Die Inositolhexakisphosphat Kinasen als Sensoren des Adenylat-Energiepotentials

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Torsten Wundenberg
aus Hannover

Hamburg, 2014

Tag der Disputation: 12.12.2014
Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

Erstgutachter:	Prof. Dr. med. Georg W. Mayr Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf Institut für Biochemie und Signaltransduktion Martinistr. 52 20246 Hamburg
Zweitguachter:	PD Dr. rer. nat. Hartwig Lüthen Universität Hamburg Biozentrum Klein Flottbek, Physiologie Ohnhorststr. 18 22609 Hamburg
Drittgutachter	Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf Institut für Immunologie Martinistr. 52 20246 Hamburg

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in

WUNDENBERG, T. and MAYR, G.W. *Synthesis and biological actions of diphosphoinositol phosphates (inositol pyrophosphates), regulators of cell homeostasis.* Biological Chemistry 393(9):979-998, **2012**

WUNDENBERG, T., GRABINSKI, N., LIN, H. and MAYR, G.W. *Discovery of $InsP_6$-kinases as $InsP_6$ dephosphorylating enzymes provides a new mechanism of cytosolic $InsP_6$ degradation driven by the cellular ATP/ADP ratio.* Biochemical Journal in press, **2014**

Inhaltsverzeichnis

Danksagung vi
Zusammenfassung vii
Abstract ix
Abkürzungsverzeichnis xi

1 Einleitung **1**
1.1 Entdeckung und Historie der Inositolphosphate 1
1.2 Nomenklatur und Isomerie der Inositolphosphate 2
1.2.1 Die Konfigurationsisomerie und Ringnummerierung des Inositols 2
1.2.2 Die Benennung der Inositolphosphat Isomere 4
1.3 Der Metabolismus der Inositolphosphate 6
1.3.1 Der Metabolismus der monophosphorylierten Isomere 6
1.3.2 Der Metabolismus der pyrophosphorylierten Inositole 7
1.4 Veränderungen von PP-InsPs korrelieren mit ausgewählten zellulären Vorgängen 9
1.4.1 Enzymunabhängige Pyrophosphorylierung von präphosphorylierten Proteinen und deren Funktion 10
1.4.2 Regulation der Endo- und Exocytose 11
1.4.3 Kompetition der PP-InsPs mit PtdInsPs um Pleckstrin Homologie (PH-) Domänen 13
1.5 Die Familie der PDKG Kinasen 15
1.5.1 Die Inositolhexakisphosphat Kinasen als Mitglieder der PDKG-Kinasen . 16
1.6 PPIP5K, die "jüngste" Inositolpyrophosphat bildende Kinase des Inositolphosphat Metabolismus 18

2 Zielsetzung **21**

3 Material **23**
3.1 Oligonukleotide/Primer 23
3.1.1 Sequenzieroligonukleotide/-primer 23
3.1.2 Klonierungsoligonukleotide/-primer 23
3.1.3 Intronüberspannende Primer für die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) 24
3.2 Geräte 24

3.3 Kits . . . 25
3.4 Chemikalien . . . 25
3.5 Enzyme . . . 25
3.6 Plasmide . . . 26
3.7 Bakterienstämme . . . 26
3.8 Säulenmaterial . . . 26
3.9 Zellkulturmedien und Medienzusätze . . . 27
3.10 Puffer und Lösungen . . . 27

4 Methoden **30**
4.1 Mikrobiologische Methoden . . . 30
4.1.1 Allgemeines mikrobiologisches Arbeiten . . . 30
4.1.2 Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli* . . . 30
4.1.3 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* . . . 30
4.1.4 Transformation von chemokompetenten *Escherichia coli* . . . 31
4.2 Molekularbiologische Methoden . . . 31
4.2.1 Ligation von DNA Fragmenten . . . 31
4.2.2 Kolonie-Polymerase Ketten Reaktion (Kolonie-PCR) als initialer Hinweis von erfolgreichen Ligationen . . . 32
4.2.3 Analytischer Restriktionsverdau von ligierten Plasmiden/Vektoren . . . 33
4.2.4 *QuickChange* PCR-Mutagenese zur gezielten Veränderung von Nukleinsäuren . . . 34
4.2.5 DpnI Restriktionsverdau zur Selektion von gezielt mutagenisierten Amplifikaten . . . 34
4.2.6 Agarose Gelelektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren . . . 35
4.2.7 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) zur Amplifikation von Nukleinsäuren 36
4.2.8 Präparativer Restriktionsverdau zur Vorbereitung von Nukleinsäuren auf eine folgende Ligation . . . 36
4.2.9 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* (Mini Prep) . . . 37
4.2.10 Bestimmung von Nukleinsäure Konzentrationen . . . 37
4.3 Biochemische Methoden . . . 38
4.3.1 Bakterielle Expression von rekombinantem Enzym . . . 38
4.3.2 Lyse von Bakterien zur Gewinnung von löslichem Protein . . . 39
4.3.3 Affinitätschromatographische Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen . . . 39
4.3.4 Vorreinigung der IPMK durch P11 Phosphocellulose Chromatographie . 40
4.3.5 Affinitätschromatographische Reinigung der IPMK als Strep-tag Fusionsprotein . . . 41

4.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 41
4.3.7 Densitometrische Proteinbestimmung 42
4.3.8 Stabilität der rekombinant hergestellten Fusionsproteine 42
4.3.9 Probenvorbereitung für die HPLC-Analyse mit *Metal-Dye-Detection* (MDD-HPLC [127]) 43
4.3.10 Arbeitsweise der MDD-HPLC [127] 43
4.3.11 Auswertung der MDD-HPLC [127] Daten zur Bestimmung der initialen Umsatzgeschwindigkeiten 44
4.3.12 HPLC basierte Nukleotidanalyse zur Quantifizierung 45
4.3.13 Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter für die Nukleotide (ATP bzw. ADP) und die jeweiligen Inositolphosphate 45
4.3.14 Partielle saure Hydrolyse zur Strukturanalyse von pyrophosphorylierten Produkten der $InsP_5$ Phosphorylierung 46
4.3.15 Bestimmung der Inositolphosphat Umsatzgeschwindigkeiten und Äquilibriumskonzentrationen in Gegenwart von unterschiedlichen ATP zu ADP Verhältnissen 46
4.3.16 Messung der $InsP_6$ Phosphorylierung und Dephosphorylierung in einem dynamischen ATP Depletionsassay 47
4.3.17 Messung der $InsP_6$ Dephosphorylierung und Rephosphorylierung in einem dynamischen ATP Regenerationsassay 48
4.3.18 Hemmung der IP6K Aktivität durch TNP *in vitro* 48
4.4 Zellbiologische Methoden 49
4.4.1 Kultivierung von humanen H1299 Karzinomzellen und Hamster DDT_1 MF-2 Karzinomzellen 49
4.4.2 ATP Depletion in H1299 Zellen und DDT_1 MF-2 Zellen durch CCCP . . . 50
4.4.3 Hemmung der zellulären IP6K Aktivität durch TNP in H1299 Zellen und DDT_1 MF-2 Zellen 50
4.4.4 Inositolphosphat Extraktion aus adhärent wachsenden Tumorzelllinien . 51
4.4.5 Zellzahlbestimmung 51
4.4.6 Trypanblau Ausschluss Test zur Messung der Zellvitalität 52

5 Ergebnisse **53**
5.1 Kinetik der Inositolhexakisphosphat Kinasen 53
5.1.1 Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ durch die Isoformen 1, 2 und 3 der IP6K 53
5.1.2 Steigende ADP-Konzentrationen inhibieren die Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ und initiieren einen $InsP_6$ Abbau 54

5.1.3 Verifizierung der $InsP_6$ Dephosphorylierung durch die Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter 55
5.1.4 Dephosphorylierung von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ in Gegenwart von ADP . . . 60
5.2 Enantiomerenzuordnung von $InsP_5$ Isomeren mittels Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK) 62
5.2.1 Die humane IPMK als enantioselektives Werkzeug zur Unterscheidung zwischen den Enantiomeren Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 (D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5) 62
5.2.2 Das Produkt der IP6K katalysierten Dephosphorylierung von $InsP_6$ ist das Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 63
5.2.3 Die einzig bekannte $InsP_6$ Phosphatase MINPP1 bildet ausschließlich das Enantiomer Ins(1,2,4,5,6)P_5 66
5.2.4 Der IP6K katalysierte $InsP_6$ Abbau ist keine klassische Dephosphorylierung sondern eine $InsP_6$/ADP Phosphattransfer-Reaktion 67
5.2.5 Die IP6Ks phosphorylieren sowohl das MINPP1 Produkt Ins(1,2,4,5,6)P_5 als auch ihr eigenes Produkt Ins(2,3,4,5,6)P_5 70
5.2.6 Je nach $InsP_5$ Isomer ist die IP6K eine Hydroxylgruppen Kinase oder auch pyrophosphorylierende Kinase 72
5.3 Einfluss des Adenylat-Energiepotentials auf die IP6K 75
5.3.1 Einfluss des ATP/ADP Molenbruches als Maß des Adenylat-Energiepotential auf die Pyrophosphorylierung und Dephosphorylierung von $InsP_6$ durch die IP6K1 und IP6K2 75
5.3.2 Etablierung von enzymatischen Systemen zur Erhöhung und Erniedrigung des Adenylat-Energiepotentials während der IP6K katalysierten Reaktionen 82
5.3.3 Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ mit nachfolgender Erniedrigung des Energiepotentials führt zur Umkehr der Kinasereaktion 83
5.3.4 Dephosphorylierung von $InsP_6$ zu Ins(2,3,4,5,6)P_5 mit nachfolgender Erhöhung des Energiepotentials führt zur Rephosphorylierung des Produkts 89
5.3.5 Inhibition der IP6K durch TNP *in vitro* und in Zelllinien 93
5.3.6 Viabilität von H1299 und DDT_1 MF-2 Zellen bei Adenylat-Energiepotentialreduktion und IP6K Inhibition 94
5.3.7 $InsP_6$ wird in H1299 Zellen zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 dephosphoryliert . . . 95
5.3.8 MINPP1 ist nicht an der zellulären energieabhängigen $InsP_6$ Dephosphorylierung beteiligt 97
5.3.9 5PP-$InsP_5$, $InsP_6$ und Ins(2,3,4,5,6)P_5 reagieren auf Veränderungen des Energiepotentials in DDT_1 MF-2 Zellen 102

6 Diskussion **105**

6.1 Kinetik der Inositolhexakisphosphat Kinasen 105

6.1.1 Die IP6Ks als ATP abhängige Inositolpyrophosphat bildende Enzyme . . 105

6.1.2 Die IP6 Kinasen sind ADP abhängige 5PP-InsP_5 und InsP_6 dephosphorylierende Enzyme 107

6.2 Enantiomerenzuordnung von InsP_5 Isomeren 108

6.2.1 Die selektive Bildung der Enantiomere Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 charakterisiert zwei voneinander getrennte InsP_6 Abbauwege in Zellen . 108

6.2.2 Ins(2,3,4,5,6)P_5 ist kein Artefakt, sondern wurde bereits enantioselektiv nachgewiesen 109

6.2.3 Neue Synthesewege zum InsP_6 110

6.3 Die IP6K Isoformen sind Sensoren des intrazellulär herrschenden Adenylat Energiepotentials 112

6.4 Ausblick 115

6.4.1 Ins(2,3,4,5,6)P_5 bzw. 5PP-InsP_5 als Signalmoleküle für ein niedriges bzw. hohes Adenylat-Energiepotential? 115

6.4.2 Einordnung der IP6K als Energiesensor bei der Insulinsekretion und peripheren Sensitivität 118

6.4.3 Die IP6K als potentes Ziel für zukünftige Diabetes Typ II Therapeutika . . 120

Wisschenschaftliche Publikationen 138

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Georg W. Mayr für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Biochemie und Signaltransduktion anfertigen zu können. Ich danke ihm für die außergewöhnlichen Freiheiten bei der Konzeptionierung und Bearbeitung der Projekte, sowie der Hilfsbereitschaft bei Schwierigkeiten und das Korrekturlesen dieser Dissertation. Er unterstütze mich nicht nur durch ständige Diskussionsbereitschaft, sondern hatte auch viele Anregungen zu den durchgeführten Experimenten.

Bei Herrn PD Dr. rer. nat. Hartwig Lüthen möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung am Fachbereich Biologie und der Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des Instituts für Biochemie und Signaltransduktion und besonders bei den Mitgliedern der AG Mayr, für das gute Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und natürlich die tolle Zeit am Institut.

Insbesondere möchte ich mich bei Susanne Giehler und Werner Fanick für die praktische Unterstützung bei vielen Fragen, sowie auch bei Frau Dr. Hongying Lin für die Einarbeitung in die MDD-HPLC und bei der Unterstützung der Durchführung der Analysen bedanken. Ein weiterer Dank gilt Angelika Harneit ebenfalls für die Unterstützung aber auch für die wunderbaren Unterhaltungen.

Ich möchte mich bei PD Dr. Marcus Nalaskowski sowie PD Dr. Sabine Windhorst ebenfalls für die Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung der Arbeit bedanken und Herrn Dr. Stefan Marotzki, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, während meiner Arbeit an der Ausbildung von BTA Schülern der School of Life Science in Hamburg mitzuwirken.

Meinen Eltern danke ich für ihre Hilfe während des Studiums und für Ihren grenzenlosen Glauben an Ihren Sohn.

Zu guter Letzt und im Besonderen möchte ich mich bei meiner Frau Kira und meiner Schwägerin Kerrin für die gemeinsame Studienzeit, die ständige Unterstützung und den unermüdlichen Glauben an mich bedanken.

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die humanen Inositol Hexakisphosphat Kinasen (IP6K, Isoformen 1, 2 und 3) bisher unbekannte Reaktionen identifiziert, die die Kinasen als zelluläre Energiesensoren charakterisieren.
Beschrieben wurden diese Kinasen als pyrophosphorylierende Enzyme von Inositolhexakisphosphat ($InsP_6$). Die Kinasereaktion verläuft in Gegenwart von ATP und die IP6K übertragen das γ-Phosphat von ATP auf die Position 5 des Substrates ($InsP_6$) und bilden 5PP-$InsP_5$. 5PP-$InsP_5$ ist ein Isomer welches unter anderem unterschiediche Proteine in ihrer Aktivität regulieren kann. Anhand dieser Arbeit wird deutlich, dass die Kinasen deren Substrat nicht nur pyrophosphorylieren, sondern in Gegenwart von ADP oder eines Gemisches aus ATP und ADP auch dephosphorylieren können. Das Hauptprodukt dieser neu identifizierten Reaktion ist Ins(2,3,4,5,6)P_5 und als Nebenprodukte konnten D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5 und Ins(1,2,3,4,6)P_5 identifiziert werden. Allerdings stellt die IP6K keine klassische hydrolysierende Phosphatase dar, sondern überträgt das Phosphat zur ATP Synthese auf ADP. Das Hauptprodukt Ins(2,3,4,5,6)P_5 stellt das enantiomere Produkt (Ins(1,2,4,5,6)P_5) der bisher einzig bekannten $InsP_6$ Phosphatase MINPP1 dar. Die Identifizierung beider HPLC-chromatographisch nicht trennbarer Produkte erfolgte mit Hilfe einer ebenfalls bisher nicht bekannten und während dieser Arbeit identifizierten Selektivität der Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK) gegenüber $InsP_5$ Isomeren. Die IPMK als Hydroxykinase für $InsP_3$ bzw. $InsP_4$ Isomere phosphoryliert enantioselektiv das MINPP1 Produkt Ins(1,2,4,5,6)P_5 zu $InsP_6$, nicht aber das IP6K Produkt Ins(2,3,4,5,6)P_5, sodass ein hier etablierter enatioselektiver Assay die eindeutige Zuordnung der isolierten Dephosphorylierungsprodukte ermöglicht.
Weitere Untersuchungen zeigten, dass die IP6K beide Dephosphorylierungsprodukte von $InsP_6$, also Ins(1,2,4,5,6)P_5und Ins(2,3,4,5,6)P_5 in Gegenwart von ATP als Hydroxylgruppenkinase wieder zurück zu $InsP_6$ und 5PP-$InsP_5$ rephosphorylieren kann. Die Umkehrreaktion der Kinasereaktion (s.o.), d.h. von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ und weiter zu Ins(2,3,4,5,6)P_5 wird ebenfalls von der IP6K bei Vorhandensein von ADP katalysiert. Es wurde somit eine von [ATP] bzw. [ADP] abhängige IP6K katalysierte Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungssequenz aus den Isomeren Ins(2,3,4,5,6)P_5, $InsP_6$ und 5PP-$InsP_5$ identifiziert. Diese Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungssequenz verläuft allerdings nicht nur in Gegenwart von ausschließlich ATP oder ADP, sondern auch bei physiologisch relevanten Konzentrationsverhältnissen beider Nukleotide.
Die Kombination von unterschiedlichen ATP und ADP Konzentrationen sowie während der IP6K katalysierten Reaktionen variierte Adenylat-Energiepotentiale ([ATP]/([ATP]+[ADP])) spiegeln sich in der Synthese bzw. Konzentrationsgleichgewichten der jeweiligen Isomere wieder. Niedrige Adenylat-Energiepotentiale begünstigen die Dephosphorylierungsreaktionen, hohe Adenylat-Energiepotentiale die Phosphorylierung bzw. Pyrophosphorylierung.

Die mit rekombinant exprimierten und gereinigten IP6K Isoformen *in vitro* erhobenen Daten konnten durch die artifizielle Variation des Adenylat-Energiepotentials in unterschiedlichen Zelllinien untermauert werden. Es konnte gezeigt werden, dass auch dort die IP6K Adenylat-Energiepotential sensitive Kinasen darstellen, die auf Veränderungen des Energiepotentials mit veränderter Produktbildung wie *in vitro* gezeigt reagieren.
Die IP6Ks als zelluläre Energiesensoren spielen im Organismus eine wichtige Rolle, da deren bisher bekanntes Produkt 5PP-InsP_5 (gebildet bei hohem Adenylat-Energiepotential) z.B. die Transkription glykolytischer Enzyme in Hefen steuert und somit direkt auf die Energie erzeugende Glykolyse einwirkt. Hochinteressant ist auch, dass 5PP-InsP_5 ebenfalls die Insulinsekretion aus pankreatischen β-Zellen stimuliert und gleichzeitig die Insulinsensitivität in peripheren Geweben reguliert, was diese Kinase als Target zur Behandlung des Typ II Diabetes höchst wertvoll machen könnte. Die mögliche biologische Funktion des in dieser Arbeit neu identifizierten und physiologisch relevanten Isomers Ins(2,3,4,5,6)P_5 ist allerdings in weiteren Studien noch zu zeigen.

Abstract

In the present thesis the human Inositolhexakisphosphate Kinase (IP6K) Isoforms 1, 2 and 3 are identified as sensors for the cellular adenylate energy potential. The IP6K have previously been described as inositol hexakisphosphate ($InsP_6$) pyrophosphorylating enzymes. In this reaction the IP6K transfer the γ-phosphate from ATP exclusively to the position 5 of the inositol phosphate to synthesize 5PP-$InsP_5$. 5PP-$InsP_5$is an isomer which regulates the activity of several proteins. Due to the present thesis it becomes clear that theIP6K do not only phosphorylate their substrate but also dephosphorylate $InsP_6$ in the presence of ADP. The main product of this reaction was identified as the enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5. The sencondary products from this new reaction were identiied as D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5 and Ins(1,2,3,4,6)P_5, respectively. The IP6K mediated dephosphorylation of $InsP_6$was shown to be a phosphate transfer from $InsP_6$ to ADP resulting in ATP synthesis. Thus the IP6K do not act as classical hydrolyzing phosphatases for $InsP_6$.

The main product Ins(2,3,4,5,6)P_5 was identified to be the enantiomer of Ins(1,2,4,5,6)P_5 which is the sole product of the only known $InsP_6$ phosphatase MINPP1. Due to the impossibility to distinguish enantiomers with standard HPLC-analysis, the clear assignment of the respective enantiomer was provided by a new identified and hitherto unknown catalytic activity of the inositol polyphosphate multikinase (IPMK). The IPMK selectively phosphorylates the 3-hydroxyl moiety of Ins(1,2,4,5,6)P_5 to $InsP_6$ and not the 1-position of Ins(2,3,4,5,6)P_5. Thus the enantiomers could easily be identified by the increase of $InsP_6$after addition of IPMK. Further investigations revealed that both dephosphorylation products from $InsP_6$, regardless of whether they derived from MINPP1 or IP6K catalyzed reactions, are re-phosphorylated to $InsP_6$ and further to 5PP-$InsP_5$ by IP6K. Thus IP6K is a pyrophosphorylating kinase and a hydroxyl moiety kinase for the positions 1 and 3 of $InsP_5$ isomers. Anyway, the IP6K did not only catalyze the phosphorylation of Ins(2,3,4,5,6)P_5 to $InsP_6$ and to 5PP-$InsP_5$ in the presence of ATP, it additionally catalyzes the backreaction (dephosphorylation) from 5PP-$InsP_5$ to $InsP_6$ and to Ins(2,3,4,5,6)P_5 in the presence of ADP. Both reactions, phosphorylation and dephosphorylation, were observed with a combination of both, ATP and ADP in a physiological and pathological range. These results suggest that IP6Ks are sensors for the adenylate energy potential reacting with either dephosphorylation or phosphorylation of its substrates depending on the prevalent adenylate energy potential. The detailed experiments with the recombinant isoforms of the IP6K *in vitro* could be confirmed with different model cell lines. Artificial ATP depletion resulted in dramatic increase of the IP6K mediated dephosphorylation product Ins(2,3,4,5,6)P_5. A specific, concomitant inhibition of cellular IP6K during ATP depletion did not result in such an increase. Emerging evidence suggest a pivotal role or IP6K as cellular adenylate energy sensors for the organism or the cell. The pyrophosphorylation product from $InsP_6$, 5PP-$InsP_5$, is synthesized at a high adenylate energy potential. It has previously been shown that 5PP-$InsP_5$

inhibits the transcription of glycolytic enzymes and thus directly regulating the energy providing glycolysis in yeast. Moreover 5PP-InsP_5 also stimulates the insulin secretion in pancreatic ß-cells and additionally regulates the sensitivity to insulin of cells in peripheral tissue. This highlights IP6K as potential drug target for treatment of diabetes type II. The biological function of the new identified physiological relevant isomer Ins(2,3,4,5,6)P_5, synthesized at a low adenylate energy potential, remains elusive so far and needs to be further investigated.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
AKT/PKB	Akt-Proteinkinase/Proteinkinase B
AMP-PNP	Adenylylimidodiphosphate
AP2	Adaptorprotein 2
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Andenosin-5´-triphosphat
AS	Aminosäure
AS160	AKT Substrat mit160 kDa
BSA	Rinderserumalbumin
Btk	Bruton´s Tyrosin Kinase
Ca^{2+}	Calcium Ion
cAMP	cyclisches AMP
CCCP	Carbonyl cyanide m-cholorophenylhydrazon
cDNA	*complementary* Desoxyribonukleinsäure
CKII	Proteinkinase (früher Caseinkinase II)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRAC	PH-Domänen Protein, beteiligt an cAMP getriebener chemotaxis in *D. discoideum*
CV	*Column Volume* (Säulenvolumen)
DAG	Diacylglycerol
Ddp1	Diphosphoinositolphosphat Phosphatase
DEAE	Diethylaminoethyl
DIPP	Diphosphoinositol-polyphosphat Phosphohydrolase
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DPIPs	Diphosphoinositolphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
FOXO1	*forkhead box O1* (Transkriptionsfaktor)
GCR	Transkriptionsfaktor glykolytischer Enzyme in Hefen
GEF	Guanin Austauschfaktor (*guanin exchange factor*)
GLUT2 /4	Glukose Transporter 2 /4
GRAB	Guanin Austauschfaktor (GEF) für Rab3A
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3

GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N′-2-ethansulfonsäure
HisPPD	Histidinsaure-Phosphatase-ähnliche Domäne
HK	Hexokinase
HPLC	*High pressure/performance liquid chromatographie*
hs	*Homo sapiens*
InsP	Inositolphosphat (allgemein)
$InsP_4$	Inositoltetrakisphosphat
$InsP_5$	Inositolpentakisphosphat
$InsP_6$	Inositolhexakisphosphat
IP3K	Inositoltrisphosphat Kinase
IP6K	Inositolhexakisphosphat Kinase
IP5-2K (IPPK)	Inositolpentakisphosphat-2-Kinase
IPMK	Inositol Polyphosphat Multikinase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	Insulinrezeptor
IRS1	Insulinrezeptor substrat 1
ITPK1	Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-Kinase
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
Kat.D	katalytische Domäne
KCl	Kaliumchlorid
Kcs1	Inositolhexakisphosphatkinase in Hefen
kDa	kilo Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_m	Michaelis Konstante
LMW	*low molecular weight* (Proteinstandard für SDS-PAGE)
µ	mikro (10^{-6})
MDD	*metal dye detection*
min	Minute
MINPP1	Multiple Inositolphosphat-Phosphat Hydrolase 1
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mM	millimolar
mol	Stoffmenge
mTORC	*mammalian target of rapamycin complex*
NaCl	Natriumchlorid
n	nano (10^{-9})

NaF	Natriumfluorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
Nsr1p	nukleäres Protein in Hefen
p	pico (10^{-12})
PAR	4-(2-Pyridyl-(2)-azo-resorcin)
PBD	Phosphoinositid bindende Domäne
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDK	Phosphoinositol abhängige Kinase
PDKG	Aminosäuremotif bei IP-Kinasen
pDNA	Plasmid DNA
Pen/Strep	Penizillin/Streptavidin
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PEP	Phosphoenolpyruvat
PIKE	Protein mit PH-Domäne; nukleäre GTPase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat (vgl. PtdInsP)
PiUS	*anorganic phosphate (Pi) uptake stimulator*
PK	Pyruvatkinase
PLC	Phospholipase C
PI3K	Phosphoinositid 3′-OH-Kinase
PP-InsP	Pyro- bzw. Diphosphoinositolphosphate (allgemein)
PP-$InsP_5$	Pyro- bzw. Diphosphoinositolpentakisphosphat
PP-$InsP_4$	Pyro- bzw. Diphosphoinositoltetrakisphosphat
PP_2-$InsP_3$	Bisdiphosphoinositoltriphosphat
PP_2-$InsP_4$	Bisdiphosphoinositoltetrakisphosphat
PPIP5K1/2	Humane Diphosphoinositolpentakisphosphat Kinase 1/2
PtdInsP	Phosphatidylinositolphosphat
PTM	posttranslationale Modifikation
Rab3A	Protein beteiligt an der Exocytose
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
Rictor	*rapamycin-insensitive companion of mTOR*
SEM	Standardtfehler des Mittelwerts
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

spez. V_0	spezifische, initiale Geschwindigkeit
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TCOF	*Treacle Protein; Treacher Collins Syndrome Protein*
TEMED	N,N,N′,N′-Tetramethylethylendiamin
TGN	*trans Golgi network*
TIAM	Protein mit PH Domäne; Guaninaustauschfaktor für Rho ähnliche GTPasen
TNP	N2-(m-Trifluorobenzyl), N6-(p-nitrobenzyl)purine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBF	*upstream binding factor*
V_0	initiale Geschwindigkeit
Vip	Diphosphoinositolphosphat Kinase in Hefen (vgl. PPIP5K)
V_{max}	maximale Geschwindigkeit
YCl_3	Yttriumchlorid

1 Einleitung

1.1 Entdeckung und Historie der Inositolphosphate

Der Begriff „Inositol“ wurde durch den deutschen Wissenschaftler Johann Joseph Scherer geprägt. 1850 isolierte er ein, wie er es nannte, „zuckerähnliches“ Molekül aus Muskelgewebe und schlug den Namen Inosit vor [1]. Es war das erste Mal, dass diese Bezeichnung in der wissenschaftlichen Welt genannt wurde. Bis heute hat sich die Bezeichnung als Wortstamm bewährt und wird nur durch zusätzliche Spezifikationen ergänzt (1.2.2). 22 Jahre nachdem Johann Joseph Scherer als erster das *myo*-Inositol beschrieb, untersuchte W. Pfeffer (1872) in den Jahrbüchern für wissenschaftliche Botanik „globoide Einschlüsse in Proteinstoffen“ und nannte in diesem Zusammenhang „Erden, die an eine mit einen organischen Körper gepaarte Phosphorsäure gebunden sind” [2]. Die Analysen der „Erden“ ergaben Magnesium und Calcium, wohingegen er die Phosphorsäure samt organischen Körper in Anlehnung an dessen Eigenschaften analog zu Scherer [1] als Zuckerphosphorsäure beschrieb [2]. Wie sich später herausstellen sollte [3, 4], wurde in diesem Artikel zum ersten Mal das Salz des vollständig phosphorylierten Inositolhexakisphosphats ($InsP_6$) analysiert und beschrieben [2]. 1903, fast 50 Jahre nach der Entdeckung des Inosits und ca. 30 Jahre nach der ersten $InsP_6$ Analyse präparierte die Arbeitsgruppe um Posternak et al. [3, 4] erneut pflanzliches Material analog zu den Arbeiten von W. Pfeffer [2]. Ihre Elementaranalysen unterstrichen die Untersuchung von W. Pfeffer und sie gaben der „Zuckerphosphorsäure“ [2] den französischen Namen „la phytine“ [3] woraus im deutschen der Begriff Phytinsäure bzw. Phytat (Salz der Säure) hervorging.
Bis auf wenige, kleinere Highlights, wie z.B. die Versuche zur Klärung der Phytinsäurestruktur in den Anfängen des zwanzigsten Jahrhunderts [5, 6, 7], wurde es relativ ruhig um die Inositole bzw. Inositolphosphate (InsPs). Der große Durchbruch erfolgte 1983, etwa 130 Jahre nach der Entdeckung des *myo*-Inositols. Die Arbeitsgruppe um Streb et al. identifizierte ein Inositolphosphatisomer, das als sekundärer, Calcium-freisetzender Botenstoff agiert und zeigten somit einen Zusammenhang der InsPs mit zentralen zellulären Signalwegen [8, 9]. Es begann eine Hochphase der Inositolphosphat-Forschung in deren Zenit um 1993 über 1000 Veröffentlichungen pro Jahr zum Thema hervorgebracht wurden. Während dieser Phase kam es nicht nur zur Identifikation weiterer Isomere, die mit der Regulation anderer zellulärer Signalwege in Verbindung gebracht werden konnten [10], sondern auch zur Entdeckung einer neuen Molekülspezies. 1992 erschien die erste Veröffentlichung über isolierbare, pyrophosphorylierte

Inositolphosphate (PP-InsPs) aus dem Schleimpilz und Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* durch Mayr et al. [11]. Ein Jahr später (1993) folgte der Nachweis dieser neuen Moleküle auch in *Mammalia* [11, 12, 13]. Die PP-InsPs sind die bisher am höchsten phosphorylierten Inositole und werden in der Literatur, je nach Phosphatgruppenzahl, verallgemeinernd als $InsP_7$ oder $InsP_8$ bezeichnet.
Erste Hypothesen und eigene Arbeiten (unveröffentlicht) zeigen ein Vorkommen weiterer neuer Isomere mit 9 Phosphaten ($InsP_9$) [14].

