasmatischen Retikulums. Das Zellvolumen verkleinert sich und die Plasmamembran bildet Bläschen. Außerdem verändern die Zellen die Chemie des äußeren Teils der Plasmamembran, indem sich z.B. das Phosphatidylserin, ein negativ geladenes Phospholipid, sich in einigen apoptotischen Blutzellen von der Zytoplastseite der Lipid-Doppelschicht auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran verlagert. Dadurch werden diese Zellen von Makrophagen erkannt und phagozytiert, so daß es im Gegensatz zur Nekrose nicht zum Auslaufen von Zytosolbestandteilen und nicht zu einer Entzündungsreaktion kommt.

Die hier durchgeführten Zellzyklusanalysen weisen in der Tat daraufhin, daß auch in den Jurkat T-Zellen Apoptose durch die getesteten Agenzien induziert wird. Dieses ist in dem DNA-Histogramm nach Einwirkung von 3',4',7,8,-Tetrahydroxyflavon am Auftreten des Sub G₁-Peaks erkennbar (Abb. 3.31. A,B). Dieser Peak ist ein Indiz für die Bildung von DNA-Fragmenten, die charakteristisch für das Auftreten von Apoptose sind.

Mittels der Agarose-Gel-Elektrophorese kann diese Fragmentierung nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises von apoptotischen Zellen ist die Färbung mit DNA-spezifischen Farbstoff Hoechst 33342 und anschließender Untersuchung unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops. Hierdurch wird die nukleare Fragmentierung sichtbar. Ebenfalls kann diese Form des Zelltods mittels der Detektion von aktivierten Caspasen (cytosolic aspartate-spezifische Proteasen), die in der Zelle als inaktive Enzyme vorliegen, nachgewiesen werden. Die Aktivierung dieser Enzyme erfolgt durch proteolytische Spaltung in einem frühen Stadium der Apoptose (Cohen, 1997). Sie inaktivieren Proteine, die die lebende Zelle vor Apoptose schützen. Weiterhin sind sie in der Lage, Zellstrukturen zu zerstören, indem sie Proteine spalten, die die Bildung des Zytoskeletts regulieren.

Die Ausnahme unter den getesteten Verbindungen stellt ATA dar, die einen anti-apoptischen Effekt besitzt, der bisher in myeloischen Zellen (Andrew et al., 1999) und in Lymphomazellen (Lavoie & Witorsch, 1995) beobachtet werden konnte. Dieser Effekt ist auf eine Hemmung der Caspasen (Mesner et al., 1999) und der Topoisomerase (Catchpole & Stewart, 1994) durch diese Verbindung zurückzuführen. Diese protektive Eigenschaft ist auch zurückzuführen auf die Hemmung der endogenen Endonukleaseaktivität. Dieses Enzym ist an der Fragmentierung der DNA in Bruchstücke von 180 Basenpaaren involviert (Mogil et al., 1994).

Auch im Rahmen dieser Proliferationshemmversuche zeigte ATA die geringste Zytotoxizität unter den getesteten Verbindungen. Sowohl bei den Versuchen mit Jurkat T-Zellen als auch mit NIH 3T3-Zellen konnte eine Überlebensrate der Zellen von 82 % bzw. 89 % bei einer Konzentration des 1,3-fachen (Jurkat T-Zellen) bzw. des 24-fachen (NIH 3T3-Zellen) IC_{50} -Wertes für das Zellwachstum ermittelt werden (Abb. 3.29.).

Hypericin ist ein Agens, welches in unterschiedlichen Zelllinien mehr Nekrose als Apoptose induziert. Dieses konnte in HL-60 Zellen gezeigt werden, in denen es bei einer Konzentration $\leq 0,65 \mu\text{M}$ Apoptose verursacht. Bei höheren Konzentrationen dagegen weisen die absterbenden Zellen Nekrose auf. In den leukämischen Zellen K-562 und Hut-78 konnte bei jeder verwendeten Dosis an Hypericin Nekrose detektiert werden (Lavie et al., 1999). Ebenso kommt eine nicht komplette Apoptose, die durch die DNA-Fragmentierung zu Oligonukleosomen in Abwesenheit von nuklearer Fragmentierung charakterisiert ist, in Neuroblastomazellen (Zhang et al., 1995) sowie in Mammakarzinomazellen (Thomas & Pardini, 1992) vor. Auch in HeLa-Zellen induziert photoaktiviertes Hypericin je nach eingesetzter Dosis entweder Apoptose oder Nekrose (Vantieghem et al., 1998).

Ob Hypericin in den Jurkat T-Zellen und in den NIH 3T3-Zellen Apoptose oder Nekrose induziert, muß noch untersucht werden.

4.8. Einfluß der Inhibitoren auf den Zellzyklus

Da alle potenten Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A die Proliferation der Jurkat T-Zellen sowie der NIH 3T3-Zellen hemmten, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Hierdurch besteht die Möglichkeit zu ermitteln, in welcher Phase des Zellzyklus die Verbindungen das Zellwachstum hemmen.

Die ermittelten Daten dieser Analyse in nicht-synchronisierten Populationen der Jurkat T-Zellen zeigen, daß Gossypol, (-)-EGCG und 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon den Zellzyklus in der S-Phase hemmen (Abb. 3.30.A - D).

Das gleiche Ergebnis konnte in einer anderen Studie für Gossypol bei Chinese hamster ovary (CHO) -Zellen ermittelt werden (Wang & Rao, 1984). Im Gegensatz dazu wird in der Literatur beschrieben, daß die Behandlung mit Gossypol zu einer Anhäufung von Zellen in den humanen Mammakarzinomzelllinien T47-D (Thomas et al., 1991) und MCF-7 (Ligueros et al., 1997), in humanen Prostatakrebszellen (Shidaifat et al., 1996) und in humanen BPH (Benign Prostatic Hyperplastic) -Zellen (Shidaifat et al., 1997) in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus führt. In der Zelllinie MCF-7 konnte gezeigt werden, daß diese Hemmung auf eine Erniedrigung der Expression der Proteine Cyclin D1 und das Tumorsuppressorprotein Retinoblastom (pRb) zurückzuführen ist (Ligueros et al., 1997). Diese Proteine sind für den Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase von großer Bedeutung, da sie an diesem Punkt des Zellzyklus eine Kontrollfunktion ausüben.

Im Gegensatz zu den Jurkat T-Zellen zeigte die humane Lungenkrebszelllinie PC-9 unter dem Einfluß des Tee-Polyphenols (-)-EGCG in einer Konzentration von 50 µM - 100 µM eine Anhäufung der Zellen in der G₂/M-Phase (Okabe et al., 1997; Fujiki et al., 1998). Ebenso induzierte (-)-EGCG (60 µM - 200 µM) in der humanen Magenkrebszelllinie KATO III einen Block in diesem Abschnitt des Zellzyklus (Okabe et al., 1997). Dagegen erfolgte mittels diesem Agens in der humanen epidermoiden Karzinomzelllinie A 431 eine Hemmung in der G₀/G₁-Phase (Ahmad et al., 1997).

Für das Flavonoid 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon liegen bislang keine Veröffentlichungen vor.

Unter dem Einfluß von Quercetin konnten in der Zellzyklusanalyse andere Effekte als bei den oben genannten Inhibitoren beobachtet werden. Bei einer geringen Dosis an Quercetin (5 μM) erniedrigt sich der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase und erhöht sich in der G₂/M-Phase. Wird die Dosis an Quercetin auf 10 μM erhöht, sinkt der Zellanteil in der G₂/M-Phase und erhöht sich in der S-Phase. Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration des Flavonols auf 20 μM erfolgt wiederum eine Umkehrung des Effektes (Tab. 3.14.). Hieraus ist ersichtlich, daß Quercetin in geringeren und höheren Konzentrationen ($\leq 5 \mu\text{M}$, $\geq 20 \mu\text{M}$) eine Anhäufung der Zellen in der G₂/M-Phase bewirkt. Im Gegensatz dazu erfolgt bei einer Dosis von 10 μM eine Hemmung des Zellzyklus in der S-Phase.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen in der Literatur beschriebenen überein, daß Quercetin bei einer Dosis von 100 μM eine Anhäufung von Brustkrebszellen (MDA-MB468) in der G₂/M-Phase (Avila et al., 1994; Balabhadrapathruni et al., 2000) bewirkt. Der gleiche Effekt ist bei einer Konzentration von 0.01 μM bis 5 μM in den Kehlkopfkrebszelllinien Hep2 und CO-K3 (Ferrandina et al., 1998) und bei einer Dosis von 20 μM bis 60 μM in den leukämischen HL-60 Zellen (Kang & Liang, 1997) zu beobachten.

Dagegen sind die oben beschriebenen Effekte nicht mit einigen Berichten übereinstimmend, die gezeigt haben, daß dieses Flavonol in humanen CEM leukämischen T-Zellen (Quercetinkonzentration = 70 μM) (Yoshida et al., 1992), in humanen Magenkrebszellen (Yoshida et al., 1990) sowie in humanen Eierstockkrebszellen (Li et al., 1999) eine Hemmung des Zellwachstums in der G₁-Phase auslöst.

Die Ergebnisse zeigen, daß die getesteten Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A zumindest in bestimmten Dosisbereichen jeweils analoge Effekte auf den Zellzyklus von verschiedenen Zelllinien, nämlich der Hemmung der S-Phase, haben. Dies könnte auf einen mit dem gemeinsamen Target Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase korrelierenden Mechanismus dieser Hemmung hinweisen. Sowohl Quercetin als auch ATA scheinen aber noch weitere Effekte im Zellzyklus auszuüben, welche obigen Effekt überlagern können.

4.9. Einfluß der Inhibitoren auf die DNA-Synthese

Da alle Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A den Zellzyklus der Jurkat T-Zellen in der S-Phase blockierten, wurde mittels des 5-Bromo-2'-deoxy-uridin-Einbaus (BrdU) die DNA-Synthese der Zellen analysiert. Diese Analyse diente zur Klärung der Frage, ob die Blockade in der S-Phase auf eine Hemmung der DNA-Synthese zurückzuführen ist.

Unter dem Einfluß von (-)-EGCG und 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon wurde in den eingesetzten Konzentrationen (0 µM - 20 µM) keine Hemmung der DNA-Synthese beobachtet.

Jedoch wurde für (-)-EGCG berichtet, daß dieses Tee-Polyphenol, vorliegend im Tee-Extrakt, in Rattenhepatom- und in Erythroleukämiezellen von Mäusen die DNA-Synthese hemmt (Lea et al., 1993).

Für das Flavon sind bislang keine Einflüsse auf die DNA-Synthese beschrieben worden.

In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte beobachtet werden, daß Gossypol bereits bei einer Konzentration von 1 µM die DNA-Synthese der Jurkat T-Zellen um 16 % gegenüber der Kontrolle hemmt. Dieser Effekt konnte ebenfalls in HeLa- und in CHO-Zellen (Wang & Rao, sowie in der Mammakarzinomazelllinie MCF-7 (Hu et al., 1993) nachgewiesen werden.

Dagegen zeigte ATA in dieser Untersuchung eine Stimulierung der DNA-Synthese um 17 % im Vergleich zur Kontrolle. Für ATA liegen jedoch keine publizierten Daten hinsichtlich der Inhibierung bzw. Stimulierung der DNA-Synthese vor.

In anderen Studien wurde gezeigt, daß auch Quercetin sowohl in Ehrlich-Ascites-Tumoren (Graziani & Chayoth, 1979) als auch in anderen Geweben (Rattenleber, - Milz) (Wong & McLean, 1999) die DNA-Synthese hemmt. Ob Quercetin diese Eigenschaft auch bei den Jurkat T-Zellen besitzt, muß noch analysiert werden.

Allerdings sollten die hier ermittelten Daten mit gewisser Skepsis betrachtet werden, da der BrdU-Einbau unter Einsatz von Mikrotiterplatten durchgeführt wurde, die sehr stark den Antikörper an der Plastikoberfläche absorbieren könnten. Ebenfalls könnte der Antikörper an der Zelloberfläche oder an Zelltrümmern von toten Zellen gebunden werden, so daß in beiden Fällen durch diese unspezifische Bindung eine DNA-Synthese vorgetäuscht wird.

Unter Anwendung von Gossypol in einer Konzentration von 3 μM wurden nur noch 16 % vitale Zellen analysiert. Diese Zellen zeigten trotzdem noch eine DNA-Synthese von 76 % der Kontrolle. Von der Firma Boehringer Mannheim wurde hinsichtlich dieser Möglichkeiten keine Kontrollen vor Verkauf dieses Assays durchgeführt.

Zur Überprüfung und Sicherstellung der ermittelten Ergebnisse muß in weiteren Untersuchungen der sensitive Einbau von Tritium-markiertem Thymidin ($[^3\text{H}]$ -Thymidin) zusätzlich durchgeführt werden.

4.10. Hemmung der Biosynthese der höher phosphorylierten Inositole

Zur Aufklärung der Rolle der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase sowie der höher phosphorylierten Inositole in der intakten Zelle, wurde mittels der hier identifizierten Hemmstoffe die Biosynthese dieser Verbindungen in einer größeren Zellpopulation gehemmt, um zu analysieren, welchen Effekt ein Fehlen dieser Inositole auf das Zellwachstum von Jurkat T-Zellen hat.

Beide für diese Versuche eingesetzten Hemmstoffe, Quercetin und Gossypol, zeigten eine signifikante Inhibierung der endogenen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinaseaktivität. Die Bildung des Produkts der Katalysereaktion, $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, wurde deutlich unterdrückt. Dieser Effekt setzte sich über die Zwischenstufen des Stoffwechselweges der Inositolphosphate (Abb. 1.4.1.) fort. Es konnte jeweils eine signifikante Reduzierung der Stoffmengen an $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$, InsP_6 und InsP_7 (PP- InsP_5) gefunden werden (Abb. 3.34., 3.36.).

Hieraus ist ersichtlich, daß die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase eine Schlüsselrolle im Inositolphosphatstoffwechsel einnimmt und daß offensichtlich alle in den Zellen vorhandenen Isoformen des Enzym Targets für die hier verwendeten Hemmstoffe sind.

Gleichzeitig wurde interessanterweise eine Erhöhung der Stoffmengen von den Isomeren $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ und $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ beobachtet (Abb. 3.35.). Welche Begründung dieser Beobachtung zugrunde liegt, ist zur Zeit noch unklar.

4.11. Schlußfolgerung

In dieser Studie wurde gezeigt, daß die Inhibitoren der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase eine Abnahme der intrazellulären Stoffmenge von Ins(1,3,4,5)P₄ sowie höher phosphorylierter Inositole durch die Hemmung der endogenen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase in Jurkat T-Zellen induzierten. Weiterhin wurde gezeigt, daß diese Hemmstoffe einen antiproliferativen Effekt sowohl auf die Jurkat T-Zellen als auch auf die NIH 3T3-Zellen besitzen.

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen könnten die antiproliferativen Aktivitäten der getesteten Verbindungen auf die Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität zurückzuführen sein. Hinweise hierzu ergeben sich in vorangegangenen Studien, in denen Johnson et al. (1989) zu der Annahme kam, daß die Metabolisierung von Ins(1,4,5)P₃ zum Ins(1,3,4,5)P₄ von großer Bedeutung für das Zellwachstum sein könnte. Diese Vermutung basiert auf dem Ergebnis, daß Fibroblasten, die mit dem v-src-Onkogen transformiert wurden, einen starken Anstieg der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität zeigten. Andere Arbeitsgruppen vermuteten, daß Ins(1,3,4,5)P₄ eine physiologische Rolle in der Initiation der DNA-Synthese beim G₁/S-Übergang in Rattenleberzellen einnimmt (Hill et al., 1989).

Weiterhin wurde vor kurzem entdeckt, daß das Produkt des Gens ARGRIII von *Saccharomyces cerevisiae* Inositolpolyphosphatmultikinaseaktivität (ipmk) besitzt, welches die Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P₃ zu Ins(1,3,4,5)P₄ und zu Ins(1,4,5,6)P₄ katalysiert (Saiardi et al., 1999). Durch Mutation dieses Gens erfolgte ein Rückgang des mRNA-Exports aus den Kern, eine Reduzierung des Zellwachstums, eine Erhöhung der zellulären InsP₃-Konzentration um den Faktor 170 sowie eine Abnahme der InsP₆-Konzentration um den Faktor 100 (Saiardi et al., 2000b).

Weitere Studien an Hefen zeigten ebenso deutlich, daß eine Beziehung zwischen dem Umsatz an Inositolphosphaten, der Regulation der Genexpression sowie des Zellwachstums besteht (York et al., 1999; Saiardi et al., 2000a). Hier wurde beschrieben, daß durch eine Mutation des Gens, welches für die Hefeform von InsP₆-Kinase codiert, sowohl ein geringeres Zellwachstum als auch ein verminderter Gehalt an InsP₆ beobachtet werden konnte. Erste Versuche einer Hemmung von InsP₆-Kinase1 durch die in dieser Arbeit gefundenen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasehemmstoffe zeigten, daß dieses Enzym zwar auch gehemmt wird, jedoch sind die ermittelten IC₅₀-Werte deutlich (ca. 10-fach) größer (Daten nicht veröffentlicht).

Dadurch könnte die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase ein rascher zu Wirkungen auf die Inositolphosphat Spiegel führendes pharmakologisches Target für Wirkstoffe mit antiproliferativen Effekten darstellen. Ein Block des Inositolphosphatstoffwechsels durch die Hemmung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase wäre wegen deren deutlich höhere Hemmstoffaffinität pharmakologisch effizienter.

Die in der Literatur dokumentierten Hemmeffekte einiger $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinasehemmstoffe (Quercetin, Gossypol, Hypericin) an der Proteinkinase C (Hofman et al., 1988; Nakadate et al., 1988; Takahashi et al., 1989) unterstützen weiterhin die Annahme, daß die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase das wohl bisher beste identifizierte Target der Hemmstoffe ist, so daß die Hemmung dieses Enzyms vermutlich deren antiproliferativen Effekt bedingt. Die Proteinkinase C nimmt zwar eine wichtige Rolle in einer großen Anzahl von fundamentalen zellulären Prozessen ein, zu denen die Regulation der Proliferation und der Differenzierung in verschiedenen Zelltypen gehört (Nishizuka, 1992), jedoch sind diese Hemmeffekte im Vergleich zu denen an der rekombinanten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A ermittelten um den Faktor 10 - 100 geringer.

Auch die Hypothesen anderer Studien, daß der antiproliferative Effekt von Quercetin auf eine Hemmung der membranären Tyrosinproteinkinase (Kang & Liang, 1997) sowie der 1-Phosphatidylinositol 4-Kinase (PIK) (Weber et al., 1996) zurückzuführen sei, favorisiert eher die Vermutung, daß die Hemmung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase den antiproliferativen Effekt des Wirkstoffes bedingt. Weber et al. (1996) konnten zwar zeigen, daß die Aktivitäten der PIK und der 1-Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase (PIP-Kinase) in einigen Tumorzellen (OVCAR-5 Zellen, Brustkrebszelllinie MDA-MB-435) erhöht sind, wodurch der antiproliferative Effekt von Quercetin auf Tumorzellen durch dessen inhibitorische Wirkung auf die PI- und PIP-Kinaseaktivität zurückzuführen sein könnte. Jedoch zeigte Quercetin sowohl an diesen Enzymen als auch an der membranären Tyrosinproteinkinase einen deutlich geringeren Hemmeffekt als an der rekombinanten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase A.

Für alle in dieser Arbeit gefundenen Kinaseinhibitoren sind ebenfalls Hemmeffekte an der Topoisomerase II dokumentiert worden. Dieses Enzym ist ein nukleares Enzym, das die Topologie bzw. Helicität der DNA mittels Doppelstrangbruch, Strangpassage sowie Religation verändert (Meikle et al., 1995). Es ist in der DNA-Replikation, Genexpression, Transkription, DNA-Rekombination und DNA-Reparatur involviert (Gellert, 1981; Wang, 1985; Drlica & Franco, 1988). Die Topoisomerase des Typs II findet man im wesentlichen nur bei Eukaryontenzellen während der Vermehrung. Da dieses Enzym auch in schnell proliferierenden Zellen wie Tumorzellen vermehrt vorkommt (Riou et al., 1985), ist es ein beliebtes Zielprotein für klinisch wichtige Antitumormedikamente. Aufgrund dieser Veröffentlichungen wurden in dieser Studie die Hemmstoffe auf ihren Effekt auf die katalytische Aktivität dieses Enzyms untersucht (Kap. 3.11.). Allerdings wurden IC_{50} -Werte ermittelt, die mit Ausnahme der Werte von (-)-ECG und ATA deutlich unspezifischer die Aktivität der Topoisomerase II inhibierten als die Aktivität der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A (Tab. 3.7.). Wiederum ergibt der Vergleich der IC_{50} -Werte, daß die $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase das beste bisher identifizierte Target der Wirkstoffe ist.

In weiteren Vergleichen der in der Literatur beschriebenen Daten mit denen an der rekombinanten $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A ermittelten IC_{50} -Werten ist ersichtlich, daß die meisten IC_{50} -Werte anderer pharmakologischer Effekte der Inhibitoren auf Enzyme in vitro oder zelluläre Funktionen mindestens um das 10-fache über den in dieser Arbeit detektierten Daten liegen. Die einzigen Ausnahmen sind die Effekte der ATA und Ellagsäure an der Topoisomerase II, von Quercetin und den Tee-Polyphenolen an der DNA-Polymerase β sowie von (-)-EGCG an der HIV reversen Transkriptase.

Diese Vergleiche zeigen, daß es sich bei allen detektierten Verbindungen um sehr spezifische Hemmstoffe der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase A handelt. Weiterhin ist ersichtlich, daß an der inhibitorischen Wirkung der Kinasehemmstoffe auf die Zellproliferation mutmaßlich eine Reihe von Effekten beteiligt sind. Allerdings kann aufgrund dieser Vergleiche aber die Vermutung geäußert werden, daß die Effekte der identifizierten Hemmstoffe auf die Zellproliferation zumindest teilweise auf die Hemmung der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase des zumeist besten Targets dieser Hemmstoffe zurückzuführen ist. Es kann kaum noch als Zufall bezeichnet werden, wenn jeder der zahlreichen in vitro aufgespürten Hemmstoffe der $Ins(1,4,5)P_3$ 3-Kinase an Zellkulturen weitgehend analoge antiproliferative Mechanismen zeigt. Der genaue molekulare Mechanismus der Proliferationshemmung muß allerdings noch aufgeklärt werden.

Zur Aufklärung dieses Sachverhalts wurde eine Transfektion der Jurkat T-Zellen mit einer hemmstoffunempfindlichen Mutante der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase (K272D) durchgeführt. Nach erfolgreicher stabiler Expression dieses mutierten Enzyms sollen weitere Proliferationsversuche mit den potenten Kinaseinhibitoren durchgeführt werden. Besitzt die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase eine zentrale Bedeutung im Zellwachstum, so sollten die hier gefundenen Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseinhibitoren einen deutlich geringeren antiproliferativen Effekt an den mutierten Jurkat T-Zellen zeigen. Bis zu diesem Zeitpunkt liegen noch keine Ergebnisse vor, da diese Versuche noch nicht abgeschlossen sind.

Alle hier gefundenen antiproliferativ wirkenden Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasehemmstoffe sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Dies könnte auf eine gemeinsame Wirkung dieser Stoffe hinweisen. Sekundärstoffe haben im Laufe der Evolution bestimmte Aufgaben im Organismus des Produzenten oder bei seiner Wechselwirkung mit der Umwelt übernommen. Zu ihnen gehören u.a. die Phytoalexine, die gegen tierische Räuber (Freßfeinde) gerichtete Gifte sind. Die Phytoalexinwirkungen oder analoge Wirkungen auf Freßfeinde der meisten der hier gefundenen Polyphenole sind ausschließlich pflanzlichen Ursprungs. Sie hemmen das Zellwachstum bei Freßfeinden und anderen Insekten, jedoch ohne diese bei den gefressenen Dosen zu töten oder schwer zu schädigen. Dies könnte dafür nützlich sein, die Vektorfunktion der Freßfeinde bei der Bestäubung zu erhalten. **Es könnte wie das hier aufgezeigte ganz offensichtlich auch proliferativ wirkende Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Hemmprinzip ein phylogenetisches, im Pflanzenreich vielfach erprobtes, nicht vorwiegend genotoxisch wirkendes antiproliferatives Prinzip aufgespürt worden sein. Dieses ließe sich für die Tumorthherapie oder der immunsuppressiven Therapie anwenden und verfeinern.**

4.12. Substratspezifität der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Eine Reihe von biologischen Inositolphosphaten (InsPs) sowie Analoga des natürlichen Substrats {Ins(1,4,5)P₃} der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A wurden auf ihr Potential als mögliche weitere Substrate oder Inhibitoren der Kinase getestet. Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluß die Position und/oder die Anzahl der Phosphatgruppen am Inositolring auf die Phosphorylierung durch die Kinase haben. Diese durchgeführten Aktivitätstests sollen zur Charakterisierung des aktiven Zentrums des Enzyms dienen („active site mapping“), aber auch weitere Hemmstoffe liefern.

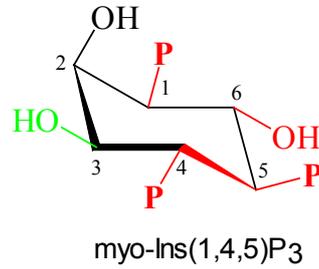
Zusätzlich zum Ins(1,4,5)P₃ konnten 12 Inositolphosphatisomere (Tab. 3.8.) und 7 InsP-Analoga (Tab. 3.9.) als Substrate der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A identifiziert werden. Hierunter befinden sich auch biologische, in tierischen Zellen nachgewiesene Inositolphosphate anderer Isomerie. Die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen könnten damit neben der Rolle der Konversion von Ins(1,4,5)P₃ zu Ins(1,3,4,5)P₄ durchaus noch eine weitere Bedeutung bei der Biosynthese höherer Inositolphosphate haben, indem sie weitere Phosphorylierungen anderer Isomere katalysieren.

4.12.1. Struktur-Aktivitätsbeziehung der Inositolphosphate und Analoga „active site mapping“ der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase-Bindungsstelle

Um einen strukturellen Vergleich zwischen dem eigentlichen Substrat der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase, D-Ins(1,4,5)P₃, und den Verbindungen zu erleichtern, wurden die InsPs um bestimmte Achsen so lange gedreht (Abb. 4.12.1.), bis eine sterische Übereinstimmung zum besten Substrat, Ins(1,4,5)P₃, gefunden war. Dieses Vorgehen erlaubte es, die im Folgenden gefundenen Strukturprinzipien und Regeln für ein „gutes“ Substrat bzw. einen gut bindenden Liganden zu erarbeiten. Dieses Vorgehen erlaubt letztendlich im Detail Aussagen über die Eigenschaften und Raumstrukturen der Substratbindungsstelle zu machen („active site mapping“).

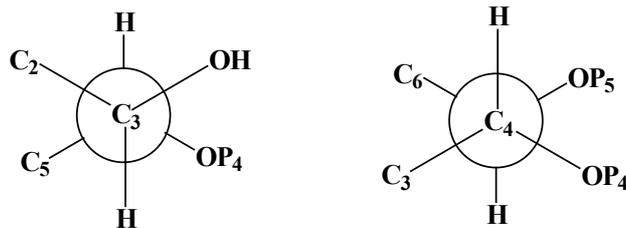
Abb. 4.12.1.: Spiegelachsenverlauf für den strukturellen Vergleich der InsPs

a)



b)

Sägebockmodelle der vicinalen Winkelverhältnisse an C₃ bis C₅ des myo-Ins(1,4,5)P₃



c)

Rotation um eine horizontale Achse zeigt die Übereinstimmung mit essentiellen Strukturen von myo-Ins(1,4,5)P₃ auf

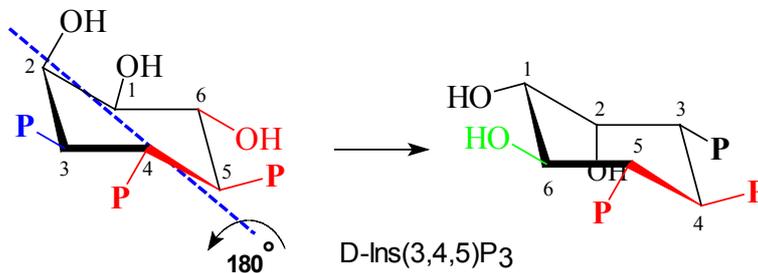
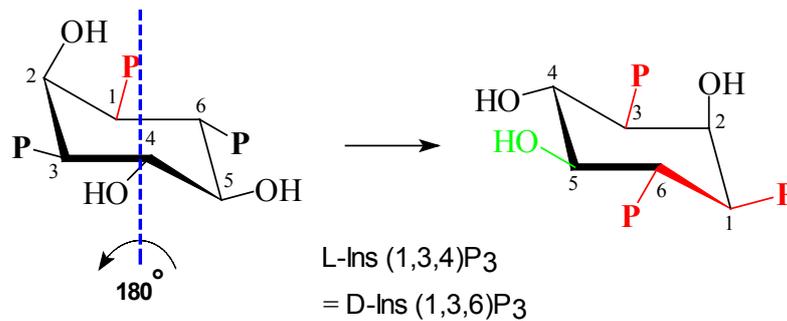


Abb. 4.12.1.: Fortsetzung

d)

Rotation um eine vertikale Achse
zeigt die Übereinstimmung mit essentiellen Strukturen
von myo-Ins(1,4,5)P₃ auf



Bei Rotation der Moleküle um eine Achse (Abb. 4.12.1.) entsprechen die Numerierungen der C-Atome des Inositolrings nicht der Standardnomenklatur und werden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Hier werden die dem myo-Ins(1,4,5)P₃ strukturell äquivalenten Positionen wie folgt gekennzeichnet: 1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*.

4.12.1.1. Die D-3-äquivalente äquatoriale Phosphatakzeptor-Hydroxylgruppe (D-3*-OH)

Bei allen substrataktiven Verbindungen enthält das Molekül eine dem äquatorialen D-3-OH äquivalente „links“ vom Bisphosphatcluster (Kap. 4.12.1.2.) gelegene Akzeptorhydroxylfunktion, die tatsächlich phosphoryliert wird (Tab. 3.11.). Eine Hydroxymethylgruppe wird offensichtlich ebenfalls akzeptiert und phosphoryliert (3-Hyms-InsP₃).

Inositolphosphate, welche ein den Strukturanforderungen entsprechendes Phosphatcluster enthalten, aber hierbei keine freie äquatoriale Hydroxylgruppe an äquivalenter Position, sondern eine bereits phosphorylierte oder eine axiale Hydroxylgruppe in D-3*-äq-Position besitzen, sind stets keine bzw. nur schwache Substrate. Letztere Eigenschaft geht dann immer darauf zurück, daß das Molekül noch an anderer Stelle (in anderer Orientierung) eine 3*-äquivalente Hydroxylgruppe aufweist {D-Ins(1,5,6)P₃, D-Ins(1,3,4)P₃, D-Ins(3,4,5)P₃, D-Ins(1,3,4,6)P₄}.

Die Analoga D-3-deoxy-3-fluoro-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat {3F-Ins(1,4,5)P₃} sowie das L-chiro-Inositol 2,3,5-trisphosphat {L-ch-Ins(2,3,5)P₃}, deren D-3-Äq-Position modifiziert wurde, wurden entsprechend nicht von der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase phosphoryliert (Safrany et al., 1992).

Allerdings konnte in dieser Arbeit für das Substratanalogon L-chiro-Ins(2,3,5)P₃ eine sehr geringe Substrataktivität nachgewiesen werden (Tab. 3.9.). Vermutlich ist dieses Analogon mit einem schwach aktiven Isomer kontaminiert.

In einer weiteren Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Derivatisierung der D-3*-OH-Funktion mit einem großen Substituenten {z.B. 3-Benzoyl-Ins(1,4,5)P₃} zu schwach aktiven und inaktiven Substraten führte (Hirata et al., 1995).

4.12.1.2. Die 4,5-äquivalente vicinale äquatoriale Phosphatgruppe {D-(4*-Äq-P, 5*-Äq-P)}

Alle hochaktiven Verbindungen besitzen benachbart zur Akzeptorhydroxyfunktion zwei vicinale äquatoriale Phosphatgruppen (Äq-P). Dieses vicinale (4,5)-äquatoriale Bisphosphatcluster {D-(4-Äq-P, 5-Äq-P)} ist z.B. in den Isomeren mit guter Substrateigenschaft D-Ins(1,4,5)P₃, L-Ins(1,3,4)P₃, D-Ins(2,4,5)P₃, D-Ins(4,5)P₂, D-Ins(3,4,5)P₃ und D-Ins(1,2,4,5)P₄ vorhanden (Abb. 4.12.1.1.). Dessen Konformation ist in den „Sägebockmodellen“ in Abb. 4.12.1. dargestellt. Zu beachten ist hierbei, daß die äquivalente Bisphosphatgruppe in D-Ins(3,4,5)P₃ um 180° vertikal rotiert ist. Durch Rotation der Moleküldarstellungen um eine vertikale bzw. horizontale Achse (Abb. 4.12.1.) kommt das Bisphosphatcluster, welches strukturell dem D-(4-Äq-P, 5-Äq-P)-Cluster entspricht, auch in weiteren aktiven Verbindungen in eine dem Ins(1,4,5)P₃ äquivalente Position in der 3-D-Darstellung besser zum Ausdruck. Dieses Cluster wird als D-(4*-Äq-P, 5*-Äq-P) gekennzeichnet. Beispiele hierfür sind: D-Ins(2,4,5)P₃, D-Ins(3,4,5)P₃, D-Ins(1,2,4,5)P₄, L-Ins(1,3,4)P₃.

In myo-Inositolphosphaten weisen z.B. das D-(5-Äq-P, 4-Äq-P)-Cluster des um eine horizontale Achse rotierten D-Ins(1,4,5)P₃-Moleküls oder des D-(6-Äq-P, 1-Äq-P)-Cluster eines um eine vertikale Achse rotierten D-Ins(1,3,6)P₃-Moleküls eine entsprechende Konformation auf (Abb. 4.12.1.). Beispiele hierfür sind: D-Ins(1,2,4,5)P₄, D-Ins(1,4,6)P₃.

Auch das Substratanalogon D/L-myo-Inositol 1,4-bisphosphat 5-phosphorothioat (D/L-InsP₃-5S), in dem eine der äquatorialen Phosphatgruppe modifiziert wurde, wurde durch die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase metabolisiert (Safrany et al., 1991).

Ein Beweis der am Enzym stattfindenden Rotation ist auch, daß durch die Phosphorylierung von InsPs bzw. Analoga zwei mögliche Produkte entstehen können {D-Ins(4,5)P₂, D-Ins(1,2,4,5)P₄, Abb. 4.12.1.1.; Glucositol-P₃, 3-Hyms-InsP₃, Abb. 4.12.1.4.}. Aufgrund dieser Rotation um eine vertikale bzw. horizontale Achse liegt das Molekül in einer Orientierung vor, in der es die Akzeptorhydroxylfunktion D-3*-OH sowie das benachbarte D-(4*-P, 5*-P)-Cluster aufweist, die für eine Phosphorylierung offensichtlich essentiell sind.

4.12.1.3. Die zum äquatorialen D-6-OH äquivalente Hydroxylgruppe (D-6*-OH)

Die äquatoriale D-6-OH-Gruppe kann bei vielen Substratanaloga durch Rotation um eine horizontale Achse die Position einer D-3*-Akzeptorhydroxylfunktion einnehmen (Abb. 4.12.1.1), wenn eine D-3-OH-Gruppe nicht vorhanden bzw. bereits phosphoryliert ist. Bei Anwesenheit einer freien D-3*-OH-Funktion kann die D-6*-OH-Funktion gleichzeitig gewisse Substituierungen/Veränderungen aufweisen, wodurch allerdings die Substrataktivität des Isomers bzw. Analogons verringert wird. Sie kann eine axiale Orientierung einnehmen {D-Ins(1,4,6)P₃, L-Ins(1,3,4)P₃} bzw. kann sie durch eine äquatoriale Phosphatgruppe substituiert sein {D-Ins(3,4,5)P₃, D-Ins(1,4,5,6)P₄, D-Ins(1,2,4,6)P₄, Abb. 4.12.1.1., 4.12.1.2.}. Größere Substituenten werden jedoch offensichtlich nicht akzeptiert, z.B. Methylphosphat in SG 43 (Abb. 3.10.). Dieses InsP₄-Analogon ist trotz des Vorhandenseins einer D-3-äquivalenten Hydroxylfunktion kein Substrat! Offensichtlich ist hier die Bindungsaffinität zu stark verringert.

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, daß die Entfernung der D-6*-OH-Funktion {6-Deoxy-Ins(1,4,5)P₃} sowohl die Bindungsaffinität des Derivats an den Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor als auch die Mobilisierung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher in permeabilisierten SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen reduziert (Bonis et al., 1991; Safrany et al., 1991). Daraus ist zu schließen, daß diese Gruppe nicht nur in der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase, sondern auch im Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor eine affinitätssteigernde Funktion aufweist.

4.12.1.4. Die zum äquatorialen D-1*-P äquivalente Phosphatgruppe (D-1*-P)

Die äquatoriale D-1*-Phosphatgruppe unterstützt ganz offensichtlich die Positionierung des InsP-Isomers bzw. Analogons in der Substratbindungsdomäne, wenn eine der vicinalen (4*,5*)-äquatorialen Phosphatgruppen fehlt. Ohne einer solchen Phosphatgruppe an der 1*-Position können derartige Substrate offensichtlich nicht phosphoryliert werden, oder die Substrateigenschaft wird hierdurch reduziert {D-Ins(1,4)P₂, D-Ins(1,2,4,6)P₄}.

Bei Vorhandensein des D-(4*-äq-P, 5*-äq-P)-Clusters kann dagegen die D-1*-P-Gruppe abwesend sein {D-Ins(4,5)P₂} bzw. wird sie auch in der axialen Orientierung akzeptiert {D-Ins(2,4,5)P₃, D-Ins(1,2,4,5)P₄, Abb. 4.12.1.1.}. Hieraus resultiert jedoch eine drastische Reduzierung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{\max} (Tab. 3.8.).

Ebenso kann statt dieser Phosphatgruppe ein größerer partiell hydrophiler Rest addiert werden wie z.B. beim GroP-D- Ins(4,5)P₂. Bei einer geringeren Substrataffinität weist GroP-D- Ins(4,5)P₂ sogar eine bessere Substrateigenschaft (höhere V_{\max}) als das eigentliche Substrat der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase, D-Ins(1,4,5)P₃, auf.

Glucositol-P₃ zeigt als gutes Substrat mit zwei gebildeten Produkten auf, daß auch ein Phosphoetherrest bzw. ein 1*-O-Atom statt des 1*-C-OH die Substrateigenschaft erhalten.

4.12.1.5. Substituenten an der D-2*-Position

An der D-2*-Position wird sowohl eine axiale als auch eine äquatoriale Phosphatgruppe akzeptiert. Jedoch reduzieren äquatoriale Phosphatgruppen die Substrateigenschaft stärker als axiale Phosphatreste, da durch erstere ganz offensichtlich die Übertragung des γ -Phosphats des ATP auf die D-3*-OH schon zu stark elektrostatisch und/oder sterisch behindert wird {siehe D-Ins(1,2,4,5)P₄, D-Ins(1,2,4,6)P₄, scyllo-Ins(1,2,4,5)P₄, Abb. 4.12.1.1., 4.12.1.2.}.

Dagegen beeinflussen äquatoriale Hydroxylgruppen anstelle von axialen Hydroxylfunktionen die Substrateigenschaft nur sehr gering, z.B. beim L-scyllo-Ins(1,2,4)P₃. Dieses Analogon ist ein sehr gutes Substrat der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase (Tab. 3.9., Abb. 4.12.1.4.).

In anderen Studien konnte gezeigt werden, daß D/L-2-Desoxy-2-fluoro-myo-Ins(1,4,5)P₃ (Wilcox et al., 1994), D/L-2-Desoxy-2-fluoro-scyllo-Ins(1,4,5)P₃ (Safrany et al., 1990), D/L-2,2-difluoro-2-desoxy-myo-Ins(1,4,5)P₃ (Safrany et al., 1990) sowohl Ca²⁺-mobilisierende Eigenschaften aufweisen als auch Substrate der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase sind.

4. Diskussion

Diese Daten deuten darauf hin, daß die axiale 2-Hydroxylgruppe nicht essentiell für die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und für die Substrataktivität ist und auch durch große Fluoratome ersetzbar sind.

Abb. 4.12.1.1.: Gute alternative Substrate der Ins(1,4,5) P_3 3-Kinase A

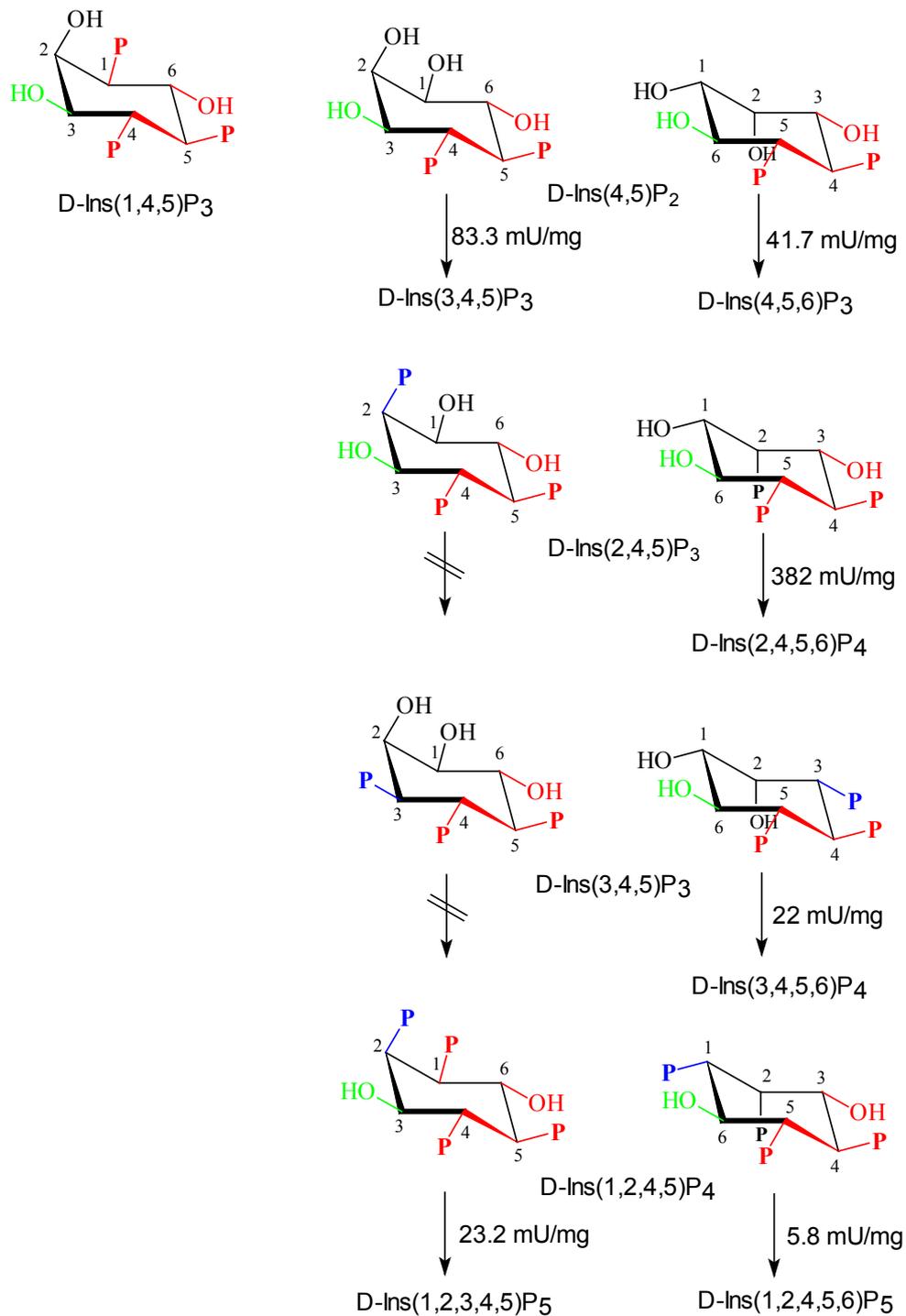
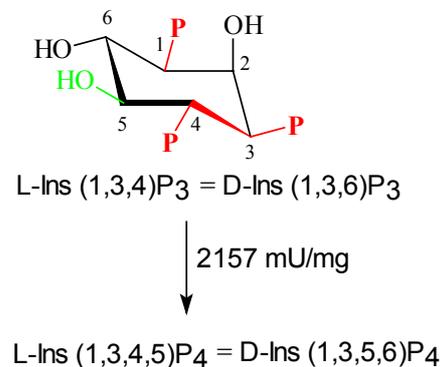


Abb. 4.12.1.1.: Fortsetzung

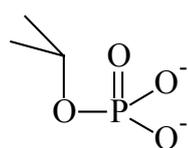


Die Darstellungen veranschaulichen jeweils, in welcher Orientierung ein alternatives Substrat phosphoryliert werden kann und in welchen nicht. Alle dargestellten Produktisomeren wurden in der Regel durch Zuordnung mittels MDD-HPLC auch bewiesen.