1.2 Nomenklatur und Isomerie der Inositolphosphate

1.2.1 Die Konfigurationsisomerie und Ringnummerierung des Inositols

Inosit oder wie es heute bezeichnet wird, *myo*-Inositol, ist der Trivialname eines cyclischen, sechswertigen Alkohols (Cyclohexanhexol). Das Präfix *myo* beschreibt die Stereoisomerie der Hydroxylgruppen bezogen zur Ringebene. Bei einer planaren Darstellung des Rings können die Gruppen sowohl auf gleicher Ebene (*cis*) als auch auf der entgegengesetzten Seite (*trans*) angeordnet sein. Unter Berücksichtigung aller Regeln zur Nummerierung der isomeren Positionen nach IUPAC [15] ergeben sich insgesamt neun mögliche Konfigurationsisomere, die jeweils mit anderen Präfixen betitelt werden (Abbildung 1.1). Von den neun Isoformen sind nur das *myo*-, *muco*-, *neo*-, D- und L-*chiro*- und *scyllo*-Insositol jeweils natürlich nachgewiesene Moleküle. Die anderen drei Isoformen, *cis*-, *epi*- und *allo*-Inositol, wurden bisher nur synthetisch beschrieben [16]. Von allen natürlich vorkommenden Isomeren ist das *myo*-Inositol das häufigste Isomer. Es bildet die Basis für eine Reihe von Molekülen (z.B. sekundären Botenstoffen) bei denen die Hydroxylgruppen durch Phosphate substituiert sind (Abbildung 1.3).

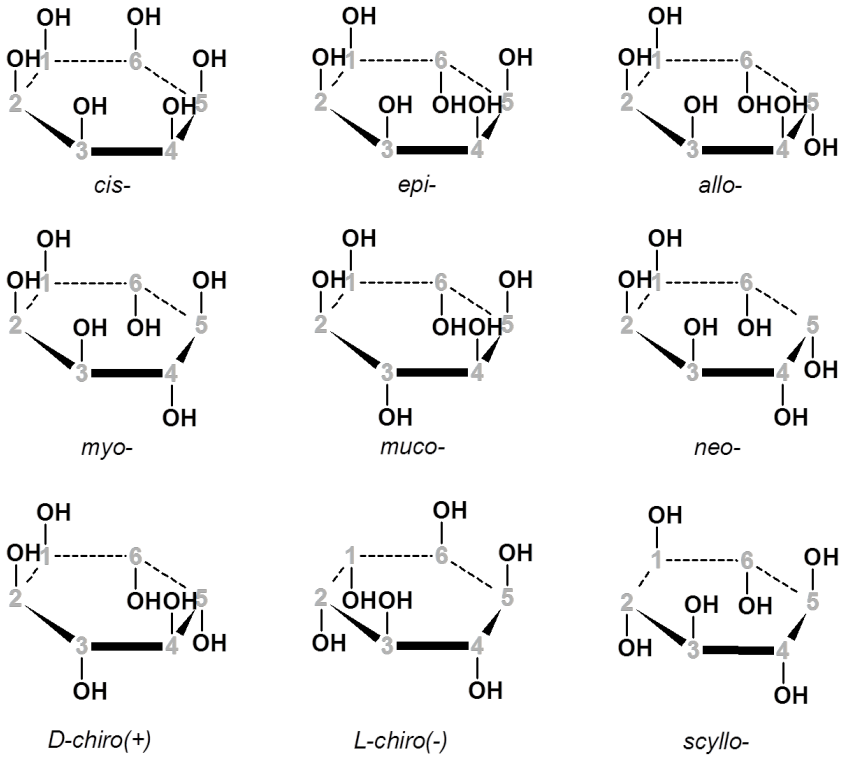


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der neun Inositol Konfigurationsisomere. Zur vereinfachten Darstellung sind nur die Hydroxylgruppen wiedergegeben. Die CH-Gruppen wurden vernachlässigt. Die Ringnummerierung richtet sich in Anlehnung an die IUPAC Bestimmung von 1989 [17] und wird im Text bzw. der Arbeit kontinuierlich beibehalten. Die Suffixe (+) und (-) bei D- und L-*chiro* beschreiben die optische Aktivität gegenüber polarisiertem Licht. Alle weiteren Isoformen sind auf Grund von Symmetrieebenen optisch inaktiv. Modifiziert nach [15, 16].

Die Anordnung der funktionellen Gruppen des *myo*-Inositols als *cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-Cyclohexanhexol bildet eine Spiegelebene zwischen der Position 2 und Position 5 (Abbildung 1.2) und erzeugt somit Stereoisomere, die nach Standard IUPAC Nomenklatur als D- bzw. L-Isomere bezeichnet werden [15]. Die Standard IUPAC Nomenklatur der Isomere barg jedoch Schwierigkeiten; Nur auf Grund der IUPAC Definition [15] konnte sich während einer simplen Reaktion (z.B. Phosphorylierung) die Isomerie des Moleküls „ändern“, was eine z.T. komplett andere Benennung desselben Moleküls zur Folge hatte und somit nicht nur für gebietsfremde Wissenschaftler sondern auch für Interessierte zu Konfusionen führte.
Eine neuere “relaxierte” IUPAC Nomenklatur, speziell für Inositole oder Inositolphosphate, wurde 1989 empfohlen [17] und richtet sich dabei ausschließlich nach der ehemaligen IUPAC D-Nomenklatur der Isomere [15]. Diese Empfehlung basiert auf der Mnemonik von Agranoff, die Moleküle in ihrer Sesselkonformation (Abbildung 1.2) mit einer axialen und fünf äquatorialen Positionen mit einer „rechtsflossigen“ Schildkröte mit erhobenem Kopf zu vergleichen [18]. Die rechte Vorderflosse bezeichnet die Position 1. Die weitere Nummerierung erfolgt entgegen dem Uhrzeigersinn, sodass die markanten Positionen zum einen durch den aufrechten Kopf (axiale

Position 2) und zum anderen durch den erhobenen Schwanz (Position 5; Spiegelebene: 2-5) repräsentiert werden (Abbildung 1.2).

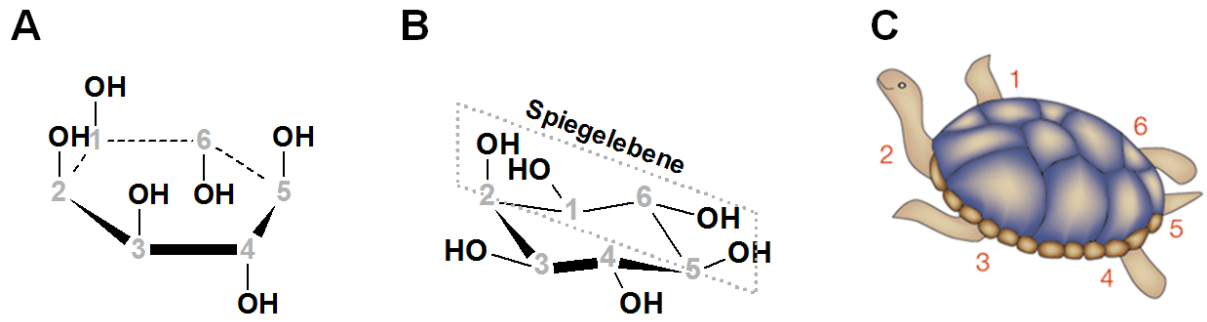
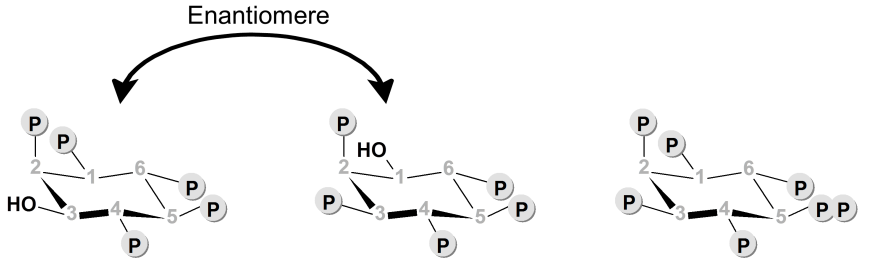


Abbildung 1.2: *Myo*-Inositol im Vergleich zu einer Schildkröte nach Agranoff [18]**.** (A) Haworth-Projektion des *myo*-Inositols (cis-1,2,3,5-trans-4,6-Cyclohexanhexol). (B) Sesselkonformation des *myo*-Inositols mit axialer Hydroxylgruppe an Position 2 und fünf äquatorialen Gruppen. Die Spiegelebene durch die Positionen 2 und 5 ist durch das verzerrte Quadrat dargestellt. (C) Mnemonik nach Agranoff mit einer „rechtsflossigen" Schildkröte. Schildkröte entnommen aus [10].

1.2.2 Die Benennung der Inositolphosphat Isomere

Da im weiteren Verlauf der Arbeit nur auf das *myo*-Inositol bzw. deren Phosphatestern (*myo*-Inositolphosphate) eingegangen wird, wird das Präfix *myo*- im Namen vernachlässigt.
Inositolphosphate bestehen aus dem beschriebenen *myo*-Inositol (1.2.1) und mindestens einem, maximal sechs Monophosphatresten. Alle zusätzlichen Phosphorylierungen führen zu Phosphorsäureanhydrid Bindungen bzw. zu Pyrophosphatgruppen und werden als pyrophosphorylierte oder diphosphorylierte Isomere bezeichnet. Bereits die Kombinationen der unterschiedlichen Positionen und die Anzahl an Monophosphaten am Inositol ermöglichen rechnerisch 63 verschiedene Isomere [19], von denen jedoch nicht alle von physiologischer Bedeutung sind.
Zur Benennung der Isomere wird nach aktueller, relaxierter IUPAC Empfehlung verfahren [17]. Der Stammname Inositol wird als „Ins" abgekürzt. Direkt daran schließen sich, mit Klammern versehen, die mit Phosphatgruppen veresterten Positionen in der D-Nomenklatur nach Agranoff an (Abbildung 1.2). Es folgt die Anzahl der Phosphatreste als, aus dem Griechischen abgeleitetes, Zahlwort (z.B. Inositolpentakisphosphat) bzw. in der Kurzschreibweise als „P" für Phosphat mit indizierter Anzahl der Gruppen (z.B. $InsP_5$). Schwierigkeiten bereiten oft Enantiomere, die mit Standardnachweismethoden nicht zu unterscheiden sind (Abbildung 1.3). Daher wird bei der Bezeichnung von Enantiomerenpaaren ohne Zuordnung des spezifischen Enantiomers korrekt die Kennzeichnung D/L vor den Namen geschrieben. Ist die genaue Position der Phosphatgruppen strukturell eindeutig, wird in der allgemeinen Bezeichnung nur die Angabe der Anzahl an Phosphatresten ohne die Angabe der Positionen verwendet (Bsp.: Inositol-(1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphat = $Ins(1,2,3,4,5,6)P_6$ = $InsP_6$).
Die höchste beschriebene Phosphorylierungsstufe stellen bisher die pyrophosphorylierten Ino-

sitolphosphate dar. Diese Isomere werden mit ihren Monophosphatgruppen am Ring identisch benannt (s.o.). Die pyrophosphorylierten Positionen hingegen werden unter Angabe der Position dem Namen vorangestellt (Abbildung 1.3). Die Empfehlungen der IUPAC zur einheitlichen Bezeichnung der Isomere als Diphosphoinositolphosphate (DPIPs [19, 20]) hat sich bisher nicht komplett durchgesetzt. Stattdessen werden die $InsP_6$ basierten Produkte (Abbildung 1.3 C) in der Literatur oft nur nach ihrer Phosphatgruppenanzahl als $InsP_7$ und $InsP_8$ bezeichnet, was in der vorliegenden Arbeit nur bei Unkenntnis der pyrophosphorylierten Position erfolgt. Die von Ins(1,3,4,5,6)P_5 abgeleiteten pyrophosphorylierten Isomere (Abbildung 1.5) besitzen keine alternativen Bezeichnungen und werden in dieser Arbeit als PP-$InsP_4$ oder PP_2-$InsP_3$ mit Angabe der einfach und der pyrophosphorylierten Position (wenn bekannt) beschrieben.
In der Literatur findet sich teilweise noch die Bezeichnung "Inositolpolyphosphate". Diese Bezeichnung, als Hinweis auf multiple Phosphatgruppen am *myo*-Inositol oder Inositolphosphat, ist nicht eindeutig und kann zu Verwirrungen führen. Polyphosphate stellen in der Phosphatchemie normalerweise Ketten oder Ringe dar, bei denen die Phophatgruppen über Phosphorsäureanhydridbindungen miteinander verknüpft sind. Inositolphosphate hingegen sind Verbindungen mit multiplen Monophosphorsäureestern. Auf Grund fehlender IUPAC Empfehlungen und zur Vermeidung von Missverständnissen sollte die Bezeichnung "Inositolpolyphosphate" nicht mehr verwendet werden.



A	B	C
Ins(1,2,4,5,6)P_5[a)]	Ins(2,3,4,5,6)P_5[a)]	5PP-InsP_5[a)]
D-Ins(1,2,4,5,6)P_5[b)]	L-Ins(1,2,4,5,6)P_5[b)]	-[b)]
InsP_5[c)]	InsP_5[c)]	InsP_7[c)], IP_7[c)], 5IP_7[c)], 5PP-Ins(1,2,3,4,6)P_5[c)d)]
Inositol-(1,2,4,5,6)-pentakisphosphat[e)]	Inositol-(2,3,4,5,6)-pentakisphosphat[e)]	5-Pyrophospho-/5-Diphospho-Inositolpentakisphosphat[e)]

[a)] Bezeichnung der Isomere nach neuer aktueller IUPAC Nomenklatur [17]; [b)] Bezeichnung der Isomere nach alter Nomenklatur [15]; [c)] Alternative Schreibweisen der Isomere; [d)] da in diesem Fall alle 6 Hydroxylgruppen „belegt" sind, erübrigt sich die Angabe der weiteren Monophosphatpositionen (vgl. [a)]). Bei pyrophosphorylierten $InsP_5$ Isomeren wäre das nicht der Fall; [e)] Bezeichnung der Isomere als Lautschrift.

Abbildung 1.3: Beispiele zur Benennung von Inositolphosphat Enantiomeren und pyrophosphorylierten Isomeren. Dargestellt sind zum einen die Strukturen zweier Enantiomere (A und B) sowie des häufigsten pyrophosphorylierten Isomers (C). Die unterschiedlichen Benennungen sind jeweils tabellarisch unterhalb der Strukturen aufgelistet.

1.3 Der Metabolismus der Inositolphosphate

Das feine Zusammenspiel aus Substratphosphorylierung und -dephosphorylierung durch Inositolphosphat Kinasen und Phosphatasen, regelt das Vorkommen der verschiedenen Isomere. Die Stoffwechselwege sind bisher jedoch z.T. nur lückenhaft verstanden und unterscheiden sich bei verschiedenen Organismen ebenfalls z.T. stark voneinander. Der Vergleich der PP-InsPs zwischen *Dictyostelia* und *Mammalia* zeigt, dass beide zwar pyrophosphorylierte Isomere synthetisieren, diese sich aber nicht nur hinsichtlich der gebildeten Menge, sondern ebenfalls in der Isomerie deutlich voneinander unterscheiden [21, 22, 23, 24]. Es wird daher im Weiteren der Schwerpunkt auf den bekannten Metabolismus der Inositolphosphate (InsPs) bzw. PP-InsPs von Säugetieren und teilweise von Hefen gelegt.

1.3.1 Der Metabolismus der monophosphorylierten Isomere

Es ist unerlässlich zu erwähnen, dass Inositolphosphate mit bis zu 4 Phosphatgruppen nicht nur als lösliche Moleküle, sondern ebenfalls als Phosphatidylinositolphosphate (PtdInsPs, PIPs; Gruppe der Phospholipide) in der Zellmembran und der Nukleusmembran vorliegen und z.T. signaltransduzierende Aufgaben wahrnehmen können [25, 26]. Durch die Spaltung des Phospholipids PtdIns(4,5)P_2 (PIP_2 bzw. PI(4,5)P_2,) wird ein aus endogenen Speichern Calcium (Ca^{2+}) freisetzender Signalweg induziert. Rezeptorvermittelt aktivierte Phosphoinositid-Phospholipase C (Phospholipase C, PLC) spaltet membranständiges PtsIns(4,5)P_2 in Diacylglycerol (DAG) und lösliches Ins(1,4,5)P_3 (Abbildung 1.4). Lösliches Ins(1,4,5)P_3 bildet den bereits erwähnten sekundären Botenstoff (1.1) und bindet an IP_3-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit der Folge eines massiven Ca^{2+}-Efflux aus diesen Speichern [25, 27].
Bisher konnten in *Mammalia* weder Hinweise erbracht noch Kinasen identifiziert werden, die die Phosphorylierung von löslichem unphosphoryliertem Inositol oder von Inositolmonophosphaten bis zu $InsP_3$ katalysieren [10, 28]. Für viele Wissenschaftler gilt daher die Bildung des löslichen Ins(1,4,5)P_3 aus PtdIns(4,5)P_2 (Abbildung 1.4) als Beginn der Inositolphosphat Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungskaskade von $InsP_3$ über $InsP_4$ und $InsP_5$ zu $InsP_6$. Die Enzyme der Kaskade sind die Inositoltrisphosphat-3-Kinase Isoformen (IP3K-A, -B und -C) [29, 30, 31], die Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK) [32, 33, 34], die Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-Kinase (ITPK1) [35, 36] und das bisher einzig bekannte $InsP_6$ produzierende Enzym, die Inositolpentakisphosphat-2-Kinase (IP5-2K, IPPK) [37] (Abbildung 1.4).
Als Gegenspieler wirken Inositolpolyphosphat Phosphatasen der Typen I-VI [38] sowie die multiple Inositolpolyphosphatphosphatase (MINPP1) [39, 40] auf die später noch eingegangen wird (Abbildung 1.4).
Die im Organismus bzw. in Zellen am häufigsten vorkommenden monophosphorylierten Isomere sind das Ins(1,3,4,5,6)P_5 und das $InsP_6$ [19]. Von $InsP_6$ ist bekannt, dass ein Großteil der gemessenen Stoffmengen an Proteine gebunden vorliegt [41, 42, 43] und die freie zelluläre Kon-

zentration dadurch weit unter den nachgewiesenen Konzentrationen liegt [19, 44].

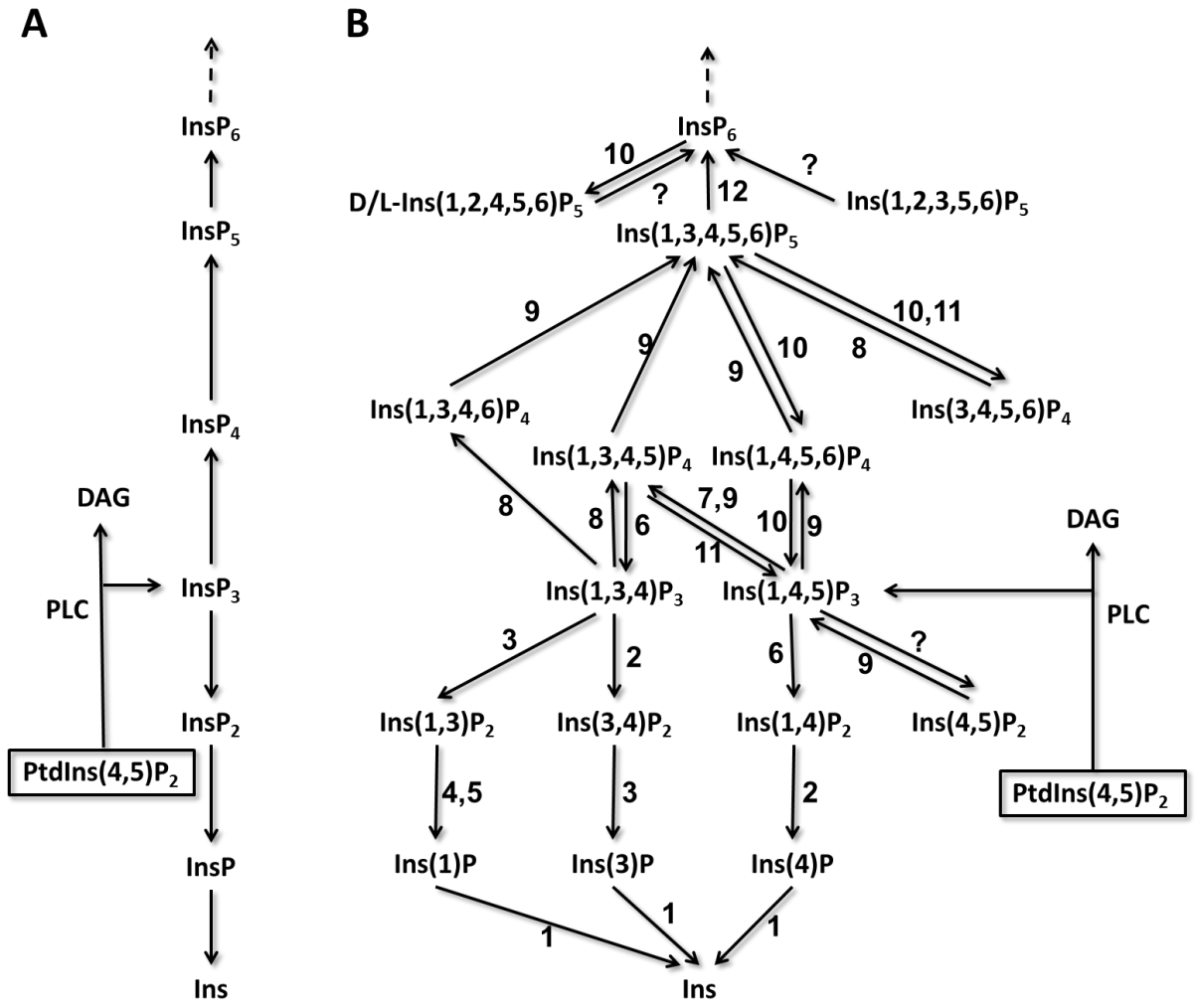


Abbildung 1.4: Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen der Inositolphosphate bis $InsP_6$ in *Mammalia* beginnend bei $PtdIns(4,5)P_2$. Dargestellt ist die Kaskade in stark vereinfachter Form (A) sowie detaillierter unter der Angabe der phosphorylierten Inositolphosphat Positionen und der verantwortlichen Enzyme (B). Bei beiden Darstellungen ist die Spaltung von $PtdIns(4,5)P_2$ (Kasten) zu Diacylglycerol (DAG) und $Ins(1,4,5)P_3$ durch die Phospholipase C (PLC) der Beginn der Kaskade in beide Richtungen. Die Enzyme sind (1) Inositolmonophosphat-Phosphatase; (2) $Inositol(1,4)P_2$/$Ins(1,3,4)P_3$-1-Phosphatase; (3) $Ins(3,4)P_2$/$Ins(1,3,4)P_3$-4-Phosphatase; (4) $Ins(1,3)P_2$-3-Phosphatase Typ I; (5) $Ins(1,3)P_2$-3-Phosphatase Typ II; (6) D-$Ins(1,4,5)P_3$/D-$Ins(1,3,4,5)P_4$-5-Phosphatase; (7) $Ins(1,4,5)P_3$-3-Kinase (IP3K bzw. ITPK); (8) $Ins(1,3,4)P_3$-5,6-Kinase/$Ins(3,4,5,6)P_4$-1-Kinase; (9) Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK); (10) Multiple Inositol Polyphosphat Phosphatase 1 (MINPP1); (11) *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN); (12) $Ins(1,3,4,5,6)P_5$-2-Kinase (IP52K bzw. IPPK). Die Kinasen der mit Fragezeichen versehenen Reaktionen sind nicht bekannt. Die Abbildung wurde modifiziert nach [10, 28, 45].

1.3.2 Der Metabolismus der pyrophosphorylierten Inositole

Die Liste der Anfang der 1990er Jahre identifizierten di- bzw. pyrophosphorylierten Inositolphosphate (PP-InsPs) muss nach heutiger Kenntnis um weitere Isomere erweitert werden. Zu

den PP-InsPs zählen nicht nur die von $InsP_6$ generierten pyrophosphorylierten Produkte, sondern ebenfalls jene, die auf Ins(1,3,4,5,6)P_5 basieren [19] (Abbildung 1.5). Bisher konnten in *Mammalia* nur zwei Enzyme bzw. deren Isoformen identifiziert werden, die in der Lage sind, pyrophosphorylierte Isomere zu synthetisieren. Die Inositolhexakisphosphatkinasen (IP6K1,-2,-3) pyrophosphorylieren spezifisch die Position 5 sowohl von Ins(1,3,4,5,6)P_5 als auch von $InsP_6$ [14, 23, 46, 47, 48]. Die entstehenden Produkte sind jeweils 5PP-Ins(1,3,4,6)P_4 bzw. 5PP-$InsP_5$. Die Pyrophosphoinositolphosphat-Kinase (PPIP5K1/-2; hsVip1/-2) ist erst kürzlich als Enzym des Inositolphosphat Metabolismus identifiziert worden [23, 49] und pyrophosphoryliert $InsP_6$ spezifisch an der Position 1 [24, 50]. Die entstehenden Produkte der einen Kinase dienen wiederum der jeweils anderen Kinase als weiteres Substrat zur Pyrophosphorylierung zu PP_2-$InsP_3$ (wahrscheinlich 1,5PP_2-Ins(3,4,6)P_3 [19, 51] bzw. 1,5PP_2-$InsP_4$ (Abbildung 1.5)). Das Letztere, auch als $InsP_8$ bezeichnete Molekür, ist das bisher am höchsten phosphorylierte, zellulär nachgewiesene Inositolphosphat. Eigene Arbeiten (unveröffentlicht) sowie die Arbeiten von Draskovic et al. [14] geben jedoch bereits Hinweise auf noch höher phosphorylierte Isomere ($InsP_9$).

Als Gegenspieler wirken die Diphosphoinositol-polyphosphat Phosphohydrolasen (DIPPs), die zur großen Familie der NudiX Hydrolasen zählen. Im Allgemeinen katalysieren NudiX Hydrolasen die Spaltung von Phosphorsäureanhydridbindungen von Substraten deren Aufbau ***Nu***kleosid ***di***phosphaten ähnelt, die kovalent an eine weitere funktionelle Gruppe ***X*** gebunden vorliegt (daher der Name: NudiX) [52]. Bei PP-InsPs bzw. PP_2-InsPs hingegen spalten die DIPPs die Phosphoanhydridbindung auch ohne ein kovalent gebundenes Nukleosid [53]. Obwohl DIPPs die Anhydridbindungen sowohl der pyrophosphorylierten Inositolphosphat Position 1 und 5 hydrolysieren können, scheinen sie dennoch eine bestimmte Reihenfolge der Spaltung vorzuziehen. Von 1,5PP_2-$InsP_4$ ausgehend bevorzugen sie die Position 1 vor der Position 5 [54].

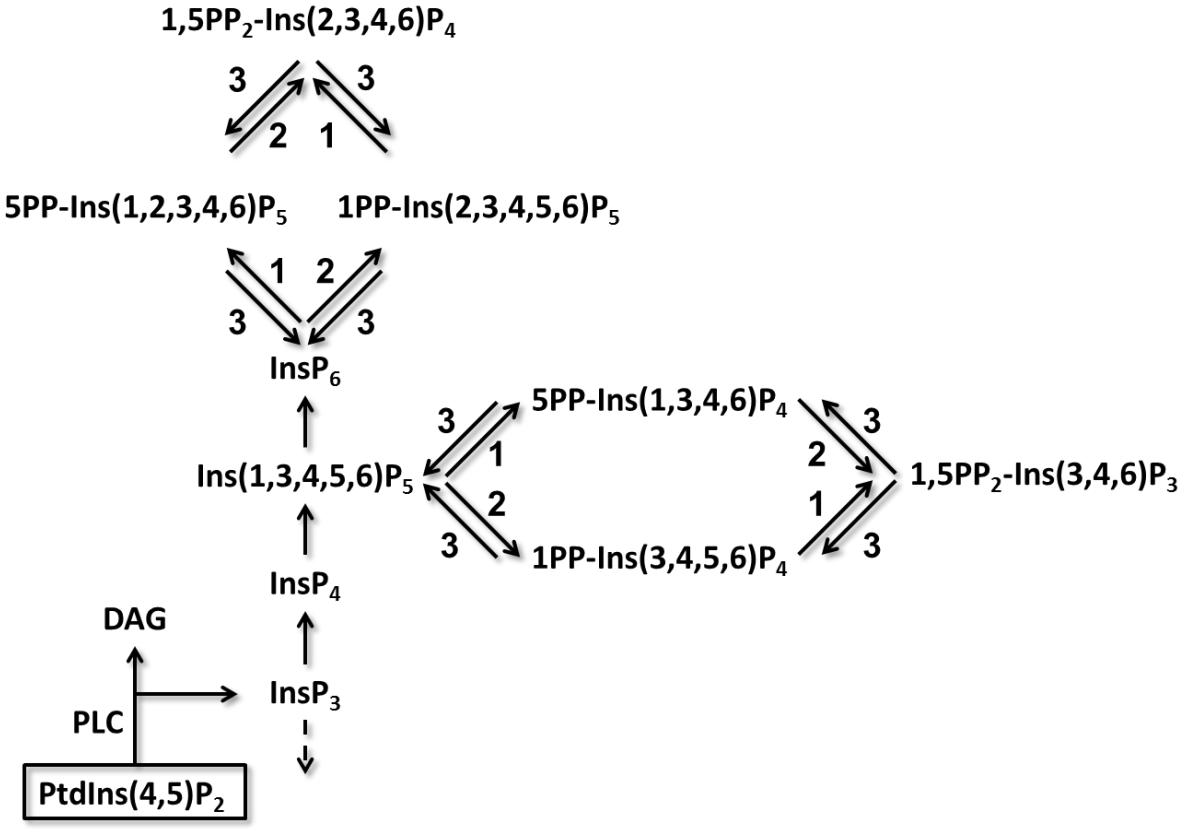


Abbildung 1.5: Synthese von Ins(1,3,4,5,6)P_5 und $InsP_6$ basierten PP-InsPs in *Mammalia*. Vereinfacht dargestellt ist die Phosphorylierung der Inositolphosphate in Analogie zu Abbildung 1.4 A ausgehend von PtdIns(4,5)P_2. Die Kinasen der Pyrophosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P_5 sowie $InsP_6$ sind (1) Inositolhexakisphosphat Kinase (IP6K) und die (2) Pyrophosphoinositolpentakisphosphat Kinase (PPIP5K bzw. hsVip). Die bisher identifizierten Phosphatasen der PP-InsPs gehören zur Klasse der Diphosphoinositol-polyphosphat Phosphohydrolasen (DIPP). Modifiziert nach [10, 19, 28, 45].