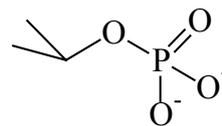
4.12.1.6. Sonderfall: Konfiguration chiro

Das Molekül des Analogons L-chiro-Ins(1,4,6)P₃ besitzt anstelle der vicinalen (4*,5*)-äquatorialen Phosphatgruppen ein D-(4*-ax-P, 5*-ax-P)-Cluster (Abb. 4.12.1.4.). Trotzdem ist dieses Analogon ein schwaches Substrat der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase. Die axialen Phosphatgruppen verhindern nicht die Phosphorylierung durch die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase, da sie sich räumlich nicht sehr stark von den äquatorialen Phosphatresten unterscheiden (Abb. 4.12.1.2.). Weiterhin führt vermutlich die konformationelle Flexibilität im Inositolphosphatringgerüst zu einer weiteren sterischen Annäherung der beiden Orientierungen.

Abb. 4.12.1.2.: Struktureller Vergleich der axialen mit der äquatorialen Phosphatgruppe

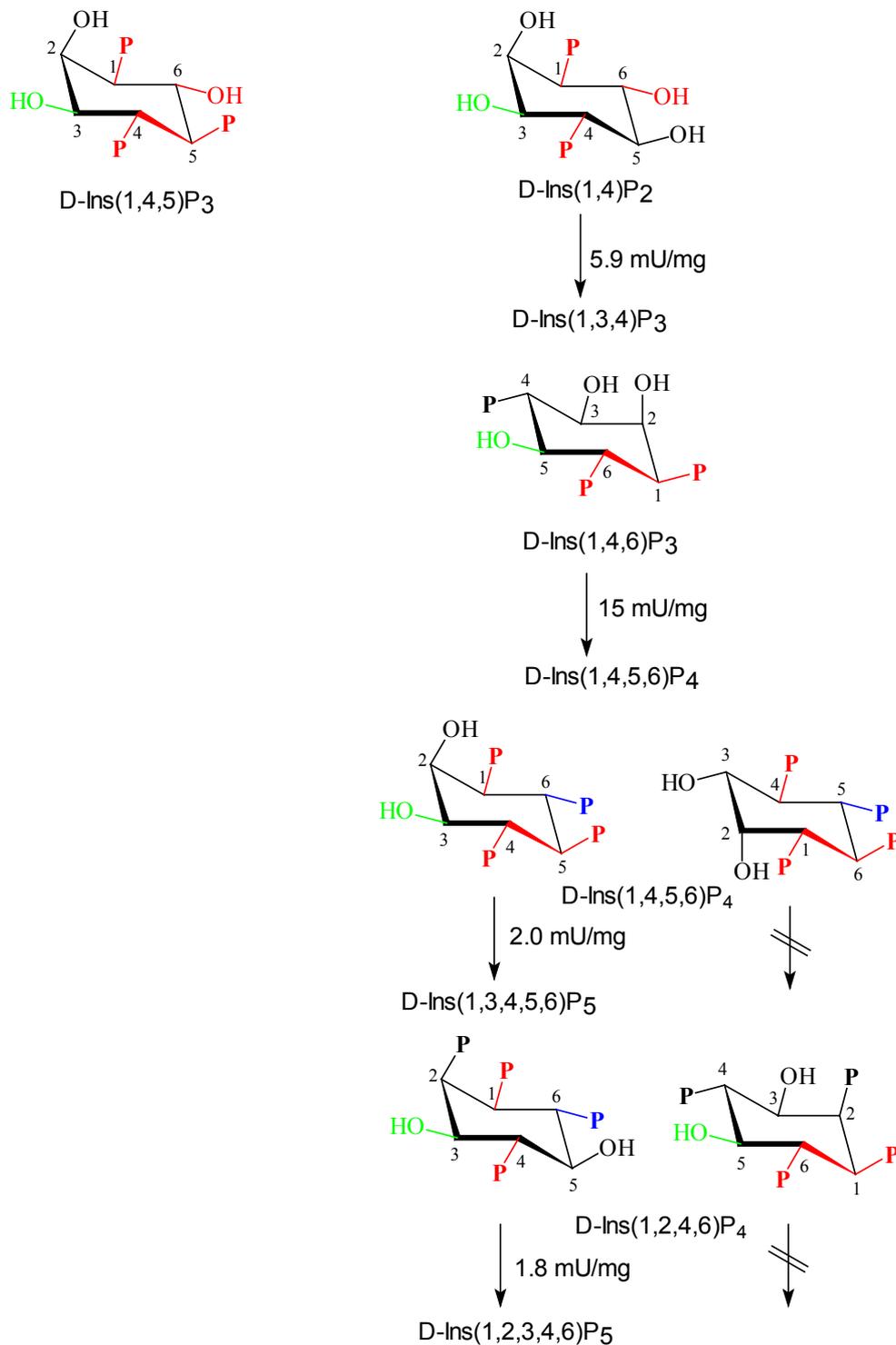


axiale
Phosphatgruppe

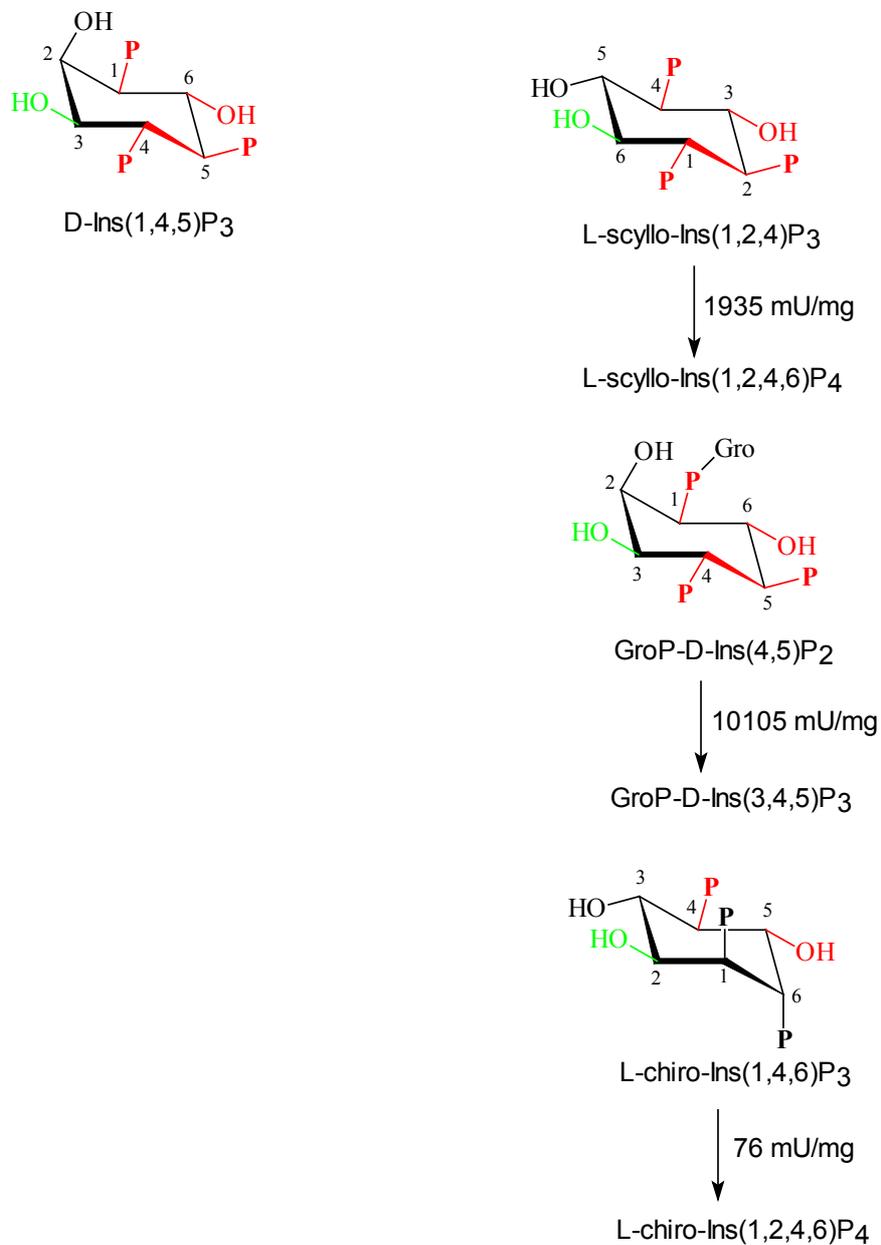


äquatoriale
Phosphatgruppe

Abb. 4.12.1.3.: Schwach aktive InsPs-Isomere der Ins(1,4,5)P₃-Kinase A

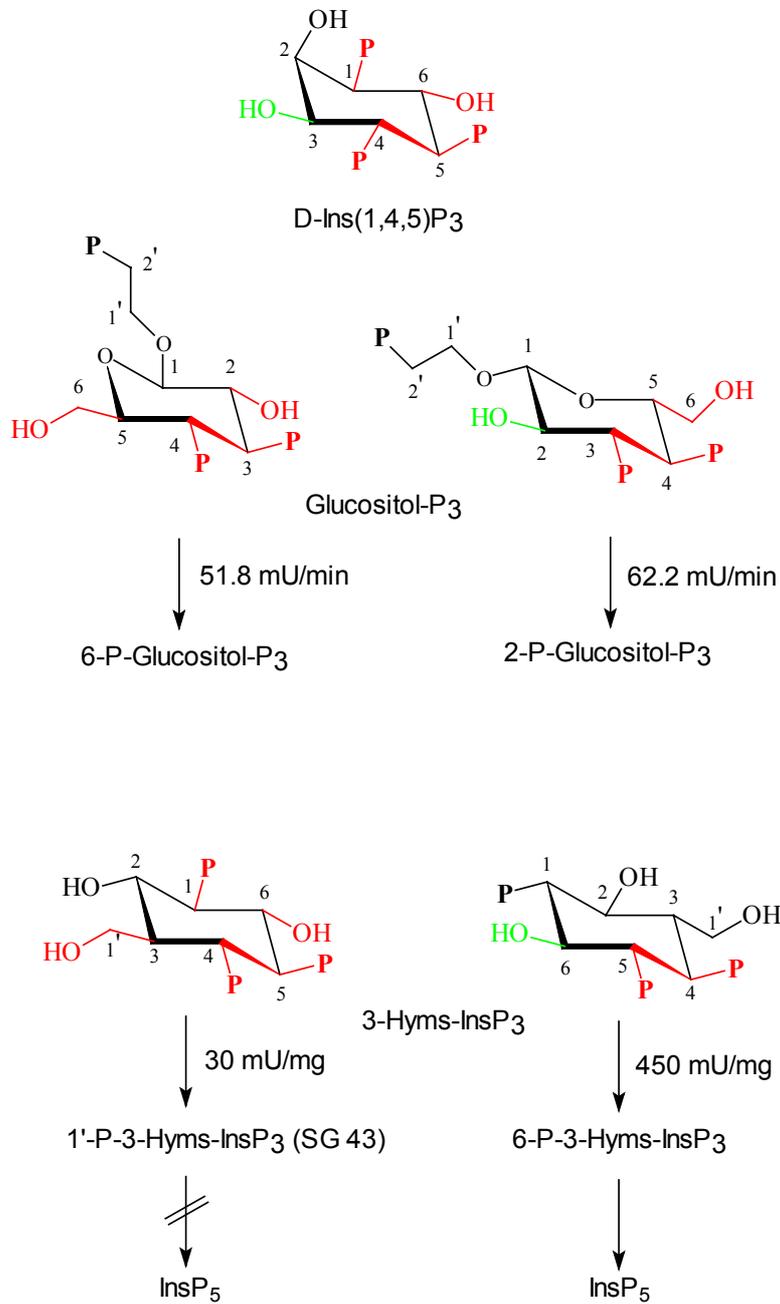


Die Darstellungen veranschaulichen jeweils, in welcher Orientierung ein alternatives Substrat phosphoryliert werden kann und in welchen nicht. Alle dargestellten Produktisomeren wurden in der Regel durch Zuordnung mittels MDD-HPLC auch bewiesen.

Abb. 4.12.1.4.: Aktive InsP-Substratanaloga der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A

Die Darstellungen veranschaulichen jeweils, in welcher Orientierung ein alternatives Substrat phosphoryliert werden kann und in welchen nicht. Alle dargestellten Produktisomeren wurden in der Regel durch Zuordnung mittels MDD-HPLC auch bewiesen.

Abb. 4.12.1.4.: Fortsetzung



Die Darstellungen veranschaulichen jeweils, in welcher Orientierung ein alternatives Substrat phosphoryliert werden kann und in welchen nicht. Alle dargestellten Produktisomeren wurden in der Regel durch Zuordnung mittels MDD-HPLC auch bewiesen.

Eine Sortierung der Substrate nach ihrer katalytischen Potenz ($k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$) zeigt sehr gut, welche Reste für diese Eigenschaft wichtig sind. Die Ergänzung dieser Liste um inaktive Isomere zeigt auch, welche Substituenten die Substrateigenschaft „eliminieren“.

Tab. 4.12.1.1.: Aufstellung der Substituenten von aktiven InsPs und Substratanaloga

Isomer	k_{cat} (min^{-1})	Ringposition																	
		D-1*				D-2*			D-3*		D-4*				D-5*		D-6*		
		äq-P	äq-OH	ax-P	ax-OH	ax-OH	äq-OH	äq-P	äq-OH	ax-OH	äq-P	äq-OH	ax-OH	ax-P	äq-P	ax-P	äq-OH	äq-P	ax-OH
D-Ins(1,4,5)P ₃	363.7	+				+			+			+				+		+	
L-sc-Ins(1,2,4)P ₃	96.0	+					+		+			+				+		+	
GroP-Ins(4,5)P ₂	43.8	+ ¹				+			+			+				+		+	
L-Ins(1,3,4)P ₃	14.2	+					+		+			+				+			+
3-Hyms-InsP ₃ a)	3.0	+					+		+ ²			+				+		+	
b)	3.0		+					+	+			+				+		+ ²	
D-Ins(2,4,5)P ₃	1.7			+			+		+			+				+		+	
D-Ins(1,4,6)P ₃	1.4		+					+	+			+				+			+
sc-Ins(1,2,4,5)P ₄	0.85	+						+	+			+				+		+	
L-ch-Ins(1,4,6)P ₃	0.17	+					+		+				+		+	+		+	
Glucositol-P ₃	0.07	+ ³				- ⁴			+ ²			+				+		+	
D-Ins(4,5)P ₂ a)	0.02		+			+			+			+				+		+	
b)	0.02				+		+		+			+				+		+	
sc-Ins(1,2,3,5)P ₄	0		+					+	+			+				+			+
D-Ins(1,3,4,5)P ₄	0				+			+	+			+				+			+
D-Ins(1,3)P ₂	0	+					+		+			+				+			+
m-Ins(1,2,3)P ₃	0		+				+		+			+			+	+		+	
D-Ins(3,4,5,6)P ₄	0	+						+	+			+				+			+
D-Ins(1,3,4)P ₃	0				+			+	+			+				+			+
m-Ins(1,3,4,6)P ₄	0	+						+		+		+				+		+	
m-Ins(4,5,6)P ₃	0		+			+			+			+				+		+	

Die in rot bzw. grün gekennzeichneten Strukturmerkmale sind für die Phosphorylierung der InsPs und Strukturanaloga durch die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase essentielle bzw. die Substrateigenschaften verbessernde Bedingungen. Die InsPs und Analoga sind in abnehmender Reihenfolge der katalytischen Konstante k_{cat} ($V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$) aufgelistet.

1: Glycerophosphatrest

2: Hydroxymethylgruppe

3: R-O-CH₂-CH₂-P-Gruppe

4: keine OH-Funktion vorhanden, da eine pyranoside Struktur vorliegt

4.12.1.7. Allgemeines Strukturmodell

Aufgrund der Molekülstruktur eines Inositolphosphates lassen sich Vorhersagen hinsichtlich der Phosphorylierung durch die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase durchführen. Aus den ermittelten Daten können folgende Regeln und Bedingungen für die Eigenschaft als ein potentes Substrat der Kinase abgeleitet werden.

Anhand der HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte (Kap. 3.12.6.) konnten Vorhersagen über die mögliche Phosphorylierungsstelle, die mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Strukturmodells durchgeführt wurden, verifiziert werden.

Essentielle Bedingungen

1. freie äquatoriale 3*-äquivalente Hydroxylgruppe = Akzeptorgruppe für Phosphorylierung (3*-äquatoriale Hydroxymethylgruppe wird akzeptiert)
2. 4,5-äquivalente vicinale äquatoriale Phosphatgruppen (bei Fehlen einer 1*-äq-P-Gruppe)

Die Substrateigenschaft verbessernde Bedingungen

1. freie äquatoriale 6-äquivalente Hydroxyl- oder Hydroxymethylgruppe (6-äquatoriale Phosphatgruppe wird bei gleichzeitiger Erfüllung der Bedingung 2 akzeptiert)
2. äquatoriale 1-äquivalente Phosphatgruppe unterstützt die geeignete Orientierung eines Substrates, insbesondere bei dem Vorhandensein einer 6*-äquatorialen Phosphatgruppe und bei Fehlen der 5*-äquatorialen- oder der 4*-äquatorialen Phosphatgruppe

Erlaubte Bedingungen

1. 1-äquivalente axiale Phosphatgruppe wird akzeptiert bei Vorhandensein der 4- und 5-äquivalenten äquatorialen Phosphatgruppe
2. 2-äquivalente äquatoriale Phosphatgruppe wird akzeptiert bei Vorhandensein der 4- und 5-äquivalenten äquatorialen Phosphatgruppe
3. 2-äquivalente äquatoriale OH-Funktion hat keine Auswirkungen auf die Substrateigenschaft
4. 4-äquivalente äquatoriale Phosphatgruppe kann fehlen, wenn der 1-äquivalente Phosphatrest vorhanden ist
5. 5-äquivalente äquatoriale Phosphatgruppe kann fehlen, wenn der 1-äquivalente Phosphatrest vorhanden ist

6. 4- und 5-äquivalente axiale Phosphatgruppen werden akzeptiert bei Vorhandensein der 1-äquivalenten äquatorialen Phosphatgruppe und der 3- und 6-äquivalenten äquatorialen Hydroxylfunktionen {Sonderfall L-chiro-Ins(1,4,6)P₃}

Stark die Substrateigenschaft beeinträchtigende/die Substrateigenschaft aufhebende Bedingungen

1. äquatoriale 2-äquivalente Phosphatgruppen verhindern die Übertragung des γ -Phosphats des ATP auf die D-3*-OH-Funktion
2. 6-äquivalente Phosphohydroxymethylgruppe ist zu groß im Gegensatz zum 6-äquivalenten Phosphatrest
3. freie axiale 3-äquivalente und phosphorylierte äquatoriale 3-äquivalente OH-Funktion ohne äquivalente äquatoriale 6-OH-Funktion verhindern die Phosphorylierung

4.12.1.8. Bindungsaffinität von InsPs und Analoga

In dieser Studie wurden weiterhin die K_m -Werte als Maß für die Affinität von einigen Inositolphosphaten analysiert (Tab. 3.12.). Für schwach aktive und inaktive InsPs und Analoga wurde darüberhinaus die kompetitive Hemmwirkung (K_i -Wert) auf die Bindung von Ins(1,4,5)P₃ als Maß für die Affinität bestimmt.

Das D-Ins(4,5)P₂ zeigte die geringste Substrataffinität der getesteten Verbindungen (Tab. 3.12.). Der Grund hierfür ist das Fehlen der äquivalenten 1-äquatorialen Phosphatgruppe (D-1*-äq-P), die vermutlich für die Positionierung des Substrates in der Bindungstasche der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase von großer Bedeutung ist (Abb. 4.12.1.1.).

Durch Einführung eines D-1*-äq-P- oder D-2*-ax-P-Restes in den Inositolring erhöht sich die Affinität {D-Ins(1,4,5)P₃; D-Ins(2,4,5)P₃}. Die Funktion der 1*-äquatorialen Phosphatgruppe kann offensichtlich auch von der D-2*-ax-P-Gruppe übernommen werden, da diese ebenfalls durch ionische Wechselwirkung mit positiven Zentren in der Substratbindungstasche interagieren könnte.

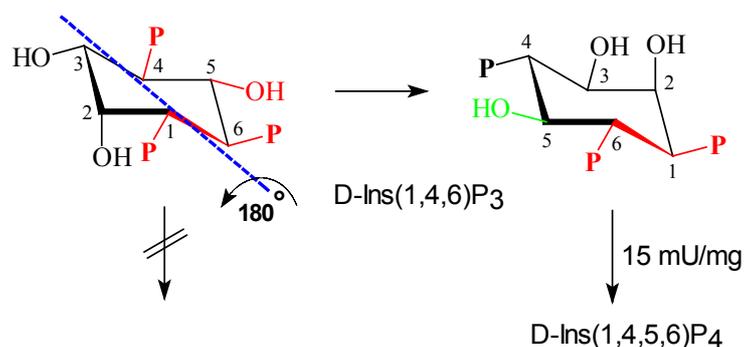
Durch die Addition eines kleinen hydrophilen Rests an die D-1*-äq-P, wird die Substrataffinität im Vergleich zum D-Ins(1,4,5)P₃ deutlich verringert { Tab. 4.12.1.1., GroP-D- Ins(4,5)P₂}. Jedoch wird nicht die maximale Umsatzgeschwindigkeit für das Substrat herabgesetzt. Eine weitere drastische Reduzierung der Affinität erfolgt durch den Austausch der D-1*-äq-P durch einen großen Substituenten (Glucositol-P₃, Abb. 4.12.1.4.). Auch eine Substitution der D-3*-äq-OH durch eine Hydroxymethylgruppe führte zu einer Affinitätsabnahme im Vergleich zum D-Ins(1,4,5)P₃ (3-Hyms-InsP₃, Abb. 4.12.1.4.).

Das L-scylo-Ins(1,2,4)P₃ zeigte interessanterweise die gleiche Substrataffinität wie das D-Ins(1,4,5)P₃ (Tab. 3.12.). Dieses Analogon kann durch Rotation eine Orientierung einnehmen, die mit Ausnahme der D-2*-äq-OH identisch mit der Orientierung von D-Ins(1,4,5)P₃ ist (Abb. 4.12.1.4.). Die D-2*-ax-OH-Funktion scheint somit nicht essentiell für eine gute Substrataffinität zu sein, da auch eine D-2*-äq-OH ohne Affinitätsverlust akzeptiert wird. Durch den Austausch der D-2*-ax-OH gegen eine D-2*-äq-P konnte allerdings eine Abnahme der Substrataffinität im Vergleich zum D-Ins(1,4,5)P₃ beobachtet werden {scylo-Ins(1,2,4,5)P₄}, so daß diese äquatoriale D-2*-P nicht nur die Substrateigenschaft erniedrigte (Kap. 4.12.1.5.).

Die Molekülstruktur des L-chiro-Ins(1,4,6)P₃ weist im Vergleich zum L-scylo-Ins(1,2,4)P₃ anstelle des äquivalenten vicinalen 4,5-äquatorialen Bisphosphatclusters axiale Bisphosphatgruppen auf (Abb. 4.12.1.4.). Diese Orientierung des Bisphosphatclusters erniedrigt somit die Substrataffinität deutlich (Tab. 3.12.).

Ebenso konnte eine Abnahme der Affinität beobachtet werden, wenn ein Austausch der D-6*-äq-OH im L-scylo-Ins(1,2,4)P₃ gegen eine axiale Hydroxyfunktion erfolgte {L-Ins(1,3,4)P₃, Abb. 4.12.1.1.}. Die D-6*-äq-OH hat vermutlich die Funktion als Wasserstoffbrückendonator bzw. -akzeptor gegenüber dem Substratbindungszentrum des Enzyms. In der axialen Orientierung ist offensichtlich diese Funktion sterisch gehindert.

Abb. 4.12.1.5.: Struktur von D-Ins(1,4,6)P₃



Im Gegensatz zu allen anderen getesteten InsPs und Analoga konnte für das nur gering substrataktive D-Ins(1,4,6)P₃ eine erhöhte Substrataffinität gegenüber dem D-Ins(1,4,5)P₃ analysiert werden. Durch Rotation des Moleküls um eine horizontale Achse (Abb. 4.12.1.5.) weist dieses sowohl das vicinale 4,5-Bisphosphatcluster als auch die Positionierungsgruppe D-1*-äq-P auf, die essentiell für eine gute Orientierung des InsP in der Bindungstasche der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase sind. Zusätzlich besitzt das Molekül in dieser Orientierung die D-6*-äq-OH-Gruppe, die die Substrateigenschaft in der Funktion als Wasserstoffdonator- bzw. Akzeptor gegenüber dem Enzym verbessern könnte. In dieser Molekülanordnung weist zwar das D-Ins(1,4,6)P₃ eine hohe Bindungsaffinität auf, aber aufgrund der axialen Orientierung der äquivalenten 3*-äquatorialen Hydroxylfunktion ist die Übertragung des γ -Phosphats des ATP vermutlich unmöglich. In einer weiteren Ausrichtung des Moleküls ist dagegen das Ins(1,4,6)P₃ ein schwaches alternatives Substrat der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A (Tab. 3.8., Abb. 4.12.1.5.), da die Hydroxylgruppe in der für eine Phosphorylierung essentiellen äquatorialen Stellung vorliegt. Aufgrund der sehr geringen Substrateigenschaft konnte zwar kein Beweis der Produktisomerie {D-Ins(1,4,5,6)P₄} geführt werden, jedoch ist aufgrund des oben genannten Modells diese die einzig plausible Isomerie.

Es konnte in einer Studie gezeigt werden, daß D/L-2,2-difluoro-2-desoxy-myo-Ins(1,4,5)P₃ ein schwaches Substrat der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase ist (Safrany et al., 1990). Diese Verbindung sollte mit einer dem D-Ins(1,4,6)P₃ vergleichbaren Affinität am Enzym binden.

Dieses anhand der ermittelten Daten erarbeitete allgemeine Strukturmodell einer Ins(1,4,5)P₃-Bindungsdomäne weist eine bemerkenswerte Analogie zum Modell der Rezeptordomäne für die Bindung der Inositolphosphate am Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor auf. Sämtliche Daten und Hypothesen aus dieser Studie erklären auch weniger ausführliche Befunde zur Substratspezifität von Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinasen, welche bisher publiziert wurden (Safrany et al., 1990; Hirata et al., 1993; DeLisle et al., 1994; Wilcox et al., 1994).

Es wurden ebenfalls die Hemmeffekte von inaktiven bzw. schwach aktiven InsPs-Isomeren und Substratanaloga an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase getestet (Abb. 4.12.1.5.).

Alle getesteten Verbindungen zeigten das Verhalten des kompetitiven Hemmtyps an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase (Abb. 3.22.), so daß die Isomere mit dem Substrat Ins(1,4,5)P₃ um die Bindung am aktiven Zentrum des Enzyms konkurrierten.

Tab. 4.12.1.2.: Übersicht der Substituenten von inhibitorisch wirkenden InsPs und Substratanaloga

Isomer	K _i (μM)	Ringposition															
		D-1*			D-2*			D-3*		D-4*		D-5*			D-6*		
		äq-P	äq-OH	ax-OH	ax-OH	äq-OH	äq-P	ax-OH	äq-P	äq-P	ax-P	ax-OH	äq-P	äq-OH	ax-OH	äq-OH	äq-P
D-Ins(1,4,6)P ₃ ¹	2.62	+				+		+					+			+	
sc-Ins(1,2,3,5)P ₄	16.7	+				+			+				+			+	
D-Ins(1,3,4,5)P ₄	19.4	+			+				+				+			+	
L-Ins(1,4,6)P ₃ ¹	28.9	+				+			+						+	+	
m-Ins(1,2,3)P ₃	37.9		+			+			+		+		+			+	
D-Ins(1,3)P ₂	72.0		+			+			+			+	+			+	
D-Ins(1,4,5,6)P ₄ ¹	75.7			+			+		+	+			+			+	
D-Ins(3,4,5,6)P ₄	78.7		+		+				+	+			+				+
D-Ins(1,3,4)P ₃	86.8	+			+				+	+			+			+	
D-Ins(3,4,5)P ₃ ¹	97.6		+		+				+	+			+			+	
m-Ins(1,3,4,6)P ₄	99.9	+			+				+	+				+			+
m-Ins(4,5,6)P ₃	>300			+		+			+	+			+			+	

Die rot und blau gekennzeichneten Strukturmerkmale sind für die inhibitorische Wirkung der InsPs und Substratanaloga an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase essentielle bzw. den Inhibitoreffekt verbessernde Bedingungen. Die InsPs und Analoga sind in abnehmender Reihenfolge der K_i-Werte aufgelistet. sc: scyllo

1: K_{i,app} falsch zu hoch, da die Verbindung ein schwach aktives Substrat ist

Unter den getesteten Verbindungen konnte für D-Ins(1,4,6)P₃ nicht nur die höchste Bindungsaffinität (Kap. 4.12.1.8.) sondern auch der stärkste Inhibitionseffekt an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A analysiert werden (K_{i,app}: 2.62 μM, Tab. 4.12.1.2.). In einer anderen Studie wurde für dieses Isomer auch an der aus Rattenhirn isolierten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase ein potenter Hemmeffekt (K_i: 12.4 μM) detektiert (Choi et al., 1997).

Die für eine potente inhibitorische Wirkung wichtige Bindungsaffinität ist auf das gemeinsame Vorhandensein folgender Strukturmerkmale zurückzuführen: D-3*-äq-P, D-1*-äq-P, D-6*äq-OH, D-(4*-äq-P, 5*-äq-P).

Die Inositolphosphate, die diese Strukturelemente aufweisen, aber hierbei keine freie äquatoriale Hydroxylgruppe aufweisen, also keine Substrate sind, sondern eine bereits phosphorylierte oder eine axiale Hydroxylgruppe in D-3*-äq-Position besitzen, weisen einen potenten Hemmeffekt an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase auf {D-Ins(1,4,6)P₃; scyllo-Ins(1,2,3,5)P₄; D-Ins(1,3,4,5)P₄, Tab. 4.12.1.2., Abb. 4.12.1.6.}.

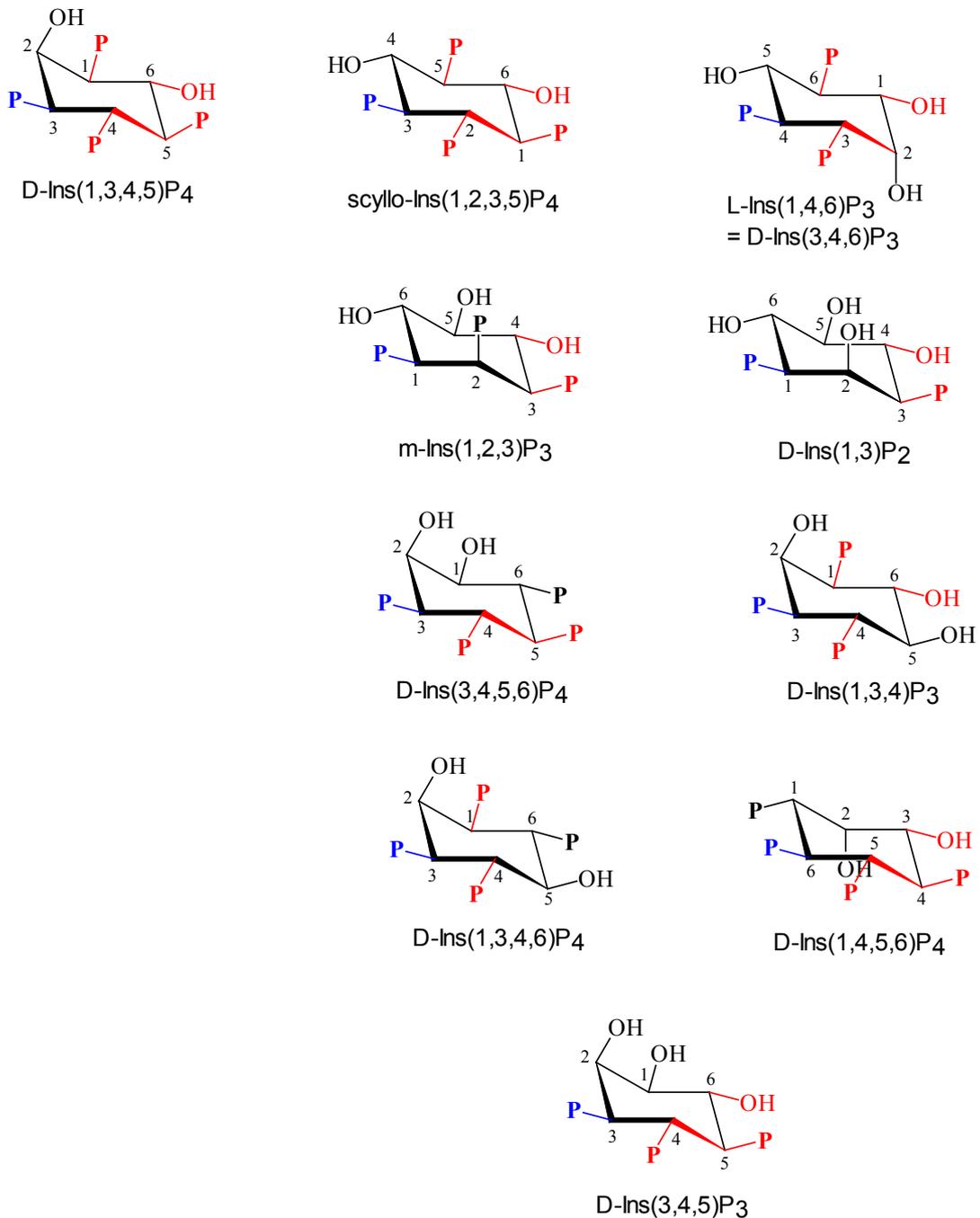
Ist dagegen die D-1*-äq-P-Gruppe durch eine axiale oder äquatoriale D-1*-OH-Funktion substituiert, so wird der Hemmeffekt deutlich reduziert {D-Ins(1,4,5,6)P₄, D-Ins(3,4,5,6)P₄, D-Ins(3,4,5)P₃, Abb. 4.12.1.6.}. Diese Phosphatgruppe ist offensichtlich für die korrekte Positionierung des InsP in der Bindungstasche der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase verantwortlich. Hierbei wird das Vorliegen der D-4*-P des Bisphosphatclusters in der axialen Orientierung akzeptiert {m-Ins(1,2,3)P₃, Abb. 4.12.1.6.}.

Bei Anwesenheit der „Positionierungsgruppe“ D-1*-äq-P kann entweder die 4- oder die 5-äquivalente äquatoriale Phosphatgruppe des Bisphosphatclusters fehlen, wodurch allerdings der inhibitorische Effekt deutlich verringert wird {L-Ins(1,4,6)P₃; m-Ins(1,2,3)P₃, D-Ins(3,4,5,6)P₄, D-Ins(1,4,5,6)P₄, D-Ins(3,4,5)P₃, Tab. 4.12.1.2., Abb. 4.12.1.6.}. Eine axiale Orientierung der D-4*-OH bzw. der D-5*-OH wird hierbei akzeptiert {D-Ins(1,3)P₂, L-Ins(1,4,6)P₃, Abb. 4.12.1.6.}.

Das Vorliegen einer D-2*-OH-Gruppe in der axialen oder äquatorialen Orientierung hat beim Vorhandensein der für eine hohe Bindungsaffinität essentiellen Strukturelemente (siehe oben) keinen deutlichen Einfluß auf den Inhibitoreffekt {D-Ins(1,3,4,5)P₄; scyllo-Ins(1,2,3,5)P₄, Tab. 4.12.1.2., Abb. 4.12.1.6.}.

Eine Substitution der D-6*-OH-Funktion durch eine äquatoriale Phosphatgruppe führt bei gleichzeitiger Abwesenheit der D-5*-äq-P-Gruppe des Bisphosphatclusters zu einer geringen Erniedrigung der Hemmwirkung des InsP {D-Ins(1,3,4,6)P₄, Abb. 4.12.1.6.}. Dagegen hat der Austausch der D-6*-OH-Funktion gegen eine 6*-äq-P-Gruppe bei Vorliegen der vicinalen 4,5-Phosphatreste und gleichzeitiger Abwesenheit der „Positionierungsgruppe“ D-1*-äq-P eine geringe Erhöhung des Hemmeffektes zur Folge {D-Ins(3,4,5,6)P₄, Abb. 4.12.1.6., Tab. 4.12.1.2.}.

Abb. 4.12.1.6.: Inhibitorisch wirkende InsPs und Substratanaloga



Die Darstellungen veranschaulichen jeweils, in welcher Orientierung ein InsP bzw. ein Analogon offensichtlich vorliegen muß, damit ein inhibitorischer Effekt analysiert werden kann. Alle hier dargestellten kompetitiven Inhibitoren weisen eine D-3*-äq-P-Gruppe auf.

Gute kompetitive Inhibitoren der Substratbindung müssen also entweder dem optimalen Substrat oder dem hieraus entstehenden Produkt ähneln und dürfen in der Regel selbst nicht phosphorylierbar sein. Da die Isomere D-Ins(1,4,6)P₃, D-Ins(1,3,4,5)P₄, L-Ins(1,4,6)P₃, D-Ins(1,4,5,6)P₄, D-Ins(3,4,5,6)P₄, D-Ins(1,3,4)P₃, D-Ins(3,4,5)P₃ und m-Ins(1,3,4,6)P₄ biologisch vorkommen können, kann dem kompetitiven Hemmeffekt dieser Isomere an der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase durchaus eine regulatorische Bedeutung zukommen. So könnte sowohl ein starker Anstieg des Produktes D-Ins(1,3,4,5)P₄ als auch von D-Ins(1,3,4)P₃ und m-Ins(1,3,4,6)P₄ zum „Ausschalten“ des Enzyms bezüglich der Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P₃ nach der PLC-Aktivierung beitragen.

Die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinaseaktivität wurde ebenfalls durch das Phosphoinositid PtdIns(4,5)P₂ gehemmt. Allerdings zeigte diese Verbindung einen nichtkompetitiven Hemmtyp (Abb. 3.25.), so daß es offensichtlich nicht mit D-Ins(1,4,5)P₃ um die Bindungsstelle am Enzym konkurrierte. Dieses Phosphoinositid besitzt an der Position 1 des Inositolringes einen Diacylglycerinrest (Abb. 1.2.1.), wodurch dessen Bindung vermutlich an einer hydrophoben Domäne erfolgt.

Eine weitere Charakterisierung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase hinsichtlich der Aufklärung der Molekülstruktur wird anhand der Kristallographie oder einer Solution-NMR-Analyse erfolgen müssen. Die Untersuchung zur Rolle des Enzyms im Zellwachstum wird mit Hilfe der Transfektion einer hemmstoffunempfindlichen Mutante in Jurkat T-Zellen erfolgen. Hierzu sind bereits die ersten Versuche in Arbeit.

5. Zusammenfassung

Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase {Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase} ist ein Enzym, welches ubiquitär in allen bisher untersuchten tierischen Geweben gefunden wurde. Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle in dem anabolen Signal-Stoffwechsel von Inositolphosphaten in tierischen Zellen. Es metabolisiert den Ca²⁺-freisetzenden sekundären Botenstoff Inositol 1,4,5-trisphosphat unter Mitwirkung von ATP zum Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat, welches das Substrat für die Biosynthese aller höher phosphorylierten Inositolen (Inositoltetrakis-, pentakis- und hexakisphosphate) ist. Für Letztere wurde vor kurzem eine Bedeutung bei der Zellproliferation aufgezeigt.

Zur Aufklärung der Rolle der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase sowie der vom Produkt, dem Ins(1,3,4,5)P₄, abgeleiteten höher phosphorylierten Inositolen in der intakten Zelle wurde die rekombinante Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A aus Hühnererythrozyten auf potente Hemmstoffe getestet. Mit Hilfe eines gekoppelten optischen Enzymtests wurden polyphenolische pflanzliche und aus Pilzen isolierte Verbindungen aus den Stoffklassen der Flavonoide, Anthrachinone, Cumarine, Triphenylmethane, Tyrphostine, Perylenequinone und Staurosporinderivate sowie viele weitere biologische Wirkstoffe auf einen Inhibitionseffekt am Enzym getestet. Unter den ca. 200 getesteten Substanzen konnten die Ellagsäure (IC₅₀: 36 nM), Gossypol (IC₅₀: 58 nM), (-)-Epicatechin-3-gallat (IC₅₀: 94 nM), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (IC₅₀: 120 nM), Aurintricarbonsäure (IC₅₀: 150 nM), Hypericin (IC₅₀: 170 nM) und Quercetin (IC₅₀: 180 nM) als potenteste Hemmstoffe der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A identifiziert werden.

Da weitere Isoformen der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase (B und C) in Zellen vorkommen, wurden die Inhibitoren ebenfalls auf einen Hemmeffekt an der rekombinanten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B getestet. Aurintricarbonsäure sowie Hypericin hemmten die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase B in vergleichbarer Weise wie die Isoform A. Bei den verbleibenden Stoffen zeigte sich eine um den Faktor 6 - 23 geringere Inhibition der Isoform B. Die Daten zeigten, daß die Hemmung der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase durch die identifizierten Inhibitoren nicht streng Isoform-A-spezifisch ist. Größere Unterschiede in der Hemmung verschiedener Isoformen können mittels eines entsprechenden Selektivitätsscreening herausgearbeitet werden. Die in dieser Studie erhaltenen Daten liefern bereits Leitstrukturen für selektive Inhibitoren der Isoformen A und B.

Die Hemmung der Enzymaktivität konnte durch Triton X-100 und durch Ca²⁺-Calmodulin bei den jeweiligen Inhibitoren unterschiedlich stark antagonisiert werden.

In einer steady-state kinetischen Analyse wurde ermittelt, daß keiner dieser potenten Inhibitoren mit dem Substrat $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ um die Bindung am aktiven Zentrum der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase konkurriert (nicht-kompetitiver Hemmtyp). Dagegen zeigten alle potenten Hemmstoffe eine gemischte Hemmung (mixed-type inhibition) in Bezug auf das Substrat ATP, vermutlich weil die Hemmstoffe aufgrund ihres aromatischen Ringsystems den hydrophoben Basenanteil des Nukleotids imitieren und auf diesem Wege partiell um die Bindungsstelle des ATP konkurrieren.

Anhand von Mutanten der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase, hergestellt durch gezielte Mutagenese, wurde gezeigt, daß diese Inhibitoren, die als gemeinsames Strukturelement eine oder mehrere Carbonylgruppen aufweisen, über eine vermutlich kovalente Bindung mit der $\epsilon\text{-NH}_2$ -Gruppe eines Lysinrestes (Schiff'sche Base) in einem speziellen Segment des katalytischen Zentrums mit dem Enzym interagieren. Am Beispiel von 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon konnte gezeigt werden, daß der Austausch der Aminosäure Lysin-272 gegen Asparaginsäure zu einem um Faktor 290 verringerten Inhibitionseffekt der Enzymaktivität führt, so daß dieser Rest mit höchster Wahrscheinlichkeit für die Hemmstoffbindung essentiell ist.

Die Wirkung der effektivsten Inhibitoren auf intakte Zellen wurde an zwei verschiedenen Zelllinien (Jurkat T-Zellen, NIH 3T3-Zellen) analysiert. Für sämtliche potente Inhibitoren konnte eine starke proliferationshemmende Wirkung gezeigt werden.