1.4 Veränderungen von PP-InsPs korrelieren mit ausgewählten zellulären Vorgängen

Seit der Entdeckung der PP-InsPs in den Anfängen der 1990er Jahre [11, 12, 13] wurden mehr oder weniger detailliert und intensiv Stoffwechselwege oder zelluläre Vorgänge untersucht, die mit PP-InsPs korrelieren. Die betrachteten Wege sind dabei so variabel wie die Forschungsbereiche aus denen sie hervorgegangen sind. In den folgenden Abschnitten soll daher nicht detailliert auf alle bisher identifizierten Wege eingegangen werden sondern vielmehr Gemeinsamkeiten aufgezeigt werden, die zeigen wie PP-InsPs Stoffwechselwege oder Signalwege regulieren können. Dennoch sollen der Vollständigkeit wegen die identifizierten zellulären Vorgänge, trotz mancher Überschneidungen aufgelistet werden (die Listung erhebt jedoch keinen Anspruch auf Vollständigkeit).

Über die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Regulationsmechanismen hinaus sind

PP-InsPs unter anderem beteiligt an zellulärer Apoptose [55, 56], der Insulinsekretion [57], der Spermiogenese [58], der Regulation der Telomerenlängen [59, 60], der Cyclin-CDK gesteuerten Expression von Genen des Phosphatstoffwechsels [61, 62], der Histon-Demethylierung [63] und der Regulation von aktivierten Neutrophilen [64]. Zusätzlich wird 1,5PP_2-InsP_4 dramatisch erhöht, sobald Säugerzellen osmotischem Stress, Hitze und Kälte, jedoch nicht mechanischem oder oxidativem Stress ausgesetzt sind [65, 66, 67].

1.4.1 Enzymunabhängige Pyrophosphorylierung von präphosphorylierten Proteinen und deren Funktion

Im Abstand von 13 Jahren zeigten zwei Publikationen, dass die Pyrophosphorylierung von InsP_6 zu 5PP-InsP_5 durch die IP6K (Abbildung 1.5) in Gegenwart von ADP reversibel verlaufen kann [68, 69]. Als verantwortlich für die Übertragung des ß-Phosphats von 5PP-InsP_5 auf ADP zur ATP Synthese wurde die hohe Energiedichte des 5PP-InsP_5 vermutet [70]. Das Potential, Phosphatgruppen zu übertragen, wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem 5PP-InsP_5 (5ß[^{32}P]P-InsP_5) auf Proteinebene als posttranslationale Modifikation näher untersucht.
Proteinphosphorylierung ist eine der am meisten verbreiteten und stark regulierten posttranslationalen Modifizierungen (PTMs) zur zellulären Steuerung von Enzymen verschiedener Signalkaskaden [71, 72]. Für 5PP-InsP_5 aber auch 1PP-InsP_5 (in der Studie fälschlicherweise als 4/6PP-InsP_5 bezeichnet) und 1,5PP_2-InsP_4 konnte ein enzymunabhängiger Transfer der ß-Phosphatgruppe auf bereits durch CK2 präphosphorylierte Serine gezeigt werden [73, 74]. Die einzige Regulation des Vorgangs scheint somit nur durch die Regulation der CK2 selbst zu erfolgen. Damit jedoch Proteine überhaupt PP-InsP_5 bzw. PP_2-InsP_4 vermittelt pyrophosphoryliert werden, benötigen sie neben der CK2 Konsensussequenz zusätzlich eine relativ saure Aminosäuresequenz, die das entsprechende Serin mit einem nahe gelegenen Lysin enthalten muss [73]. Die Übertragung des Phosphates zum Serin-Pyrophosphat soll laut Autoren gegenüber bekannten Proteinphosphatasen als Gegenspieler von Proteinphosphorylierungen stabiler sein, was ein länger anhaltendes Signal zur Folge haben könnte [74].
Die Studien sind jedoch trotz hochrangiger Veröffentlichungen umstritten, da zum einen bisher keiner weiteren Arbeitsgruppe die Reproduktion gelang und zum anderen der Nachweis einer gezielten Regulation zum Abschalten des Signals fehlt.
Dennoch wurden einige Zielproteine der enzymunabhängigen Reaktion identifiziert. Zu ihnen zählen Nsr1p, Srp40p, Ygr130cp [73] und GCR1 [75] aus Hefen, sowie die Säugerproteine TCOF1, Nopp140 [74] und AP-3ß1/2 [76]. Das zu humanem Nukleolin homolge nukleäre Nrs1p ist beteiligt an der Ribosomenbiogenese und der Transkriptionsregulation [77, 78]. Srp40, das homologe humane Nopp140 sowie TCOF1 sind ebenfalls nukleäre Proteine, die an der Ribosomenbiogenese und Transkriptionsregulation beteiligt sind [79, 80], von denen jedoch z.T. zusätzliche Interaktionen mit weiteren Inositolphosphaten bzw. deren Kinasen bekannt sind: CK2 bildet mit Nopp140 einen inhibierenden Komplex, der in Anwesenheit von InsP_6 gestört

ist, so dass die CK2 nun aktiv bleibt [81, 82]. TCOF1 interagiert mit der IPPK als Gerüstprotein in einem Transkriptionskomplex mit UBF und CKII [83]. Das einzige bisher identifizierte extranukleäre Protein ist das Vesikeladapterprotein AP-3ß1/2, welches im AP3 Adapterkomplex am intrazellulären Stofftransport zwischen dem trans-Golgi Netzwerk (TGN) und den Endosomen beteiligt ist [84]. Ygr130cp ist ein Protein mit bisher unbekannter Funktion, das aber in einem *yeast-two-hybrid assay* mit der GTPase ARF1 interagieren soll [85] und somit ebenfalls am vesikulären Transport beteiligt wäre.
Das erst kürzlich identifizierte GCR1 als Zielprotein der enzymunabhängigen Pyrophosphorylierung [75] zählt zu den Transkriptionsregulatoren der Hefe. Das durch CKII präphosphorylierte GCR1 stellt zusammen mit RAP1 einen GCR2 vermittelten aktiven Transkriptionsregulator glykolytischer Enzyme dar. Pyrophosphoryliert wird die GCR1 Interaktion mit GCR2 gestört, so dass es zu einer Repression der Transkription kommt [75, 86].

1.4.2 Regulation der Endo- und Exocytose

Die Einflussnahme von Insositolphosphaten, insbesondere von $InsP_6$, auf den Vesikeltransport wurde als einer der ersten durch $InsP_6$ regulierten zellulären Vorgänge untersucht. Der *clathrin adaptor protein complex* AP2 sowie das cerebrale, clathrinbindende Protein AP180 wurden sowohl als $InsP_6$ Rezeptoren als auch als PP-InsPs bindende Proteine identifiziert [87, 88, 89, 90]. In beiden Fällen vermindert die Bindung an AP2 als auch an AP180 die rezeptorvermittelte Endozytose über Clathrin beschichtete Vesikel. Detailliertere weiterführende Untersuchungen zur InsP oder PP-InsP vermittelten Inhibition der vesikulären, rezeptorabhängigen Membraneinstülpung über AP2 oder AP180 wurden weitestgehend vernachlässigt, als bekannt wurde, dass neben PIP_2 (PtdIns(4,5)P_2) ebenfalls membranständiges PIP_3 (PtdIns(3,4,5)P_3) sogar höher affin an die ANTH Domäne von AP180 bzw. den ENTH/ANTH vergleichbar gefalteten N-terminus der α-Untereinheit von AP2 bindet [91, 92, 93]. Interessanterweise wurde der gesamte AP2-Komplex später kristallisiert und es wurden die unterschiedlichen Bindungsdomänen identifiziert [94]. Um die PtdInsP Bindungsdomäne zu markieren, sowie die Bindung unterschiedlicher Inositolphosphatisomere gleichzeitig simulieren zu können, cokristallisierten die Autoren der Studie anstelle von PtdInsP lösliches $InsP_6$ [94] und zeigten somit die Anfang der 1990er Jahre beschriebene inhibitorische Komplexierung von $InsP_6$ an AP2 [87, 88, 89, 90]. Die Autoren identifizierten zwei unterschiedliche Bindungsstellen von $InsP_6$; die Bindung an den N-Terminus der α-Untereinheit als bereits bekannte Bindungsstelle für PtdInsPs [91] und eine neue, zweite Position an der C-µ2 Untereinheit die als weitere PtdInsP Bindungsstelle dient [94].

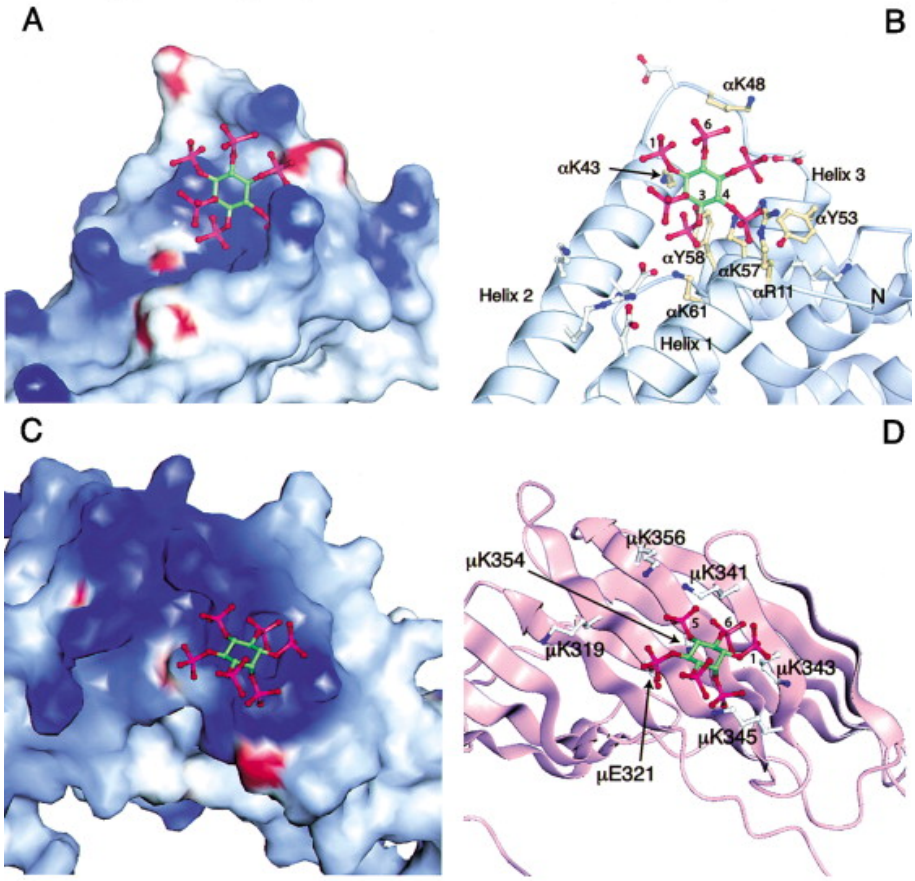


Abbildung 1.6: Strukturkomponenten zur Bindung von PtdInsPs sowie $InsP_6$ an AP2 bei einer Auflösung von 2,6 Å. Dargestellt sind jeweils die Bindung von $InsP_6$ an AP2 als elektrostatisches Oberflächenmodell (A und C) sowie als Sekundärstrukturdarstellung mit hervorgehobenen Seitenketten zur Interaktion mit $InsP_6$ (B und D). (A) und (B) zeigen jeweils die Bindung an die α-Untereinheit und (C) und (D) jeweils die Bindung an die, in der Studie neu identifizierte C-μ2 Untereinheit von AP2. Entnommen aus [94].

Weitere Untersuchungen beziehen sich ebenfalls auf die Endozytose und zeigen, dass kcs1 defiziente (Δ*kcs1*) Hefen starke Defekte im Aufbau ihrer Vakuole besitzen [95, 96]. Die Defizienz der Kcs1, der einzigen $InsP_6$ Kinase von Hefen führt zu verminderter 5PP-$InsP_5$ Synthese und zu einer vermehrt ablaufenden, möglicherweise rudimentär gesteuerten Endozytose. Die Folge ist ein Verlust der Membranintegrität der Hefevakuole mit anschließender Fragmentierung in einzelne, kleinere Vakuolen [97]. Der Effekt ist, wie auch die Proteinpyrophosphorylierung, nicht spezifisch für 5PP-$InsP_5$, sondern kann ebenso durch weitere PP-InsP Isomere (basierend auf Ins(1,3,4,5,6)P_5) ausgelöst werden [97].
Die Studie untermauert die frühen Inhibitionsstudien von $InsP_6$ oder PP-InsPs mit AP2 oder AP180 und zeigt, dass scheinbar basale InsP/PP-InsP Spiegel, Prozesse wie die beschriebene Endozytose fein regulieren können.
Nicht nur die Endozytose über Clathrin beschichtete Vesikel, sondern ebenfalls die Sekretion von Zellmaterial (Exozytose) scheint ein durch PP-InsPs regulierter Vorgang des Vesikeltrans-

ports zu sein. In pankreatischen ß-Zellen konnte die Insulinsekretion mit einem variierenden 5PP-InsP_5 Spiegel korreliert werden [57]. Die Überexpression der IP6K als 5PP-InsP_5 bildende Kinase in pankreatischen ß-Zellen (HIT-T15 Zellen) führt zu einer stark erhöhten Insulinsekretion, wohingegen die Überexpression einer Kinase-inaktiven Mutante keinen Einfluss auf das zelluläre 5PP-InsP_5 Niveau und die Sekretion hat [57]. Erst nach der direkten Applikation von 5PP-InsP_5 oder anderen z.T. synthetischen Isomeren (1PP-, 3PP- und 4PP-InsP_5) in die Zellen, konnte erneut ein erhöhtes Sekretionslevel gemessen werden [57]. Gestärkt wird die Untersuchung unter anderem durch Arbeiten an IP6K knock out Mäusen. Diese zeigen eine deutlich reduzierte Insulinkonzentration um 65-70% [58]. Wie der Mechanismus der Exocytose jedoch durch 5PP-InsP_5 unterstützt wird ist bisher nicht geklärt.

1.4.3 Kompetition der PP-InsPs mit PtdInsPs um Pleckstrin Homologie (PH-) Domänen

Nicht nur bei der Endo- oder Exozytose, sondern auch im Verlauf von z.B. rezeptorvermittelten Signalkaskaden binden verschiedene Proteine zur Signalweiterleitung an die Zellmembran bzw. an einzelne Phospholipide der inneren Membran. Konservierte Domänen wie die Pleckstrin Homologie (PH-) Domäne [98] binden an Phosphatidylinositolphosphate (PtdInsPs) und vermitteln so die Bindung des Proteins zur Membran. PtdInsPs gehören zu den u.a. in der Plasmamembran vorkommenden, aber gering konzentrierten Phospholipiden. PtdIns(4,5)P_2, als eines der bedeutendsten membranständigen Lipide, macht nur etwa 1% der Gesamtmenge an vorhandenen Phospholipiden aus (vgl. ~30% Phosphatidylserin) [99]. Sowohl PtdIns(4,5)P_2, als auch dessen Phosphorylierungsprodukt PtdIns(3,4,5)P_3, werden durch PH-Domänen gebunden. Allerdings unterscheiden sich verschiedene PH-Domänen in Ihrer Affinität zu den verschiedenen PtdInsPs sehr deutlich. Nur etwa 10% der Domänen binden hochaffin an Phospholipide [98]. Der Großteil bindet nur schwach an die Membran [100], was die Möglichkeit der promiskuitiven Bindung anderer Liganden (z.B. zu InsPs) erhöht.
Bereits 1997 konnte gezeigt werden, dass neben PtdInsPs ebenfalls lösliche Inositolphosphate um die PH-Domäne der Btk (Tyrosinkinase der Tec Familie) konkurrieren [101]. Im Laufe der Jahre folgten weitere Interaktionsstudien und sogar Proteinkristallisationen [102, 103], die die Kompetition von Inositolphosphaten und PtdInsPs mit PH-Domänen enthaltenen Proteinen untermauerten [98, 102, 103, 104, 105].
Auch PP-InsPs konkurrieren mit Phosphoinositiden um die Bindung an PH-Domänen. Erste Hinweise erfolgten im Modellorganismus *D. discoideum*. Dieser besitzt im Gegensatz zu Säugern bis zu 100mal [106] bzw. 300mal [21] höhere InsP_7 Konzentrationen (Gemisch aus 5PP-InsP_5 und 6PP-InsP_5 [22]) und es konnten Interaktionen zwischen InsP_7 und CRAC (PH-Domänen Protein, beteiligt an cAMP getriebener Chemotaxis) nachgewiesen werden [106].
Die Autoren der Studie untersuchten ebenfalls die Interaktion mit ausgewählten Säugerproteinen (Akt, PIKE und TIAM) *in vitro* und zeigten auch dort eine Kompetition mit PtdIns(3,4,5)P_3

[106]. Weitere Hinweise einer PP-InsP Bindung an PH-Domänen erfolgten durch Komander et al, 2004 [105]. Trotz des Nachweises einer schwachen Wechselwirkung zwischen der PH-Domäne von PDK (*3´Phoshoinositid-dependent-kinases*) und 5PP-InsP_5 wurde eine physiologisch relevante Wirkung auf Grund der geringen Affinität im Vergleich zu Ins(1,3,4,5,6)P_5 oder InsP_6 und letztlich auch der vergleichbar geringeren zellulären Konzentration von 5PP-InsP_5 als unwahrscheinlich erklärt [105].
Aktuelle Untersuchungen zeigen jedoch eindeutig einen regulierenden Einfluss insbesondere von 5PP-InsP_5 auf die Membranlokalisation und somit auf die Aktivität von Akt/PKB [64, 107]. 5PP-InsP_5 verhindert die Membranlokalisation und inhibiert die Aktivierung von Akt/PKB [107], was durch die Analyse von *downstream* Effektoren des Akt/PKB Signalwegs in IP6K *knock-out* Mäusen [58] bestätigt wurde.
Akt (auch als Protein Kinase B bezeichnet, PKB) ist eine Serin-Threonin Kinase des klassischen rezeptorvermittelten Phosphoinositid 3'-OH-Kinase (PI3K)-Signalwegs. Zur Verdeutlichung des Signalweges ist in Abbildung 1.7 ein deutlich vereinfachter Insulinsignalweg dargestellt. Nach der Bindung von Insulin an seinen Rezeptor (IR, Insulinrezeptor) erfolgt dessen Aktivierung durch trans-Autophoshorylierung von Tyrosinresten. Die Phosphorylierungen bieten Bindungsstellen für sogenannte Adapterproteine (hier IRS1, Isulinrezeptor Substrat 1), die weitere Proteine an die Membran rekrutieren und aktivieren. Im Fall des Insulinrezeptors rekrutiert IRS1 die PI3K an die Plasmamembran. Dort phosphoryliert die Kinase PtdIns(4,5)P_2 zu PtdIns(3,4,5)P_3, welche als membranständige Bindungspartner für Proteine mit PH-Domäne (hier Akt/PKB) dienen. Membranständige Akt/PKB wird nun durch PDK1 (Phosphoinositid abhängige Kinase), ebenfalls eine Kinase mit PtdIns(3,4,5)P_3 bindender PH-Domäne, phosphoryliert und aktiviert. Die volle Aktivität erlangt Akt/PKB jedoch erst durch eine weitere Phosphorylierung durch mTORC2 (Komplex mit *rapamycin-insensitive companion of mTOR*, rictor) an einer von PDK1 verschiedenen Position.
Aktivierte Akt/PKB hat als Kinase viele unterschiedliche *downstream* Effektoren, deren Aktivität durch Phosphorylierung z.T. direkt reguliert werden können [108]. Die wichtigsten Effektoren des Insulin Signalweges sind AS160 (AKT Substrat mit 160 KDa), GSK3ß (Glykogen Synthase Kinase 3ß), FOXO (*forkhead box O1*) und mTORC (*mammalian target of rapamycin complex*) (Abbildung 1.7).
AS160 als GTPase aktivierendes Enzym ist verantwortlich für die Translokation von GLUT4 (Glukose Transporter 4) und folglich die verstärkte Aufnahme von Glukose; die Akt/PKB vermittelte Phosphorylierung von GSK3ß inaktiviert GSK3ß und hebt den inhibierenden Einfluss auf die Glykogen Synthase auf; der Transkriptionsfaktor FOXO1 reguliert unter anderem die Expression von Genen der hepatischen Glukoneogenese und wird nach Phosphorylierung durch das Protein 14-3-3 im Zytoplasma zurückgehalten, so dass die Expression dieser Gene zum Erliegen kommt und die Akt/PKB vermittelte Aktivierung des Rapamycin sensitiven Komplexes (mTORC) die Translation reguliert und die Proteinbiosynthese steigert [108, 109].

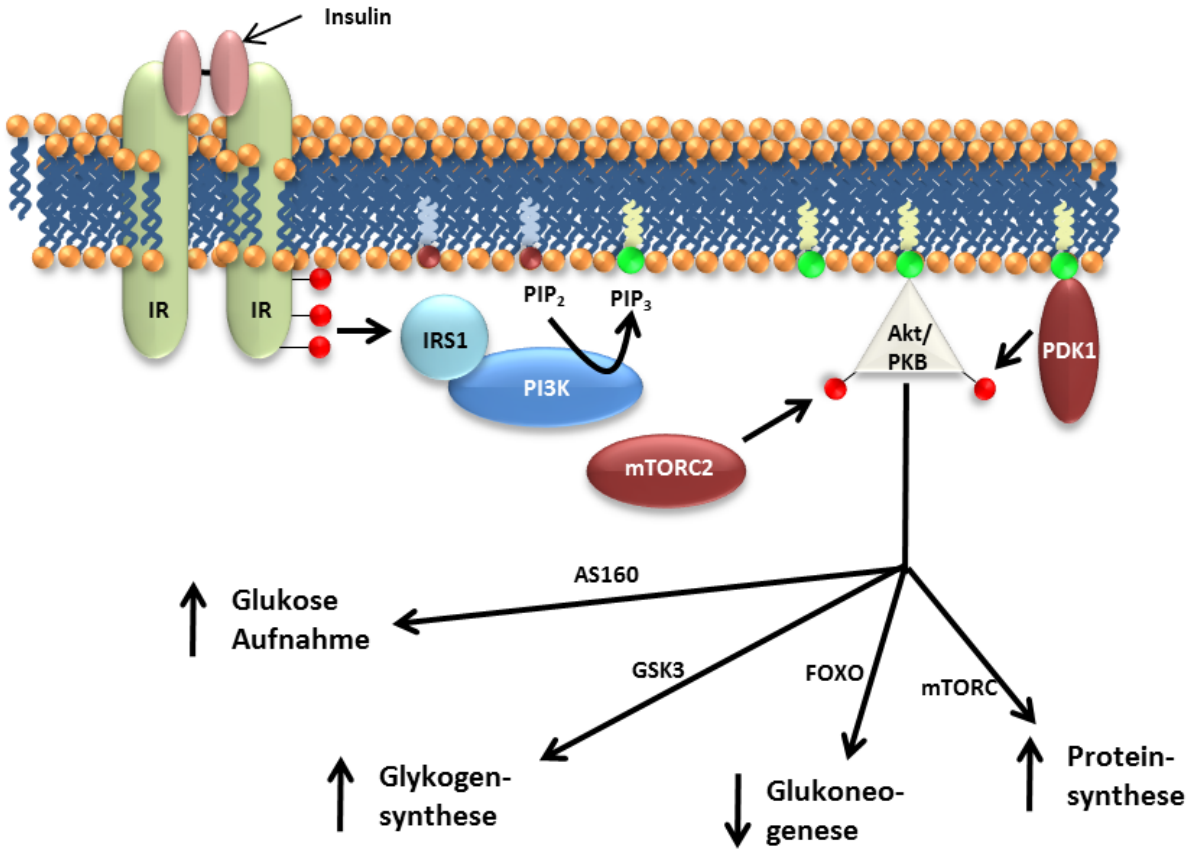


Abbildung 1.7: Komponenten des Insulin Signalweges zur Aktivierung von Akt/PKB. Die Bindung des extrazellulären Insulins führt nach Rezeptorautophosphorylierung zur Aktivierung der PI3K über das Adapterprotein IRS1. Die PI3K phosphoryliert PtdIns(4,5)P_2 (PIP_2) zu PtdIns(3,4,5)P_3 (PIP_3) an der inneren Membran. Akt/PKB bindet mit dessen PH-Domäne an PtdIns(3,4,5)P_3 und wird durch PDK1 sowie mTORC2 aktiviert. Die resultierenden Antworten der Zelle auf Insulin sind eine gesteigerte AS160 vermittelte Glukoseaufnahme, GSK3 regulierte Glykogensynthese, eine verminderte Glykoneogenese über FOXO1 sowie eine gesteigerte Proteinsynthese durch mTORC1. IR: Insulinrezeptor; IRS1: Isulinrezeptorsubstrat; PI3K: Phosphoinositid 3'-OH-Kinase; mTORC2: *mammalian target of rapamycin complex 2*; PDK1: *Phosphoinositide dependend kinase 1*. Die Abbildung wurde zusammengetragen aus [109] und modifiziert.

1.5 Die Familie der PDKG Kinasen

Die Familie der PDKG-Kinasen umfasst die Mehrzahl der Inositolphosphat Kinasen und deren Isoformen. Zu ihr zählen die Inositol-1,4,5-trisphosphat-3-Kinasen (IP3K) A, B und C, die Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK) und die Inositolhexakisphosphat Kinasen (IP6K) 1, 2 und 3. Die Familie wird definiert durch die hochkonservierten C-Termini, in denen jeweils die katalytische Domäne mit der Bindungsstelle für ATP und die Inositolphosphat Substrate (InsPs) lokalisiert sind (Abbildung 1.8).

Namensgeber der Familie ist eine Aminosäureabfolge innerhalb eines Motives, welches an der Positionierung der zwei Substrate ATP und InsPx und dem γ-Phosphattransfer von ATP auf

InsPx verantwortlich ist. Dieses Motiv wird wegen der in fett markierten konservierten Aminosäurereste **P**-C-[VI]-[ML]-**D**-X-**K**-[MI]-**G** als **PDKG** Motiv bezeichnet[110, 111]. Weitere Motive, die nicht namensgebend, aber ebenfalls essentiell für die Aktivität der Kinasen sind, sind das SSLL-Motiv, das G[FV]-Motiv (bzw. GFR-Motiv bei IP3K) und das DF[GA]-Motiv [33, 111, 112]. Der Hauptunterschied der Kinasen liegt im jeweiligen N-Terminus. Dort sind je nach Kinase Lokalisationssignale (NLS, NES) oder weitere regulatorische Segemente, die weitere Funktionen des Enzyms vermitteln (z.B. CaM-Bindedomäne oder F-Aktin Bindedomäne bei IP3K) vorhanden.

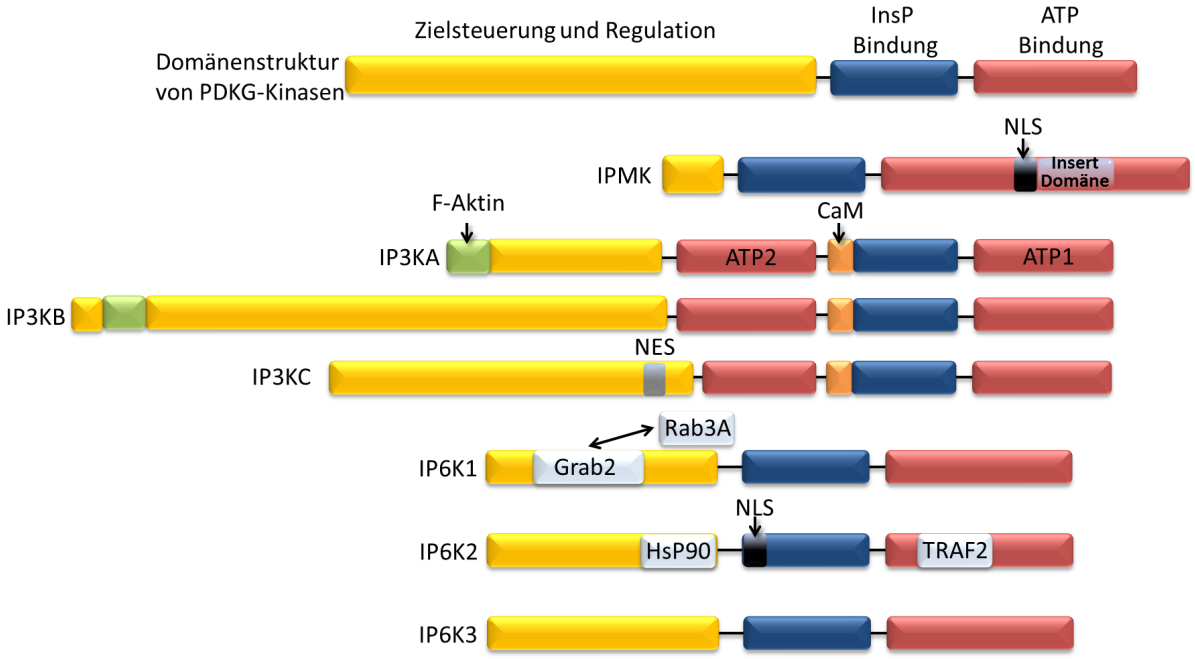


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Familie der PDKG Kinasen. Die N-Termini (links) sind gelb hinterlegt. Der hochkonservierte C-Terminus ist blau (InsP-Bindung) bzw. rot (ATP-Bindung) koloriert. Gezeigt sind neben der IPMK auch die Isoformen A, B, C der Inositol-1,4,5-trisphosphat-3-Kinasen (IP3K). Die unteren drei Schemata zeigen die Domänenstruktur der Inositolhexakisphosphatkinasen 1, 2 und 3 (IP6K1, 2, 3) mit entsprechenden nachgewiesenen, wechselwirkenden Proteinen. Die IPMK Insert Domäne ist ein ungewöhnlich großer Abschnitt, dessen Funktion noch nicht geklärt ist, von dem eine strukturbildende Funktion vermutet wird. Modifiziert nach [10] und kombiniert mit [113].

1.5.1 Die Inositolhexakisphosphat Kinasen als Mitglieder der PDKG-Kinasen

Entdeckt wurde die IP6K als *Phosphate uptake stimulator* (PiUS) in *Xenopus laevis* [114]. Die eigentliche Aktivität als Inositolphosphat Kinase wurde erst 2 Jahre später identifiziert [46], nachdem die Sequenz der PiUS Homologien zu einer kurz zuvor identifizierten IP6K aufwiesen. Die identifizierte IP6K wurde anschließend als Isoform 1 und die PiUS als IP6K2 bezeichnet [47]. Die 3. Isoform wurde aus zerebralem Gewebe isoliert [48] und ist bisher am wenigsten untersucht [51]. Anders als beim Menschen ist bei Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) nur eine Isoform

der IP6K bekannt, die als kcs1 bezeichnet wird [47, 95].
Die humanen Isoformen wie auch die Hefe kcs1 katalysieren die Pyrophosphorylierung der Position 5 von Ins(1,3,4,5,6)P_5, InsP_6, 1PP-Ins(3,4,5,6)P_4 und 1PP-InsP_5 (Abbildung 1.5) [14, 19, 23, 46, 47, 48]. Der Unterschied liegt jedoch in deren Aktivität gegenüber den Substraten [19], sowie deren gewebespezifischer und subzellulärer Lokalisation. *Northern Blot* Analysen von Mausgeweben ergaben, dass alle Isoformen im Gehirn stark exprimiert werden. Zusätzlich wird die Isoform 1 verstärkt in Hoden, die Isoform 2 in Lungengewebe und die Isoform 3 in neuronalem Gewebe exprimiert (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Gewebespezifische und subzelluläre Lokalisation der IP6K Isoformen 1, 2 und 3.