Ebenfalls wurde der Einfluß der Hemmstoffe auf den Zellzyklus von Jurkat T-Zellen untersucht. Die ermittelten Daten dieser Analyse zeigten, daß Gossypol, (-)-EGCG und 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavon den Zellzyklus in der S-Phase hemmten. Dagegen konnte beobachtet werden, daß Quercetin in geringeren und höheren Konzentrationen ($\leq 5 \mu\text{M}$, $\geq 20 \mu\text{M}$) eine Anhäufung der Zellen in der G_2/M -Phase bewirkte. Andererseits hemmte diese Verbindung bei einer Dosis von $10 \mu\text{M}$ den Zellzyklus ebenfalls in der S-Phase.

Die Wirkung der potentesten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinaseinhibitoren auf den Stoffwechsel der höher phosphorylierten Inositole in intakten Jurkat T-Zellen wurde am Beispiel von Quercetin und Gossypol im Detail analysiert. Unter Anwendung des Verfahrens der „High-performance-liquid-chromatography“ mittels der Metal-Dye-Detection-Methode (MDD-HPLC) zur Analyse aller höher phosphorylierten Inositole konnte gezeigt werden, daß sowohl Quercetin als auch Gossypol über die Hemmung der endogenen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinaseaktivität die Biosynthese der meisten höher phosphorylierten Inositole bis hin zum InsP_5 und weniger stark zum InsP_6 und InsP_7 hemmen.

Das hier identifizierte molekulare Target polyphenolischer Pflanzenstoffe ist dasjenige mit der höchsten bisher gefundenen Affinität. Es könnte eine kausale Bedeutung bei der bei diesen Stoffen beobachteten antiproliferativen und apoptotischen Wirkung haben. Durch ein derzeit laufendes Experiment mit stabiler Expression einer hemmstoffresistenten Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase in Zellkulturen sollte diese Hypothese bewiesen oder widerlegt werden.

In dieser Arbeit wurde weiterhin die Inositolphosphat-Bindungsdomäne des Enzyms durch ein sog. „active site mapping“ charakterisiert. Hierfür wurden eine Reihe von biologischen myo-Inositolphosphaten (InsPs) sowie synthetische Analoga des natürlichen Substrats der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase auf ihr Potential getestet, als alternative Substrate der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase zu fungieren. Zusätzlich zum Ins(1,4,5)P₃ konnten 12 myo-Inositolphosphatisomere und 6 InsP-Analoga als Substrate der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase identifiziert werden. Hierbei konnte gezeigt werden, daß das Vorhandensein der vicinalen 4,5-äquivalenten äquatorialen Phosphatgruppen sowie eine freie äquatoriale 3-äquivalente Hydroxylgruppe essentiell für eine Phosphorylierung mittels der Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase sind. D-Ins(1,4,6)P₃ sowie das Analogon L-scyllo-Ins(1,2,4)P₃ zeigten unter den getesteten aktiven Substanzen eine höhere bzw. gleiche Substrataffinität wie das D-Ins(1,4,5)P₃ (K_m: 0.19 µM und 0.36 µM). Inaktive oder schwach-substrataktive InsPs und Analoga wurden auch auf eine kompetitive Hemmung des Enzyms getestet. Unter diesen Verbindungen waren das D-Ins(1,4,6)P₃ (K_i: 2.62 µM) und scyllo-Ins(1,2,3,5)P₄ (K_i: 16.7 µM) die effektivsten Inhibitoren der Kinaseaktivität. Ebenso wurde die Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase A durch das Phosphoinositid PtdIns(4,5)P₂ mit einem IC₅₀-Wert von 8 µM gehemmt. Das PtdIns(4,5)P₂, welches ebenfalls untersucht wurde, zeigte den Mechanismus einer nicht-kompetitiven Hemmung. Hier aufgefundene alternative biologische Substrate oder Hemmstoffe können beim komplexen Metabolismus der InsPs in der intakten Zelle bedeutsam sein. Eine Umsetzung alternativer Substrate durch die rekombinante Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase kann für die biosynthetische Herstellung biologisch wichtiger InsPs und Analoga aus geringer phosphorylierbaren Ausgangsverbindungen nützlich sein.

5.1. Summary

Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase {Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase} is an enzyme which has been ubiquitously found in all animal tissues. It plays a central role in the anabolic routes of inositol phosphates in animal cells, as it metabolises the ubiquitous Ca²⁺-mobilising second messenger D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate with the help of ATP to inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. In animal cells, the latter apparently is the only starting substrate for the biosynthesis of all other higher phosphorylated inositols. For the highest phosphorylated species (e.g. inositol hexakisphosphate) an essential role in cell growth has recently been evidenced.

To elucidate in the intact cell the role of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase as well as of the more highly phosphorylated inositols, derived from the product Ins(1,3,4,5)P₄, recombinant Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase A from chicken erythrocytes was tested for potent inhibitors employing a coupled optical enzymatic assay. Polyphenolic compounds from plants and from fungi belonging to the structural families of flavonoids, anthraquinones, coumarins, triphenylmethanes, tyrophostins, perylenequinones and staurosporine derivatives, as well as many other biologically active compounds were tested for an inhibitory effect on this enzyme. Among 200 compounds tested for inhibition ellagic acid (IC₅₀: 36 nM), gossypol (IC₅₀: 58 nM), (-)-epicatechin-3-gallate (IC₅₀: 94 nM), (-)-epigallocatechin-3-gallate (IC₅₀: 120 nM), aurintricarboxylic acid (IC₅₀: 150 nM), hypericin (IC₅₀: 170 nM) and quercetin (IC₅₀: 180 nM) could be identified as the most potent inhibitors of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase A.

Since further isoforms of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase (B and C) are existing in cells inhibitors were also investigated on their effects on recombinant Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase B.

Aurintricarboxylic acid and hypericin inhibited Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase B with a potency comparable to the isoform A. The remaining compounds showed an inhibition of the human B-isoform which was weaker by a factor of 6 - 23. The data showed, that inhibition of the Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase by the identified inhibitors is not strictly isoform A specific. Stronger differences in inhibition of various isoforms could be worked out by an appropriate selectivity screening, and the data obtained in this work give already lead structures for selective inhibitors of the isoforms A and B.

Depending on the inhibitors, the inhibition of the Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase could be antagonized by Triton X-100 and by Ca²⁺-Calmodulin to a variable extent.

In a detailed steady-state kinetic analysis none of these inhibitors turned out to interfere with the binding of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ to the catalytic site of the enzyme (noncompetitive inhibition). In contrast to this finding all inhibitors displayed a mixed-type inhibition with respect to the substrate ATP. Due to their aromatic ring system the inhibitors probably mimick the nucleobase part of the nucleotide, and thus interfere with the binding site of ATP.

Using site-directed mutants of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-kinase it could be shown that these inhibitors, which show one or more carbonyl groups as a common structural element might interact with the enzyme via covalent binding with $\epsilon\text{-NH}_2$ -groups of lysines in a special segment of the catalytic center. With 3',4',7,8-tetrahydroxyflavone as an example it could be shown that the exchange of the amino acid lysine-272 by aspartic acid leads to a reduction of the inhibitory effect by a factor of 290. It is concluded, that this particular amino acid residue is essential for the binding of inhibitors, likely by forming a Schiff base.

The effect of the most potent inhibitors on intact cells was analysed using two different cell lines (Jurkat T-lymphocytes, NIH 3T3). For all identified inhibitors a strong antiproliferative effect could be determined. The influence of the inhibitor on cell cycle progression were analysed, too. The data of this analysis showed, that gossypol, (-)-EGCG as well as 3',4',7,8-tetrahydroxyflavone blocked the cell cycle during the S-phase. In contrast low and high doses of quercetin ($\leq 5 \mu\text{M}$, $\geq 20 \mu\text{M}$) resulted in an accumulation of cells in the G_2/M -phase. On the other hand this substances applied at a dose of $10 \mu\text{M}$ also inhibited the cell cycle in the S-phase.

With the identified $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-kinase inhibitors quercetin and gossypol the effect on the metabolism of the more highly phosphorylated inositols in Jurkat T-lymphocytes was analysed in detail. Analysis of inositol phosphates by „high-performance-liquid-chromatography“ with metal-dye-detection (MDD-HPLC) showed, that in intact cells quercetin as well as gossypol suppressed the biosynthesis of most of the higher phosphorylated inositols up to InsP_6 and InsP_7 via inhibition of the endogenous $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-kinase activity.

This identified molecular target of the polyphenolic plant compounds has the highest affinity among all intracellular targets of polyphenolics hitherto identified. It may have a functional relevance for the antiproliferative and apoptotic effects of these compounds. This hypothesis is in proof by inhibition assays using cell lines stably transfected with an inhibitor insensitive mutant of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-kinase.

Furthermore, the Ins(1,4,5)P₃ binding domain of the enzyme was characterized by a so called „active site mapping“. A number of biological myo-inositol phosphates (InsPs) as well as synthetic analogues of the natural substrate Ins(1,4,5)P₃ were tested for their potential to be alternative substrates of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase. In addition to Ins(1,4,5)P₃ 12 isomers of myo-inositol phosphate and 6 synthetic InsP-analogues could be identified as alternative substrates for Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase. It could be enforced, that the presence of vicinal 4,5-equivalent equatorial phosphate groups as well as a free equatorial 3-equivalent hydroxyl group is essential for phosphorylation by the Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase.

D-Ins(1,4,6)P₃ and the analogue L-scylo-Ins(1,2,4)P₃ showed an enhanced or similar substrate affinity (K_m : 0.19 μ M and 0.36 μ M, respectively). Inactive or weakly active InsPs or analogues were also tested for a competitive inhibition of the enzyme activity. Among the tested compounds D-Ins(1,4,6)P₃ (K_i : 2.62 μ M) and scylo-Ins(1,2,3,5)P₄ (K_i : 16.7 μ M) were identified as the most potent competitive Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase inhibitors. The phosphoinositide PtdIns(4,5)P₂ inhibited the enzyme with an IC_{50} value of 8 μ M in a non-competitive manner. The identified alternative biological substrates or inhibitors may be important in the complex metabolism of inositol phosphates in intact cells. The highlighted conversion of alternative substrates by recombinant Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase may be useful in the biosynthetic production of biologically important InsPs and analogues from less phosphorylated precursors.

6. Literatur

Aaronson, S.A. und Todaro, G.J. (1968)

Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro
Science **162**, 1024 - 1026

Abdullah, M., Hughes, P.J., Craxton, A., Gigg, R., Desai, T., Marecek, J.F., Prestwich, G.D.
und Shears, S.B. (1992)

Purification and characterization of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase from rat
liver using an inositol hexakisphosphate affinity column
J. Biol. Chem. **267**, 22340 - 22345

Agostinis, P., Vandenbogaerde, A., Donella-Deana, A., Pinna, L.A., Lee, K-T., Goris, J.,
Merlevede, W., Vandenheede, J.R. und De Witte, P. (1995)

Photosensitized inhibition of growth factor-regulated protein kinases by Hypericin
Biochem. Pharmacol. **49**, 1615 - 1622

Agostinis, P., Donella-Deana, A., Cuveele, J., Vandenbogaerde, A., Sarno, S.,
Merlevede, W. und De Witte, P. (1996)

A comparative analysis of the photosensitized inhibition of growth-factor regulated
protein kinases by Hypericin-derivatives
Biochem. Biophys. Res. Com. **220**, 613 - 617

Agullo, G., Gamet-Payrastre, L., Fernandez, Y., Anciaux, N., Demigné, C. und Rémésy, C.
(1996)

Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a
colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells)
Cancer Lett. **105**, 61 - 70

Agullo, G., Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Viale, C., Rémésy, C., Chap, H. und
Payrastre, B. (1997)

Relationship between flavonoid structure and inhibition of
phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase
C inhibition
Biochem Pharmacol. **53**, 1649 – 1657

- Ahmad, N., Feyes, D.K., Nieminen, A.L., Agarwal, R. und Mukhtar, H. (1997)
Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells
J. Natl. Cancer Inst. **89**, 1881 - 1886
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., und Fukami, Y. (1987)
Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases
J. Biol. Chem. **262**, 5592 - 5595
- Albert, C., Safrany, S.T., Bembenek, M.E., Reddy, K.M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Bröcker, M., Shears, S.B. und Mayr, G.W. (1997)
Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cells
Biochem. J. **327**, 553 - 560
- Andrew, D.J., Hay, A.W. und Evans, S.W. (1999)
Aurintricarboxylic acid inhibits apoptosis and supports proliferation in a haemopoietic growth-factor dependent myeloid cell line
Immunopharmacology **41**, 1 - 10
- Asano, Y., Okamura, S., Ogo, T., Eto, T., Otsuka, T. und Niho, Y. (1997)
Effect of (-)-epigallocatechin gallate on leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia
Life Sciences **60**, 135 - 142
- Austin, C.A., Patel, S., Ono, K., Nakane, H., und Fisher, L.M. (1992)
Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives
Biochem. J. **282**, 883 - 889
- Avila, M.A., Velasco, J.A., Cansado, J. und Notario, V. (1994)
Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468
Cancer Res. **54**, 2424 - 2428

- Bae, Y.S., Cantley, L.G., Chen, C.S., Kim, S.R., Kwon, K.S. und Rhee, S.G. (1998)
Activation of phospholipase C- γ by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
J. Biol. Chem. **273**, 4465 - 4469
- Bai, J.Z., Saafi, E.L., Zhang, S. und Cooper, G.J. (1999)
Role of Ca²⁺ in apoptosis evoked by human amylin in pancreatic islet beta-cells
Biochem. J. **343**, 53 - 61
- Balabhadrapathruni, S., Thomas, T.J., Yurkow, E.J., Amenta, P.S. und Thomas, T. (2000)
Effects of genistein and structurally related phytoestrogens on cell cycle kinetics and
apoptosis in MDA-MB-468 human breast cancer cells
Oncol. Rep. **7**, 3 - 12
- Balzarini, J., Mitsuya, H., De Clercq, E. und Broder, S. (1986)
Aurintricarboxylic acid and evans blue represent two different classes of anionic
compounds which selectively inhibit the cytopathogenicity of human t-cell
lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy-associated virus
Biochem. Biophys. Res. Com. **136**, 64 - 71
- Band, V., Hoffer, A.P., Band, H., Rhinehardt, A.E., Knapp, R.C., Matlin, S.A. und
Anderson, D.J. (1989)
Antiproliferative effect of gossypol and its optical isomers on human reproductive
cancer cell lines
Gynecol. Oncol. **32**, 273 - 277
- Bansal, V.S., Inhorn, R.C. und Majerus, P.W. (1987)
The metabolism of inositol 1,3,4-trisphosphate to inositol 1,3-bisphosphate
J. Biol. Chem. **262**, 9444 - 9447
- Barch, D.H., Rundhaugen, L.M., Stoner, G.D., N.S. Pillay und Rosche, W.A. (1996)
Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid
Carcinogenesis **17**, 265 - 269

Barhoumi, R. und Burghardt, R.C. (1996)

Kinetic analysis of the chronology of patulin- and gossypol-induced cytotoxicity in vitro

Fundam. Appl. Toxicol. **30**, 290 - 297

Barnard, D.L., Huffman, J.H., Morris, J.L.B., Wood, S.G., Hughes, B.G. und Sidwell, R.W. (1992)

Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus

Antiviral Res. **17**, 63 - 77

Batistatou, A. und Greene, L.A. (1991)

Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity

J. Cell. Biol. **115**, 461 - 471

Béládi, I., Pusztai, R. und Bakay, M. (1965)

Inhibitory activity of tannic acid and flavonols on the infectivity of Herpesvirus Hominis and Herpesvirus Suis

Naturwissenschaften **13**, 402

Benchokroun, Y., Couprie, J. und Larsen, A.K. (1995)

Aurintricarboxylic acid, a putative inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in chinese hamster fibrosarcoma cells

Biochem Pharmacol. **49**, 305 - 313

Benezra, M., Vlodaysky, I., Yayon, A., Bar-Shavit, R., Regan, J., Chang, M. und Ben-Sasson, S. (1992)

Reversal of basic fibroblast-growth factor-mediated autocrine cell transformation by aromatic anionic compounds

Cancer Res. **52**, 5656 - 5662

- Benezra, M., Ben-Sasson, S., Regan, J., Chang, M. Bar-Shavit, R. und Vlodaysky, I. (1994)
Antiproliferative activity to vascular smooth muscle cells and receptor binding of
heparin-mimicking polyaromatic anionic compounds
Arterioscler. Thromb. **14**, 1992 - 1999
- Beretz, A., Anton, R. und Stoclet, J.C. (1977)
Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase
Experientia **34**, 1054 - 1055
- Berridge, M.J. und Irvine, R.F. (1984)
Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction
Nature **312**, 315 - 321
- Berridge, M.J. und Irvine, R.F. (1989)
Inositol phosphates and cell signalling
Nature **341**, 197 - 205
- Berridge, M.J., (1993)
Inositol trisphosphate and calcium signalling
Nature **361**, 315 - 325
- Berridge, M.J., (1995)
Capacitative calcium entry
Biochem. J. **312**, 1 - 11
- Bertsch, U., Haefs, M., Möller, M., Deschermeier, C., Fanick, W., Kitzerow, A., Ozaki, S.,
Meyer, H.E. und Mayr, G.W. (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., Weglöhner, W., Emmrich, F. und Mayr, G.W. (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
- Biden, T.J., Comte, M., Cox, J.A. und Wollheim, C.B. (1987)
Calcium-Calmodulin stimulates inositol 1,4,5-trisphosphate kinase activity from insulin-secreting RINm5F cells
J. Biol. Chem. **262**, 9437 - 9440
- Biden, T.J., Vallar, L. und Wollheim, C.B. (1988a)
Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate metabolism in insulin-secreting RINm5F cells
Biochem. J. **251**, 435 - 440
- Biden, T.J., Altin, J.G., Karjalainen, A. und Bygrave, F. (1988b)
Stimulation of hepatic inositol 1,4,5-trisphosphate kinase activity by Ca²⁺-dependent and -independent mechanisms
Biochem. J. **256**, 697 - 701
- Bindoli, A., Valente, M. und Cavallini, L. (1985)
Inhibitory action of quercetin on xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity
Pharmacol. Res. Commun. **17**, 831 - 839
- Blanco, A. und Zinkham, W.H. (1963)
Lactate dehydrogenase in the human testis
Science **139**, 601 - 602
- Blumenthal, T. und Landers, T.A. (1973)
The inhibition of nucleic acid-binding proteins by aurintricarboxylic acid
Biochem. Biophys. Res. Com. **55**, 680 - 688

- Bock, P.E., Srinivasan, K.R. und Shore, J.D. (1981)
Activation of intrinsic blood coagulation by ellagic acid: insoluble ellagic acid-metal ion complexes are the activating species
Biochemistry **20**, 7258 - 7266
- Bonis, D., Sezan, A., Mauduit, P., Dubreuil, D., Cleophax, J., Gero, S.D. und Rossignol, B. (1991)
Comparative studies of D-myoinositol 1,4,5-trisphosphate and synthetic 6-deoxy D-myoinositol 1,4,5-trisphosphate: binding and calcium release activity in rat parotid microsomes
Biochem. Biophys. Res. Com. **175**, 894 - 900
- Bork, P.M., Bacher, S., Schmitz, M.L., Kaspers, U. und Heinrich, M. (1999)
Hypericin as a non-antioxidant inhibitor of NF-kappa B
Planta Med. **65**, 297 - 300
- Bottomley, M.J., Salim, K. und Panayotou, G. (1998)
Phospholipid-binding protein domains
Biochem. Biophys. Acta **1436**, 165 - 183
- Boulton, D.W., Walle, U.K. und Walle, T. (1998)
Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins
J. Pharm. Pharmacol. **50**, 243 - 249
- Bruns, R. F., Miller, F.D., Merriman, R. L., Howbert, J.J., Heath, W. F., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T., und Nakano, H. (1991)
Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent
Biochem. Biophys. Res. Com. **176**, 288 - 291
- Bushunow, P., Reidenberg, M.M., Wasenko, J., Winfield, J., Lorenzo, B., Lemke, S., Himpler, B., Corona, R. und Coyle, T. (1999)
Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas
J. Neurooncol. **43**, 79 - 86

Carpenter, S. und Kraus, G.A. (1991)

Photosensitization is required for inactivation of equine infectious anemia virus by hypericin

Photochem. Photobiol. **53**, 169 - 174

Catchpoole, D.R. und Stewart, B.W. (1994)

Inhibition of topoisomerase II by aurintricarboxylic acid: Implications for mechanisms of apoptosis

Anticancer Res. **14**, 853 - 856

Chen, Z.P., Schell, J.B., Ho, C.-T. und Chen, K.Y. (1998)

Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts

Cancer Lett. **129**, 173 - 179

Choi, K.Y., Kim, H.K., Lee, S.Y., Moon, K.H., Sim, S.S., Kim, J.W., Chung, H.K. und Rhee, S.G. (1990)

Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase

Science **248**, 64 - 66

Choi, G., Chang, Y.-T., Chung, S.-K. und Choi, K.Y. (1997)

Molecular interactions of all possible regioisomers of synthetic myo-inositol phosphates with inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase

Bioorg. Med. Chem. Lett. **7**, 2709 - 2714

Chung, J.Y., Huang, C., Meng, X., Dong, Z. und Yang, C.S. (1999)

Inhibition of activator protein 1 activity and cell growth by purified green tea and black tea polyphenols in H-ras-transformed cells: structure-activity relationship and mechanisms involved

Cancer Res. **59**, 4610 - 4617

- Chung, P.S., Saxton, R.E., Paiva, M.B., Rhee, C.K., Soudant, J., Mathey, A., Foote, C. und Castro, D.J. (1994)
Hypericin uptake in rabbits and nude mice transplanted with human squamous cell carcinoma: study of a new sensitizer for laser phototherapy
Laryngoscope **104**, 1471 - 1476
- Cohen, G.M. (1997)
Caspases: the executioners of apoptosis
Biochem. J. **326**, 1 - 16
- Communi, D., Vanweyenberg, V. und 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 - 673
- Communi, D., Vanweyenberg, V. und Erneux, C. (1995)
Molecular study and regulation of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
Cell. Signalling **7**, 643 - 650
- Communi, D., Vanweyenberg, V. und Erneux, C. (1997)
D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A is activated by receptor activation through a calcium:calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation mechanism
EMBO **16**, 1943 - 1952
- Conigrave, A., Patwardhan, A., Broomhead, L. und Roufogalis, B. (1992)
A purification strategy for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from rat liver based upon heparin interaction chromatography
Cell. Signalling **4**, 303 - 312
- Constantinou, A., Stoner, G.D., Mehta, R., Rao, K., Runyan, C. und Moon, R. (1995)
The dietary anticancer agent ellagic acid is a potent inhibitor of DNA topoisomerases in vitro
Nutrition and Cancer **23**, 121 - 130

- Coyle, T., Levante, S., Shetler, M. und Winfield, J. (1994)
In vitro and in vivo cytotoxicity of gossypol against central nervous system tumour cell lines
J.Neurooncol. **19**, 25 - 35
- Cullen, P.J., Dawson, A.P. und Irvine, R.F. (1995a)
Purification and characterization of an Ins(1,3,4,5)P₄ binding protein from pig platelets: possible identification of a novel non-neuronal Ins(1,3,4,5)P₄ receptor
Biochem. J. **305**, 139 - 143
- Cullen, P.J., Chung, S.K., Chang, Y.T., Dawson, A.P. und Irvine, R.F. (1995b)
Specificity of the purified inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding protein from porcine platelets
FEBS-Lett. **358**, 240 - 242
- Cullen, P.J., Hsuan, J.J., Truong, O., Letcher, A.J., Jackson, T.R., Dawson, A.P. und Irvine, R.F. (1995c)
Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P₄-binding protein as a member of the GAP1 family
Nature **376**, 527 - 530
- Cullen, P.J. (1998)
Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling
Biochem. Biophys. Acta **1436**, 35 - 47
- Da Silva, C. P., Emmrich, F. und Guse, A. H. (1994)
Adriamycin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate 3-Kinase activity in vitro and blocks formation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in stimulated Jurkat T-lymphocytes
J. Biol. Chem. **269**, 12521 - 12526
- Das, M., Bickers, D.R. und Mukhtar, H. (1984)
Plant phenols as in vitro inhibitors of glutathione S-transferase(s)
Biochem. Biophys. Res. Com. **120**, 427 - 433

- Deck, L.M., Vander Jagt, D.L. und Royer, R.E. (1991)
Gossypol and derivatives: a new class of aldose reductase inhibitors
J. Med. Chem. **34**, 3301 - 3305
- DeLisle, S., Radenberg, T., Wintermantel, M.R., Tietz, C., Parys, J.B., Pittet, D.,
Welsh, M.J. und Mayr, G.W. (1994)
Second messenger specificity of the inositol trisphosphate receptor: reappraisal
based on novel inositol phosphates
Am. J. Physiol. **266**, C429 - C436
- De Peyster, A. und Wang, Y.Y. (1993)
Genetic toxicity studies of gossypol
Mutation Res. **297**, 293 - 312
- Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G. und Newmark, H.L. (1991)
Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia
Carcinogenesis **12**, 1193 - 1196
- Dessauer, C.W., Posner, B.A. und Gilman, A.G. (1996)
Visualizing signal transduction: receptors, G-proteins, and adenylate cyclases
Clin. Sci. (Colch.) **91**, 527 - 537
- De Witte, P., Agostinis, P., Van Lint, J., Merlevede, W. und Vandenhede, J.R. (1993)
Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by hypericin
Biochem. Pharmacol. **46**, 1929 - 1936
- Dixit, R. und Gold, B. (1986)
Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by
ellagic acid
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 8039 - 8043
- Donié, F. und Reiser, G. (1991)
Purification of a high-affinity inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor from brain
Biochem. J. **275**, 453 - 457

- Drlica, K. und Franco, R.J. (1988)
Inhibitors of DNA topoisomerases
Biochemistry **27**, 2253 - 2259
- D'Santos, C., Communi, D., Ludgate, M., Vanweyenberg, V., Takazawa, K. und Erneux, C. (1994)
Identification of high molecular weight forms of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in rat thymus and human lymphocytes
Cell. Signalling **6**, 335 - 344
- Duarte, J., Vizcaino, F.P., Utrilla, P., Jimenez, J., Tamargo, J. und Zarzuelo, A. (1993)
Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships
Gen. Pharmacol. **24**, 857 - 862
- Erneux, C., Govaerts, C., Communi, D. und Pesesse, X. (1998)
The diversity and possible functions of the inositol polyphosphate 5-phosphatases
Biochem. Biophys. Acta **1436**, 185 - 199
- Fernandez, J.M., Bilgin, M.D. und Grossweiner, L.I. (1997)
Singlet oxygen generation by photodynamic agents
J. Photochem. Photobiol. B **37**, 131 - 140
- Ferrandina, G., Almadori, G., Maggiano, N., Lanza, P., Ferlini, C., Cattani, P., Piantelli, M., Scambia, G. und Ranelletti, F.O. (1998)
Growth-inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type II estrogen binding sites in human laryngeal cancer cell lines and primary laryngeal tumors
Int. J. Cancer **77**, 747 - 754
- Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., De Takats, P.G., Anderson, D., Baker, J. und Kerr, D.J. (1996)
Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition
Clin. Cancer Res. **2**, 659 - 668

- Fiala, E.S., Sodum, R.S., Bhattacharya, M. und Li, H. (1996)
(-)-Epigallocatechin gallate, a polyphenolic tea antioxidant, inhibits peroxynitrite-mediated formation of 8-oxodeoxyguanosine and 3-nitrotyrosine
Experientia **52**, 922 - 926
- Flack, M.R., Pyle, R.G., Mullen, N.M., Lorenzo, B., Wu, Y.W., Knazek, R.A., Nisula, B.C. und Reidenberg, M.M. (1993)
Oral gossypol in the treatment of metastatic adrenal cancer
J. Clin. Endocrinol. Metabol. **76**, 1019 – 1024
- Fleischer, B., Xie, J., Mayrleitner, M., Shears, S.B., Palmer, D.J. und Fleischer, S. (1994)
Golgi coatomer binds and forms K⁺-selective channels gated by inositol polyphosphates
J. Biol. Chem. **269**, 17826 - 17832
- Fraga, C.G., Martino, V.S., Ferraro, G.F., Coussio, J.D. und Boveris, A. (1987)
Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence
Biochem. Pharmacol. **36**, 717 - 720
- Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Komori, A., Sueoka, E., Kozu, T., Tada, Y., Suga, K., Imai, K. und Nakachi, K. (1998)
Cancer inhibition by green tea
Mutation Res. **402**, 307 - 331
- Fukuda, M., Aruga, J., Niinobe, M., Aimoto, S. und Mikoshiba, K. (1994)
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2B domain of IP4BP/Synaptotagmin II
J. Biol. Chem. **269**, 29206 - 29211
- Gazit, A., Oshero, N., Posner, I., Yaish, P., Poradosu, E., Gilon, C. und Levitzki, A. (1991)
Tyrphostins: Heterocyclic and alpha-substituted benzylidenemalononitrile tyrphostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases
J. Med. Chem. **34**, 1896 - 1907

Gellert, M. (1981)

DNA topoisomerases

Annu. Rev. Biochem. **50**, 879 - 910

Givens, J.F. und Manly, K.F. (1976)

Inhibition of RNA-directed DNA polymerase by aurintricarboxylic acid

Nucl. Acid Res. **3**, 405 - 418

González, R.G., Haxo, R.S. und Schleich, T. (1980)

Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein-nucleic acid interactions

Biochemistry **19**, 4299 - 4303

Graf, E., Empson, K.L. und Eaton, J.W. (1987)

Phytic acid. A natural antioxidant

J. Biol. Chem. **262**, 11647 - 11650

Graziani, Y. und Chayoth, R. (1979)

Regulation of cyclic AMP level and synthesis of DNA, RNA and protein by quercetin in Ehrlich ascites tumor cells

Biochem. Pharmacol. **28**, 397 - 403

Graziani, Y., Erikson, E. und Erikson, R.L. (1983)

The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo

Eur. J. Biochem. **135**, 583 - 589

Gschwendt, M., Horn, F., Kittstein, W. und Marks, F. (1983)

Inhibition of the calcium- and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by Quercetin

Biochem. Biophys. Res. Com. **117**, 444 - 447

- Gschwendt, M., Horn, F., Kittstein, W., Fürstenberger, G., Besemfelder, E. und Marks, F. (1984)
Calcium and phospholipid-dependent protein kinase activity in mouse epidermis cytosol. Stimulation by complete and incomplete tumor promoters and inhibition by various compounds
Biochem. Biophys. Res. Com. **124**, 63 - 68
- Gschwendt, M., Müller, H.-J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G. und Marks, F. (1994)
Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor
Biochem. Biophys. Res. Com. **199**, 93 - 98
- Guse, A.H. (1999)
Cyclic ADP-ribose: a novel Ca²⁺-mobilising second messenger
Cell. Signal. **11**, 309 - 316
- Gutfreund, H. (1971)
Enzymes: Physical Principles
Wiley & Sons Ltd., London, 189 - 203
- Habtemariam, S. (1997)
Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- α in L-929 tumor cells
J. Nat. Prod. **60**, 775 - 778
- Hamilton, H.B., Hinton, D.R., Law, R.E., Gopalakrishna, R., Su, Y.Z., Chen, Z.H., Weiss, M.H. und Couldwell W.T. (1996)
Inhibition of cellular growth and induction of apoptosis in pituitary adenoma cell lines by the protein kinase C inhibitor hypericin: potential therapeutic application
J. Neurosurg. **85**, 329 - 334
- Hammonds-Odie, L.P., Jackson, T.R., Profit, A.A., Blader, I.J., Turck, C.W., Prestwich, G.D. und Theibert, A.B. (1996)
Identification and cloning of Centaurin- α
J. Biol. Chem. **271**, 18859 - 18868

- Harlan, J.E., Hajduk, P.J. Yoon, H.S. und Fesik, S.W. (1994)
Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
Nature **371**, 168 - 170
- Harris, M.S., Sakamoto, T., Kimura, H., He, S., Spee, C., Gopalakrishna, R.,
Gundimeda, U., Yoo, J.S., Hinton, D.R. und Ryan, S.J. (1996)
Hypericin inhibits cell growth and induces apoptosis in retinal pigment epithelial cells:
possible involvement of protein kinase C
Current Eye Res. **15**, 255 - 262
- Haspel, H.C., Ren, Y.-F., Watanabe, K.A., Sonnenberg, M. und Corin, R.E. (1984)
Cytocidal effect of gossypol on cultured murine erythroleukemia cells is prevented by
serum protein
J. Pharmacol. Exp. Ther. **229**, 218 - 225
- Hawkins, P.T., Poyner, D.R., Jackson, T.R., Letcher, A.J., Lander, D.A. und Irvine, R.F.
(1993)
Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a
possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate
Biochem. J. **294**, 929 - 934
- Hill, T.D., Zwiller, J. und Boynton, A.L. (1989)
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate stimulates the initiation of DNA synthesis in
Ca²⁺-deprived rat liver cells
J. Cell. Physiol. **140**, 403 - 407
- Hirata, M., Watanabe, Y., Yoshida, M., Koga, T. und Ozaki, S. (1993)
Roles for hydroxyl groups of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate in the recognition by
its receptor and metabolic enzymes
J. Biol. Chem. **268**, 19260 - 19266
- Hirata, M., Watanabe, Y., Kanematsu, T., Ozaki, S. und Koga, T.
D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate analogues substituted at the 3-hydroxyl group
Biochim. Biophys. Acta **1244**, 404 - 410

Höweler, U.

MOBY: Molecular Modelling on the PC
Version 1.5
Springer New Media (1992)

Hofman, J., Doppler, W., Jakob, A., Maly, K., Posch, L., Uberall, F. und Grunicke, H.H. (1988)

Enhancement of the antiproliferative effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) and nitrogen mustard by inhibitors of protein kinase C
Int. J. Cancer **42**, 382 - 388

Hoth, M. und Penner, R. (1992)

Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells
Nature **355**, 353 - 356

Hu, Y.-F., Chang, C.J., Brueggemeier, R.W. und Lin, Y.C. (1993)

Gossypol inhibits basal and estrogen-stimulated DNA synthesis in human breast carcinoma cells
Life Sci. **53**, 433 - 438

Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, Z.Y., Ferraro, T., Finnegan-Olive, T., Lou, Y.R., Mitchell, J.M., Laskin, J.D., Newmark, H. und Yang, C.S. (1992)

Inibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin
Carcinogenesis **13**, 947 - 954

Hudson, J.B., Harris, L. und Towers, G.H. (1993)

The importance of light in the anti-HIV effect of hypericin
Antiviral Res. **20**, 173 - 178

Hudson, J.B., Imperial, V., Haugland, R.P. und Diwu, Z. (1997)

Antiviral activities of photoactive perylenequinones
Photochem. Photobiol. **65**, 352 - 354

- Hughes, P.J., Hughes, A.R., Putney, Jr., J.W. und Shears, S.B. (1989)
The regulation of the phosphorylation of inositol 1,3,4-trisphosphate in cell-free preparations and its relevance to the formation of inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate in agonist-stimulated rat parotid acinar cells
J. Biol. Chem. **264**, 19871 - 19878
- Imboden, J.B. und pattison, G. (1987)
Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate kinase activity after stimulation of human T cell antigen receptor
J. Clin. Invest. **79**, 1538 - 1541
- Inhorn, R.C. und Majerus, P.W. (1987)
Inositol polyphosphate 1-phosphatase from calf brain. Purification and inhibition by Li^+ , Ca^{2+} , and Mn^{2+}
J. Biol. Chem. **262**, 15946 - 15952
- Irvine, R.F., Letcher, A.J., Heslop, J.P. und Berridge, M.J. (1986)
The inositol tris/tetrakisphosphate pathway - demonstration of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-kinase activity in animal tissues
Nature **320**, 631 - 634
- Irvine, R.F. und Moor, R.M. (1986)
Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca^{2+}
Biochem. J. **240**, 917 - 920
- Isaacks, R.E. und Harkness, D.R. (1980)
Erythrocyte organic phosphates and haemoglobine function in birds, reptils and fishes
Am. Zool. **20**, 115 - 129
- Ito, T., Warnken, S.P. und May, W.S. (1999)
Protein synthesis inhibition by flavonoids: roles of eukaryotic initiation factor 2 alpha kinases
Biochem. Biophys. Res. Com. **265**, 589 - 594

- Jankun, J., Selman, S.H., Swiercz, R. und Shrzypczak-Jankun, E. (1997)
Why drinking green tea could prevent cancer
Nature **387**, 561
- Janmey, P.A. (1994)
Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly
Annu. Rev. Physiol. **56**, 169 - 191
- Johanson, R.A., Hansen, C.A. und Williamson, J.R. (1988)
Purification of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from rat brain
J. Biol. Chem. **263**, 7465 - 7471
- Johnson, L.F. und Tate, M.E. (1969)
Structure of phytic acid
Can. J. Chem. **47**, 63 - 73
- Johnson, R.M., Wasilenko, W.J., Mattingly, R.R., Weber, M.J. und Garrison, J.C. (1989)
Fibroblasts transformed with v-src show enhanced formation of an inositol tetrakisphosphate
Science **246**, 121 - 124
- Josephy, P.D., Lord, H.L. und Snieckus, V.A. (1990)
Inhibition of benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide mutagenicity by synthetic analogues of ellagic acid
Mutation Res. **242**, 143 - 149
- Kang T.B. und Liang, N.C. (1997)
Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells
Biochem. Pharmacol. **54**, 1013 - 1018
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. und Yano, M. (1999)
Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation
Anticancer Res. **19**, 1261 - 1270

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics

Br. J. Cancer **26**, 239 - 257

Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Pathania, V. und Syal, N. (1999)

Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice

Food Chem. Toxicol. **37**, 313 - 318

Kim, I., Marcelle, G.B., Waller, D.P., Cordell, G.A. und Fong, H.H.S. (1987)

Inhibition of lactate dehydrogenase-X by imino-derivatives of gossypol: structure activity relationship

Contraception **35**, 289 - 297

Kimura, Y., Hirata, M., Yamaguchi, K. und Koga, T. (1987)

Activation by Calmodulin of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in guinea pig peritoneal macrophages

Arch. Biochem. Biophys. **257**, 363 - 369

Kimura, Y., Watanabe, Y., Ozaki, S., Koga, T. und Hirata, M. (1990)

Ca²⁺/Calmodulin independent inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in guinea pig peritoneal macrophages

Comp. Biochem. Physiol. **97B**, 527 - 533

Kleinsmith, L.J. und Kish, V.M. (1995)

Principles of cell and molecular biology

Harper Collins College publishers, second edition

Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. und Tamaoki, T. (1989)

Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C

Biochem. Biophys. Res. Com. **159**, 548 - 553

- Komori, A., Yatsunami, J., Okabe, S., Abe, S., Hara, K., Suganuma, M., Kim, S.J. und Fujiki, H. (1993)
Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols
Jpn. J. Clin. Oncol. **23**, 186 - 190
- Kulkarni, G.R., Kantharaj, G.R., Fluellen, C., Niranjana, B.G. und Avadhani, N.G. (1987)
Stimulation of transcription and translation by aurin tricarboxylic acid in mitochondrial lysates from Ehrlich ascites cells
Biochem. Biophys. Res. Com. **145**, 1149 - 1157
- Kuntz, S., Wenzel, U. und Daniel, H. (1999)
Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines
Eur. J. Nutr. **38**, 133 - 142
- Larsson, O., Barker, C.J., Sjöholm, A., Carlqvist, H., Michell, R.H., Bertorello, A., Nilsson, T., Honkanen, R.E., Mayr, G.W., Zwiller, J. und Bergren, P.O. (1997)
Inhibition of phosphatases and increased Ca²⁺ channel activity by inositol hexakisphosphate
Science **278**, 471 - 474
- Lavie, G., Kaplinsky, C., Toren, A., Aizman, I., Meruelo, D., Mazur, Y. und Mandel, M. (1999)
A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthron and hypericin in leukaemic cells: possible relevance to photodynamic therapy
Br. J. Cancer **79**, 423 - 432
- La Voie, H.A. und Witorsch, R.J. (1995)
Investigation of intracellular signals mediating the anti-apoptotic action of prolactin in Nb2 lymphoma cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **209**, 257 - 269

- Lea, M.A., Xiao, Q., Sadhukhan, A.K., Cottle, S., Wang, Z.Y. und Yang, C.S. (1993)
Inhibitory effects of tea extracts and (-)-epigallocatechin gallate on DNA synthesis and proliferation of hepatoma and erythroleukemia cells
Cancer Lett. **68**, 213 - 236
- Lee, H.S., Oh, W.K., Kim, B.Y., Ahn, C.A., Kang, D.O., Shin, D.J., Kim, J., Mheen, T. und Ahn, J.S. (1996)
Inhibition of phospholipase C γ 1 activity by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*
Planta Medica 62, 293 - 296
- Lee, S.Y., Sim, S.S., Kim, J.W., Moon, K.H., Kim, J.H. und Rhee, S.G. (1990)
Purification and properties of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from rat brain
J. Biol. Chem. **265**, 9434 - 9440
- Li, W., Shen, F. und Weber, G. (1999)
Ribavirin and quercetin synergistically downregulate signal transduction and are cytotoxic in human ovarian carcinoma cells
Oncol. Res. **11**, 243 - 247
- Liao, S. und Hiipakka, R.A. (1995a)
Selective inhibition of steroid 5 α -reductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate
Biochem. Biophys. Res. Com. **214**, 833 - 838
- Liao, S., Umekita, Y., Guo, J., Kokontis, J.M. und Hiipakka, R.A. (1995b)
Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate
Cancer Lett. **96**, 239 - 243
- Ligueros, M., Jeoung, D., Tang, B., Hochhauser, D., Reidenberg, M.M. und Sonenberg, M. (1997)
Gossypol inhibition of mitosis, cyclin D1 and Rb protein in human mammary cancer cells and cyclin-D1 transfected human fibrosarcoma cells
Br. J. Cancer **76**, 21 - 28

- Lin, A., Barnes, S. und Wallace, R.W. (1990)
Phosphorylation by protein kinase C inactivates an
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase purified from human platelets
Biochem. Biophys. Res. Com. **170**, 1371 - 1376
- Lin, A., Wallace, R.W. und Barnes, S. (1993)
Purification and properties of a human platelet inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
Arch. Biochem. Biophys. **303**, 412 - 420
- Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C.S. und Cantley, L.C. (1994)
Novel function of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate as a cofactor for membrane
phospholipase D
J. Biol. Chem. **269**, 21403 - 21406
- Lockyer, P.J., Bottomley, J.R., Reynolds, J.S., McNulty, T.J., Venkateswarlu, K.,
Potter, B.V.L., Dempsey, C.E. und Cullen, P.J. (1997)
Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate
receptors GAP1IP4BP and GAP1m result from the GAP1IP4BP PH domain directing
plasma membrane targeting
Curr. Biol. **7**, 1007 - 1010
- Lozano, R.M., Rivas, G. und Giménez-Gallego, G. (1997)
Destabilization, oligomerization and inhibition of the mitogenic activity of acidic
fibroblast-growth factor by aurintricarboxylic acid
Eur. J. Biochem. **248**, 30 - 36
- Lückhoff, A. und Clapham, D.E. (1992)
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca^{2+} -permeable channel
Nature **355**, 356 - 358
- Lyn-Cook, B.D., Rogers, T., Blann, E.B., Kadlubar, F.F. und Hammons, G.J (1999)
Chemopreventive effects of tea extracts and various components on human
pancreatic and prostate tumor cells in vitro
Nutr. Cancer **35**, 80 - 86

- Matsuo, N., Yamada, K., Shoji, K., Mori, M. und Sugano, M. (1997)
Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship
Allergy **52**, 58 - 64
- Matter, W.F., Brown, R. F., and Vlahos, C.J. (1992)
The inhibition of phosphatidylinositol 3-Kinase by quercetin and analogs
Biochem. Biophys. Res. Com. **186**, 624 - 631
- Mattingly, R.R., Stephens, L.R., Irvine, R.F. und Garrison, J.C. (1991)
Effects of transformation with the v-src oncogene on inositol phosphate metabolism in Rat-1 fibroblasts
J. Biol. Chem. **266**, 15144 - 15153
- Majerus, P.W. (1992)
Inositol phosphate biochemistry
Annu. Rev. Biochem. **61**, 225 - 250
- Mayr, G.W. und Dietrich, W. (1987)
The only inositol tetrakisphosphate detectable in avian erythrocytes is the isomer lacking phosphate at position 3: a NMR study
FEBS-Lett. **213**, 278 - 282
- Mayr, G.W. (1988)
Inositol phosphates: structural components, regulators and signal transducers of the cell - a review
Boehringer Mannheim, Topics In Biochemistry **7**
- Mayr, G.W. (1990)
Mass determination of inositol phosphates by High-Performance Liquid Chromatography with postcolumn complexometry (Metal-Dye Detection)
Methods in Inositide Research, edited by R.F. Irvine, Raven Press, Ltd., New York