Isoform	Gewebe		Subzelluläre Lokalisation[b)]	Ref.
	Starke Expression	Schwache Expression		
IP6K1	Gehirn, Hoden	Herz, Niere, Leber, Lunge, Milz, pankreatische ß-Zellen[a)]	Zytoplasma, Nukleus	[47, 48, 57]
IP6K2	Gehirn, Lunge	Herz, Niere, Leber, Hoden, Darm, pankreatische ß-Zellen[a)]	Nukleus, Zytoplasma[c)]	[47, 48, 57, 114-116]
IP6K3	Gehirn, neuronales Gewebe	Niere	Zytoplasma	[48]

[a)] Analysen erfolgten nicht per *Northern Blot* sondern über quantitative RT-PCR [57]; [b)] Lokalisation als GFP Fusionsproteine; [c)] zytoplasmatische Lokalisation nur in NIH-OVCAR-3 Zellen [115, 116]

Neben der Gewebespezifität unterscheiden sich die Isoformen zusätzlich in ihrer subzellulären Lokalisation als GFP-Fusionsprotein (Tabelle 1.1). Während die Isoform 1 sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma der Zelle zu finden ist [48], liegt die Isoform 3 ausschließlich zytoplasmatisch vor [48]. Untersuchungen der Isoform 2 beschreiben das Enzym als ausschließlich nukläres Protein [48]. In späteren Studien an NIH-OVCAR-3 Zellen (eptiheliale ovariale Adenokarzinomzellen) stellte sich jedoch heraus, dass die IP6K2 dort eine zytosolische und perinukleäre Lokalisation aufweist. Erst die Behandlung mit IFN-ß führte zu einer nukleären Translokation [115, 116]. Gesteuert wird die nukleäre Lokalisation der IP6K2 durch ein bipartites NLS (298-YLRRELLGPVLKKLTEL-314), welches nur in der Isoform 2 zu finden ist und durch Aminosäuresubstitution basischer Reste inaktiviert werden kann [115].
Neben der katalytischen, pyrophosphorylierenden Aktivität der Kinasen wurden für die Isoformen 1 und 2 Interaktionspartner identifiziert, mit denen die Kinasen unabhängig von deren katalytischer Aktivität wechselwirken können (Abbildung 1.8). Für die Isoform 3 wurden bisher keine Protein-Protein Wechselwirkungen nachgewiesen.
Die IP6K1 interagiert N-terminal mit GRAB [117]. GRAB ist ein Guaninaustauschfaktor (GEF) für Rab3A, einem Mitglied der Ras-Onkogen-Familie. Rab3A ist als Ras ähnliche GTPase an

der Exozytose von synaptischen Vesikeln beteiligt. Eine Störung von Rab3A führt zum Zusammenbruch der Exozytose [118]. IP6K1, nicht aber die Isoform 2, bindet kompetitiv mit Rab3A an GRAB und verhindert bei Rab3A den Austausch des GDP zu GTP und somit dessen Aktivierung. Die Folge ist eine verringerte Exozytose [117]. Die genauen interagierenden N-terminalen Bereiche der IP6K1 mit GRAB konnten bisher jedoch nicht zugeordnet werden.
Für die IP6K2 wurden drei funktionelle Aminosäuremotive identifiziert und verifiziert. Von 4 C terminal gelegenen, identifizierten SXXE Motiven und konnten zwei als TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) Bindungsstellen charakterisiert werden (Abbildung 1.8). Über TRAF2 ist die IP6K2 in der Lage die NF-kB Bindung an die DNA zu unterbinden, wodurch dieser stressaktivierte Transkriptionsfaktor inhibiert wird [55].
Das dritte, N-terminal gelegene Motiv befindet sich zwischen den Aminosäuren V132 und S143 (132 VRQHRKEEKMKS-143) und wurde als physiologische Bindungsstelle des Hitze schock Proteins 90 (HSP90) verifiziert. Die Bindung des C-Terminus von HSP90 an die IP6K2 hat unter anderem zur Folge, dass die katalytische Aktivität der IP6K2 inhibiert wird und es zu einer deutlichen Reduktion des 5PP-InsP_5 Levels kommt [119].

1.6 PPIP5K, die "jüngste" Inositolpyrophosphat bildende Kinase des Inositolphosphat Metabolismus

Das Hefeenzym Vip ist ein zu PPIP5K (Diphosphoinositolpentakisphosphat Kinase) homologes Enzym und wurde in Kcs1 (IP6K der Hefe) und Ddp1 (Diphosphoinositol phopsphat Phosphatase) defizienten Hefen (*S. serviciae*) zum ersten Mal beschrieben [23, 49]. Es stellte sich heraus, dass trotz der Defizienz von Kcs1, geringe Mengen PP-InsP_5 gebildet wurden, die später als 1PP-InsP_5 identifiziert werden konnten [24, 50]. Im gleichen Jahr der Erstbeschreibung [23, 49] wurde die *Mammalia* Form aus Rattenhirnen gereinigt und charakterisiert [66]. In Anlehnung an diese Arbeit [66] und die Bezeichnung des Enzyms durch die Autoren als PPIP5K, hat sich dieser Name gegenüber hsVip (humane Vip) für die humane Variante durchgesetzt. Bisher wurden zwei Isoformen, PPIP5K1 (1433 Aminosäuren, ~160 kDa) und PPIP5K2 (1243 Aminosäuren, ~140 kDa), mit einer Aminosäuresequenzhomologie von 86% identifiziert [23, 49]. Beide Isoformen pyrophosphorylieren die Position 1 von InsP_6 und 5PP-InsP_5 (Abbildung 1.5). Weitere Substrate sind Ins(1,3,4,5,6)P_5 und dessen IP6K Produkt (wahrscheinlich 5PP-Ins(1,3,4,6)P_4 [19], Abbildung 1.5). Der Aufbau der PPIP5Ks unterscheidet sich deutlich von den PDKG-Kinasen, wie die Krstallstruktur zeigt (Abbildung 1.8). Die katalytische Domäne liegt N-terminal und ähnelt einer ATP-Grasp Domäne [50] (Abbildung 1.9), wie sie auch in ähnlicher Form bei der Inositol 1,3,4-trisphosphat 5/6 kinase (IP56K) zu finden ist [120]. Bei der PPIP5K1 liegt die katalytische Domäne zwischen den Aminosäuren 67 und 372 [49] und bei der Isoform 2 zwischen den Aminosäuren 37 (bzw. 41) und 366 [50].

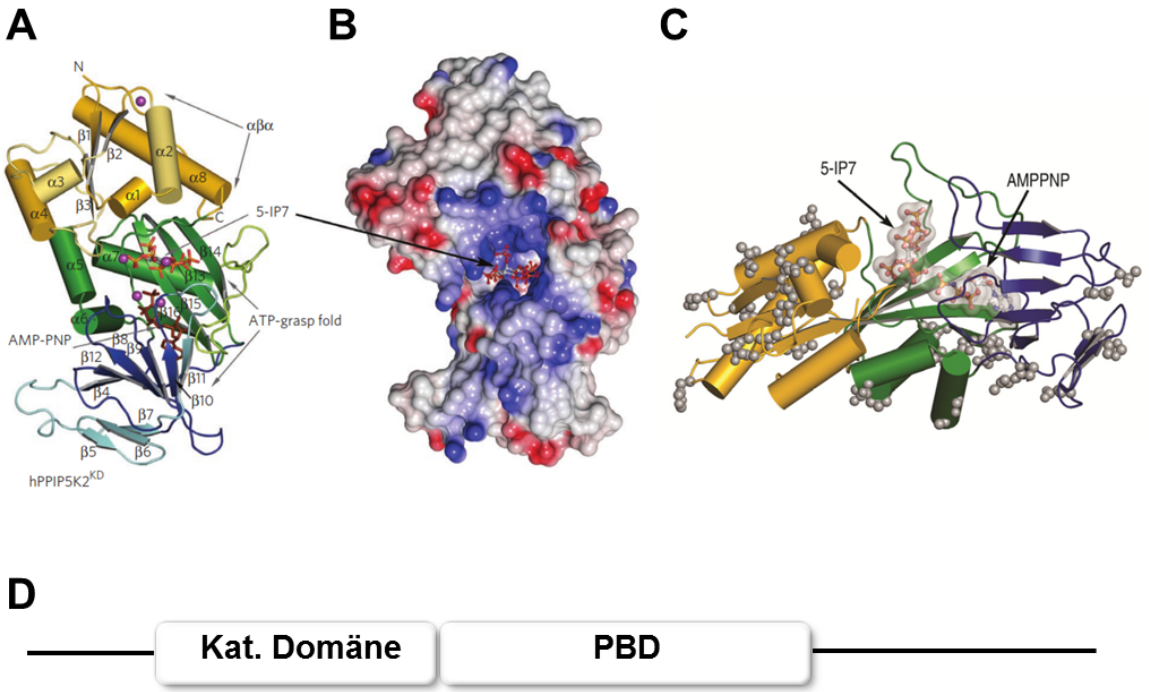


Abbildung 1.9: 3D-Struktur der katalytischen Domäne von PPIP5K2 mit 5PP-InsP$_5$ und AMP-PNP im aktiven Zentrum. Dargestellt ist die Domäne als Bandmodel mit α-Helices als Säulen und β-Faltblättern als antiparallele Pfeile (A und C) sowie als Modell mit positivem (blau) und negativem (rot) elektrostatischen Oberflächenpotential (B, physiologischer pH-Wert). Magnesium Ionen sind in lila und 5PP-InsP$_5$ bzw. AMP-PNP als Stabmodell wiedergegeben (A-C). Innerhalb der katalytischen Domäne befinden sich verschiedene Bereiche: Aminosäuren 42-124 und 330-366 (gelb) entsprechen einer αβα-Domäne; die grünen (AS 125-148 und 244-329) und blauen β-Faltblätter (AS 149-243) entsprechen der ATP-Grasp Domäne (A und C). 5PP-InsP$_5$ ist in einem deutlich positiv geladenen Bereich mit vielen basischen Aminosäuren eingebettet (B). (C) zeigt einen Vergleich der katalytischen Domäne der PPIP5K2 mit der katalytischen Domäne von PPIP5K1. Die voneinander verschiedenen Aminosäuren sind mit grauen Kreisen dargestellt und nicht an der Bindung der Substrate 5PP-InsP$_5$ oder AMP-PNP beteiligt, was für identische Aktivitäten spricht (C). (D) repräsentiert die stark vereinfachte Domänenstruktur beider PPIP5K Isoformen. Kat. Domäne: katalytische Domäne; PBD: Phosphatidylinositolphosphat bindende Domäne. Entnommen aus [50] und modifiziert.

Direkt hinter der katalytischen Domäne befindet sich bei beiden Isoformen eine Phosphatidylinositolphosphat bindende Domäne (PBD) [121], die früher auf Grund ihrer Sequenz als Histidinsaure-Phosphatase-ähnliche Domäne (HisPPD) beschrieben wurde [49]. Eine Aktivität der HisPPD konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden. Die PBD ermöglicht der PPIP5K vermutlich eine Translokation und Akkumulation an der Plasmamembran nach Stimulation der PtdIns(3,4,5)P$_3$ Synthese [121], die ich in unveröffentlichten Versuchen nicht verifizieren konnte (kein Bestandteil dieser Dissertation).

Neuere Studien zeigen, dass die Bindung der PPIP5K PDB an PtdIns(3,4,5)P$_3$ durch die Substrate der PPIP5K aber auch durch dessen Produkte inhibiert werden kann [122]. Die IC$_{50}$-Werte der Produkte 1PP-InsP$_5$ bzw. 1,5PP-InsP$_4$ liegen mit 43 µM und 32 µM jedoch weit über den freien zellulären Konzentrationen [19], so dass von einer Inhibition durch die Produkte *in vivo*

abgesehen werden kann. Die freien Konzentrationen der Substrate *in vivo* hingegen bewegen sich im Bereich der IC_{50}-Werte mit 7 µM ($InsP_6$) bzw. 5 µM (5PP-$InsP_5$) [122], sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Membranakkumulation der PPIP5K erst bei deutlicher PtdIns(3,4,5)P_3 Erhöhung erfolgt.
Der C-Terminus der Kinasen direkt hinter der PBD ist bei beiden PPIP5K Isoformen ein Bereich mit bisher unbekannter Funktion (Abbildung 1.9).
Trotz intensiver Arbeiten seit der Entdeckung und der Kristallisation der PPIP5K konnten bisher keine Interaktionspartner nachgewiesen werden, die auf mögliche katalytisch unabhängige Funktionen der Enzyme schließen könnten. Es wird jedoch auf Grund der Membranakkumulation vermutet, dass durch lokale InsP bzw. PP-InsP Konzentrationsänderungen durch die PPIP5K die Signalintensität von PtdInsPs vermittelten Signalkaskaden moduliert wird. Die lokale Änderung hätte eine veränderte Kompetition von weiteren PH-Domänen Proteinen und deren PtdInsP Interaktion zur Folge [122].

2 Zielsetzung

Inositolphosphate sind zelluläre Signalmoleküle bzw. sekundäre Botenstoffe, deren Vorkommen fein reguliert wird. Inositolhexakisphosphat ($InsP_6$) ist ein vollständig an allen 6 Hydroxylgruppen phosphoryliertes *myo*-Inositol das in der Natur am häufigsten vorkommt. Die Inositolhexakisphosphat Kinase (IP6K) verwendet $InsP_6$ als bevorzugtes Substrat und pyrophosphoryliert es mit Hilfe von ATP zumeist an der Position 5 zu 5PP-$InsP_5$. 5PP-$InsP_5$ ist ebenfalls ein Signalmolekül, das unter anderem die Insulinsekretion aus pankreatischen ß-Zellen unterstützt, aber auch unterschiedliche Proteine in ihrer Aktivität regulieren kann.
Von der humanen IP6K existieren 3 Isoformen von denen bezüglich der Substratspezifität die Isoformen 1 und 2 bereits relativ ausführlich untersucht wurden. Neben $InsP_6$ konnten dadurch noch weitere weniger phosphorylierte Inositolphosphatsubstrate identifiziert werden. Über die Regulation der humanen IP6K Aktivität hingegen ist bisher nur relativ wenig bekannt.
In Vorarbeiten konnte in der Arbeitsgruppe, z.T. von mir persönlich, gezeigt werden, dass in Gegenwart von hohen Substratkonzentrationen die Synthese von 5PP-$InsP_5$ aus $InsP_6$ durch die IP6K je nach Reaktionsbedingungen z.T. nicht vollständig verlief. Es wurde vermutet, dass die Aktivität der IP6K gegenüber $InsP_6$ durch eine Produktinhibition von entweder 5PP-$InsP_5$ oder ADP reguliert werden könnte. Diese Beobachtung und die im Vergleich zu anderen Inositolphosphat Kinasen ungewöhnlich hohen K_m-Werte für ATP führten zu der Hyothese, dass die IP6K durch ATP und ADP bzw. durch das Adenylat-Energiepotential ([ATP]/([ATP]+[ADP]) in ihrer Aktivität reguliert wird und so als "über die Zeit integrierender" Sensor dieses Potentials dienen könnte. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Regulation aller drei Isoformen der humanen IP6K über deren Substrate und ganz besonders durch das Adenylat-Energiepotential untersucht werden.
Dazu sollten die humanen Isoformen 1, 2 und 3 der IP6K kloniert, bakteriell exprimiert, gereinigt und deren *steady state* kinetischen Eigenschaften in Gegenwart von variiertem ATP und ADP im Einzelnen analysiert werden. Kombinationen aus beiden Nukleotiden sollten das Adenylat-Energiepotential *in vitro* simulieren und somit einen möglichen Einfluss auf die Aktivität der Kinase zeigen. Darüber hinaus sollte die Akzeptanz und positionsspezifische Phosphorylierung von allen möglichen $InsP_5$ Isomeren als Substrat weiter untersucht werden.
Die Relevanz der *in vitro* erhobenen Daten sollte durch die Übertragung auf entsprechende Zellkulturmodelle bestätigt werden. Es sollten für verschiedene Zelllinien weiterhin geeignete Methoden entwickelt werden, die eine artifizielle Veränderung des Adenylat-Energiepotentials

ermöglichen. Diese Methode sollte es nun gestatten, den resultierenden Effekt auf die IP6K in lebenden Zellen zu studieren und durch geeignete Kontrollen sicher nur den IP6K Enzymen zuzuordnen.

3 Material

3.1 Oligonukleotide/Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

3.1.1 Sequenzieroligonukleotide/-primer

Sequenzieren von IP6K1
TW78 : 5´…GGTTACATCAACTTAGTGGCC…3´
TW79 : 5´…CAATATCTGCACAATGGCCTG…3´
TW80 : 5´…CTGCTGCTTGTGACAACGCAG…3´
Sequenzieren von IP6K2
TW72 : 5´…CTTCAGATTTCTTTAGCCACTC…3´
TW73 : 5´…GTGCGTCAGCACCGTAAAGAG…3´
Sequenzieren von IP6K3
TW81 : 5´…GTGCACCTCTGGAAAGACAGC…3´
TW82 : 5´…GGAAGAAAACTCTCAGTGGAG…3´
TW83 : 5´…CTTGTTCTCTGGGTACTCGGA…3´

3.1.2 Klonierungsoligonukleotide/-primer

Anfügen einer N-terminalen ACCIII und C-terminalen BGlII Schnittstelle an IP6K2 (pEPito)
TW 70 : 5´…GTTCCGGAATGAGCCCAGCCTTC…3´
TW 71 : 5´…GTAGATCTTCACTCCCCACTCTC…3´
Anfügen einer N-terminalen EcoRI und C-terminalen NotI Schnittstelle an IP6K1
TW74 : 5´…GAATTCAATGTGTGTTTGTCAAACCATGG…3´
TW75 : 5´…GCGGCCGCCTACTGGTTCTCGTCCCGCATC…3´
Anfügen einer N-terminalen EcoRI und C-terminalen NotI Schnittstelle an IP6K3
TW76 : 5´…GAATTCAATGGTTGTGCAAAACAGCGCAG…3´
TW77 : 5´…GCGGCCGCTCATTCTCCCTCTTGGATATCC…3´

3.1.3 Intronüberspannende Primer für die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR)

Zum Nachweis der IP6K1
TW84(L) : 5´…CCTGTCCCTTGAGACCTCTG…3´
TW85(R) : 5´…GGACCTCTGAGTGGCTGTG…3´
Zum Nachweis der IP6K2
TW86(L) : 5´…ACATGGTGATGATGCTTCAGA…3´
TW87(R) : 5´…CCACTGCCTGCTTGGTACA…3´
Zum Nachweis der IP6K3
TW88(L) : 5´…TTCCATACACTCCCCACGAT…3´
TW89(R) : 5´…CCTCCTGTCTGTGGGTTCTC…3´

3.2 Geräte

Gerät	**Firma**
Zentrifuge Biofuge pico	Haraeus
Zentrifuge Biofuge fresco (4°C)	Haraeus
Zentrifuge Cryofuge 8500i	Haraeus
Zentrifuge RC5C plus	Sorval
Rotoren GSA, SM24, SS34	Sorval
Biophotometer	Eppendorf
Nano Drop 2000c	Thermo Scientific
Multiscan FC	Thermo Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortexer VF2	Janke & Kunkel
Vortex Genie 2	Scientific Industries
PCR-Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf
PCR-Cycler Mastercycler personal	Eppendorf
Gene Power Supply GPS 200/400	Pharamcia
2197 Powersupply	LKB Bromma
Brutschrank für Bakterienkulturen	Memmert
Shaker series 25	New Brunswick Scientific
Waage PM480 Delta Range	Mettler
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph
Kamera Vario Cam	Phase
Drucker Video Graphic Printer UT860CE	Sony
UV-Tisch	Bachofer

Gerät	Firma
Gelkammer	Phase
Schüttelwasserbad 1086	GFL
Schüttler Duomax 1030	Heidolph
Schüttler Rotamax 120	Heidolph
Clean Bench LaminAir HB 2448K	Haraeus
Heizblock TRIO Thermoblock	Biometra
Vakuumzentrifuge	Bachofer
MDD-HPLC	
Äkta Prime	Amersham Bioscience
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Casy counter	Schärfe Systems

3.3 Kits

Kit-Name	Firma
Nucleo Spin Plasmid	Macherey Nagel
Nucleo Spin Extract	Macherey Nagel
Nucleo Spin RNAII	Macherey Nagel
Endofree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN

3.4 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck, DB (Becton, Dickinson & Co.), Invitrogen, Biomol, Calbiochem, Sigma, Roche, Fluka, Serva, Biorad und Roth bezogen.

3.5 Enzyme

Bezeichnung	Aktivität	Firma
Taq Polymerase	5 U/µL	Invitrogen
Phusion Polymerase	2 U/µL	Thermo Scientific
Pfu Ultra^{TM} II	2,5 U/µL	Stratagene
EheI	10 U/µL	Fermentas
XhoI	10 U/µL	Fermentas
EcoRI	10 U/µL	Fermentas

Bezeichnung	**Aktivität**	**Firma**
NotI	10 U/µL	Fermentas
SalI	10 U/µL	Fermentas
PstI	10 U/µL	Fermentas
Hexokinase	340 U/mL (25°C)	Roche
Pyruvatkinase	200 U/mL (25°C)	Roche
Pyruvatkinase	500 U/mL (37°C)	Roche

3.6 Plasmide

Bezeichnung	**Resistenz**	**Firma**
pGEX-4T3	AmpR	GeHealthcare
pGEX-KG-IP6K-2	AmpR	bereitgestellt von Stephen B. Shears, NIH
pET17b	AmpR	Novagen

3.7 Bakterienstämme

Stammbezeichnung	**Genotyp**
BL21 Star™(DE3)	F^- ompT hsdSB (rB^- mB^-) gal dcm rne131 (DE3)
C41(DE3)pLysS	F^- ompT hsdSB (rB^- mB^-) gal dcm λ (DE3) pLysS (Cm^{R*})
XL1 blue	endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 $proAB^+$ $lacI^q$ Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K^- m_K^+)

3.8 Säulenmaterial

Matrixbezeichnung	**Säulenvolumen (SV)**	**Firma**
HiTrap DEAE FF	1 mL / 5 mL	GE Healthcare
MiniQ PC 3.2/3 HPLC-Säule	0,24 mL	Pharmacia
GST Buster QF-Glutathione	1-2 mL	Amocol
P11 Phosphocellulose	1-2 g	Whatman
StrepTactin Sepharose High Performance	1-7 mL	GE Healthcare

3.9 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Bezeichnung	**Kat-Nr.**	**Firma**
DMEM, *high glucose* (*Dulbecco´s modified eagle medium*)	41965-039	Gibco®
FBS (*fetal bovine serum)*	10500-064	Gibco®
Pen/Strep (Penicillin/Streptomyzin)	15140-122	Gibco®
10x Trypsin/EDTA (0,5%/0,2% (w/v) in 10xPBS)	L2153	BiochromAG

3.10 Puffer und Lösungen

LB-Medium (1000 mL)	25 g Difco™,LB Broth (Luria-Bertani) Mit H_2O auf 1000 mL auffüllen, pH-Wert auf 7,2 einstellen und autoklavieren
LB-Agar	12,5 g Bacto®-Trypton 7,5 g Difco® Agar Mit H_2O auf 500 mL auffüllen, pH-Wert auf 7,2 einstellen und autoklavieren
RFI	100 mM RbCl 50 mM $MnCl_2$ 30 mM Kaliumacetat 10 mM $CaCl_2$ 15 % Glycerin pH-Wert auf 5,8 mit Essigsäure einstellen
RFII	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM $CaCl_2$ 15 % Glycerin pH-Wert auf 6,8 mit Essigsäure einstellen
6x DNA Probenpuffer	30% Glycerol in H_2O 0,1 % Bromphenolblau

Mg^{2+} Stock (20 mL)	5,08 g $MgCl_2$ x $6H_2O$ 6,16 g $MgSO_4$ x $7H_2O$ Mit 20 mL H_2O aufgießen; steril filtrieren
SOC-Medium (100 mL)	2,0 g Bacto®-Trypton 0,5 g Bacto®-Hefe Extrakt 1 mL 1 M NaCl 1 mL 1 M KCl 1 mL 2 M Mg^{2+}-Stock* 1 mL 2 M glucose (steril) pH-Wert auf 7,0 einstellen
1x PBS	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 4,3 mM Na_2HPO_4 1,47 mM KH_2PO_4
Puffer A	25 mM HEPES 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 pH-Wert auf 7,5 einstellen
Puffer B	Puffer A +750 mM NaCl
Bst-Puffer	75 mM HEPES 1 mM EDTA 2 mM DTT 150 mM NaCl 0,1 % Triton X-100 pH-Wert auf 8,0 einstellen
Est-Puffer	Bst-Puffer + 2,5 mM Desthiobiotin (DTB)

4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-Cl, pH 8,8 0,4% SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-Cl, pH 6,8 0,4% SDS
10% Trenngel	3,33 mL 30% Acrylamid-0,8% N,N-Methylbisacrylamid 2,50 mL 4x Trenngelpuffer 4,07 mL H_2O 50 µL 10% Ammoniumpersulfat (APS) 10 µL TEMED
4,8% Sammelgel	0,8 mL 30% Acrylamid-0,8% N,N-Methylbisacrylamid 1,25 mL 4x Sammelgelpuffer 2,88 mL H_2O 25 µL 10% Ammoniumpersulfat (APS) 10 µL TEMED
1x Laemmli Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
4x Probenpuffer	0,2 M Tris-Cl, pH 6,8 5,4% ß-Mercaptoethanol 0,04% Bromphenolblau 8,8% SDS 15% Glycerin
Minimalmedium	140 mM NaCl 20 mM HEPES, pH 7,4 5 mM KCl 1 mM Na_2HPO_4 1 mM $MgSO_4$ 0,5 mM $CaCl_2$ 1 mg/mL BSA 2,5 mM Glukose (optional)

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Allgemeines mikrobiologisches Arbeiten

Die Arbeitsmaterialien für mikrobiologische Arbeiten wie Reaktionsgefäße, Glaswaren, Pipettenspitzen und temperaturstabile Lösungen wie LB-Medien werden vor der Verwendung bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 1,2 bar für 35 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen (Antibiotika) werden steril filtriert und nachträglich unter einer mikrobiologischen reinen Produktschutzwerkbank hinzugegeben. Arbeitsflächen und Geräte werden vor der Benutzung mit 70%-igem Ethanol desinfiziert.

4.1.2 Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli*

Die Bakterienstämme werden bei -80°C in RFII Lösung gelagert. Die Anzucht von Bakterien erfolgt durch Ausstreichen der aufgetauten Suspension des Stammes auf LB-Agar Platten mit entsprechendem Antibiotikum. Inkubiert wird über Nacht bei 37°C. Mit Parafilm versiegelte LB-Agar Bakterienplatten können bei 4°C maximal 4 Wochen gelagert werden. Die Anzucht von Bakterien erfolgt als Suspensionskultur in LB Medium aus Einzelkolonien bei 37°C und 250 rpm im Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific, USA). Inkubiert wird die Kultur bis zu 18 Stunden über Nacht. Als Zusätze dienen die entsprechenden Antibiotika gegen intrinsische Resistenzen oder transformierte Resistenzplasmide (Tabelle 4.1).
Nach Autoklavieren des LB-Agars wird das Medium leicht abgekühlt, das entsprechende Selektionsantibiotikum hinzugegeben, mit etwa 0,5-1,0 cm Füllhöhe auf Petrischalen verteilt und ausgehärtet. Die Lagerung der Platten erfolgt bei 10-15°C für maximal 4 Wochen.

4.1.3 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli*

Das Verfahren zur Herstellung chemokompetenter Zellen basiert auf dem $RbCl_2$-Verfahren nach Hanahan, 1983 [123]. Aus einer bei -80°C gelagerten, chemokompetenten *Escherichia coli* Zellsuspension werden 10 µL entnommen und zu 50 mL LB-Medium mit Selektionsantibiotikum (Tabelle 4.1), gegeben:

Tabelle 4.1: Verwendete *Escherichia coli* Stämme mit entsprechendem Resistenzantibiotikum und Arbeitskonzentration.

Escherichia coli Stamm	Antibiotikum	Endkonzentration
XL1 blue	Tetrazyklin	12,5 µg/mL
C41 (DE3)pLysS	Chloramphenicol	30 µg/mL
BL21 Star™(DE3)	Keine intrinsische Resistenz	

Die jeweilige Bakteriensuspension wird bei 37°C im Schüttelinkubator in LB-Medium kultiviert. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6 wird das Medium für 15 min auf Eis gekühlt und im Anschluss für 15 min bei 4°C und 1000xg zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1/3 des Ausgangsvolumens kalter, steril filtrierter RFI Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 1000xg wird das Zellpellet in 1/12,5 des Ausgangsvolumens kalter, ebenfalls steril filtrierter RFII Lösung vorsichtig resuspendiert und ein weiteres Mal für 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden in Aliquoten zu 100 µL in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.4 Transformation von chemokompetenten *Escherichia coli*

Mit einer Transformation werden Zellen angeregt, vektorielle Fremd-DNA aus deren Medium aufzunehmen. Die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen werden auf Eis angetaut. Für eine Retransformation genügt eine Vektormenge von 15-50 ng. Auf Grund der nicht zu ermittelnden Konzentrationen eines *Quick-Change-Mutagenese* Ansatzes (4.2.4) oder eines Ligationsansatzes (4.2.1) wirde jeweils der halbe Ansatz mit 15-25 µL zu der Zellsuspension von 100 µL gegeben, leicht verrührt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für 45-60 Sekunden bei 42°C. Nach erneutem Kühlen für 2 min auf Eis werden 900 µL vorgewärmtes LB- oder SOC-Medium (3.10) zu den Bakterien gegeben und bei 37°C unter leichtem Schütteln (600 rpm) im Thermoschüttler für eine Stunde inkubiert. Je nach Art der Transformation und Kompetenz der Bakterien wurden unterschiedliche Volumina auf LB Agar-Platten mit Selektionsmedium gegen die Plasmide ausplattiert. Nach einer Plasmid Retransformation wurden 50-100 µL der transformierten Bakteriensuspension und nach einer *Quick-Change*-Mutagenese oder eines Ligationsansatzes wurden 2 LB-Agar Platten mit je 100 µL und 900 µL Bakteriensuspension ausplattiert.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Ligation von DNA Fragmenten

Die zu ligierenden DNA Doppelstrang Fragmente (Insert und Zielvektor) werden im Anschluss an einen präparativen Restriktionsverdau (4.2.8) aus Agarose Gelen extrahiert (4.2.6) (Nukleo-

spin Plasimd Kit, Macherey Nagel) und deren Konzentration gemessen (4.2.10). Optional kann der Zielvektor vor der Agarose Gelextraktion mit antarktischer Phosphatase versetzt werden, um die Anzahl an religierten Vektoren zu minimieren.
Unter ATP Verbrauch (T4-Ligase Puffer) verbrückt die verwendete T4 Ligase jeweils das frei vorliegende 5´-Phosphatende mit der freien 3´-Hydroxygruppe der zuvor präparativ mit Restriktionsendonukleasen verdauten DNA Doppelstränge (4.2.8).
Für die Ligation werden die verdauten, aus dem Gel extrahierten Fragmente (vgl. Nukleospin Plasimd Kit, Macherey Nagel) in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 (Vektor:Insert) eingesetzt und über Nacht mit der T4-Ligase in einem Gesamtvolumen von 40 µL bei 15°C inkubiert. 50% des Ligationsansatzes wird für eine Transformation in *E. coli* XL1blue eingesetzt.

Ansatz	
50 ng	Vektor
1:1-1:3	Insert (molares Verhältnis)
4 µL	10x Ligase Puffer
x µL	H_2O
0,5 µL	T4-Ligase
auf 40 µL	mit H_2O auffüllen

4.2.2 Kolonie-Polymerase Ketten Reaktion (Kolonie-PCR) als initialer Hinweis von erfolgreichen Ligationen

Eine Kolonie-PCR dient einer ersten Analyse von transformierten Ligationsansätzen. Die Bakterien werden direkt bei der PCR (4.2.7) durch die initiale Deanturierung lysiert um die transformierten Plasmide/Vektoren ohne vorherige Plasmid-Präparation zu analysieren. Diese Methode spart Zeit, Geld und Material, ist aber auf Grund hoher Fehlerquellen (falsch positive Klone) nicht als alleinige Kontrolle einer Ligation geeignet. Es werden etwa fünf bis zehn Einzelkolonien einer LB-Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausgewählt, mit jeweils einem autoklavierten Zahnstocher gepickt und auf einer weiteren LB-Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen („*Back-up* Platte“). Der verbleibende Kolonierest wird in 50 µL H_2O überführt (Koloniesuspension). Eine direkte Überführung der gepickten Kolonien in den PCR-Ansatz ist möglich, kann aber zu Störungen durch verschlepptes Agar in der PCR führen. Zur Lyse der Bakterien bedarf es bei dieser Art der PCR einer verlängerten initialen Denaturierung.

Ansatz mit Koloniesuspension		Ansatz direkt mit Kolonie	
0,5 µL	Primer 1	0,5 µL	Primer 1
0,5 µL	Primer 2	0,5 µL	Primer 2
0,6 µL	50 mM $MgCl_2$	0,6 µL	50 mM $MgCl_2$
2 µL	10x PCR-Puffer	2 µL	10x PCR-Puffer
0,8 µL	5 mM dNTP Mix	0,8 µL	5 mM dNTP Mix
0,1 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)	0,1 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)
10,5 µL	H_2O	15,5 µL	H_2O
5 µL	Koloniesuspension	+ Kolonie	
Σ 20 µL		Σ 20 µL	

Die Ansätze werden vollständig für die PCR eingesetzt und durchlaufen folgende Zyklen:

3 min	Initiale Denaturierung	94°C	
30 Sek.	Denaturierung	94°C	⎫
1 min	Annealing	50-58°C	⎬ 35 Zyklen
1,5-4 min	Elongation	68-72°C	⎭
10 min	Elongation	68-72°C	

Die Annaelingtemperatur ist abhängig von den verwendeten Primern und liegt etwa 15°C unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur. Die Elongationszeiten werden von der Geschwindigkeit der eigesetzten Polymerase und der Größe des Inserts (Anzahl an Nukleotiden) determiniert. Verwendete Polymerasen sind Taq (1-1,5 kb/min; Invitrogen), Pfu Ultra™ II (2 kb/min; Stratagene) und Phusion Hot Start II (2-4 kb/min; ThermoScientific). Die Analyse der Amplifikate erfolgt auf einem Agarose Gel mit 0,5-1,0% Agarose in 1xTAE (4.2.6).

4.2.3 Analytischer Restriktionsverdau von ligierten Plasmiden/Vektoren

Zur Kontrolle von ligierten DNA Fragmenten gibt eine Kolonie-PCR (4.2.2) erste Hinweise, auf Grund derer eine Vorselektion getroffen wird. Die positiv erscheinenden Kolonien werden von der „*Back-up* Platte“ gepickt und die ligierten Fragmente nach einer über Nacht Kultur (4.1.2) isoliert (4.2.9). Ähnlich dem präparativen Restriktionsverdau zur Vorbereitung des Plasmids und des Inserts für die Ligation wird mit denselben Enzymen und Puffern in geringerem Volumen geschnitten. Die Ínkubation der Restriktion bei 37°C wird auf etwa eine Stunde reduziert. Die Analyse erfolgt auf einem Agarose Gel mit 0,5-1% Agarose in 1x TAE (4.2.6).

2 µL	10x Puffer
1 µL	Restriktionsenzym 1
1 µL	Restriktionsenzym 2
~700 ng	pDNA
auf 20 µL	mit H_2O auffüllen

4.2.4 *QuickChange* PCR-Mutagenese zur gezielten Veränderung von Nukleinsäuren

Die *QuickChange* PCR-Mutagenese (QC-PCR) ist eine Methode zur spezifischen Veränderung von Nukleinsäuren. Dazu zählen das Entfernen oder Einfügen von Punktmutationen zum Austausch von einzelnen Aminosäuren oder mehrerer Aminosäuren durch multiple Insertionen, Deletionen oder Mutationen. Die Primerlänge variiert mit der gewünschten Veränderung der Nukleinsäure und besteht aus mindestens 33 Basen. Die gezielte Mutation in der Mitte der Primer wird zu jeder Seite von etwa 15 zur Nukleinsäure komplementären Basen flankiert. Die Primer sind zueinander selbst komplementär und unterscheiden sich somit von denen einer normalen PCR. Auf Grund der Komplementarität findet die zirkuläre Amplifikation des Plasmids in zwei voneinander isolierten PCR Ansätzen mit jeweils einem Primer und 12-15 Zyklen statt. Im Anschluss werden die Reaktionsansätze vereint und mit zusätzlicher Polymerase für weitere 16-20 Zyklen der PCR unterzogen.
Die für diese Arbeit verwendeten QC-PCR Ansätze dienen in erster Linie der Entfernung von unerwünschten, während der Amplifikationen aufgetretenen, zufälligen Mutationen.

1. Ansatz		2. Ansatz	
5 µL	5x HF Puffer	5 µL	5x HF Puffer
1,25 µL	dNTPs (5 mM)	1,25 µL	dNTPs (5 mM)
1 µL	Mutagenese-Primer 1 (10 pmol)	1 µL	Mutagenese-Primer 2 (10 pmol)
~25 ng	Template	~25 ng	Template
1 µL	Phusion Hot start	1 µL	Phusion Hot start
auf 25 µL	mit H_2O auffüllen	auf 25 µL	mit H_2O auffüllen

Beide Ansätze durchlaufen die ersten 12-15 Zyklen mit

30 sek.	Initiale Denaturierung	94°C	
30 Sek.	Denaturierung	94°C	12-15 Zyklen
1 min	Annealing	Primerspez.	
4-10 min	Elongation	68-72°C	

Nach Ablauf der Reaktionen werden die Ansätze vereint und für weitere 16-20 Zyklen mit demselben Programm im Cycler umgesetzt.
Der Gesamtreaktion wird ein DpnI-Verdau angeschlossen.

4.2.5 DpnI Restriktionsverdau zur Selektion von gezielt mutagenisierten Amplifikaten

Aus Bakterien isolierte Plasmide/Vektoren liegen in der Regel methyliert vor. Werden diese bei einer PCR oder QC-PCR als Template eingesetzt sind deren Amplifikate nicht methyliert. DpnI ist eine Restriktionsendonuklease dessen häufig vorkommende palindromische Schnittstelle

zur Erkennung methyliert ist. Wird im Anschluss an eine QC-PCR ein DpnI Verdau durchgeführt, so erkennt und verdaut es nur das methylierte, unmutierte Template, nicht aber das unmethylierte, mutagenisierte Amplifikat.
Vor dem DpnI Restriktionsverdau werden 10 µL des QC-PCR Ansatzes zur späteren Analyse entnommen. Der verbleibende Rest (40 µL) wird für die Selektion durch DpnI eingesetzt.

40 µL	QC-PCR-Ansatz
1 µL	DpnI

Der Restriktionsansatz mit DpnI wird für mind. 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die QC-PCR Ansätze vor dem Verdau (s.o.), sowie nach der Restriktion (je 10 µL) werden auf einem Agarose Gel mit 0,5-1% Agarose analysiert. Es wird eine Transformation in *E. coli* XL1blue angeschlossen (4.1.4).

4.2.6 Agarose Gelelektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren

Agarose wird aus den Rotalgengattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen und ist ein aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose bestehendes Polysaccharid mit etwa 400 Disacchariden. Gelöst wird der Feststoff Agarose durch Kochen in 1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA Puffer). Während des Abkühlens bildet Agarose ein Netzwerk mit Poren, deren Größe von der Konzentration der Agarose abhängig ist. Die Größentrennung von Nukleinsäuren erfolgt auf Grund einer von außen angelegten Spannung nach der jeweiligen Porengröße.
Durch Vergleich der Laufstrecken von DNA-Fragmenten mit bekannter Größe (1 kb DNA-Marker) und des zu analysierenden Fragments wird die Größe und somit die Basenanzahl der Nukleinsäure abgeschätzt. Je nach erwarteter Fragmentgröße und Trennvermögen werden verschiedenprozentige Gele verwendet. Als Faustregel gilt: Kleine Fragmente werden in hochprozentigen Gelen, große Fragmente in niedrigprozentigen Gelen besser getrennt.
Für die Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Fragmente werden Gele hergestellt, die einen Agaroseanteil von 0,5-1% besitzen. Für Gele mit 1% Anteil werden 0,5 g Agarose in 50 mL 1xTAE Puffer in der Mikrowelle erhitzt, leicht abgekühlt und mit 1,5 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL) versetzt. Analytische Gele werden mit 10 oder 20 Probenkammern mit je ~25 µL und präparative Gele mit 6 oder 12 Kammern zu je ~60 µL Fassungsvolumen gegossen. Die Proben werden mit 6xDNA-Probenpuffer beschwert und in die Kammern überführt (Endkonzentration DNA-Probenpuffer: 1x) .
Die Fragmente werden für 45 min in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 80 V getrennt. Die Visualisierung der Fragmente erfolgt nach Fluoreszenzanregung der EtBr-DNA Komplexe bei einer Wellenlänge von 312 nm.

4.2.7 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) zur Amplifikation von Nukleinsäuren

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist eine zyklische Reaktion zur Amplifikation von doppelsträngiger DNA. Ein Zyklus besteht aus der Denaturierung der DNA bei 94°C, der Primeranlagerung (Annealing) bei 50-58°C und der Elongation der angelagerten Primer am Template bei 68°C (Pfu Polymerase) oder 72°C (Phusion Hot Start), für bestimmte Zeiten. Die Annealingtemperatur wird jeweils 10-15°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer gewählt.
Verwendet wird die PCR für die Amplifikation der jeweiligen Protein kodierenden DNA von IP6K1, IP6K2 und IP6K3 aus deren Ursprungsvektoren. Die verwendeten Klonierungsprimer (3.1.2) sind jeweils mit spezifischen, terminal gelegenen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonuklasen versehen um eine anschließende Klonierung in die genannten Vektoren (3.6) nach Gelextraktion (4.2.6) der Amplifikate zu ermöglichen.

Ansatz Pfu		Ansatz Phusion	
1 µL	Primer 1 (10 pmol)	1 µL	Primer 1 (10 pmol)
1 µL	Primer 2 (10 pmol)	1 µL	Primer 2 (10 pmol)
2,5 µL	dNTPs Mix (5 mM)	2,5 µL	dNTPs Mix (5 mM)
5 µL	10x Pfu Puffer	10 µL	5xHF Puffer
1 µL	Pfu-Polymerase	1 µL	Phusion Hot Start
x µL	H_2O	x µL	H_2O
ca. 50 ng	Template DNA	ca. 50 ng	Template DNA
auf 50 µL	mit H_2O auffüllen	auf 50 µL	mit H_2O auffüllen

Die Ansätze durchlaufen je nach Template Größe folgende Zyklen:

30 sek.	Initiale Denaturierung	94°C	
30 Sek.	Denaturierung	94°C	25-30 Zyklen
1 min	Annealing	50-65°C	
ca. 0,5 min/kb	Elongation	68°C	
5 min	Elongation	68°C	

Die Analyse der Ansätze erfolgt auf einem Agarose Gel mit 0,5-1% Agarose Anteil.

4.2.8 Präparativer Restriktionsverdau zur Vorbereitung von Nukleinsäuren auf eine folgende Ligation

Präparative Verdaus dienen als Vorstufe für eine folgende Ligation (4.2.1). Die isolierten Vektoren bzw. gelextrahierten PCR-Amplifikate (4.2.7) werden nach der Konzentrationsbestimmung direkt für einen präparativen Restriktionsverdau eingesetzt. Verwendet werden jeweils Mengen von ca. 1-1,5 µg in einem Gesamtvolumen von 50 µL. Liegen die Erkennungssequenzen zweier Restriktionsenzyme weit genug auseinander, so kann ein Doppelverdau simultan durchgeführt werden. Ist dies nicht der Fall werden konsekutive Restriktionen durchgeführt.

Es werden jeweils die gemeinsamen Puffer verwendet, in denen beide Restriktionsendonukleasen die höchsten Aktivitäten aufweisen. Durch die Kombination der Puffer abweichende Enzymaktivitäten werden durch Variation der eingesetzten Enzymmenge ausgeglichen. Liegen bei beiden Enzymen keine hohen Aktivitäten in den verwendeten Puffern vor, so wird über Nacht (ca. 16 Stunden), mindestens jedoch für 2 Stunden bei 37°C verdaut. Der gesamte Ansatz wird im Anschluss auf Agarose Gelen analysiert (4.2.6), extrahiert (3.3) und für die Ligation (4.2.1) eingesetzt.

Restriktionsverdau von Zielvektor und Insert bei 100% Aktivität (getrennte Ansätze)

1-1,5 µg	Vektor oder Insert
5 µL	10x Puffer X (X = variabel)
1 µL	Restriktionsendonuklease A
1 µL	Restriktionsendonuklease B
x µL	H_2O
auf 50 µL	mit H_2O auffüllen

4.2.9 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* (Mini Prep)

XL1 blue ist ein auf Plasmid-DNA Vermehrung optimierter *E. coli* Stamm. Der Stamm besitzt eine intrinsische Antibiotikumresistenz gegen Tetrazyklin. Nach der Transformation der Plasmide/Vektoren (3.6) werden die Bakterien auf eine LB-Agar Platte mit Tetrazyklin (12,5 µg/µL) und einem Selektionsantibiotikum gegen den Vektor ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Gewachsene Kolonien werden mit einem Zahnstocher gepickt und in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert (5 mL bei *high copy* bzw. 10 mL bei *low copy* Plasmiden). Die Bakterien werden am folgenden Morgen durch Zentrifugation bei 11000xg geerntet. Mit dem Bakterienpellet wird nach dem Protokoll des Kits Nucleospin Plasmid II der Firma Macherey Nagel weiter verfahren.
Anders als im Protokoll beschrieben, werden die an die Säulenmatrix adsorbierten Plasmide mit 25 µL Elutionspuffer (TE) oder H_2O (pH 8,5) von der Nucleospin Säule eluiert. Der Vorteil ist eine deutlich erhöhte Konzentration an gereinigtem Plasmid.

4.2.10 Bestimmung von Nukleinsäure Konzentrationen

Die Nukleinsäure Konzentrationen werden mit dem Nano Drop Photometer 2000c (Thermo Scientific) ermittelt. 2 µL der unverdünnten DNA Lösung werden gegen 2 µL des Elutionspuffers (TE oder H_2O pH 8,5) als Referenz vermessen. Die Ausbeuten betragen zwischen 150 und 350 ng/µL für pGEX-Vektoren und ca. 1000 ng/µL für pEGFP-Vektoren.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Bakterielle Expression von rekombinantem Enzym

Die bakterielle Expression dient der Gewinnung von rekombinantem Protein. Für die Herstellung rekombinanter IP6K (Isoformen 1, 2 und 3; Tabelle 4.2) wird der Bakterienstamm C41(DE3)pLysS [124] verwendet. Alle Kinasen sind in das bakterielle Expressionsvektor-System pGEX (GE Healthcare) einkloniert und werden als Fusionsproteine mit N-terminal fusionierter Glutathion-S-Transferase (GST) überexprimiert.
Der bakterielle Expressionsvektor unterliegt der Kontrolle des Lac Operons und ist mit Isopropyl-ß-D-Galaktopyranosid (IPTG) induzierbar. Um eine basale Expression des Fusionsproteins während der Anzucht der Bakterien zu verhindern, wird jedes Wachstumsmedium mit Glukose versetzt. Vor jeder Expression wird eine Übernacht Kultur von 5 ml LB-Medium (BD; Becton, Dickinson and Company) mit 0,2% (w/v) Glukose und 100 µg/ml Ampicillin hergestellt. Jede Kultur wird mit einer Bakterienkolonie (mit entsprechend transformiertem Plasmid) beimpft und bei 37°C für ca. 14-17 h unter Schütteln inkubiert. Die Übernacht Kultur wird am folgenden Tag 1:100 mit LB-Medium, versetzt mit 0,2% (w/v) Glukose und 100 µg/ml Ampicillin, verdünnt und die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) halbstündlich bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei einem Wert von 0,5-0,6 kontrolliert. Bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wird die Expression der IP6K als Fusionsprotein mit 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach 3 h Überexpression bei 37°C werden die Bakterien mittels Zentrifugation bei 4°C für 10 min und 4066xg geerntet. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 1xPBS (3.10) aufgenommen.
Die Expression der IPMK (Tabelle 4.2) erfolgt im Bakterienstamm BL21(DE3)pLysSpREP4. Als Vektorsystem dient ein auf pET17b basierender IPTG indudzierbarer Strep-tag Vektor. Für die Expression wird analog zu [32] verfahren. Die Technik in Kürze: Die Übernacht Kulturen, wie auch die Hauptkulturen, werden zusätzlich zum oben beschriebenen Ampicillin mit 50 µg/µL Chloramphenicol und 34 µg/µL Kanamycin versetzt. Die Inokulation und Expression erfolgt identisch wie oben beschrieben. Die Induktion der IPMK erogt bei einer OD_{600} von 0,5-0,6 anders als bei den IP6K Isoformen mit 1 mM IPTG. Die Ernte der Bakterien erfolgt durch identische Zentrifugationen. Das Bakterienpellet wird im Anschluss in einem entsprechenden Volumen (10 mL je 250 mL Expressionshauptkultur) Puffer A (3.10), zur späteren Vorreinigung über P11 Cellulose (4.3.4), resuspendiert. Bis zur Weiterverarbeitung, mindestens über Nacht, maximal jedoch für 14 Tage, wird das resuspendierte Pellet in Puffer A bei -20°C gelagert.

Tabelle 4.2: Übersicht über die exprimierten Proteine inklusive Identifikationsnummer.

Kinase	UniProtKB/ Swiss-Prot	EC Nummer
IP6K1	Q92551	EC=2.7.4.21
IP6K2	Q9UHH9	EC=2.7.4.21
IP6K3	Q96PC2	EC=2.7.4.21
IPMK	Q8NFU5	EC=2.7.1.151

4.3.2 Lyse von Bakterien zur Gewinnung von löslichem Protein

Nach der Ernte der Bakterien werden diese aufgeschlossen, um das lösliche, überexprimierte Fusionsprotein in Lösung zu bringen. Eine Lyse der Bakterien durch zyklisches Einfrieren und Auftauen ist auf Grund der geringen Stabilität der IP6K und dem damit verbundenen Aktivitätsverlust nicht ratsam. Die Lyse der IP6K exprimierenden Bakterien erfolgt direkt nach der Ernte und Resuspendieren in 1x PBS auf Eis. Die IPMK wird über Nacht, aber jedoch maximal 14 Tage bei -20°C eingefroren. Zum Schutz des Fusionsproteins vor proteolytischer Degradation werden der Bakteriensuspension zusätzlich 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 0,5 mM Benzamidin zugesetzt. Als Schutz vor Oxidation der proteinogenen Sulfhydrylgruppen wird zusätzlich 1 mM des reduzierenden 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT) zugegeben.
Die weiteren Arbeiten werden ohne Unterbrechung auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Zur Lyse der Bakterien wird der Suspension 0,5% (v/v) Triton-X100 zugesetzt und im Anschluss 3x für 45 sek mit jeweils 60 sek Unterbrechung bei maximaler Energie sonifiziert. Die Ultraschallbehandlung dient neben der Zerstörung der Bakterienmembran zusätzlich dem Brechen von bakteriellen Nukleinsäuren durch Kavitation. Die entstandenen bakteriellen Zelltrümmer werden bei 4°C für 11 min und 14460xg pelletiert. Der Überstand enthält alle löslichen bakteriellen und überexprimerten Proteine. Bis zur chromatographischen Reinigung wird dieser auf Eis gelagert.

4.3.3 Affinitätschromatographische Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen

Die affinitätschromatographische Reinigung dient der Trennung des überexprimierten Fusionsproteins von bakteriellen Proteinen. Die in dieser Arbeit überexprimierten GST-Fusionsproteine binden an Glutathion, welches über einen *spacer* kovalent an Zellulose basierte Partikel gekoppelt ist (Firma Amocol). Für die Reinigung der bakteriell in 250 mL Wachstumsmedium überexprimierten Fusionsproteine (4.3.1) wird ein sedimentiertes Matrix-Säulenvolumen (CV; *column volume*) von 500 µL in einer Schwerkraft betriebenen (*gravity flow)* Säule (Durchmesser 1 cm) verwendet. Bei anderen Expressionsvolumina wird die Menge der Säulenmatrix entsprechend angepasst. Die Reinigung der Enzyme erfolgt in fünf Schritten; Equilibrieren, Auftragen der

Proteinlösung (bakterieller Überstand), Waschen der Säule, Elution des Fusionsproteins und die Regeneration der Säule.
Alle Schritte werden bei einer Temperatur von 10°C mit eisgekühlten Puffern durchgeführt. Das Equilibrieren der Säule dient der Anpassung der Pufferbedingungen auf der Säule an die der löslichen Proteine. Die Matrix wird in 1 CV Schritten und insgesamt 10 CV 1x PBS mit 1 mM DTT equilibriert. Direkt im Anschluss wird der bakterielle Überstand mit allen löslichen Proteinen (4.3.2) ebenfalls in 1 CV Schritten und einer Durchlaufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule gegeben. Der Durchlauf enthält alle nicht an die Matrix gebundenen bakteriellen Proteine. Das Waschen der Säule, zur Entfernung von unspezifisch an die Matrix gebundenen Proteinen, erfolgt mit 10 CV 1x PBS bei maximaler Flußgeschwindigkeit. Eluiert wird in 3 Schritten mit je 1 mL frischem Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris-Cl pH 7,5). Der zweite Elutionsschritt wird 15 min auf der Säule belassen und dann aufgefangen.

4.3.4 Vorreinigung der IPMK durch P11 Phosphocellulose Chromatographie

Vor der affinitätschromatographischen Reinigung über den Strep-tag der IPMK wird eine Vorreinigung über P11 Phosphocellulose durchgeführt. P11 besitzt freie Phosphatgruppen und dient zum einen als Ionentauscher und zum anderen als Affinitäts-Matrix. Nach der Bindung der Kinase an die Matrix erfolgt die Elution mittels hoher NaCl Konzentration (750 mM) von der Säule. P11 Phosphocellulose ist ein Pulver und muss zu Beginn aktiviert werden. Nach Einwiegen der entsprechenden Menge für 250 mL Expressionskultur (2 g) (1 g entsprechen ca. 5 mL Matrix) werden je 1 g P11 Phosphocellulose mit 25 mL 0,5 M NaOH versetzt und 5 min inkubiert. Nach der Überführung in einen 1 L Standzylinder wird mit dH_2O auf 1 L verdünnt und die Suspension 20 min sedimentiert. Der Überstand wird dekantiert, die Matrix erneut mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt und wieder 20 min sedimentiert. Der Überstand wird erneut verworfen und vom verbleibenden Rest über der Matrix wird der pH-Wert gemessen. Bei einem Wert von ~10 wird um das Volumen der sedimentierten Matrix mit 1 M HCl aufgefüllt und 5 min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird mit dH_2O auf 1 L verdünnt, 20 min sedimentiert und der Überstand dekantiert. Die gequollene Matrix wird in eine Schwerkraft betriebene Säule überführt und mit 1 M Tris-Cl pH 7,5 auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.
Die Matrix wird mit dem Bakterienüberstand der Lyse (4.3.2) mit der überexprimierten IPMK versetzt. Die Tropfgeschwindigkeit des Überstandes beträgt ca. 1 mL/min. Der Durchlauf wird aufgefangen und bis zur späteren Analyse über SDS-PAGE (4.3.6) auf Eis gelagert. Nach der kompletten Auftragung wird die Matrix mit 5 CV Puffer A gewaschen und fraktioniert aufgefangen. Die Elution der IPMK erfolgt in 7 mL Schritten mit 750 mM NaCL in Puffer A. Neben dem Durchlauf werden ebenso die Waschfraktionen und Elutionen bis zur Analyse und weiteren Reinigung auf Eis gelagert.

4.3.5 Affinitätschromatographische Reinigung der IPMK als Strep-tag Fusionsprotein

Die IPMK als Fusionsprotein, mit einem N-terminalen Strep-tag II wird nach der P11 Phosphocellulose Vorreinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie zusätzlich gereinigt. Der Strep-tag II (...-Asn-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-...) bindet mit hoher Affinität an immobilisiertes Streptavidin der Säulenmatrix und kann mit Hilfe von Desthiobiotin, einem Derivat des Biotins, von der Matrix eluiert werden [125].
Zur endgültigen Reinigung der vorgereinigten, vereinten P11 Elutionsfraktionen werden diese zuvor mit dem zweifachen Volumen an Puffer A verdünnt. Als Streptavidin Matrix dient ein sedimentiertes Matrix-Volumen von max. 5 mL. Die Matrix wird mit 10 CV Bst-Puffer und maximaler Flussrate äquilibriert bevor die P11 Elutionsfraktionen mit etwa 0,5 mL/min auf die Säule aufgegeben werden. Nach der vollständigen Auftragung wird die Matrix mit mindestens 10 CV Bst-Puffer gewaschen und das Fusionsprotein (IPMK) mit Est-Puffer in einem Schritt wieder eluiert. Die Elution erfolgt in 7x 1 CV Schritten. Nach dem ersten Schritt wird der Puffer Est für 30 min auf der Säule inkubiert, dann eluiert und aufgefangen. Der Erfolg der Reinigung wird mittels SDS-PAGE (4.3.6) überprüft.

4.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter denaturierten Bedingungen können auf ein SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragene Proteine elektrophoretisch voneinander getrennt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich in etwa stöchiometrisch an hydrophobe Seitenketten der Proteine an und ist für die proportionale Laufgeschwindigkeit zu deren Größe verantwortlich. Bei konstanter von außen angelegter elektrischer Spannung laufen kleinere Proteine schneller durch das Porensystem des Polyacrylamidgels als größere. An Hand eines zusätzlich zu den Proben aufgetragenen Standards mit Proteinen bekannter Größe (LMW, GeHealthcare, Tabelle 4.3) wird das Fusionsprotein bzw. das gesuchte Protein über sein relatives Molekulargewicht identifiziert.
In dieser Arbeit werden Polyacrylamidgele nach Laemmli [126] mit diskontinuierlichem Sammel- und Trenngel verwendet. Diese dienen der Kontrolle von Proteinexpressionen (4.3.1) bzw. des Reinigungserfolges (4.3.3/4.3.4/4.3.5). Die Acrylamid Konzentration des Trenngels beträgt 10%, die des Sammelgels 4,8%. Vor der Auftragung auf die Gele werden die Proteinproben im Glyzerin Probenpuffer (4x Probenpuffer) für 10 min bei 95°C denaturiert, im Anschluss gekühlt und zentrifugiert. Nach der Auftragung auf das Gel und bis zum Eintritt in das Trenngel wird von außen eine Spannung von 85 V angelegt. Beim Eintritt der Proben in das Trenngel, erkennbar an der Methylenblau-Front, wird die Spannung auf 125 V erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Banden unter ständigem schwenken mit kolloidalem Coomassie Blau (0,5%) für 30-60 min gefärbt. Mit dem Austausch der Coomassie Lösung gegen Entfärbelösung (8% (v/v) Eisessig, 25% (v/v) Ethanol) werden die Gele über Nacht entfärbt.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung des LMW Proteinstandards von GeHealthcare zur Identifikation der Proteinbanden.

LMW:	Größe	Konzentration in 400 µL	Bande auf SDS-PAGE
Phosphorylase b	97,0 kDa	167,5 ng/µL	0,84 µg
Albumin	66,0 kDa	207,5 ng/µL	1,04 µg
Ovalbumin	45,0 kDa	367,5 ng/µL	1,84 µg
Carbonic anhydrase	30,0 kDa	207,5 ng/µL	1,04 µg
Trypsin inhibitor	20,1 kDa	200 ng/µL	1,00 µg
α-Lactalbumin	14,4 kDa	290 ng/µL	1,45 µg

4.3.7 Densitometrische Proteinbestimmung

Eine densitometrische Konzentrationsbestimmung bietet sich bei Proteinen an, deren Reinheit für eine Gesamtproteinbestimmung nach Bradford oder Lowry nicht ausreicht. Die Abschätzung der Proteinkonzentration erfolgt durch Auftragen von Proteinstandards oder Referenzproteinen (Tabelle 4.3) mit bekannter Proteinkonzentration zusätzlich zu den zu analysierenden Proteinproben auf ein SDS-PAGE Gel.

4.3.8 Stabilität der rekombinant hergestellten Fusionsproteine

Für jede Messung werden die Proteine neu exprimiert (4.3.1) und gereinigt (4.3.3). Gereinigte Proteine werden für maximal 3 Tage auf Eis gelagert. Nach einer Konzentrationsabschätzung (4.3.7) werden Messungen des spezifischen Substratumsatzes des bevorzugten Substrates für jede Kinase in Gegenwart von sättigenden (soweit nicht anders angegeben) ATP oder ADP Konzentrationen bei 37°C vorgenommen. Dies dient der Bestimmung der spezifischen Aktivität direkt nach der Reinigung. Bei Bedarf können diese Bestimmungen wiederholt werden, um eine bestimmte Aktivität in den Assays einzustellen.
Für jede Messung wird ein Reaktionsmix mit 4 oder 10 facher Konzentration an HEPES, KCl, $MgCl_2$, EDTA und DTT (Tabelle 4.4) hergestellt. Dieser wird entsprechend mit Wasser, NaF, ATP (oder ADP), Enzym und Substrat auf die Endkonzentrationen verdünnt (Tabelle 4.4). Die Ansätze werden nach einer Vorinkubation für 15 min bei 37°C mit 2,5-5,0 µM der bevorzugten Substrate z.B. $InsP_6$ (für IP6K und PPIP5K), oder das zu vermessende Substrat in entsprechender Konzentration, gestartet. Nach Ablauf von festgelegten Zeitpunkten werden Proben/Aliquote aus dem Gesamtansatz entnommen und die Reaktion durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Gelagert werden die Aliquote bis zur Aufarbeitung und MDD-HPLC-Analytik (4.3.9) bei 20°C. Das Volumen der entnommenen Aliquote wird so gewählt, dass die Stoffmenge der Inositolphosphate für die anschließende MDD-HPLC Analytik 1-2 nmol beträgt (4.3.10). Die IP6Ks werden mit einer Konzentration von ca. 53-106 nM eingesetzt. Die

Konzentration der weniger aktiven katalytischen Domänen der PPIP5Ks beträgt zwischen 250 und 350 nM.