McClarty, G.A., Chan, A.K., Creasey, D.C. und Wright, J.A. (1985)

Ribonucleotide reductase: an intracellular target for the male antifertility agent, gossypol

Biochem. Biophys. Res. Com. **133**, 300 - 305

Meikle, I., Cummings, J., Macpherson, J.S., Hadfield, J.A. und Smyth, J.F. (1995)

Biochemistry of topoisomerase I and II, inhibition by anthracenyl-amino acid conjugates

Biochem. Pharmacol. **49**, 1747 - 1757

Meruelo, D., Lavie, G. und Lavie, D. (1988)

Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 5230 - 5234

Mesner, P.W. Jr, Bible, K.C., Martins, L.M., Kottke, T.J., Srinivasula, S.M., Svingen, P.A., Chilcote, T.J., Basi, G.S., Tung, J.S., Krajewski, S., Reed, J.C., Alnemri, E.S., Earnshaw, W.C. und Kaufmann, S.H. (1999)

Characterization of caspase processing and activation in HL-60 cell cytosol under cell-free conditions. Nucleotide requirement and inhibitor profile

J. Biol. Chem. **274**, 22635 - 22645

Mogil, R.J., Shi, Y., Bissonette, R.P., Bromley, P., Yamaguchi, I. und Green, D.R. (1994)

Role of DNA fragmentation in T cell activation-induced apoptosis in vitro and in vivo

J. Immunol. **152**, 1674 - 1683

Molnár, J., Béládi, I., Domonkos, K., Földeák, S., Boda, K. und Veckenstedt, A. (1981)

Antitumor activity of flavonoids on NK/Ly ascites tumor cells

Neoplasma **28**, 11 - 18

Moon, K.H., Lee, S.Y. und Rhee, S.G. (1989)

Developmental changes in the activities of phospholipase C, 3-kinase, and 5-phosphatase in rat brain

Biochem. Biophys. Res. Com. **164**, 370 - 374

- Morris, A.J., Downes, C.P., Harden, T.K. und Michell, R.H. (1987)
Turkey erythrocytes possess a membrane-associated
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase that is activated by Ca^{2+} in the presence of
calmodulin
Biochem. J. **248**, 489 - 493
- Morris, A.P., Gallacher, D.V., Irvine, R.F. und Petersen, O.H. (1987)
Synergism of inositol trisphosphate and tetrakisphosphate in activating
 Ca^{2+} -dependent K^+ channels
Nature **330**, 653 - 655
- Murakami, S., Muramatsu, M. und Otomo, S. (1992)
Gastric H^+ , K^+ -ATPase inhibition by catechins
J. Pharm. Pharmacol. **44**, 926 - 928
- Nadakavuken, M., Sorensen, R.H. und Tone, J.N. (1979)
Effect of gossypol on the ultrastructure of rat spermatozoa
Cell Tissue Res. **204**, 293 - 296
- Nagao, A., Seki, M. und Kobayashi, H. (1999)
Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids
Biosci. Biotechnol. Biochem. **63**, 1787 - 1790
- Nakadate, T., Jeng, A.Y. und Blumberg, P.M. (1988)
Comparison of protein kinase C functional assays to clarify mechanisms of inhibitor
action
Biochem. Pharmacol. **37**, 1541 - 1545
- Nakane, H. und Ono, K. (1990)
Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human
immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and
ribonucleic acid polymerases
Biochemistry **29**, 2841 - 2845

- Nakayama, M., Suzuki, K., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y. und Shimamura, T. (1993)
Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols
Antivir. Res. **21**, 289 - 299
- Nakayasu, M., Sakamoto, H., Terada, M. Nagao, M. und Sugimura, T. (1986)
Mutagenicity of quercetin in chinese hamster lung cells in culture
Mutat. Res. **174**, 79 - 83
- Narayanan, B.A., Geoffrey, O., Willingham, M.C., Re, G.G. und Nixon, D.W. (1999)
P53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in
ellagic acid treated cancer cells
Cancer Lett. **136**, 215 - 221
- Neumann, M., Wilisch, A., Diddens, H., Probst, H. und Gekeler, V. (1992)
MDR hamster cells exhibiting multiple altered gene expression: effects of
dexamethasone-HCl (B859-35), cyclosporin A and buthionine sulfoximine
Anticancer Res. **12**, 2297 - 2302
- Niinobe, M., Yamaguchi, Y., Fukuda, M. und 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. Com. **205**, 1036 - 1042
- Nishizuka, Y. (1988)
The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular
regulation
Nature **334**, 661 - 665
- Nishizuka, Y. (1992)
Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of
protein kinase C
Science **258**, 607 - 614

- Norris, F.A., Ungewickell, E. und Majerus, P.W. (1995)
Inositol hexakisphosphate binds to Clathrin assembly protein 3 (AP3/AP180) and inhibits Clathrin cage assembly in vitro
J. Biol. Chem. **270**, 214 - 217
- Ogawa, S., Hirayama, T., Tokuda, M., Hirai, K. und Fukui, S. (1986)
The effect of quercetin, a mutagenicity-enhancing agent, on the metabolism of 2-acetylaminofluorene with mammalian metabolic activation systems
Mutat. Res. **162**, 179 - 186
- Okabe, S., Suganuma, M., Hayashi, M., Sueoka, E., Komori, A. und Fujiki, H. (1997)
Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by tea polyphenols
Jpn. J. Cancer Res. **88**, 639 - 643
- Okabe, S., Ochiai, Y., Aida, M., Park, K., Kim, S.J., Nomura, T., Suganuma, M. und Fujiki, H. (1999)
Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive: effect of compounds on human stomach cancer cell lines
Jpn. J. Cancer Res. **90**, 733 - 739
- Okada, N. und Koizumi, S. (1995)
A neuroprotective compound, aurin tricarboxylic acid, stimulates the tyrosine phosphorylation cascade in PC12 cells
J. Biol. Chem. **270**, 16464 - 16469
- Okada, N. und Koizumi, S. (1997)
Tyrosine phosphorylation of ErbB4 is stimulated by aurintricarboxylic acid in human neuroblastoma SH-SY5Y cells
Biochem. Biophys. Res. Com. **230**, 266 - 269
- Olgiatei, K.L. und Toscano, W.A. (1983)
Kinetics of gossypol inhibition of bovine lactate dehydrogenase X
Biochem. Biophys. Res. Com. **115**, 180 - 185

- Olgianti, K.L., Toscano, D.G., Atkins, W.M. und Toscano, W.A. (1984)
Gossypol inhibition of adenylate cyclase
Arch. Biochem. Biophys. **231**, 411 - 415
- Ono, K. und Nakane, H. (1990)
Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids
J. Biochem. **108**, 609 - 613
- Paschka, A.G., Butler, R. und Young, C.Y.-F. (1998)
Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin - gallate
Cancer Lett. **130**, 1 - 7
- Perchellet, J.P., Gali, H.U., Perchellet, E.M., Klish, D.S. und Armbrust, A.D. (1992)
Antitumor-promoting activities of tannic acid, ellagic acid, and several gallic acid derivatives in mouse skin
Basic-Life-Sci. **59**, 783 - 801
- Prajda, N., Singhal, R.L., Yeh, Y.A., Olah, E., Look, K.Y. und Weber, G. (1995)
Linkage of reduction in 1-phosphatidylinositol 4-kinase activity and inositol 1,4,5-trisphosphate concentration in human ovarian carcinoma cells treated with quercetin
Life Sci. **56**, 1587 - 1593
- Putney, J.W., Jr. (1986)
A model for receptor-regulated calcium entry
Cell calcium **7**, 1 - 12
- Qian, Z.S. und Wang, Z.G. (1984)
Gossypol: a potential antifertility agent for males
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **24**, 329 - 360

Randazzo, P.A. (1997)

Functional interaction of ADP-ribosylation factor 1 with
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
J. Biol. Chem. **272**, 7688 - 7692

Rao, P.N., Wang, Y.-C., Lotzova, E., Khan, A.A., Rao, S.P. und Stephens, L.C. (1985)

Antitumor effects of gossypol on murine tumors
Cancer Chemother. Pharmacol. **15**, 20 - 25

Reymann, A., Looft, G., Woermann, C., Dietel, M. und Erttmann, R. (1993)

Reversal of multidrug resistance in Friend leukemia cells by dexniguldipine-HCl
Cancer Chemother. Pharmacol. **32**, 25 - 30

Richter, A. und Davies, D.E. (1995)

Effects of anthralin and hypericin on growth factor signalling and cell proliferation in
vitro
Biochem. Pharmacol. **50**, 2039 - 2045

Riou, G.P., Gabillot, M., Barrois, M., Breitburd, F. und Orth, G. (1985)

A type-II DNA topoisomerase and a catenating protein from the transplantable VX2
carcinoma
Eur. J. Biochem. **146**, 483 - 488

Rodgers, E.H. und Grant, M.H. (1998)

The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and
enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells
Chem. Biol. Interact. **116**, 213 - 228

Rosenberg, L.J., Adlakha, R.C., Desia, D.M. und Rao, P.N. (1986)

Inhibition of DNA polymerase alpha by gossypol
Biochim. Biophys. Acta **866**, 258 - 267

Royer, R.E. und Vander-Jagt, D.L. (1983)

Gossypol binds to a high-affinity binding site on human serum albumin
FEBS-Lett. **157**, 28 - 30

- Royer, R.E., Mills, R.G., Deck, L.M., Mertz, G.J. und Vander Jagt, D.L. (1991)
Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by derivatives of gossypol
Pharmacol Res. **24**, 407 - 412
- Ruckstuhl, M., Beretz, A., Anton, R. und Landry, Y. (1979)
Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors
Biochem. Pharmacol. **28**, 535 - 538
- Rui, H., Xu, J., Mehta, S., Fang, H., Williams, J., Dong, F. und Grimley, P.M. (1998)
Activation of the Jak2-Stat5 signaling pathway in Nb2 lymphoma cells by an anti-apoptotic agent, aurintricarboxylic acid
J. Biol. Chem. **273**, 28 - 32
- Ryu, S.O., Lee, S.Y., Lee, K.Y. und Rhee, S.G. (1987)
Catalytic properties of inositol trisphosphate kinase: activation by Ca^{2+} and calmodulin
FASEB J. **1**, 388 - 393
- Safrany, S.T., Sawyer, D., Wojcikiewicz, R.J.H., Nahorski, S.R. und Potter, B.V.L. (1990)
 Ca^{2+} -mobilising properties of synthetic fluoro-analogues of myo-inositol 1,4,5-trisphosphate and their interaction with myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase and 5-phosphatase
FEBS Lett. **276**, 91 - 94
- Safrany, S.T., Wojcikiewicz, R.J., Strupish, J., Nahorski, S.R., Dubreuil, D., Cleophax, J., Gero, S.D. und Potter, B.V. (1991)
Interaction of synthetic D-6-deoxy-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate with the Ca^{2+} -releasing D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, and the metabolic enzyme 5-phosphatase and 3-kinase
FEBS Lett. **278**, 252 - 256
- Saiardi, A., Erdjument-Bromage, H., Snowman, A., Tempst, P. und Snyder, S.H. (1999)
Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases
Curr. Biol. **9**, 1323 - 1326

- Saiardi, A., Caffrey, J.J., Snyder, S.H. und Shears, S.B. (2000a)
The inositol hexakisphosphate kinase family
J. Biol. Chem. **275**, 24686 – 24692
- Saiardi, A., Caffrey, J.J., Snyder, S.H. und Shears, S.B. (2000b)
Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in
Saccharomyces cerevisiae
FEBS Lett. **468**, 28 - 32
- Sakamoto, K., Venkatraman, G. und Shamsuddin, A.M. (1993)
Growth inhibition and differentiation of HT-29 cells in vitro by inositol hexaphosphate
(phytic acid)
Carcinogenesis **14**, 1815 - 1819
- Sakaria, J.N., Tibbetts, R.S., Busby, E.C., Kennedy, A.P., Hill, D.E. und Abraham, R.T.
(1998)
Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent
wortmannin
Cancer Res. **58**, 4375 - 4382
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463 - 5467
- Sasakawa, N., Sharif, M. und Hanley, M.R. (1995)
Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol
hexakisphosphate
Biochem. Pharmacol. **50**, 137 - 146
- Segel, I.H. (1993)
Enzyme kinetics; Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state
enzyme systems
John Wiley & Sons, INC.

Shamsuddin, A.M. und Yang, G.Y. (1995)

Inositol hexaphosphate inhibits growth and induces differentiation of PC-3 human prostate cancer cells

Carcinogenesis **16**, 1975 - 1979

Shamsuddin, A.M., Yang, G.Y. und Vucenik, I. (1996)

Novel anti-cancer functions of IP₆: Growth inhibition and differentiation of human mammary cancer cell lines in vitro

Anticancer Res. **16**, 3287 - 3292

Shamsuddin, A.M., Vucenik, I. und Cole, K.E. (1997)

IP₆: A novel anti-cancer agent

Life Sciences **61**, 343 - 354

Shears, S.B. (1991)

Regulation of the metabolism of 1,2-diacylglycerols and inositol phosphates that respond to receptor activation

Pharmac. Ther. **49**, 79 - 104

Shears, S.B. (1998)

The versatility of inositol phosphates as cellular signals

Biochem. Biophys. Acta **1436**, 46 - 67

Shelley, M.D., Hartley, L., Fish, R.G., Groundwater, P., Morgan, J.J.G., Mort, D., Mason, M. und Evans, A. (1999)

Stereo-specific cytotoxic effects of gossypol enantiomers and gossypolone in tumour cell lines

Cancer Lett. **135**, 171 - 180

Shidaifat, F., Canatan, H., Kulp, S.K., Sugimoto, Y., Chang, Y.C., Zhang, Y.,

Brueggemeier, R.W., Somers, W.J., und Lin, Y.C. (1996)

Inhibition of human prostate cancer cells growth by gossypol is associated with stimulation of transforming growth factor- β

Cancer Lett. **107**, 37 - 44

- Shidaifat, F., Canatan, H., Kulp, S.K., Sugimoto, Y., Zhang, Y., Brueggemeier, R.W., Somers, W.J., Chang, W.Y., Wang, H.-C. und Lin, Y.C. (1997)
Gossypol arrests human benign prostatic hyperplastic cell growth at G0/G1 phase of the cell cycle
Anticancer Res. **17**, 1003 - 1010
- Shin, Y.S., Choi, G. und Choi, K.Y. (1995)
Overexpression, purification and characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from rat brain
Mol. Cells. **5**, 348 - 353
- Shoskes, D.A., Zeitlin, S.I., Shahed, A. und Rajfer, J. (1999)
Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial
Urology **54**, 960 - 963
- Sim, S.S., Kim, J.W. und Rhee, S.G. (1990)
Regulation of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C
J. Biol. Chem. **265**, 10367 - 10372
- Singhal, R.L., Yeh, Y.A., Prajda, N., Olah, E., Sledge, G.W. Jr. und Weber, G. (1995)
Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells
Biochem. Biophys. Res. Com. **208**, 425 - 431
- Spinozzi, F., Pagliacci, M.C., Migliorati, G., Moraca, R., Grignani, F., Riccardi, C. und Nicoletti, I. (1994)
The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells
Leukemia Res. **18**, 431 - 439
- Srivastava, A. (1985)
Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin
Biochem. Biophys. Res. Com. **131**, 1 - 5

- Stephens, L.R., Jackson, T.R. und Hawkins, P.T. (1993a)
Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system?
Biochem. Biophys. Acta **1179**, 27 - 75
- Stephens, L., Radenberg, T., Thiel, U., Vogel, G., Khoo, K.H., Dell, A., Jackson, T.R., Hawkins, P.T. und Mayr, G.W. (1993b)
The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate(s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate(s)
J. Biol. Chem. **268**, 4009 - 4015
- Stoner, G.D. und Morse, M.A. (1997)
Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer
Cancer Lett. **114**, 113 - 119
- Stricker, R., Hülser, E., Fischer, J., Jarchau, Th., Walter, U., Lottspeich, F. und Reiser, G. (1997)
cDNA cloning of porcine p42^{IP4}, a membrane-associated and cytosolic 42 kDa inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor from pig brain with similarly high-affinity for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
FEBS-Lett. **405**, 229 - 236
- Suolinna, E.-M., Buchsbaum, R.N. und Racker, E. (1975)
The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells
Cancer Res. **35**, 1865 - 1872
- Takahashi, I., Nakanishi, S., Kobayashi, E., Nakano, H., Suzuki, K. und Tamaoki, T. (1989)
Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: Possible relation to their antiretroviral activity
Biochem. Biophys. Res. Com. **165**, 1207 - 1212
- Takazawa, K., Passareiro, H., Dumont, J.E. und Erneux, C. (1989)
Purification of bovine brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
Biochem. J. **261**, 483 - 488

- Takazawa, K., Lemos, M., Delvaux, A., Lejeune, C., Dumont, J.E. und Erneux, C. (1990a)
Rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
Biochem. J. **268**, 213 - 217
- Takazawa, K., Vandekerckhove, J., Dumont, J.E. und Erneux, C. (1990b)
Cloning and expression in Escherichia coli of a rat brain cDNA encoding a
Ca²⁺/calmodulin-sensitive inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
Biochem. J. **272**, 107 - 112
- Takazawa, K., Perret, J., Dumont, J.E. und Erneux, C. (1991a)
Molecular cloning and expression of a human brain
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
Biochem. Biophys. Res. Com. **174**, 529 - 535
- Takazawa, K., Perret, J., Dumont, J.E. und Erneux, C. (1991b)
Molecular cloning and expression of a new putative
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme
Biochem. J. **278**, 883 - 886
- Takazawa, K. und Erneux, C. (1991c)
Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in rat brain
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
Biochem. J. **280**, 125 - 129
- Tamaoki, T. und Nakano, H. (1990)
Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin
Biotechnology **8**, 732 - 735
- Tan, Z., Bruzik, K.S. und Shears, S.B. (1997)
Properties of the inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate 1-kinase purified from rat liver
J. Biol. Chem. **272**, 2285 - 2290
- Tanphaichitr, N., Agulnick, A. und Hill, J.A. (1989)
Inhibitory effects of gossypol analogs on human sperm motility
Contraception **36**, 687 - 697

- Tarver, A.P. und Anderson, R.E. (1988)
Detection of inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in retina
Biochem. J. **250**, 891 - 895
- Teel, R.W. (1986)
Ellagic acid binding to DNA as a possible mechanism for its antimutagenic and anticarcinogenic action
Cancer Lett. **30**, 329 - 336
- Theibert, A.B., Estevez, V.A., Mourey, R.J., Marecek, J.F., Barrow, R.K., Prestwich, G.D. und Snyder, S.H. (1992)
Photoaffinity labeling and characterization of isolated inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate- and inositol hexakisphosphate-binding proteins
J. Biol. Chem. **267**, 9071 - 9079
- Thomas, M., Von Hagen, V., Moustafa, Y., Montmasson, M.-P. und Monet, J.D. (1991)
Effects of gossypol on the cell cycle phases in T47-D human breast cancer cells
Anticancer Res. **11**, 1469 - 1476
- Thomas, C. und Pardini, R.S. (1992)
Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells
Photochem. Photobiol. **55**, 831 - 837
- Thomas, C., MacGill, R.S., Miller, G.C. und Pardini, R.S. (1992)
Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase
Photochem. Photobiol. **55**, 47 - 53
- Timerman, A.P., Mayrleitner, M.M., Lukas, T.J., Chadwick, C.C., Saito, A., Watterson, D.M., Schindler, H. und Fleischer, S. (1992)
Inositol polyphosphate receptor and clathrin assembly protein AP-2 are related proteins that form potassium-selective ion channels in planar lipid bilayers
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 8976 - 8980

Tso, W.-W. (1984)

Gossypol inhibits Ehrlich ascites tumor cell proliferation
Cancer Lett. **24**, 257 - 261

Tuszynski, G.P. und Cossu, G. (1984)

Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines
Cancer Res. **44**, 768 - 777

Uda, Y., Price, K.R., Williamson, G. und Rhodes, M.J.C. (1997)

Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids
Cancer Lett. **120**, 213 - 216

Umekawa, H., Takada, Y., Furuichi, Y., Takahashi, T., Achiwa, Y., Komiya, T. und Yoshida, S. (1999)

Inhibition of eukaryotic DNA polymerase alpha by persimmon (*Diospyros kaki*) and related polyphenols
Biochem. Mol. Biol. Int. **47**, 795 - 801

Vajanaphanich, M., Schultz, C., Rudolf, M., Wasserman, M., Enyedi, P., Craxton, A., Shears, S.B., Tsien, R.Y., Barrett, K.E. und Traynor-Kaplan, A. (1994)

Long-term uncoupling of chloride secretion from intracellular calcium levels by Ins(3,4,5,6)P₄
Nature **371**, 711 - 714

Valcic, S., Timmermann, B.N., Alberts, D.S., Wachter, G.A., Krutzsch, M., Wymer, J. und Guillen, J.M. (1996)

Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines
Anticancer Drugs **7**, 461 - 468

Vandenbogaerde, A.L., Geboes, K.R., Cuveele, J.F., Agostinis, P.M., Merlevede, W.J. und De Witte, P.A. (1996)

Antitumor activity of photosensitized hypericin in A431 cell xenografts
Anticancer Res. **16**, 1619 - 1626