Tabelle 4.4: Standardzusammensetzung der Reaktionspuffer für kinetische Messungen der verschiedenen Proteine.

Substanz	IP6K1,2,3	PPIP5K1, 2
HEPES	20 mM (pH 7,2)	20 mM (pH 6,8)
KCl	50 mM	50 mM
$MgCl_2$	8 mM	8 mM
EDTA (pH 7,0)	1 mM	1 mM
DTT	5 mM	5 mM
NaF	10 mM	10 mM
ATP/(ADP) (pH 7,2)	5 mM	5 mM

4.3.9 Probenvorbereitung für die HPLC-Analyse mit *Metal-Dye-Detection* (MDD-HPLC [127])

Zur Analyse von Inositolphosphaten über die MDD-HPLC [127] müssen die Ansätze frei von Proteinen sein. Mittels Trichloressigsäure (TCA) bis zu einer Konzentration von 10% werden die Proteine aus dem Ansatz durch Fällung und Zentrifugation entfernt (modifiziert nach [128]). Die gefrorenen Reaktionsansätze werden auf Eis angetaut, mit 50% eiskalter TCA Lösung bis zu einer Konzentration von 10%, sowie mit EDTA und NaF bis zu einer Endonzentration von 7 mM und 5 mM versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 4°C und 11000xg für 2 min wird der Überstand in 2 mL Reaktionsgefäße überführt und 3x mit eiskaltem Ether zur Entfernung von TCA extrahiert. Jede Extraktion erfolgt jeweils mit 2-3 fachem Probenvolumen an eiskaltem, mit Wasser gesättigtem Diethylether unter maximalem Schütteln für 4 min. Die organische Phase wird durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig entfernt. Nach dem letzten Extraktionsschritt werden die Ansätze mit 2 M Tris auf pH 6-7 eingestellt und verbleibender Ether durch Erwärmen der Ansätze auf 50°C für 10 min oder in der Vakuumzentrifuge entfernt. Jede Probe wird letztlich mit H_2O auf 1 mL aufgefüllt und mittels MDD-HPLC analysiert [127].

4.3.10 Arbeitsweise der MDD-HPLC [127]

Die Analyse von Inositolphosphaten, InsPx mit x>1, beruht auf der Anionenaustausch chromatographischen Trennung eines Inositolphosphatgemisches über eine MiniQ-Säule (PC 3 2/3 Pharmacia). Die online Detektion der einzelnen Komponenten nach der Säulentrennung erfolgt als Komplex aus dem trivalenten Metallion Yttrium, dem Inositiolphosphat und dem Farbstoff 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) bei einer Wellenlänge von 520 nm.

Von den vorbereiteten Proben (4.3.9) werden 950 µL entnommen und mit Aufnahmepuffer (2 mM NaCl, 2 mM Na-Acetat, pH 6,0) auf 1,3 mL in HPLC-Probenröhrchen aufgefüllt. 1,2 mL der so vorbereiteten Proben werden über einen Autosampler (Kontron HPLC 560) mit Eluent A (0,2 mM HCl, 15 µM YCl_3) in das Elutionssystem eingebracht, so dass 1 mL auf die Säule gelangt. Die Inositolphosphate werden mit entsprechendem Gradienten des Eluenten A (s.o.) und B (500 mM HCl, 15 µM YCl_3) von der Säule eluiert und kontinuierlich mit dem halben Volumen des Nachsäulenreagenz C (1,6 M Triethanolamin, 300 µM PAR, pH 9,0) versetzt. Die Flussraten der Eluenten betragen in der Summe 0,5 mL/min und des Nachsäulenreagenz 0,25 mL/min. Je nachdem welche Inositolphosphate bzw. Diphophoinositolphosphate nachgewiesen werden sollen wird der Elutionsgradient variiert.
Die eluierten Inositolphosphate bilden mit dem so zugeführten trivalenten Kation Yttrium der Eluenten A und B einen hochafinen Komplex. Der Kation-spezifische Farbstoff PAR im Nachsäulenreagenz bildet mit Yttrium einen mittelaffinen Komplex, der bei 520 nm absorbiert. Die Komplexbildung zwischen Yttrium und eluierenden Inositolphosphaten ist affiner als die mit PAR und führt so zu einer detektierbaren Absorptionsabnahme (Shimadzu SPD-10AV Vp) immer dann wenn ein Inositolphosphat eluiert. Invertiert ergibt das Signal einen positiven Peak. Mit einem Phytinsäure-Standard (IPx Standard) bzw. IP7/IP8-Standard, mit bekannter Inositolphosphat Zusammensetzung, können den Peaks an Hand der jeweiligen Retentionszeiten die entsprechenden Inositolphosphate der Proben zugeordnet werden.
Die verwendeten Eluenten A, B und Reangenz C werden permanent mit Helium begast.

4.3.11 Auswertung der MDD-HPLC [127] Daten zur Bestimmung der initialen Umsatzgeschwindigkeiten

Die Inositolphosphat Stoffmengen (pmol) werden mit Hilfe der normierten Flächen (Absorption*Zeit in µV*min) unter dem jeweiligen HPLC-Ausschlag ermittelt. Anhand von verschiedenen Volumina des IPx-Standards mit jeweils bekannter Stoffmengenkonzentration werden für jedes Isomer und jede Analyse z.T. nicht-lineare Eichkurven erstellt, mit deren Hilfe die unbekannten Stoffmengen berechnet werden können.
Normalisierungsverfahren: Die Summen der Masse von Substrat und Produkt jeder Messung einer Zeitreihe werden gemittelt. Anhand der Abweichungen jeder Summe vom Mittelwert wird für jeden Messpunkt ein Divisor berechnet mit dessen Hilfe die Massen von Substrat und Produkt normiert werden.
Für jeden Messpunkt werden sowohl die Substrat Konzentration/Stoffmenge wie auch die Produkt Konzentration/Stoffmenge gegen die Zeit aufgetragen. Mit GraphPad Prism4.0 werden an den Graphen der Substratabnahme eine „*one phase exponential decay*“ Funktion und an Produktzunahmen eine „*one phase exponential assocaition*“ Funktion approximiert. Mit beiden Funktionen werden jeweils die Substrat/Produkt Konzentrationen/Stoffmengen zum Zeitpunkt f(x) = 0,5 min berechnet. Die initiale Umsatzrate (µM/min) wird durch die Steigung der Gera-

den am jeweiligen Graphen zwischen A(0/0) und B(0,5/f(x)) (bzw. für die Substratabnahme A(0/f(x)) und B(0,5/f(x)) berechnet. Die spezifische Umsatzrate wird durch Division der Umsatzrate mit der Proteinkonzentrationen in mg/L im Ansatz ermittelt. Die Wechselzahl wird durch die Division mit der molaren Enzymkonzentration in µmol/L berechnet.

4.3.12 HPLC basierte Nukleotidanalyse zur Quantifizierung

Die Nukleotidanalyse dient der Kontrolle der Nukleotidkonzentrationen in ausgewählten Assays sowie der Analyse zellulärer Nukleotidkonzentrationen. Zur Trennung der Nukleotide wird ebenfalls eine MiniQ (PC 3 2/3 Pharmacia) Säule und ein identisches Kontron System wie bei der Inositolphosphat Analyse jedoch ohne Nachsäulenderivatisierung verwendet.
Von den aufgearbeiteten Proben (4.3.9) werden 10-50 µL entnommen (je nach eingesetzter oder erwarteter Nukleotid Stoffmenge), mit H_2O auf 1 mL aufgefüllt und analysiert. Anders als bei der Inositolphosphat Analytik wird Wasser als Eluent A sowie 0,3 M NaCl als Eluent B verwendet. Auf Grund der Absorption der Nukleotide bei 260 nm können diese direkt photometrisch detektiert werden. Die Elutionsbedingungen bleiben konstant mit einer Flussrate von 0,5 mL/min: 0-1 min, 3% Eluent B; 1-3 min, 3-15% Eluent B; 3-4 min, 15-30% Eluent B; 4-12,5 min, 30-47% Eluent B; 12,5-13 min, 47-52% Eluent B; 13-15 min, waschen der Säule mit 95% Eluent B.

4.3.13 Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter für die Nukleotide (ATP bzw. ADP) und die jeweiligen Inositolphosphate

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m-Wert) ist diejenige Substratkonzentration, bei der die Enzymreaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Mit Hilfe dieser Konstanten lassen sich Aussagen über die Affinität des Enzyms für ein Substrat treffen. Bei Kinasen die als Bisubstratenzyme zwei Substrate verwenden muß hierbei ein Substrat jeweils eine sättigende Konzentration aufweisen. Die maximale, spezifische Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) gibt Auskunft über die Prozessivität für das betrachtete Substrat pro eingesetzter Enzymmenge. Diese Konstanten sind für das betrachtete Enzym und Substrat spezifische Werte.
Die Kinasen dieser Arbeit nutzen als Bisubstratenzyme (s.o.) sowohl ATP als auch Inositolphosphate. Zur Bestimmung der Parameter werden die Enzyme unter den genannten Bedingungen (4.3.8) vermessen wobei eines der Substrate in sättigenden Konzentrationen eingesetzt wird. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter für ATP bzw. ADP werden die Inositolphosphat Konzentrationen in der Regel auf 2,5-5,0 µM gesetzt. Die Nukleotide werden von 0,5-10 mM variiert. Die Bestimmung der Parameter gegenüber der Inositolphophate (0,2-5,0 µM) erfolgt in Gegenwart von 5 mM ATP für Phosphorylierungen und 5 mM ADP für "Dephosphorylierungen" (siehe Ergebnisse) mit Übertragung des Phosphates auf ADP (Reaktion ist eigentlich ein $InsP_6$ ADP Phosphattransfer).

Die initialen, spezifischen Umsatzgeschwindigkeiten (in pmol/min/mg) werden entsprechend 4.3.11 für jedes Enzym und jede Substratkozentration berechnet und gegen die entsprechende variierende Substratkonzentration in GraphPad Prism4.0 aufgetragen.

4.3.14 Partielle saure Hydrolyse zur Strukturanalyse von pyrophosphorylierten Produkten der $InsP_5$ Phosphorylierung

Die Produkte der entsprechenden $InsP_5$ Isomere werden durch IP6K2 katalysierte Phosphorylierung hergestellt. Die Konzentration der Isomere beträgt 2,5 µM bzw. 5 µM. Die Reaktionsansätze entsprechen denen unter 4.3.8 beschrieben. Im Vorfeld wurde die Aktivität der IP6K2 gegenüber allen $InsP_5$ Isomeren untersucht. Weniger gute Substrate, zu denen Ins(1,2,3,4,6)P_5, Ins(1,2,3,5,6)P_5 und Ins(1,2,3,4,5)P_5 zählen, werden 180 min phosphoryliert. Zum vollständigen Ablauf der Phosphorylierung werden die besseren Substrate, Ins(1,2,4,5,6)P_5, Ins(2,3,4,5,6)P_5 und Ins(1,3,4,5,6)P_5 für 120 min mit der Kinase inkubiert. Die Probenentnahme zur MDD-HPLC Analyse (4.3.9) erfolgt zu Beginn (0 min) sowie nach 120 min bzw. 180 min. Nach Ablauf der Phosphorylierung wird das Protein mit eisgekühlter TCA Lösung (10% TCA, 7 mM EDTA und 5 mM Endkonzentration) 10 min gefällt, für 5 min bei 4°C und 11000xg in der Tischzentrifuge präzipitiert und der saure Überstand bei 95°C für 20 min im Heizblock inkubiert. Zur Kontrolle der Hydrolyse werden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion durch Abkühlen auf Eis gestoppt. Die Proben werden in Analogie zu 4.3.9 durch Etherextraktion, Neutralisation und Verdünnen auf 1 mL für die Inositolphosphat Analyse vorbereitet.

4.3.15 Bestimmung der Inositolphosphat Umsatzgeschwindigkeiten und Äquilibriumskonzentrationen in Gegenwart von unterschiedlichen ATP zu ADP Verhältnissen

Die Reaktionsansätze entsprechen denen unter Tabelle 4.4 mit 8 verschiedenen Konzentrationen an ADP und ATP (Tabelle 4.5). Die Summe der Nukleotidkonzentration beträgt stets 2 mM mit enstprechend weniger $MgCl_2$ (5 mM, entsprechen ca. 2 mM freies Mg^{2+}). Als Substrate dienen die jeweiligen Inositolphosphate mit einer Konzentration von 2,5 µM. Zur Darstellung des ATP zu ADP Verhältnisses wird der Stoffmengenanteil von ATP an der Summe beider Nukleotide (immer 2 mM) mit [ATP]/([ATP]+[ADP]) berechnet. Variiert wird ATP zwischen 2,0 und 0,0 mM mit jeweils entsprechender ADP Konzentration zwischen 0,0 und 2,0 mM. Der Stoffmengenanteil von ATP liegt somit zwischen 0 (0 mM ATP + 2 mM ADP) und 1 (2 mM ATP + 0 mM ADP). Die initialen, spezifischen Umsatzgeschwindigkeiten werden entsprechend 4.3.11 für jedes Substrat bei den verschiedenen ATP zu ADP Verhältnissen errechnet und gegen den ATP Stoffmengenanteil aufgetragen.
Die Reaktionen werden so lange gemessen bis sich ein Aqulibrium zwischen dem eingesetzten Substrat und dem Produkt eingestellt hat. Ist dies noch nicht erreicht, wird an Hand der

approximierten Funktionen (4.3.11) das Äquilibrium berechnet und ebenfalls gegen den ATP Stoffmengenanteil aufgetragen.

Tabelle 4.5: In den Reaktionen eingesetzte ATP und ADP Konzentrationen mit entsprechendem ATP Stoffmengenanteil ([ATP]/([ATP]+[ADP])).

	1	2	3	4	5	6	7	8
[ATP], mM	2,0	1,9	1,7	1,5	1,0	0,5	0,3	0,0
[ADP], mM	0,0	0,1	0,3	0,5	1,0	1,5	1,7	2,0
ATP Stoffmengenanteil	1,0	0,95	0,85	0,75	0,5	0,25	0,15	0,0

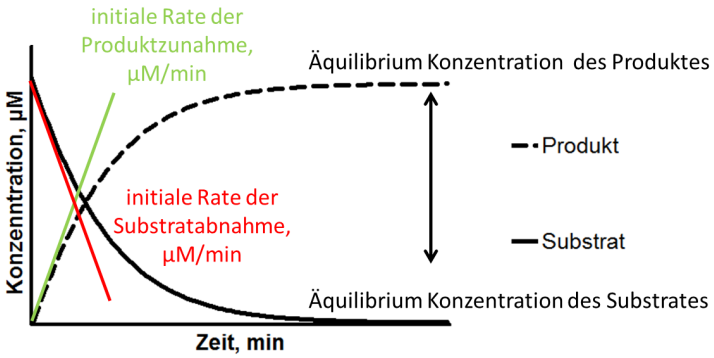


Abbildung 4.1: Typische, schematische Darstellung eines Reaktionsverlaufes zur Verdeutlichung der ermittelten Parameter. Die Darstellung ist typisch für einen Verlauf einer einfachen Kinase Reaktion mit nur einem Substrat und nur einem Produkt. Aufgetragen sind die aus den MDD-HPLC Chromatogrammen ermittelten Inositolphosphat-Konzentrationen in µM gegen die Zeit in min. An die Werte werden jeweils exponentielle Funktionen approximiert, mit deren Hilfe die initialen Produktbildungsgeschwindigkeiten in µM/min (grün) bzw. Geschwindigkeiten der Substratabnahme in µM/min (rot) ermittelt werden. Die spezifischen Werte (pmol/min/mg) werden aus den Umsatzraten (µM/min) berechnet. Das Äquilibrium sind die Gleichgewichts-Konzentrationen die sich mit fortschreitender Zeit einstellen. Dabei erreicht sowohl das Substrat als auch das Produkt eine Konzentration, in der die Reaktion im Gleichgewicht steht.

4.3.16 Messung der $InsP_6$ Phosphorylierung und Dephosphorylierung in einem dynamischen ATP Depletionsassay

Die Verwendung von Hexokinase (HK) in Kombination mit dessen Substrat Glukose eignet sich für eine dynamische, während der Reaktion ablaufende Energiepotentialumkehr durch ATP Depletion *in vitro*. Die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat erfolgt stöchiometrisch, so dass der ATP Verbrauch durch die Menge an Glukose genau eingestellt werden kann. In Vorversuchen wurden die Bedingungen ausführlich untersucht und letztlich für die dargestellten Ergebnisse verwendet. Die Reaktionsansätze mit der Isoform 2 der IP6K werden entsprechend 4.3.8 mit 5 mM ATP und variabler Glukosekonzentration zwischen 0 mM und 5 mM in einem Gesamtvolumen von 2100 µL angesetzt. Gestartet werden die Reaktionen nach 15 min Vorinkubation bei 37°C durch Zugabe von 5 bzw. 7,5 µM $InsP_6$. Innerhalb einer

Stunde werden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben zu je 200 µL entnommen (~1 nmol InsPx für MDD-HPLC Analyse), die Reaktion sofort in flüssigem Stickstoff gestoppt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Nach Ablauf der Stunde werden dem Rest des Ansatzes sofort 3,5 µL der HK (~1 mU/µL) zugegeben. Zwischen 0,5 min und 200 min werden weitere Proben entnommen und ebenfalls in flüssigem Stickstoff gestoppt.
Die Aufarbeitung zur Inositolphosphat-Analyse mittels MDD-HPLC (4.3.10) sowie zur Nukleotid Analyse (4.3.12) erfolgen Analog zu (4.3.11).

4.3.17 Messung der $InsP_6$ Dephosphorylierung und Rephosphorylierung in einem dynamischen ATP Regenerationsassay

In Enzym-gekoppelten optischen Messungen von Phosphorylierungen wird zur Regeneration des verwendeten ATPs oft ein System aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und der Pyruvatkinase (PK) eingesetzt [129]. Unter $InsP_6$ Dephosphorylierungsbedingungen, d.h. in Gegenwart von ADP, kann unter der Verwendung von PEP und PK, ebenfalls ATP aus vorhandenem ADP regeneriert werden. In Analogie zu 4.3.16 wo während der Reaktion ATP depletiert wird, kann mit dieser Kombination ATP gebildet werden. Die Übertragung des Phosphates (von PEP) auf ADP erfolgt ebenfalls stöchiometrisch in Abhängigkeit der PEP Konzentration, so dass die ATP Synthese aus ADP während der Reaktion gesteuert werden kann.
Die Ansätze zur Dephosphorylierung von $InsP_6$ durch die IP6K2 werden entsprechend 4.3.8 mit 5 mM ADP und variablem PEP zwischen 0 mM und 5 mM in einem Gesamtvolumen von 2100 µL angesetzt. Gestartet werden die Reaktionen nach 15 min Vorinkubation bei 37°C durch Zugabe von 5 µM $InsP_6$. Auf Grund der langsamer verlaufenden Dephosphorylierung werden Proben zu 5 verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 min und 180 min mit jeweils 200 µL Volumen entnommen (~1 nmol InsPx für MDD-HPLC Analyse). Nach dem Stoppen der Reaktion in flüssigem Stickstoff werden die Proben bei -20°C gelagert. Nach 180 min werden zum verbleibenden Volumen (1100 µL) 3 µL PK (~14 mU/µL) zugegeben. 5 weitere Probenentnahmen mit anschließendem Gefrieren (s.o.) erfolgen innerhalb der folgenden 120 min.
Die Aufarbeitung für die MDD-HPLC Analyse (4.3.10) sowie zur Nukleotid Analyse (4.3.12) erfolgen analog zu (4.3.9).

4.3.18 Hemmung der IP6K Aktivität durch TNP *in vitro*

N2-(m(trifluoromethyl)benzyl) N6-(p-(nitrobenzyl)purin (TNP, Calbiochem, Kat-Nr. 406170) ist ein Purin-Analogon und inhibiert die Kinaseaktivität von Inositolphosphat Kinasen [130, 131]. Padmanabhan et. al konnten 2009 zeigen, dass TNP im Vergleich zu anderen Inositolphosphat Kinasen besonders selektiv an die ATP Bindungsstelle der IP6K bindet und deren Aktivität auch bevorzugt *in vivo* inhibiert [131].
TNP wurde als Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und bei -20°C

unter Lichtausschluss für maximal 7 Tage gelagert. Ausgehend von dieser Stocklösung werden Verdünnungen zwischen 0-10 mM hergestellt. Die Reaktionsassays für Phosphorylierungen (mit 5 mM ATP im Ansatz) bzw. Dephosphorylierungen von $InsP_6$ (mit 5 mM ADP im Ansatz) entsprechen denen unter 4.3.8 angegeben. Die Endkonzentrationen des Hemmstoffes TNP in den Assays liegen zwischen 0 und 10 µM. Die des Lösungsmittels DMSO konstant bei 0,1% . Der Hemmstoff wird mit dem Enzym (~53 nM) 15 min bei 37°C vorinkubiert. Der spezifische initiale Umsatz des Substrates bzw. der Produktbildung wird in Gegenwart der unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen berechnet und gegen die entsprechende TNP-Konzentration mit logarithmischer Abszisse zur IC_{50}-Wert Bestimmung in GraphPad Prism4.0 aufgetragen.

4.4 Zellbiologische Methoden

Alle durchgeführten Arbeiten mit humanen Zelllinien werden unter keimarmen Bedingungen an der sterilen Werkbank durchgeführt. Medien, Lösungen, Gefäße und Arbeitsmaterial werden steril bezogen oder selbst autoklaviert. Vor dem Einbringen von Material unter die Werkbank wird diese und das Material mit 70% Ethanol gereinigt. Als Nährmedium wird DMEM (*high glucose*) mit 10% FBS und 1% Pen/Strep versetzt. Die Trypsin/EDTA Lösung wird mit H_2O zu einer 1x konzentrierten Lösung verdünnt. Beide Lösungen werden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

4.4.1 Kultivierung von humanen H1299 Karzinomzellen und Hamster DDT_1 MF-2 Karzinomzellen

Die adhärent wachsenden humanen Lungen Adenokarzinomzellen (*non-small cell lung carcinoma cell line*, H1299) und die syrischen Goldhamster *Ductus Deferens* Myoblasten (DDT_1 MF-2) werden in Kulturflaschen (75 cm^2) unter ständiger CO_2 Begasung (5,0%) bei 37°C im Brutschrank mit Nährmedium kultiviert. Nach drei Tagen Wachstum werden die zu 80% konfluent gewachsenen Zellen passagiert.
Das Nährmedium, Trypsin/EDTA sowie 1x PBS werden zuvor auf 37°C vorgewärmt. Das überstehende, verbrauchte Medium wird mit sterilen Pasteurpipetten abgesaugt, die Zellen zweimal vorsichtig mit 10 mL 1x PBS gewaschen und mit 2 mL Trypsin/EDTA nach etwa 3-5 min Inkubation bei 37°C vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Gestoppt wird die Trypsinisierung durch Verdünnung der Trypsin/EDTA/Zellsuspension mit 8 mL des Nährmediums. Nach Vereinzelung der Zellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren werden von der 10 mL Zellsuspension 9,5 mL verworfen oder für weiterführende Experimente aufbewahrt (Passage). Der verbleibende Rest der Zellsuspension wird mit 9,5 mL Nährmedium versetzt, im Durchlichtmikroskop auf Vereinzelung und Zellzahl kontrolliert und im Anschluss erneut im Inkubator kultiviert. Für weiterführende Experimente wird die Zellsuspension je nach Experiment 1:10 bzw. 1:20 mit Nährmedium verdünnt eingesetzt.

4.4.2 ATP Depletion in H1299 Zellen und DDT_1 MF-2 Zellen durch CCCP

Carbonyl-Cyanid 3-Chlorophenylhydrazon (CCCP, Sigma, C2759-100MG) ist ein mitochondrialer Protonenentkoppler, der die Neusynthese von ATP durch den Verlust des mitochondrialen Protonengradienten inhibiert. In Vorversuchen wurde eine optimale Konzentration zur Inhibition der ATP Neusynthese von 10 µM in Minimalmedium ermittelt.
Passagen sowohl der H1299 als auch der DDT_1 MF-2 Tumorzelllinien (4.4.1) werden in 6 Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von je 15 cm ausgesäht (1:20 verdünnt; Volumen 20 mL, je Zeitpunkt eine Schale plus eine Schale als Reserve) und im Brutschrank bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% (ca. 48 h) inkubiert. 2 h vor der Behandlung mit CCCP wird das Nährmedium gegen vorgewärmtes Minimalmedium (37°C) mit im Vergleich zum Nährmedium reduzierter Glukose (2,5 mM) bzw. ohne Glukose ausgetauscht. Die Zellen werden zuvor 2x mit 1x PBS (37°C) gewaschen und nach dem Medientausch weiter im Brutschrank (37°C, 5% CO_2) inkubiert. Das genaue Vorwärmen der Medien ist unerlässlich, da die Verwendung kälterer Medien in Vorversuchen zu einer unerwünschten Perturbation der Zellen bezüglich der Inositolphosphat Verteilung führten. Nach Ablauf der Vorinkubation werden 10 µM CCCP, gelöst in DMSO, zu den Zellen gegeben (DMSO Endkonzentration im Medium 0,1% (v/v)). Die Zellen werden im Anschluss für 30, 60 und 120 min im Brutschrank inkubiert. Der 0 min Wert wird als letztes mit DMSO versetzt und sofort (Dauer bis zur der Extraktion max 3 min nach Zugabe) aufgearbeitet (4.4.4).

4.4.3 Hemmung der zellulären IP6K Aktivität durch TNP in H1299 Zellen und DDT_1 MF-2 Zellen

Die Inhibition von rekombinanten, gereinigten Enzymen *in vitro* ist oft nicht vergleichbar mit der zellulären Hemmwirkung, da Hemmstoffe zum einen mehrere Angriffsziele haben und zum anderen von weiteren Proteinen gebunden und somit „weggefangen" werden. Zur Ermittlung der zellulären IP6K Restaktivität bei der Verwendung von 10 µM TNP werden die Zellen initial mit TNP in einer Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen 0 und 30 µM (Endkonzentrationen) inkubiert. Sowohl H1299 als auch DDT_1 MF-2 Zellen werden analog zu 4.4.2 in 15 cm Zellkulturschalen ausgesäht. Bei einer Konfluenz von ca. 80% (nach 2 Tagen) wird das Vollmedium nach Waschen der Zellen mit 1x PBS gegen 20 mL Minimalmedium ausgetauscht. Im Anschluss werden die Zellen für weitere 2 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. 30 min vor Ablauf der Zeit werden die Zellen mit TNP, gelöst in DMSO, vorinkubiert. Die maximale DMSO Konzentration über den Zellen beträgt 0,1% (v/v). Zum Zeitpunkt 0 min werden 10 mM NaF (Stammlösung 500 mM) zu den Zellen gegeben um den möglichen Abbau von 5PP-$InsP_5$ durch DIPPs (1.3.2) zu vermeiden. Nach weiteren 2 h Kultivierung (bzw. 2,5 h in Gegenwart von TNP) werden die Zellen außerhalb der sterilen Werkbank zur Inositolphosphat Extraktion nach (4.4.4) aufgearbeitet. Zur Analyse der Restaktivität der IP6 Kinasen wird die

zellulär vorhandene 5PP-InsP_5 Stoffmenge (prozentual zur nicht TNP behandelten Stoffmenge) nach 2 h (bzw. 2,5 h), gegen die entsprechende TNP Konzentration aufgetragen und die Restaktivität der IP6 Kinasen bei 10 µM TNP berechnet. Bei der Inhibition der IP6K durch TNP bei gleichzeitiger ATP-Depletion (4.4.2) wurde auf die Verwendung von NaF verzichtet.

4.4.4 Inositolphosphat Extraktion aus adhärent wachsenden Tumorzelllinien

Für die Analyse von zellulären Inositolphosphaten mittels MDD-HPLC müssen diese proteinfrei aus den Zellen extrahiert werden. Die adhärent wachsenden Zellen werden nach der Behandlung (s.o.) mit 1x PBS gewaschen und die Zellen in 1,5 mL TCA-Lösung (12% (v/v) TCA, 1,25 mM EDTA, 0,625 mM NaF) von der Kulturschale geschabt (mittels *Rubber policeman*). Die Zellsuspension wird in 12 mL Schnappdeckelgefäße für Zellkultursuspensionen überführt und durch Vortexen und drei Einfrier-/Auftauzyklen mit flüssigem Stickstoff und H_2O lysiert. Die Zelltrümmer werden für 5 min bei ~2900xg und 4°C im Ausschwingrotor zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Schnappdeckelröhrchen überführt und zur sauren Lyse des Kreatinphosphates für 30 min bei 38-40°C im Wasserbad inkubiert. Die Dauer der Extraktion von der TCA-Zugabe bis zur Trennung der Zelltrümmer vom Überstand darf maximal 25 min betragen, da ansonsten membranständige PIPs (Phosphatidylinositolphosphate) durch saure Hydrolyse deacyliert werden und dies zu einer fälschlich erhöhten zellulären Inositolphosphatverteilung führt.
Die pelletierten Zelltrümmer werden bis zur Trocknung auf Eis gelagert, in ein zuvor leer gewogenes Reaktionsgefäß (1,5 mL) überführt und scharf zentrifugiert. Es wird 2x mit je 250-500 µL Aceton versetzt und erneut 5-10 min bei ~16000xg pelletiert. Das Pellet wird über Nacht bei 37°C mit geöffnetem Deckel getrocknet. Der Überstand wird 3x mit 4 mL eiskaltem Diethylether durch 1 min Schütteln und Entfernen der oberen, organischen Phase, extrahiert. Der saure, extrahierte Überstand wird mit 2 M Tris neutralisiert (pH 6-7), auf 1 mL in der Vakuumzentrifuge eingeengt und bis zur MDD-HPLC Analyse bei -20°C gelagert. Das getrocknete Pellet wird im Reaktionsgefäß gewogen und anhand der Differenz zum Leergewicht des Gefäßes mit Hilfe von von Standardbestimmungen die Zellzahl geschätzt (4.4.5).

4.4.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels Casy Counter. 50 µL trypsinierte Zellsuspension werden mit 10 mL Casyton-Lösung versetzt und in einer Dreifachbestimmung die Zellzahl ermittelt. In mehreren unabhängigen Kontrollversuchen/Vorversuchen wurde die Zellzahl wie beschrieben bestimmt und die trypsinieten Zellen identisch zur Inositolphosphat Extraktion aufgearbeitet. Das Gewicht des getrockneten Zelltrümmerpellets kann so mit der Zellzahl korreliert werden. Für H1299 Zellen ergibt sich ein durchschnittlicher Wert von 2,17*10^6 Zellen je mg Trockenpellet und für DDT_1 MF-2 Zellen 1,59*10^6 Zellen je mg Pellet.

4.4.6 Trypanblau Ausschluss Test zur Messung der Zellvitalität

Sowohl H1299 Zellen als auch DDT_1 MF-2 Zellen werden analog zu 4.4.1 verdünnt, in 24-*Well-Plates* ausgesäht und identisch zu 4.4.2 bzw. 4.4.3 mit CCCP, TNP oder beidem in Minimalmedium mit und ohne Glukose stimuliert. Zu identischen Zeitpunkten (0, 30, 60 und 120 min) wird das Medium entfernt und die Zellen werden 2x mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen werden dann für 1 min in 0,25 mL 0,2% Trypanblau, gelöst in 1x PBS, inkubiert und sofort nach Entfernen der Trypanblau Lösung mit 3% Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung werden die Zellen erneut mit 1x PBS gewaschen, bis keine blaue Trübung des 1x PBS durch Trypanblau sichtbar ist (3-4mal). Die Zellen werden bis zur Mikroskopie bei 4°C gelagert (max. 1 Tag). Von jedem Well werden 5 Fotos, aus den immer gleichen Arealen, festgehalten und der Anteil der gefärbten, apoptotischen/nekrotischen Zellen an ungefärbten Zellen ausgezählt.

5 Ergebnisse

5.1 Kinetik der Inositolhexakisphosphat Kinasen

5.1.1 Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ durch die Isoformen 1, 2 und 3 der IP6K

Die in dieser Arbeit klonierten (4.2), exprimierten (4.3.1) und gereinigten (4.3.3) drei Isoformen der IP6K pyrophosphorylieren bevorzugt $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ in Gegenwart von ATP [47, 48, 95]. Als Kontrolle der Expression und der Enzymaktivitäten wurden die Michaelis-Menten Parameter unter den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen (4.3.8) ermittelt. Die Substratabnahme, wie auch die Produktzunahme über die Zeit wurden MDD-HPLC chromatographisch gemessen und die spezifischen, initialen Umsatzgeschwindigkeiten (4.3.11) nach Michaelis-Menten gegen die jeweilige Substratkonzentration aufgetragen. Die ermittelten apparenten kinetischen Parameter für $InsP_6$ wie auch ATP sind in Tabelle 5.1 zusammengetragen.

Tabelle 5.1: Zusammengefasste Michaelis-Menten Parameter für die Phosphorylierung von $InsP_6$ durch die Isoformen 1, 2 und 3 der IP6K.

Isoform	Konstantes Substrat	Variiertes Substrat	$K_{m,\ app}$ [a)] (µM)	$V_{max,\ app}$ [a)] (nmol/min/mg)	$K_{cat,\ app}$ [a)] (min^{-1})	kat. Effizienz [b)] min^{-1} *µM^{-1}
IP6K1						
	ATP, 5 mM	$InsP_6$	1.34 +/- 0.48[c)]	30.2 +/- 4.08[c)]	2.30 +/- 0.31[c)]	1.72[c)]
	$InsP_6$, 2,5 µM	ATP	719 +/- 392[c)]	37.3 +/- 6.26[c)]	1.51 +/- 0.25[c)]	0.002[c)]
IP6K2						
	ATP, 5 mM	$InsP_6$	1.58 +/- 0.32[c)]	124 +/- 9.91[c)]	9.34 +/- 0.74[c)]	5.91[c)]
	$InsP_6$, 2,5 µM	ATP	323 +/- 134[c)]	126 +/- 12.4[c)]	9.45 +/- 0.93[c)]	0.3[c)]
IP6K3						
	ATP, 5 mM	$InsP_6$	0.63 +/- 0.43[c)]	4.53 +/- 0.97[c)]	0.33 +/- 0.07[c)]	0.52[c)]
	$InsP_6$, 2,5 µM	ATP	1825 +/- 795[c)]	5.05 +/- 0.80[c)]	0.37 +/- 0.06[c)]	<0,001[c)]

Bedingungen zur Bestimmung der Parameter, siehe Methoden (4.3.13). [a)] für variierte Substratkonzentrationen; [b)] die katalytische Effizienz wurde aus dem Verhältnis von $K_{cat,\ app}/K_{m,\ app}$ berechnet; [c)] Parameter wurden aus der Zunahme von 5PP-$InsP_5$ bestimmt. Tabelle entnommen aus und modifiziert nach [132]

Der Vergleich der apparenten K_m-Werte ($K_{m,\ app}$) für $InsP_6$ als Substrat zeigt, dass die IP6K1 und die IP6K2 etwa identische Affinitäten für $InsP_6$ haben ($K_{m,\ app}$ (IP6K1) = 1,34 +/- 0,48 µM;

$K_{m,\,app}$ (IP6K2) = 1,58 +/- 0,32 µM). Die IP6K3 hingegen besitzt bereits bei einer $InsP_6$ Konzentration von 0,63 +/- 0,43 µM ihre halbmaximale Geschwindigkeit und hat somit eine zu etwa 60% höhere Affinität für $InsP_6$ als die Isoformen 1 und 2. Trotz der hohen Affinität der IP6K3 für $InsP_6$, ist sie die Isoform mit der niedrigsten katalytischen Effizienz (0,52 min^{-1}*μM^{-1}) bei der Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$. Sie ist etwa 11 mal niedriger als die der effizientesten Isoform 2 mit 5,91 min^{-1}*μM^{-1} und 3 mal niedriger als die der Isoform 1 mit 1,72 min^{-1}*μM^{-1}. Der Grund für die niedrige Effizienz der IP6K3 liegt in der maximalen spezifischen Umsatzgeschwindigkeit, die mit 4,53 +/- 0,97 nmol/(min*mg) nur ca. 4% bzw. 15% von der der IP6K2 und IP6K1 beträgt.
Für ATP besitzt die IP6K2, mit einem apparenten $K_{m,app}$-Wert von 323 +/- 134 µM, die höchste Affinität. Die Isformen 1 und 3 besitzen jeweils einen 2 mal bzw. 6 mal höheren apparenten $K_{m,app}$-Wert und haben folglich eine niedrigere Affinität für ATP. Dies äußert sich deutlich in der katalytischen Effizienz, die bei der IP6K2 mindestens etwa 150 fach höher ist als bei den anderen beiden Isoformen 1 und 3.
Zusammengefasst ist die Isoform 2 der IP6K ist in Gegenwart von ATP unter den in dieser Arbeit gemessenen Bedingungen (4.3.8) die effizienteste $InsP_6$ pyrophosphorylierende Kinase.

5.1.2 Steigende ADP-Konzentrationen inhibieren die Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ und initiieren einen $InsP_6$ Abbau

Kinasen sind Bisubstratenzyme und nutzen das energiereiche γ-Phosphat von ATP oder anderen Nukleosidtriphosphaten für einen Phosphattransfer auf deren Substrate. Die Produkte dieser Reaktionen sind somit das weniger energiereiche ADP und das jeweilige phosphorylierte Substrat. Das bei den Reaktionen entstehende ADP kann die Kinase-Reaktion durch Produktinhibition beeinträchtigen. Dieser ADP Effekt wird normalerweise bei Messungen *in vitro* durch hohe ATP Konzentrationen minimiert oder durch die Verwendung ATP regenerierender Systeme (4.3.17) ganz verhindert.
Im Folgenden wurde gezielt der Einfluss von ADP auf die Kinase-Reaktionen der IP6K untersucht. In Vorversuchen konnte bereits eine geringe Inhibition der Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ durch niedrige ADP Konzentrationen festgestellt werden. Bei zunehmenden ADP Konzentrationen trat eine weitere, unerwartete Reaktion auf. In Gegenwart von ADP bei konstanter ATP Konzentration konnten drei zusätzliche Isomer-Peaks identifiziert werden, die mit steigenden ADP Konzentrationen und/oder fortlaufender Zeit anstiegen und bei geeigneten ATP/ADP Verhältnissen sogar die Menge an pyrophosphoryliertem 5PP-$InsP_5$ übertrafen (Abbildung 5.1). Diese Isomer-Peaks eluieren noch vor $InsP_6$ von der HPLC-(Mini-Q)-Säule bei einer Retentionszeit, die denen von $InsP_5$ Isomeren entspricht. Mittels IPx-Standard konnte der Hauptpeak dem Enantiomerenpaar D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 zugeordnet werden und die beiden niedrigeren Peaks dem D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5 bzw. der Mesoform Ins(1,2,3,4,6)P_5 (Abbildung 5.1).

Wie der Anstieg der Isomere mit steigender ADP Konzentration in Abbildung 5.1 vermuten lässt, hemmt ADP nicht die gesamte Kinase in Ihrer Aktivität, sondern nur die Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ und initiiert parallel eine Dephosphorylierung von $InsP_6$. Das Auftreten von drei unterschiedlichen Produkten spricht für drei unterschiedliche mögliche Orientierungen des Substrates in der katalytischen Domäne, sodass an drei Positionen des Inositolphosphat Rings ein Phosphat entfernt werden kann. Dabei scheint die Positionierung von $InsP_6$, die zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 als Produkt führt, die bevorzugte zu sein, da dieses während der Reaktion bevorzugt entsteht (höchster Peak, Abbildung 5.1).

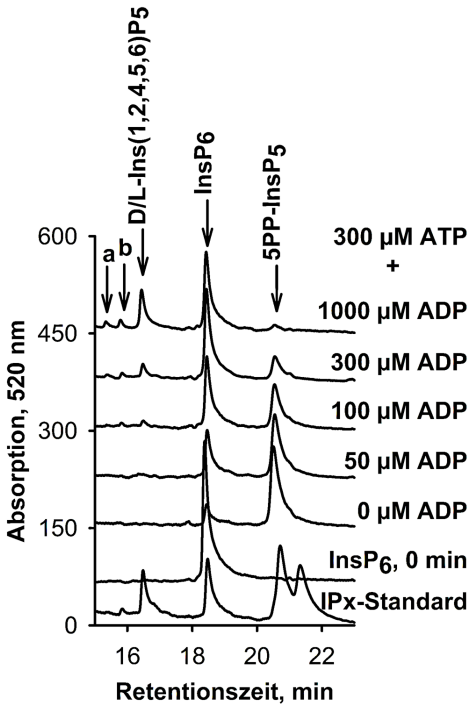


Abbildung 5.1: Einfluss von steigenden ADP Konzentrationen auf die Pyrophosphorylierung von $InsP_6$. Dargestellt sind superponierte Chromatogramme der Produktbildung von 2,5 µM $InsP_6$ bei konstanter ATP Konzentration (300 µM) und variierenden ADP Konzentrationen (0-1000 µM) nach jeweils 20 min durch ~110 nM IP6K2. Von unten nach oben: IPx-Standard zur Identifizierung der Isomere (die Zuordnung der Isomere steht oberhalb der Peaks des letzten Chromatogramms); $InsP_6$ vor Beginn der Reaktionen (0 min) und weiter aufsteigend, die Chromatogramme der Produktbildung aus $InsP_6$ bei 300 µM ATP und ohne ADP; bei 300 µM und 50 µM ADP; bei 300 µM und 100 µM ADP; bei 300 µM und 300 µM ADP und die Produktbildung von $InsP_6$bei 300 µM und 1000 µM ADP. Bei konstanten ATP-, aber steigenden ADP Konzentrationen wird in der gleichen Zeit weniger 5PP-$InsP_5$ synthetisiert. Ab einer ADP Konzentration von 100 µM entstehen neue Peaks, die vor $InsP_6$ eluieren. Mittels Standard identifiziert als a) Ins(1,2,3,4,6)P_5, b) D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5 und D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 als Hauptprodukt.

5.1.3 Verifizierung der $InsP_6$ Dephosphorylierung durch die Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter

Die Beobachtung, dass die $InsP_6$-Kinasen nicht nur eine Kinase-Aktivität besitzen sondern in Gegenwart von ADP ebenfalls $InsP_6$ dephosphorylieren können (Abbildung 5.1) wurde detail-

lierter untersucht. Die rekombinanten Enzyme wurden in den Reaktionsansätzen (4.3.8) mit einem ATP verbrauchenden System aus Hexokinase und Glukose (5.3.2 (2)) mit ADP und $InsP_6$ inkubiert. Das ATP verbrauchende System soll die konkurrierende Reaktion durch das während der Reaktion möglicherweise entstehende ATP vermindern bzw. ausschließen.
Aus der Darstellung ausgewählter, superponierter, aber repräsentativer Chromatogramme für die Dephosphorylierung von $InsP_6$ durch die drei Isoformen (Abbildung 5.2) wird deutlich, dass alle IP6Ks in Gegenwart von nur ADP $InsP_6$ zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 als Hauptprodukt dephosphorylieren. Die Nebenprodukte D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5 bzw. Ins(1,2,3,4,6)P_5 sind bei den Isoformen 1 und 2 deutlich sichtbar, wohingegen diese bei der Isoform 3 fehlen. Allerdings lag auf Grund der Peakhöhe des Hauptproduktes die Vermutung nahe, dass die Nebenprodukte der IP6K3 auf Grund der geringeren Dephosphorylierungsaktivität unterhalb der HPLC-Nachweisgrenze liegen (vgl. Tabelle 5.2). Unter der Annahme eines vergleichbaren $InsP_6$ Substratumsatzes jeder Isoform unter den Bedingungen der dargestellten Chromatogramme lässt sich bereits ein erster Aktivitätsvergleich ziehen. 79 nM der IP6K1 hatten in 60 min ca. 50% (~1,25 µM) $InsP_6$ zu $InsP_5$ umgesetzt. Die IP6K2 hingegen hatte mit ca. 1/3 weniger Enzym (53 nM) in nur etwa 1/3 der Zeit (40 min) bereits ca. 40% (~0,8 µM) dephosphoryliert. Im Vergleich dazu hatte die IP6K3 in 30 min und der 1,4-2,0 fachen Enzymkonzentration (110 nM) nur etwa 5% (0,1 µM) umgesetzt. Dies deutet bereits auf eine deutlich verminderte $InsP_6$ Dephosphorylierung durch die IP6K3 hin.

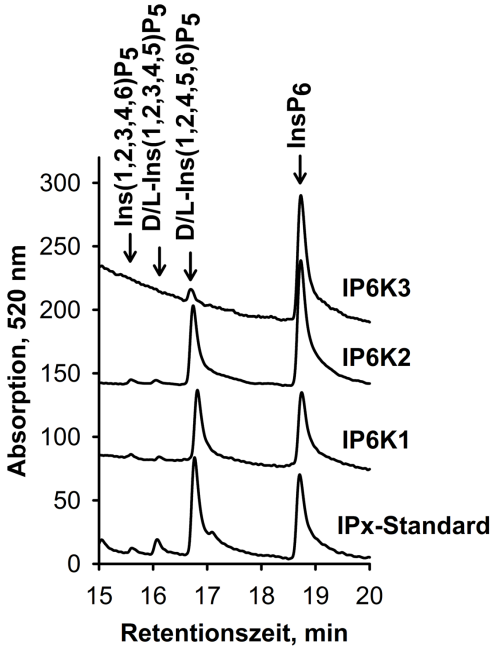


Abbildung 5.2: Superponierte MDD-HPLC Chromatogramme der $InsP_6$ Dephosphorylierung durch die Isoformen 1, 2 und 3 der IP6K. Alle Ansätze wurden in Gegenwart von 5 mM ADP wie beschrieben durchgeführt (4.3.8). Von unten nach oben dargestellt: IPx-Standard zur Identifikation der eluierten Inositolphosphate; Dephosphorylierung von 2,5 µM $InsP_6$ durch die Isoform 1 der IP6K (79 nM) nach 60 min; Dephosphorylierung von 2,0 µM $InsP_6$ durch 53 nM der Isoform 2 nach 40 min; Dephosphorylierung von 2,0 µM $InsP_6$ durch 110 nM Isoform 3 nach 30 min. Die Isomer Zuordnung ist durch Pfeile oberhalb der Peaks dargestellt. Alle Isoformen „dephosphorylieren" $InsP_6$ zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 als Hauptisomer und D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5 bzw. Ins(1,2,3,4,6)P_5 als Nebenisomere (Bei IP6K3 wahrscheinlich unterhalb der HPLC-Nachweisgrenze). Abbildung entnommen aus und modifiziert nach [132].

Zur Bestätigung der unterschiedlichen Isoformaktivitäten für die betrachteten Reaktionen wurden die Michaelis-Menten Parameter der $InsP_6$ „Dephosphorylierung" wie beschrieben (4.3.13) ermittelt. Die Auswertung der spezifischen, initialen Umsatzraten jeder Isoform erfolgte zum einen aus der $InsP_6$ Abnahme (entspricht der Zunahme aller $InsP_5$ Produkte) und zum anderen aus der Zunahme der drei $InsP_5$ Produkte D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5, D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5 und Ins(1,2,3,4,6)P_5 im Einzelnen. Die ermittelten apparenten Parameter für jede Isoform sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Der Vergleich der $K_{m,\,app}$-Werte der Isoformen für die $InsP_6$ Dephosphorylierung zu allen $InsP_5$ Isomeren in Gegenwart von ADP (Tabelle 5.2) macht deutlich, dass die IP6K3, wie auch bei der Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ (Tabelle 5.1), die höchste apparente Affinität für $InsP_6$ ($K_{m,\,app}$=0,19 +/- 0,16 µM) und die niedrigste maximale Umsatzgeschwindigkeit (0,27 +/- 0,06 nmol/min/mg) hat. Dies äußert sich in der niedrigen katalytischen Effizienz, die mit 0,10 min^{-1}*μM^{-1} identisch zu der der IP6K1 ist. Die IP6K1 hat mit 2,77 +/- 0,98 µM die niedrigste Affinität für $InsP_6$ und mit 1354 +/- 421 µM auch die niedrigste Affinität für ADP. Die Isoform 2 hat mit 0,44 +/- 0,22 µM eine etwa 2 mal niedrigere Affinität für $InsP_6$ als die IP6K3, aber dennoch eine ca. 6 mal höhere Affinität als die der IP6K1 in Gegenwart von ADP. Mit der

höchsten maximalen Umsatzrate von 8,9 +/- 1,22 nmol/min/mg ist sie mit 1,52 min^{-1}*μM^{-1} die katalytisch effizienteste Kinase bei der Dephosphorylierung von $InsP_6$ (~15 fach effizienter als die Isoformen 1 und 3). Die apparente Affinität der IP6K2 für ADP ist mit 671 +/- 196 µM etwa doppelt so hoch im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen, aber nur ca. halb so groß wie für ATP (Tabelle 5.1). Dieses Verhältnis ist bei allen Isoformen der Fall, d.h. die apparente Affinität für ATP ist jeweils etwa doppelt so hoch wie für ADP. Auffällig ist neben den Affinitäten gegenüber den Nukleotiden, die Affinität der IP6K1 für $InsP_6$. Der $K_{m,\,app}$-Wert für die $InsP_6$ Dephosphorylierung ist mit 2,77 +/- 0,98 µM (Tabelle 5.2) etwa doppelt so groß wie für die Pyrophosphorylierung mit 1,34 +/- 0,48 µM (Tabelle 5.1). Bei den anderen Isoformen (2 und 3) ist es umgekehrt. Sie besitzen für die Dephosphorylierung von $InsP_6$ in Gegenwart von ADP jeweils etwa 3 mal niedrigere $K_{m,\,app}$ Werte und somit höhere Affinitäten (Tabelle 5.2) als für die Phosphorylierung von $InsP_6$ in Gegenwart von ATP. Der Vergleich der ermittelten Parameter der entstehenden $InsP_5$ Produkte im Einzelnen untermauert das Gezeigte unter Abbildung 5.2. Die Dephosphorylierung von $InsP_6$ zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 als Produkt (in der Tabelle 5.2 als Ins(2,3,4,5,6)P_5 beschriftet) ist jeweils die bevorzugte Reaktion der Kinasen.
Wie bei der $InsP_6$ Pyrophosphorylierung ist die Isoform 2 der IP6K auch bei der Dephosphorylierung die effizienteste Kinase.

Tabelle 5.2: Zusammengefasste Michaelis-Menten Parameter für die $InsP_6$ Dephosphorylierung durch die Isoformen 1, 2 und 3 der IP6K.

Isoform	Reaktion	Konstantes Substrat	Variiertes Substrat	$K_{m,\ app}$ [a] (µM)	$V_{max,\ app}$ [a] (nmol/min/mg)	$K_{cat,\ app}$ [a] (min^{-1})	kat. Effizienz [b] min^{-1} *$µM^{-1}$
IP6K1	**Dephosphorylierung von $InsP_6$**						
	zu allen $InsP_5$ Produkten	ADP, 5 mM	$InsP_6$	2.77 +/- 0.98[c]	3.72 +/- 0.65[c]	0.28 +/- 0.05[c]	0.10[c]
		$InsP_6$, 2,5 µM	ADP	1354 +/- 421[c]	2.63 +/- 0.33[c]	0.20 +/- 0.02[c]	0,0001
				$K_{0.5,\ app}$ [d], (µM)			
	zu Ins(2,3,4,5,6)P_5	ADP, 5 mM	$InsP_6$	2.50 +/- 1.02[d]	2.30 +/- 0.48[d]	0.17 +/- 0.03[d]	0.07[d]
	zu Ins(1,2,3,4,6)P_5	ADP, 5 mM	$InsP_6$	2.49 +/- 2.09[d]	0.27 +/- 0.10[d]	0.02 +/- 0.01[d]	0,01[d]
	zu D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5	ADP, 5 mM	$InsP_6$	0.95 +/- 1.07[d]	0.19 +/- 0.09[d]	0.01 +/- 0.01[d]	0,01[d]
IP6K2	**Dephosphorylierung von $InsP_6$**						
	zu allen $InsP_5$ Produkten	ADP, 5 mM	$InsP_6$	0.44 +/- 0.22[c]	8.90 +/- 1.22[c]	0.67 +/- 0.09[c]	1.52[c]
		$InsP_6$, 2,5 µM	ADP	671 +/- 196[c]	6.16 +/- 0.57[c]	0.46 +/- 0.04[c]	0,0007
				$K_{0.5,\ app}$ [d], (µM)			
	zu Ins(2,3,4,5,6)P_5	ADP, 5 mM	$InsP_6$	0.27 +/- 0.10[d]	6.31 +/- 0.56[d]	0.47 +/- 0.04[d]	1.74[d]
	zu Ins(1,2,3,4,6)P_5	ADP, 5 mM	$InsP_6$	0.52 +/- 0.23[d]	0.18 +/- 0.02[d]	0.010 +/-0.002[d]	0.02[d]
	zu D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5	ADP, 5 mM	$InsP_6$	0.76 +/- 0.28[d]	0.34 +/- 0.04[d]	0.030 +/-0.003[d]	0.04[d]
IP6K3	**Dephosphorylierung von $InsP_6$**						
	zu allen $InsP_5$ Produkten	ADP, 5 mM	$InsP_6$	0.19 +/- 0.16[c]	0.27 +/- 0.06[c]	0.019 +/- 0.004[c]	0.10[c]
		$InsP_6$, 2,5 µM	ADP	1173 +/- 620[c]	0.47 +/- 0.09[c]	0.03 +/- 0.01[c]	<0,0001
				$K_{0.5,\ app}$ [d], (µM)			
	zu Ins(2,3,4,5,6)P_5	ADP, 5 mM	$InsP_6$	0.28 +/- 0.23[d]	0.23 +/- 0.05[d]	0.017+/- 0.004[d]	0.08[d]

Bedingungen zur Bestimmung der Parameter, siehe Methoden (4.3.13). [a] für variierte Substratkonzentrationen; [b] katalytische Effizienz wurde berechnet aus dem Verhältnis von $K_{cat,app}/K_{m,app}$ bzw. $K_{cat,app}/K_{0.5,app}$; [c] Parameter wurden aus der Substratabnahme bestimmt; [d] Parameter wurden aus der Zunahme des Produktes bestimmt. Tabelle entnommen aus und modifiziert nach [132].

5.1.4 Dephosphorylierung von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ in Gegenwart von ADP

Bereits 1996 wurde eine $InsP_6$ Kinase aus einem 100 000xg Überstand von Rattenhirn-Extrakt (*Rattus novergicus*; *Sprague dawley* Linie) isoliert und auf ihre kinetischen Eigenschaften untersucht [68]. Das Produkt der Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ wurde jedoch nicht näher charakterisiert. Ebenfalls kann diese Kinase mit einem Molekulargewicht von 54 kDa keiner bisher bekannten Ratten $InsP_6$ Kinase zugeordnet werden (ratIP6K1-3: ~42-49 kDa, ratPPIP5K: ~160 kDa), so dass nicht eindeutig klar ist, um welche Kinase es sich handelt. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die isolierte $InsP_6$ Kinase die Rückreaktion von PP-$InsP_5$ (die genaue Position der Pyrophosphatgruppe ist hier nicht bekannt) zu $InsP_6$ unter ATP Synthese (aus ADP) katalysieren kann [68]. 2009 wurde eine chemische Synthese von 5PP-$InsP_5$ veröffentlicht, bei der mittels *Luciferase Assay* die Rückreaktion von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ und Phosphattransfer auf ADP als IP6K1 abhängige Reaktion beschrieben wurde [69].
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die oben beschriebene Rückreaktion von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ unter den hier verwendeten Bedingungen (4.3.13) nochmals genau charakterisiert (Abbildung 5.3). Mit Hilfe der IP6K2 wurde 5PP-$InsP_5$ präparativ aus $InsP_6$ hergestellt und mittels Anionentauschersäule (Q-Sepharose) mit anschließender HCl Elution und LiOH Neutralisation isoliert. Das isolierte, neutralisierte Produkt wurde bis zur Trockene eingeengt und in entsprechendem Puffer aufgenommen. Eine anschließende MDD-HPLC Analyse diente der Bestimmung der Produktreinheit (~99%). Das isolierte, zu ~99% reine 5PP-$InsP_5$ wurde für die folgenden Messungen als Substrat der Reaktionen eingesetzt.

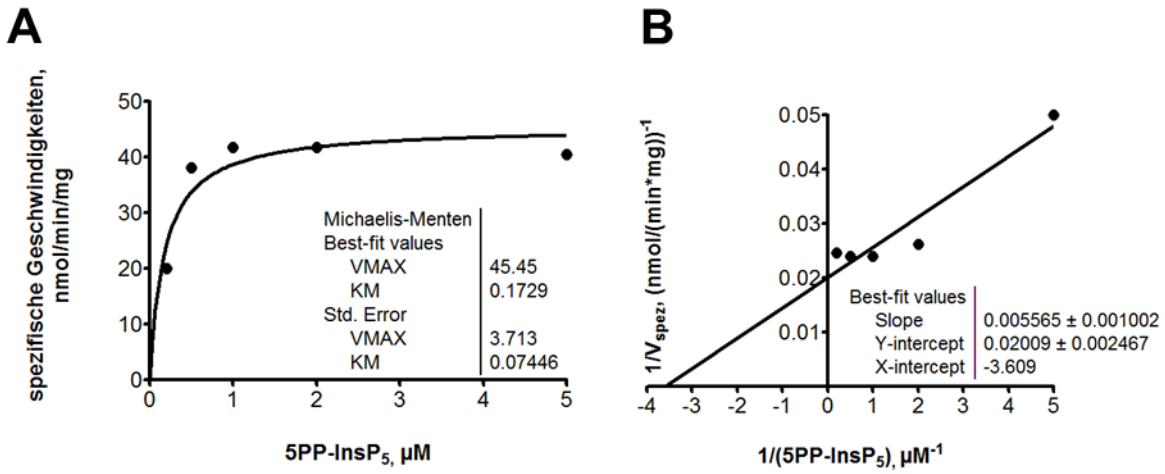


Abbildung 5.3: Dephosphorylierung von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ in Gegenwart von ADP durch die IP6K2. Dargestellt sind jeweils die spezifischen, initialen Geschwindigkeiten der IP6K2 gegen die entsprechende Substratkonzentration (Michaelis-Menten; A), sowie die doppelt reziproke Darstellung beider Datensätze nach Lineweaver und Burk (B). Die Achsenabschnitte der doppelt reziproken Darstellung (B) entsprechen $y = 1/V_{max}$ und $x = -1/K_m$. Messung der Parameter erfolgte auf Grund des begrenzt vorliegenden 5PP-$InsP_5$ nur einfach. Approximation der Graphen in GraphPad Prism 4.0.

Abbildung 5.3 zeigt den Verlauf der enzymatischen Rückreaktion von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ durch die IP6K2 in Gegenwart von ADP. Aufgetragen wurden die Daten nach Michaelis-Menten (A), sowie in doppelt reziproker Darstellung nach Lineweaver und Burk (B). Die Approximation der Graphen (Sättigungskurve und lineare Regression) erfolgte jeweils getrennt mit GraphPad Prism 4.0. Auf Grund des stark begrenzt vorliegenden 5PP-$InsP_5$ wurde der Versuch zur Bestimmung der Parameter mit der IP6K2 nur einmal durchgeführt.
Die verschiedenartige Auftragung derselben Daten lieferte durch die unterschiedliche Approximation jeweils leicht divergente Werte von $V_{max,app}$ und $K_{m,app}$ (Abbildung 5.3). Die Michaelis-Menten Auswertung mittels nicht-linearer Graphenapproximation (in GraphPad Prism 4.0) zeigt einen maximalen Umsatz von 45,5 nmol/min*mg (Abbildung 5.3 A). Nach Lineweaver-Burk ergibt sich ein V_{max} Wert von 49,8 nmol/min/mg (Abbildung 5.3 B). Die apparente halbmaximale Sättigung mit 5PP-$InsP_5$($K_{m,app}$-Wert) liegt bei etwa 0,17 µM (Abbildung 5.3 A) bzw. 0,28 µM (Abbildung 5.3 B). Im Vergleich zur $InsP_6$ Pyrophosphorylierung durch die IP6K2 („Hinreaktion"; K_m=1,58 +/- 0,32 µM, Tabelle 5.1) ist die Affinität für 5PP-$InsP_5$ in Gegenwart von ADP bei der Rückreaktion ca. 5-10 mal höher. Im Gegensatz dazu ist die maximale Geschwindigkeit der Rückreaktion von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ *in vitro* etwa 2,5 mal geringer als bei der "Hinreaktion" von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$).
Die katalytische Effizienz ist jedoch mit 19,9 min^{-1}*µM^{-1} (Tabelle 5.3) bzw. 13,3 min^{-1}*µM^{-1} (Tabelle 5.3) im Vergleich zur IP6K2 katalysierten Dephosphorylierung von $InsP_6$(1,52 min^{-1}*µM^{-1}; Tabelle 5.2) nicht nur die effizientere Dephosphorylierungsreaktion, sondern sogar höher als bei der Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ (5,91 min^{-1}*µM^{-1}; Tabelle 5.1) und somit die effizienteste Reaktion der in dieser Arbeit betrachteten Reaktionen überhaupt.

Tabelle 5.3: Michaelis-Menten Parameter für die Dephosphorylierung von 5PP-$InsP_5$ durch die IP6K Isoform 2 in Gegenwart von ADP.

Konstantes Substrat	Variiertes Substrat	$K_{m,\ app}$ [a)] (µM)	$V_{max,\ app}$ [a)] (nmol/min/mg)	$K_{cat,\ app}$ [a)] (min^{-1})	kat. Effizienz [b)] min^{-1} *µM^{-1}
ADP, 5 mM	5PP-$InsP_5$	0,17[c)]	45,5[c)]	3,38[c)]	19,9[c)]
ADP, 5 mM	5PP-$InsP_5$	0,28[d)]	49,8[d)]	3,71[d)]	13,3[d)]

Bedingungen zur Bestimmung der Parameter, siehe Methoden (4.3.13). [a)] für variierte Substratkonzentrationen; [b)] katalytische Effizienz wurde berechnet aus dem Verhältnis von $K_{cat,\ app}/K_{m,\ app}$; [c)] Bestimmt aus der Michaelis-Menten Auftragung in Abbildung 5.3 A; [d)] Bestimmt aus der lineweaver-Burk Auftragung in Abbildung 5.3 B.

5.2 Enantiomerenzuordnung von $InsP_5$ Isomeren mittels Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK)

5.2.1 Die humane IPMK als enantioselektives Werkzeug zur Unterscheidung zwischen den Enantiomeren Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 (D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5)

Inositolphosphate besitzen wegen ihrer Struktur eine Spiegelebene zwischen der axialen Position 2 und der äquatorialen Position 5 (Abbildung 1.2). Daher sind die Positionen 1 und 3 bzw. 4 und 6 enantiomer zueinander und können mit Standard HPLC- oder NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Methoden nicht voneinander unterschieden werden. Die oben gezeigte Dephosphorylierung von $InsP_6$ durch die IP6K Isoformen liefert das Hauptprodukt D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5, ein Enantiomerenpaar, an dem entweder das Phosphat der Position 1 oder der Position 3 durch die IP6K entfernt wurde. Um jedoch das Reaktionsprodukt der IP6K katalysierten $InsP_6$ Dephosphorylierung genau einem Enantiomer oder einem Gemisch aus beiden zuordnen zu können, mussten alternative Methoden zu den Standardmethoden etabliert werden.
Viele Enzyme, auch des Inositolphosphat Metabolismus, zeichnen sich durch eine ausgesprochene Enantioselektivität aus. Die humane Inositol Polyphosphat Multikinase (hsIPMK) zum Beispiel besitzt relativ viele Substratisomere, aber phosphoryliert dort jeweils selektiv die Hydroxylgruppen der Positionen 3 und 6 von z.B. Ins(1,4,5)P_3 und bildet Ins(1,3,4,5,6)P_5 [32]. Die Substrat-Variabilität mit gleichzeitig hoher Positionsselektivität der hsIPMK macht diese Kinase besonders interessant für enantioselektive Analysen. Ob die hsIPMK ebenfalls bei Ins(1,2,4,5,6)P_5 die Position 3 phosphorylieren kann und somit als enatioselektives Enzym für die Unterscheidung von Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 dienen kann, wurde mit enantiomerenreinem Ins(1,2,4,5,6)P_5 bzw. Ins(2,3,4,5,6)P_5 getestet (Abbildung 5.4).
Die hsIPMK wurde bakteriell exprimiert (4.3.1), gereinigt (4.3.4/4.3.5) und unter den beschriebenen Bedingungen (4.3.8) auf ihre Aktivität gegenüber Ins(1,4,5)P_3 als bevorzugtes Substrat getestet. Die Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P_3 über Ins(1,3,4,5)P_4 zum Endprodukt Ins(1,3,4,5,6)P_5 (Kontrolle nicht gezeigt) bestätigte die publizierte Selektivität [32].
Die Reaktion der hsIPMK mit enantiomerenreinem Ins(1,2,4,5,6)P_5 zeigte einen ~90%igen Umsatz zu $InsP_6$ nach bereits 20 min (Abbildung 5.4 A). Ein weiteres Isomer (Substrat Kontamination mit Ins(1,3,4,5,6)P_5) hingegen wurde nicht phosphoryliert (Abbildung 5.4 A). Die unter identischen Bedingungen gemessene Reaktion mit Ins(2,3,4,5,6)P_5 zeigte keinen Umsatz des Enantiomers in 20 Minuten (Abbildung 5.4 B).
Diese Daten zeigen, dass die hsIPMK bereits nach kurzer Zeit selektiv die Hydroxylgruppe an Position 3 von Ins(1,2,4,5,6)P_5 phosphorylieren kann. Weder die Position 2 von Ins(1,3,4,5,6)P_5 noch die Position 1 von Ins(2,3,4,5,6)P_5 wurden phosphoryliert und stellen somit kein Substrat der hsIPMK dar. Die hsIPMK konnte demnach zwischen den eingesetzten Enantiomeren perfekt unterscheiden.

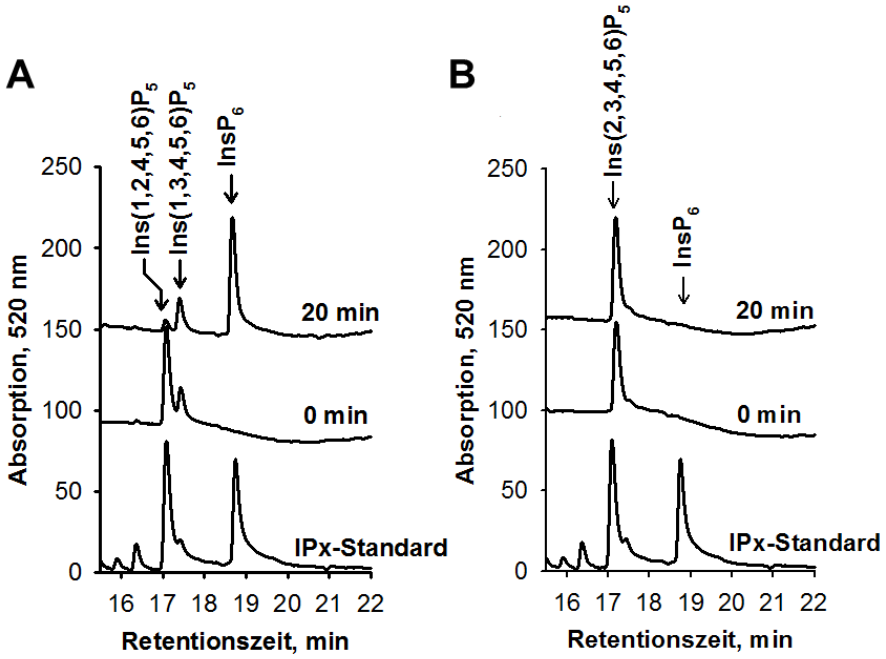


Abbildung 5.4: Selektive Phosphorylierung von enatiomerenreinen Ins(1,2,4,5,6)P_5 (A) und Ins(2,3,4,5,6)P_5 (B) durch die hsIPMK. Von unten nach oben ist jeweils dargestellt: Chromatogramme des IPx-Standard zur Identifizierung der Peaks der eingesetzten Isomere zu Beginn der Reaktion (0 min) und des Verlaufs der Reaktion nach 20 min. <90% Ins(1,2,4,5,6)P_5 wurde innerhalb von 20 min an der Position 3 zu InsP_6 phosphoryliert; eine Verunreinigung mit Ins(1,3,4,5,6)P_5 nicht (A). Ins(2,3,4,5,6)P_5 wurde nicht phosphoryliert und war nicht Substrat der IPMK (B). Die IPMK phosphoryliert enantioselektiv Ins(1,2,4,5,6)P_5. Entnommen aus und modifiziert nach [132].

5.2.2 Das Produkt der IP6K katalysierten Dephosphorylierung von InsP_6 ist das Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die humane IPMK zwischen den Enantiomeren Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 unterscheiden kann und selektiv nur Ins(1,2,4,5,6)P_5 zu InsP_6 phosphoryliert. Die hsIPMK bietet somit die Möglichkeit der enantioselektiven Analyse von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 als Produkt der IP6K katalysierten Dephosphorylierung von InsP_6 (Abbildung 5.5).

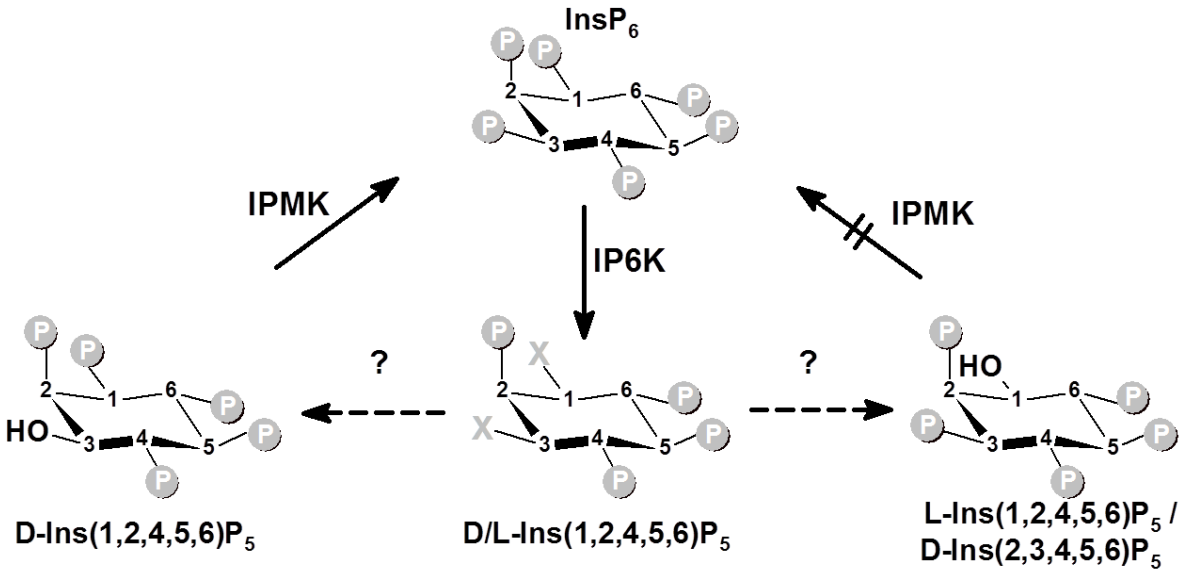


Abbildung 5.5: Schematisch zusammengefasste Darstellung der IP6K katalysierten $InsP_6$ Dephosphorylierung mit anschließender Enantiomerenphosphorylierung durch die humane IPMK. Das Produkt der IP6K katalysierten Reaktion wird MDD-HPLC chromatographisch als D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 identifiziert (unten Mitte). D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 ist eine Enantiomerenbezeichnung und kann entweder D-Ins(1,2,4,5,6)P_5 (links), D-Ins(2,3,4,5,6)P_5 (rechts; L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 entspricht der veralteten IUPAC Bezeichnung) oder ein Gemisch aus beiden sein. Die IPMK phosphoryliert selektiv nur D-Ins(1,2,4,5,6)P_5 zu $InsP_6$ (links), nicht aber dessen Enantiomer D-Ins(2,3,4,5,6)P_5 (rechts).

Für die enantioselektive Rephosphorylierung wurden 60-70% $InsP_6$ mit IP6K2 und ADP zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 dephosphoryliert. Die Kinase wurde denaturiert und wie beschrieben aus der Reaktion entfernt (4.3.17). Durch Zugabe von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase (PK) wurde das vorhandene ADP zu ATP phosphoryliert (vgl. 5.3.4) und nach Zugabe rekombinanter hsIPMK das Rephosphorylierungsprodukt mittels MDD-HPLC analysiert (Abbildung 5.6 A). Als Kontrolle für eine vollständige IP6K2 Denaturierung erfolgte die Rephosphorylierung ohne Zugabe von hsIPMK oder IP6K (Abbildung 5.6 B). Als weitere Kontrolle einer möglichen verbliebenen IP6K2 Restaktivität wurde nach der Denaturierung erneut IP6K2 zugegeben um deren Aktivität während der Rephosphorylierung zu untersuchen (Abbildung 5.6 C). Um zu gewährleisten, dass die hsIPMK unter den Dephosphorylierungs-/ Rephosphorylierungsbedingungen aktiv ist, wurde ein identischer Ansatz ohne $InsP_6$ durchgeführt und kurz vor der Denaturierung das bevorzugte Substrat Ins(1,2,4,5,6)P_5 zur anschließenden Rephosphorylierung durch die hsIPMK zugegeben (Abbildung 5.6 D).

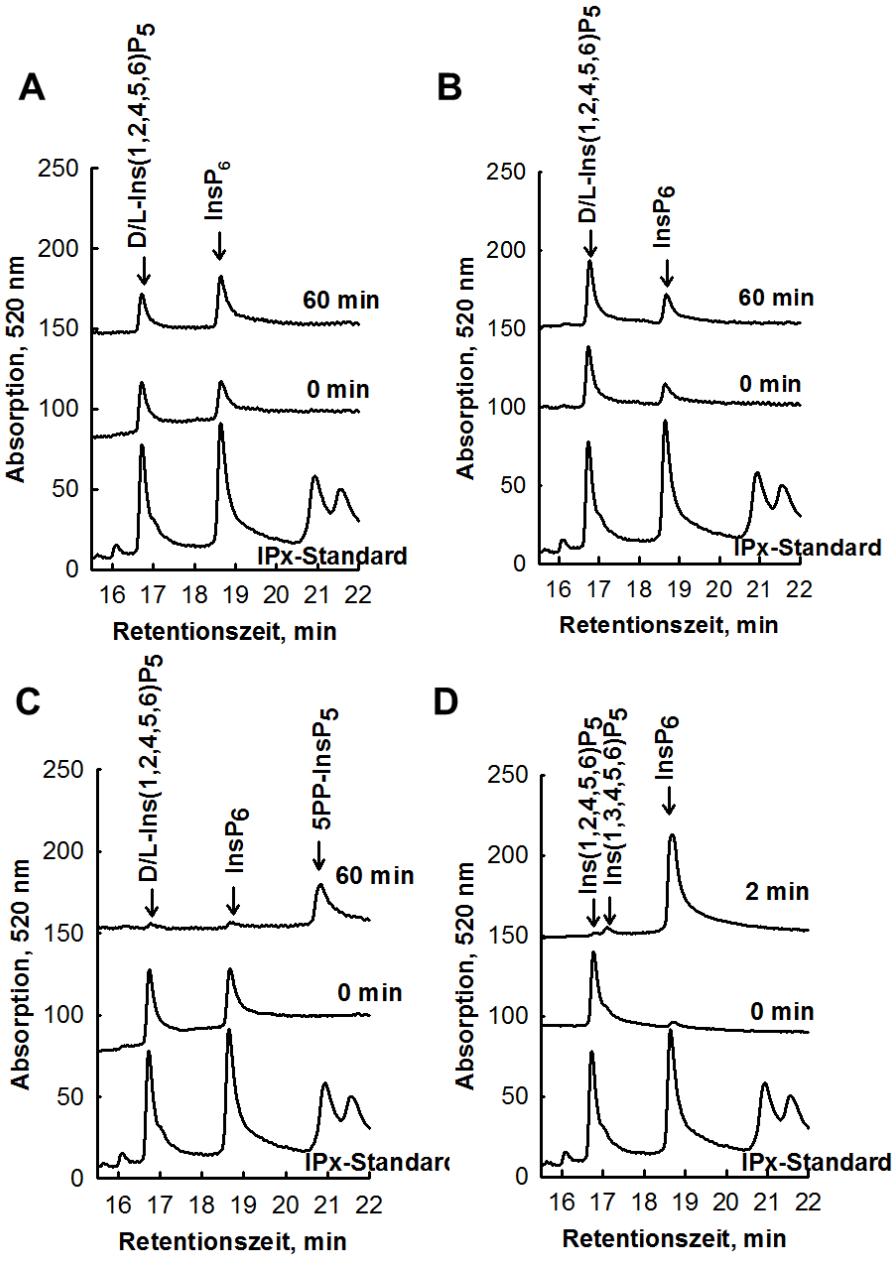


Abbildung 5.6: Identifikation der Enantiomerie des IP6K2 Dephophorylierungsproduktes mittels enantioselektiver hsIPMK. Von unten nach oben ist jeweils dargestellt: IPx-Standard zur Identifikation der Inositolphosphate; Isomerpeaks zu Beginn der Rephosphorylierung (0 min); Inositolphosphate nach beendeter Rephosphorlierung. (A-C) Die Dephosphorylierung von $InsP_6$ zu Beginn (0 min) jedes Versuches erfolgte in verschiedenen, jeweils eigenen Ansätzen. Ca. 60-70% $InsP_6$ wurden zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 „dephosphoryliert" (0 min). (A) Die Rephosphorylierung von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 mit hsIPMK zeigt nach 60 min einen minimalen $InsP_6$ Anstieg (<5%). (B) dIE Rephosphorylierung ohne Enzym zeigt einen winzigen $InsP_6$ Anstieg und deutet auf eine nahezu komplette Denaturierung der IP6K2 hin. (C) Zugabe von IP6K2 führt zur fast vollständigen Rephosphorylierung von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 über $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ innerhalb von 60 min. (D) Die hsIPMK ist unter den hiesigen Bedingungen voll aktiv und phosphoryliert das bevorzugte Enantiomer Ins(1,2,4,5,6)P_5 innerhalb von 2 min zu $InsP_6$. Entnommen aus und modifiziert nach [132].

Die superponierten Chromatogramme zeigen deutlich, dass die Rephosphorylierung von D/L-

Ins(1,2,4,5,6)P_5, als Produkt der IP6K katalysierten InsP_6 Dephosphorylierung, durch die hsIPMK nur zu einer minimalen Zunahme von InsP_6 innerhalb von 60 min führt (Abbildung 5.6 A). Das InsP_5 Produkt der IP6K2 scheint somit kein bzw. nur ein sehr schlechtes Substrat der hsIPMK zu sein. Die geringe Phosphorylierung von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 während der Reaktion mit der hsIPMK beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf einer geringen Restaktivität der IP6K2 aus der vorangegangenen Denaturierung. Wie aus Abbildung 5.6 B deutlich wird, ist eine minimale Rephosphorylierung von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 zu InsP_6 ohne Zugabe eines weiteren Enzyms zu beobachten. Dies spricht für die bereits erwähnte, nicht vollständige Denaturierung der IP6K2. Die Restenzymaktivität reichte vermutlich aus, um die beobachteten geringen Mengen im betrachteten Zeitraum (60 min) zu rephosphorylieren (Abbildung 5.6 A). Dass die Denaturierung der IP6K2 aber nahezu vollständig war, zeigt Abbildung 5.6 C. Die Zugabe von neuer IP6K2 resultierte in einer fast vollständigen Phosphorylierung von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 über InsP_6 zu 5PP-InsP_5 innerhalb von 60 min (Isomeriezuordnung vgl. Abbildung 5.10).
Die hsIPMK bevorzugt *in vitro* enantiomerenreines Ins(1,2,4,5,6)P_5 vor Ins(2,3,4,5,6)P_5 als Substrat zur Phosphorylierung an der Hydroxylgruppe der Position 3 (Abbildung 5.4). Dass die hsIPMK ebenfalls unter den verwendeten Dephosphorylierungs-/Rephosphorylierungsbedingungen vollständig aktiv war, zeigt Abbildung 5.6 D. Bereits nach 2 min wurde das bevorzugte Enantiomer Ins(1,2,4,5,6)P_5 zu InsP_6 phosphoryliert. Die schlechte bzw. fehlende Rephosphorylierung des IP6K Dephosphorylierungsproduktes D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 durch die vollständig aktive, enantioselektive hsIPMK deutet darauf hin, dass das Produkt der IP6K2 katalysierten InsP_6 Dephosphorylierung nicht das bevorzugte Substrat der hsIPMK ist und somit ausschließlich Ins(2,3,4,5,6)P_5 sein muss.

5.2.3 Die einzig bekannte InsP_6 Phosphatase MINPP1 bildet ausschließlich das Enantiomer Ins(1,2,4,5,6)P_5

Die einzig bisher bekannte InsP_6 Phosphatase MINPP1 dephosphoryliert InsP_6 ebenfalls zu dem Enantiomer D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 [40]. Eigene Analysen bestätigten die chromatographische Zuordnung des Produkts (Abbildung 5.7, 0 min). Zur Identifikation des Dephosphorylierungsproduktes der MINPP1 bietet sich ebenfalls die IPMK als selektive Kinase an. Bakteriell überexprimierte und gereinigte rekombinante MINPP1 zeigte gegenüber InsP_6 *in vitro* trotz Optimierungsversuchen nur geringe bis keine Aktivität. Deshalb wurde das Produkt von MINPP1 aus MINPP1 überexprimierenden H1299 Zellen nach deren Aufnahme von exogenem InsP_6 [133] isoliert, HPLC-chromatographisch analysiert, gereinigt und konzentriert [132]. Die Phosphorylierung des isolierten Produkts *in vitro* erfolgte analog zu Abbildung 5.4 mit rekombinanter hsIPMK in Gegenwart von ATP (Abbildung 5.7). Das MINPP1 katalysierte Produkt D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.7, 0 min) wurde nach 20 min komplett zu InsP_6 phosphoryliert und zeigt, dass hsIPMK die Hydroxylgruppe an Position 3 phosphorylieren konnte. Also muss es sich bei dem Isomer der MINPP1 katalysierten InsP_6 Dephosphorylierung um das

bevorzugte Substrat der hsIPMK, dem Enantiomer Ins(1,2,4,5,6)P_5 handeln (Abbildung 5.4) . Es konnten also zwei Enantiomere identifiziert werden die jeweils aus dem Abbau von $InsP_6$ entstehen und eindeutig zwei unterschiedlichen Enzymen zugeordnet werden konnten: Die IP6K dephosphoryliert $InsP_6$ in Gegenwart von ADP zu Ins(2,3,4,5,6)P_5 als Hauptprodukt wohingegen die MINPP1 $InsP_6$ zu dessen Enantiomer Ins(1,2,4,5,6)P_5 dephosphoryliert.

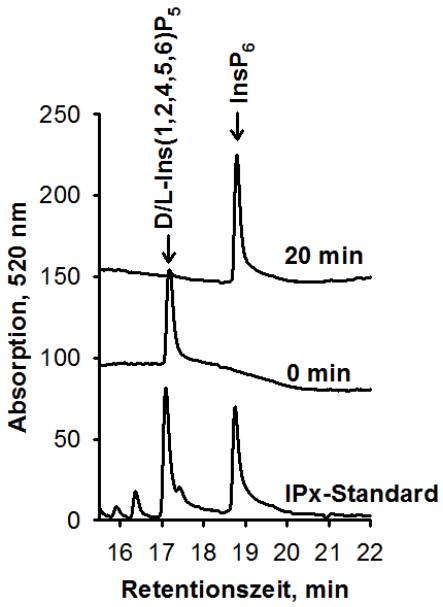
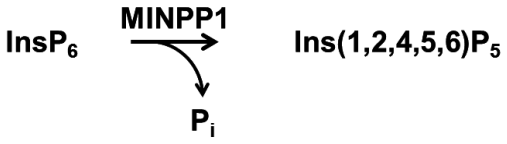


Abbildung 5.7: Enantioselektive Phosphorylierung des MINPP1 katalysierten $InsP_6$ Dephosphorylierungsproduktes D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 durch hsIPMK. Von unten nach oben dargestellt: IPx-Standard zur Identifikation der Inositolphosphate; Isoliertes, gereinigtes MINPP1 Produkt (D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5) zu Beginn der Rephosphorylierung (0 min); Inositolphosphate nach 20 min Phosphorylierung mit hsIPMK. D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 wurde in der angegebenen Zeit komplett zu $InsP_6$ phosphoryliert. Entnommen aus und modifiziert nach [132].

5.2.4 Der IP6K katalysierte $InsP_6$ Abbau ist keine klassische Dephosphorylierung sondern eine $InsP_6$/ADP Phosphattransfer-Reaktion

Typische Phosphatasen mit der *Enzyme comission number* (EC 3.1.3), zu der auch die MINPP1 zählt (EC 3.1.3.62) hydrolysieren Phosphomonoester Bindungen unter Freisetzung von anorganischem Phosphat (P_i). Die MINPP1 katalysierte Dephosphorylierung von $InsP_6$ zu Ins(1,2,4,5,6)P_5 erfolgt somit schematisch nach [40, 134, 135]:



Die Wahrscheinlichkeit, dass die IP6Ks als klassische Hydrolasen $InsP_6$ „dephosphorylieren" ist relativ niedrig. Dagegen spricht zum einen, dass die Dephosphorylierung nur in Gegenwart von ADP abläuft (5.1.3) und zum anderen die bereits publizierte ATP-Synthase Aktivität bei der Rückreaktion von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ in Gegenwart von ADP [68, 69]. Dennoch sollte im Folgenden der Beweis des Phosphattransfers von $InsP_6$ auf ADP bei der Dephosphorylierung zu Ins(2,3,4,5,6)P_5 erbracht werden. Dazu wurde $InsP_6$ in Gegenwart von ADP dephosphoryliert und es wurden sowohl die gebildeten Inositolphosphate als auch die Nukleotide mittels HPLC (MDD-HPLC bzw. Ionentauscher-HPLC) quantitativ bestimmt. Ein Phosphattransfer sollte bei dieser Reaktion stöchiometrisch ablaufen, sodass der Anstieg des Produkts Ins(2,3,4,5,6)P_5 identisch mit der ATP Synthese sein sollte. Um einen stöchiometrischen Transfer exakt bestimmen zu können wurde die $InsP_6$ Konzentration auf 10 µM erhöht und die ADP Konzentration von üblicherweise 2 bzw. 5 mM auf 250 µM erniedrigt. Als Kontrolle dienten zwei weitere Ansätze: Um eine spontane $InsP_6$ Degradation durch Phosphohydrolyse-Aktivität ausschließen zu können wurde $InsP_6$ unter identischen Bedingungen ohne das Enzym IP6K inkubiert. Zweitens, um eine mögliche unspezifische ATP Synthase erkennen zu können wurde die Enzymfraktion ohne $InsP_6$ in Gegenwart von ADP inkubiert.
Alle Ansätze wurden doppelt mit jeweils unterschiedlich stark gereinigter Kinase durchgeführt. Dies sollte die beobachtete und im Folgenden beschriebene unspezifische ATP-Synthase der Enzympräparation minimieren. Das Enzym wurde rekombinant hergestellt (4.3.1) und affinitätschromatographisch gereinigt (4.3.3) (Abbildung 5.8 A und B). Die Hälfte derselben Enzymfraktion wurde zusätzlich über SP-Sepharose gereinigt und ebenfalls vermessen (Abbildung 5.8 C und D). In beiden Fällen zeigte die Reaktion von $InsP_6$ ohne Enzym weder einen ATP Anstieg noch eine Ins(2,3,4,5,6)P_5 Synthese (nicht gezeigt), sodass eine nicht enzymatische $InsP_6$ Degradation bzw. ATP Synthese ausgeschlossen werden kann.

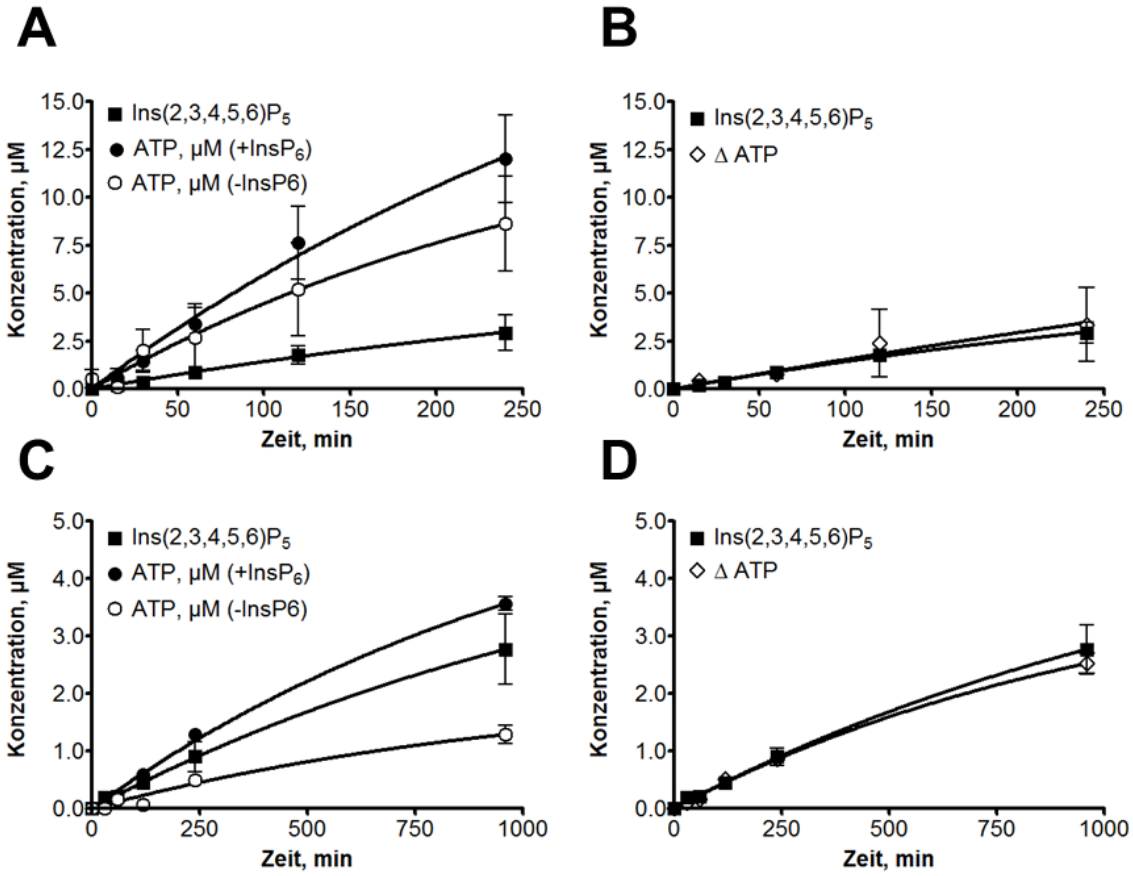


Abbildung 5.8: Stöchiometrische ATP und Ins(2,3,4,5,6)P_5 Synthese bei der Dephosphorylierung von InsP_6. InsP_6 wurde mit IP6K2 in Gegenwart von 250 µM ADP dephosphoryliert. (A und C) Aufgetragen wurde die Zunahme von ATP und Ins(2,3,4,5,6)P_5 (µM) wie auch die Zunahme von ATP (µM) ohne Substrat bei der Inkubation von IP6K2 und entsprechender Reaktionszeit. (B und D) Die Differenz der ATP Synthesen (mit InsP_6 und ohne InsP_6) wurden zusammen mit der Ins(2,34,5,6)P_5 Synthese gegen die Zeit aufgetragen. (A und B) InsP_6 Dephosphorylierung mit GST-Sepharose gereinigter Kinase, (C und D) InsP_6 Dephosphorylierung mit zusätzlich über Ionentauscher (SP-Sepharose) gereinigter Kinase. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei bzw. drei unabhängigen Versuchen +/- SEM. Z.T. entnommen aus und modifiziert nach [132].

Auf