- Van Dijken, P., Lammers, A.A., Ozaki, S., Potter, B.V.L., Erneux, C. und Van Haastert, P.J.M. (1994)
Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate analogues by 3-kinase and dephosphorylation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate analogues by 5-phosphatase
Eur. J. Biochem. **226**, 561 - 566
- Vantieghem, A., Assefa, Z., Vandenabeele, P., Declercq, W., Courtois, S., Vandenheede, J.R., Merlevede, W., De Witte, P. und Agostinis, P. (1998)
Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis
FEBS-Lett. **440**, 19 - 24
- Vanweyenbergh, V., Communi, D., D'Santos, C.S. und Erneux, C. (1995)
Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase isoenzymes
Biochem. J. **306**, 429 - 435
- Varma, S.D., Mikuni, I., and Kinoshita, J.H. (1975)
Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase
Science **188**, 1215 - 1216
- Voglmaier, S.M., Keen, J.H., Murphy, J.E., Ferris, C.D., Prestwich, G.D., Snyder, S.H. und Theibert, A.B. (1992)
Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2
Biochem. Biophys. Res. Com. **187**, 158 - 163
- Voglmaier, S.M., Bembenek, M.E., Kaplin, A.I., Dormán, G., Olszewski, J.D., Prestwich, G.D. und Snyder, S.H. (1996)
Purified inositol hexakisphosphate kinase is an ATP synthase: Diphosphoinositol pentakisphosphate as a high-energy phosphate donor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 4305 - 4310
- Wang, Y. und Rao, P.N. (1984)
Effect of gossypol on DNA synthesis and cell cycle progression of mammalian cells in vitro
Cancer Res. **44**, 35 - 38

- Wang, J.C. (1985)
DNA topoisomerases
Annu. Rev. Biochem. **54**, 665 - 697
- Wang, Z.-Y., Huang, M.-T., Ferraro, T., Wong, C.-Q., Lou, Y.-R., Reuhl, K., Latropoulos, M., Yang, C.S., und Conney, A.H. (1992a)
Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice
Cancer Res. **52**, 1162 - 1170
- Wang, Z.-Y., Huang, M.-T., Ho, C.T., Chang, R., Ma, W., Ferraro, T., Reuhl, K., Yang, C.S. und Conney, A.H. (1992b)
Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice
Cancer Res. **52**, 6657 - 6665
- Wang, Z.-Y., Huang, M.-T., Lou, Y.-R., Xie, J.-G., Reuhl, K., Newmark, H.L., Ho, C.-T., Yang, C.S. und Conney, A.H. (1994)
Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 mice
Cancer Res. **54**, 3428 - 3435
- Weber, G., Shen, F., Prajda, N., Yeh, Y.A., Yang, H., Herenyiova, M. und Look, K.Y. (1996)
Increased signal transduction activity and down-regulation in human cancer cells
Anticancer Res. **16**, 3271 - 3282
- Wie, Y.-Q., Zhou, Y., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K. und Uchida, A. (1994)
Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock proteins
Cancer Res. **54**, 4952 - 4957
- Wilcox, R.A., Safrany, S.T., Lampe, D., Mills, S.J., Nahorski, S.R. und Potter, B.V.L. (1994)
Modification at C2 of myo-inositol 1,4,5-trisphosphate produces inositol trisphosphates and tetrakisphosphates with potent biological activities
Eur. J. Biochem. **223**, 115 - 124

Wilson, M.P. und Majerus, P.W. (1997)

Characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana*
inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase
Biochem. Biophys. Res. Com. **232**, 678 - 681

Wong, W.S. und McLean, A.E. (1999)

Effects of phenolic antioxidants and flavonoids on DNA synthesis in rat liver, spleen,
and testis in vitro
Toxicology **139**, 243 - 253

Woodring, P.J. und Garrison, J.C. (1996)

Transformation of Rat-1 fibroblasts with the v-src oncogene induces
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase expression
Biochem. J. **319**, 73 - 80

Woodring, P.J. und Garrison, J.C. (1997)

Expression, purification and regulation of two isoforms of the
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
J. Biol. Chem. **272**, 30447 - 30454

Wu, Y.W., Chik, C.L. und Knazek, R.A. (1989)

An in vitro and in vivo study of antitumor effects of gossypol on human SW-13
adrenocortical carcinoma
Cancer Res. **49**, 3754 - 3758

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. und Currie, A.R. (1980)

Cell death: the significance of apoptosis
Int. Rev. Cytol. **68**, 251 - 253

Xie, W., Kaetzel, M.A., Bruzik, K.S., Dedman, J.R., Shears, S.B. und Nelson, D.J. (1996)

Inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate inhibits the Calmodulin-dependent
protein kinase II-activated chloride conductance in T84 colonic epithelial cells
J. Biol. Chem. **271**, 14092 - 14097

- Xu, Y., Ho, C.T., Amin, S.G., Han, C. und Chung, F.L. (1992)
Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants
Cancer Res. **52**, 3875 - 3879
- Yamaguchi, K., Hirata, M. und Kuriyama, H. (1988)
Purification and characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from pig aortic smooth muscle
Biochem. J. **251**, 129 - 134
- Yang, C.S., Lee, M.J., Chen, L. und Yang, G.Y. (1997)
Polyphenols as inhibitors of carcinogenesis
Environmental Health Perspectives **105**, 971 - 976
- Yang, C.S., Yang, G.Y., Landau, J.M., Kim, S. und Liao, J. (1998)
Tea and tea polyphenols inhibit cell hyperproliferation, lung tumorigenesis, and tumor progression
Exp. Lung. Res. **24**, 629 - 639
- Yang, G.Y.; Liao, J., Kim, K., Yurkow, E.J. und Yang, C.S. (1998)
Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols
Carcinogenesis **19**, 611 - 616
- Yang, X., Rudolf, M., Carew, M.A., Yoshida, M., Nerreter, V., Riley, A.M., Chung, S.K., Bruzik, K.S., Potter, B.V.L., Schultz, C. und Shears, S.B. (1999)
Inositol 1,3,4-trisphosphate acts in vivo as a specific regulator of cellular signaling by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate
J. Biol. Chem. **274**, 18973 - 18980
- Ye, W., Ali, N., Bembenek, M.E., Shears, S.B. und Lafer, E.M. (1995)
Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3
J. Biol. Chem. **270**, 1564 - 1568

- York, J.D., Odom, A.R., Murphy, R., Ives, E.B. und Wentz, S.R. (1999)
A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export
Science **285**, 96 - 100
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., Nishino, H. und Aoike, A. (1990)
The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells
FEBS-Lett. **260**, 10 - 13
- Yoshida, M., Yamamoto, M. und Nikaido, T. (1992)
Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle
Cancer Res. **52**, 6676 - 6681
- Yoshida, Y. und Imai, S. (1997)
Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
Jpn. J. Pharmacol. **74**, 125 - 137
- Yu, B.-Z., Rogers, J., Ranadive, G., Baker, S., Wilton, D.C., Apitz-Castro, R. und Jain, M. K. (1997)
Gossypol modification of Ala-1 of secreted phospholipase A2: a probe for the kinetic effects of sulfate glycoconjugates
Biochemistry **36**, 12400 - 12411
- Zhang, W., Lawa, R.E., Hinton, D.R., Su, Y. und Couldwell, W.T. (1995)
Growth inhibition and apoptosis in human neuroblastoma SK-N-SH cells induced by hypericin, a potent inhibitor of protein kinase C
Cancer Lett. **96**, 31 - 35
- Zhang, W., Law, R.E., Hinton, D.R. und Couldwell, W.T. (1997)
Inhibition of human malignant glioma cell motility and invasion in vitro by hypericin, a potent protein kinase C inhibitor
Cancer Lett. **120**, 31 - 38

Zhang, Y., Schols, D. und De Clercq, E. (1999)

Selective activity of various antiviral compounds against HHV-7 infection

Antiviral Res. **43**, 23 - 35

Zhao, Y., Cao, J., Ma, H. und Liu, J. (1997)

Apoptosis induced by tea polyphenols in HL-60 cells

Cancer Lett. **121**, 163 - 167

7. Anhang

Nachfolgend sind die verwendeten Chemikalien und Inhibitoren aufgeführt, die nach Anhang 6 der Gefahrstoffverordnung mit Gefahrensymbolen und Sicherheitsratschlägen versehen sind.

7.1. Gefahrstofflisten

Tab. 7.1.1.: Lösungsmittel

Lösungsmittel	Kennzeichnung	Gefahrenhinweise R-Sätze	Sicherheitsratschläge S-Sätze
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Eisessig	C	10-35	23,2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Isoamylalkohol	Xn	10-20	24/25
Isobutanol	Xn	10-20	16
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45

Tab. 7.1.2.: Reagenzien

Reagenzien	Kennzeichnung	R-Sätze	S-Sätze
Acrylamid	T	45-46-E24/25- E48/23/24/25	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Benzamidin	Xi	36/37/38	26-36
Calciumchlorid-Dihydrat	Xi	36	22-24
1,4-Dithiothreitol	Xn	22-36/38	24-25
Ethidumbromid	T+, Xn, Xi	22-26-36/37/38-40	26-28, 2-36/37-45
Kalilauge	C	22-35	26-36/37/39-45
Natriumcyanoborhydrid	F, C	15-32-34	26-36/37/39-43, 6-45
Natriumdodecylsulfat	Xn	22-36/38	26-36
Natriumfluorid	T	25-32-36/38	22-36-45
Propidiumjodid	T+	40	36/37-45
Salzsäure	C	34-37	26-36/37/39-45

Tab. 7.1.2.: Fortsetzung

Reagenzien	Kennzeichnung	R-Sätze	S-Sätze
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	F, C	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Trichloressigsäure	C	35	24/25-26-45
Tris(hydroxymethyl)-aminoethan	Xi	36/38	24-25
Triton X-100	Xn	22-41	24-26-39
Trypanblau-Lösung	Xn	40	22-36/37
Trypsin	Xn	36/37/38-42	22-24-26-36/37
Xylencyanol	Xi	36	24

Tab. 7.1.3.: Inhibitoren

Inhibitoren	Kennzeichnung	R-Sätze	S-Sätze
O-Acetylsalicylsäure	T	25	36/37/39-45
Adriamycin	T	45-46-22	53-36/37/39-45
Aesculetin	Xi	36/37/38	26-36
Aloin	Xi	36/37/38	26-36
Apigenin	Xi	36/38	26-36
Aurintricarbonsäure	Xi	36/38	26-36
Baicalein	Xi	36/37/38	26-36
(-)-Catechin	Xi	36/37/38	26-36
Chinalizarin	Xi	36/37/38	26-36
Compound-5-Methylester	Xn	20/21/22	22-24/25-36/37/39-45
Cromolyn	Xi	36/37/38	26-36
Curcumin	Xi	36/37/38	26-36
Daidzein	Xi	36/38	24-26
Daunomycin	T	45-22	53-36/37-45
L-Dopa	Xn	22	10-23
Ellagsäure	Xi	36/37/38	26-36
Embonsäure	Xi	36/37/38	26-36
Emodin	Xi	36/37/38	26-36
(-)-Epicatechin	Xi	36/37/38	26-36
(-)-Epicatechin Gallat	Xi	36/37/38	26-36
(-)-Epigallocatechin Gallat	Xi	36/37/38	26-36
Etoposid	T	23/24/25-46-61	22-36/37/39-45
Fluoresceinisothiocyanat	Xn	42	22-24/25
Gallussäure	Xi	37/38-41	26-36
Genistein	Xn, Xi	36/37/38-40	22-24/25-26-36/37/39-45
Gossypol	Xn	22-40	22-36
Herbimycin A	Xn	40	22-36
Hypericin	Xn	22	22-36
DL-Laudanosolin	T	23/24/25	28-27-45-36/37/39

Tab. 7.1.3.: Fortsetzung

Inhibitoren	Kennzeichnung	R-Sätze	S-Sätze
Morin	Xi	36/37/38	26-36
Naphthalin-1,4,5,8-tetracarbonsäureanhydrid	Xi	36/37/38	26-36
Naringenin	Xi	36/37/38	26-36
Nordihydroguaiaretiksäure	Xi	22-36/37/38	26-36
Perylentetracarbonsäure	Xi	36/37/38	26-36
Pseudohypericin	Xn	20	22-36
Purpurin	Xi	36/37/38	26-36
Quercetin	T	25-40	36/37/39-45
Rhein	Xi	36/37/38	26
Robinetin	Xn	22	22-45
Rottlerin	Xn	20/21/22-40	22-24/25-36/37/39-45
Staurosporin	T	23/25-36/37/38-45-63	22-36/37/39-45-53
Stigmatellin	T	25	36/37/39-45
Taxifolin	Xi	22	36
Taxol	T	23/24/25-37/38-41-46-60	22-26-36/37/39-45
Tetracyclin	Xn	22-40-63	36/37
Tetrahydroxychinon	Xi	36/37/38	26-36
L-Thyroxin	Xn	20/21/22	36/37
Tyrphostin A51	Xi	36/37/38	26-36
Tyrphostin B42	Xi	36/37/38	26-36
Tyrphostin B46	Xi	36/37/38	26-36
Warfarin	T	61-48/25	53-45
Wortmannin	T+	26/27/28	22-36/37/39-45
Zearalenon	T	45	53-45

7.2. Abkürzungen

7.2.1. Allgemeine Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Arf	ADP-ribosylation Faktor
APS	Ammoniumpersulfat
ATA	Aurintricarboxylsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Ba ²⁺	Barium
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-uridin
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure
CDP	Cytidindiphosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CIF	calcium influx factor
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
D-2-ax	axiale D-2-Position
D-2-ax-OH	axiale D-2-Hydroxylgruppe
D-2-ax-P	axiale D-2-Phosphatgruppe
D-3*-ax-OH	strukturell äquivalente axiale D-3-Hydroxylgruppe
D-3-äq-OH	äquatoriale D-3-Hydroxylgruppe
D-5*-äq-OH	strukturell äquivalente D-5-Hydroxylgruppe
D-6-äq-OH	äquatoriale D-6-Hydroxylgruppe
D-1-äq-P	äquatoriale D-1-Phosphatgruppe
D-4-äq-P	äquatoriale D-4-Phosphatgruppe
D-5-äq-P	äquatoriale D-5-Phosphatgruppe
D-(1-äq-P, 6-äq-P)	vicinales (1,6)-äquatoriales Bisphosphatcluster
D-(3-äq-P, 4-äq-P)	vicinales (3,4)-äquatoriales Bisphosphatcluster
D-(4-äq-P, 5-äq-P)	vicinales (4,5)-äquatoriales Bisphosphatcluster

D-(5-äq-P, 6-äq-P)	vicinales (5,6)-äquatoriales Bisphosphatcluster
DAG	Diacylglycerol
db.cAMP	Dibutyryl-cAMP
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNIG	Dexniguldipin
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Enzym
EC50	Effektivdosis 50
ECG	(-)-Epicatechingallat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	(-)-Epigallocatechin
EGCG	(-)-Epigallocatechingallat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI	Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex
FBS	Fötales Rinderserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
G418	Geneticin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAP1 ^{IP4BP}	GTPase aktivierendes Protein, welches IP4 bindet
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden (<i>hours</i>)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
HMW	High molecular wight
I	Inhibitor
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung hervorruft
I _{CRAC}	calcium-release-activated-current

Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase	Inositol (1,4,5)-trisphosphat 3-Kinase
InsP ₃ 3-Kinasen	Inositoltrisphosphat 3-Kinasen
IP ₄ BP ₂	Inositol (1,3,4,5)-tetrakisphosphat-bindendes Protein
IRES	internal ribosome entry site
Kap.	Kapitel
k _{cat}	katalytische Konstante
K _d	Dissoziationskonstante
K _i	Hemmkonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
K _{m,app}	apparente Michaelis-Menten-Konstante
K _s	Dissoziationskonstante des Substrats
K _{s app}	apparente Dissoziationskonstante des Substrats
LDH	L-Lactatdehydrogenase
LMW	Low molecular wight
MAPKs	Mitogen-aktivierten Proteinkinasen
MCS	multiple cloning site
MDD	Metal-dye-detection
MDR	Multi-Drogen-Resistenz-Transportprotein
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	millimolar
NaCNBH ₄	Natriumcyanoborhydrid
NADH	hydriertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ PO ₄	Dinatriumphosphat
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
PAR	4-(2-Pyridyl-(2)-azo)-resorcin Mononatriumsalz
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Blutplättchen spez. Wachstumsfaktor
PDT	photodynamischen Therapie
PEP	Phosphoenolpyruvat
PH-Domäne	pleckstrin homology Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase

PIK	1-Phosphatidylinositol 4-Kinase
PIP-Kinase	1-Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase
PK	Pyruvatkinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PP-InsP ₅	Diphosphoinositolpentakisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sr ²⁺	Strontium
t	Zeit (<i>time</i>)
TAE	Tris-Acetat/ EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U	enzymatische Einheit (<i>unit</i>)
UV	ultraviolettes Licht
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
VP-16	Etoposid
YCl ₃	Yttriumchlorid
z.A.	zur Analyse

7.2.2. Myo-Inositolphosphate und Phosphatidylinositole

InsPs	Inositolphosphate
InsP ₅	Inositolpentakisphosphat
InsP ₆	Inositolhexakisphosphat
IP ₄	Inositoltetrakisphosphat
D-Ins(1,3)P ₂	D-Inositol (1,3)-bisphosphat
D-Ins(1,4)P ₂	D-Inositol (1,4)-bisphosphat
Ins(3,4)P ₂	Inositol (3,4)-bisphosphat
D-Ins(4,5)P ₂	D-Inositol (4,5)-bisphosphat
m-Ins(1,2,3)P ₃	m-Inositol (1,2,3)-trisphosphat
D-Ins(1,3,4)P ₃	D-Inositol (1,3,4)-trisphosphat
L-Ins(1,3,4)P ₃	L-Inositol (1,3,4)-trisphosphat
D-Ins(1,4,5)P ₃	D-Inositol (1,4,5)-trisphosphat
D-Ins(1,4,6)P ₃	D-Inositol (1,4,6)-trisphosphat
L-Ins(1,4,6)P ₃	L-Inositol (1,4,6)-trisphosphat
D/L-Ins(1,5,6)P ₃	D/L-Inositol (1,5,6)-trisphosphat
D-Ins(2,4,5)P ₃	D-Inositol (2,4,5)-trisphosphat
D-Ins(3,4,5)P ₃	D-Inositol (3,4,5)-trisphosphat
m-Ins(4,5,6)P ₃	m-Inositol (4,5,6)-trisphosphat
D/L-Ins(1,2,3,4)P ₄	D/L-Inositol (1,2,3,4)-tetrakisphosphat
D-Ins(1,2,4,5)P ₄	D-Inositol (1,2,4,5)-tetrakisphosphat
L-Ins(1,2,4,5)P ₄	L-Inositol (1,2,4,5)-tetrakisphosphat
D/L-Ins(1,2,4,5)P ₄	D/L-Inositol (1,2,4,5)-tetrakisphosphat
D-Ins(1,2,4,6)P ₄	D-Inositol (1,2,4,6)-tetrakisphosphat
D-Ins(1,3,4,5)P ₄	D-Inositol (1,3,4,5)-tetrakisphosphat
m-Ins(1,3,4,6)P ₄	m-Inositol (1,3,4,6)-tetrakisphosphat
D-Ins(1,4,5,6)P ₄	D-Inositol (1,4,5,6)-tetrakisphosphat
D/L-Ins(2,3,4,5)P ₄	D/L-Inositol (2,3,4,5)-tetrakisphosphat
D/L-Ins(2,4,5,6)P ₄	D/L-Inositol (2,4,5,6)-tetrakisphosphat
D-Ins(3,4,5,6)P ₄	D-Inositol (3,4,5,6)-tetrakisphosphat
D-Ins(1,2,3,4,5)P ₅	D-Inositol (1,2,3,4,5)-pentakisphosphat
D-Ins(1,2,3,4,6)P ₅	D-Inositol (1,2,3,4,6)-pentakisphosphat
D-Ins(1,2,4,5,6)P ₅	D-Inositol (1,2,4,5,6)-pentakisphosphat
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	Inositol (1,3,4,5,6)-pentakisphosphat

PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdInsP	Phosphatidylinositolphosphat
PtdInsP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PtdIns(4)P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat

7.2.3. Substratanaloga

L-chiro-Ins(1,4,6)P ₃	L-chiro-Inositol (1,4,6)-trisphosphat
L-chiro-Ins(2,3,5)P ₃	L-chiro-Inositol (2,3,5)-trisphosphat
GroP-Ins(4)P	Glycerol-inositol-4-monophosphat
GroP-Ins(4,5)P ₂	Glycerol-inositol (4,5)-bisphosphat
3-Hyms-InsP ₃	3-Hyms-Inositoltrisphosphat
neo-Ins(1,3,4)P ₃	neo-Inositol (1,3,4)-trisphosphat
scyllo-Ins(1,2,4)P ₃	scyllo-Inositol (1,2,4)-trisphosphat
scyllo-Ins(1,2,3,5)P ₄	scyllo-Inositol (1,2,3,5)-tetrakisphosphat
scyllo-Ins(1,2,4,5)P ₄	scyllo-Inositol (1,2,4,5)-tetrakisphosphat

7.2.4. Einbuchstaben-Code der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin

R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Lebenslauf

Name: Kirsten Hillemeier
Geburtsdatum: 20.09.1962
Geburtsort: Uetersen, Kreis Pinneberg

Schulbildung:

1969 - 1973: Grundschule Uetersen
1973 - 1979: Realschule Uetersen
1979 - 1982: Ludwig-Meyn-Gymnasium Uetersen

Berufsausbildung:

1982 - 1984: Berufsschule für Chemisch-technische-Assistenten,
Neumünster
1987 - 1990: Abendschule Fachrichtung Chemietechnik, Hamburg

Berufliche Tätigkeiten:

01.01.1985 - 31.12.1986: Chemielaborantin bei Schmidt & Hagen GmbH, Uetersen
01.01.1987 - 19.10.1990: Chemielaborantin bei Noblee & Thörl GmbH, Hamburg
01.09.1992 - 31.10.1992: Studentische Aushilfskraft Nordmark Arzneimittel GmbH, Uetersen
01.08.1993 - 31.10.1993: Studentische Aushilfskraft Beiersdorf-Lilly GmbH, Hamburg
seit 01.09.1995: Technische Assistentin am Universitätsklinikum Eppendorf,
Hamburg
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion

Weiterbildung:

1990 - 1994: Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
01.10.1994 - 30.04.1995: Pharmazeutisches Praktikum Born-Apotheke, Hamburg
01.05.1995 - 31.08.1995: Pharmazeutisches Praktikum Beiersdorf-Lilly GmbH, Hamburg
seit 01.03.1997: Kollegiatin im Graduierten Kolleg 336
„molekulare Endokrinologie und endokriner Stoffwechsel“
seit 01.09.1995: Promotion am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion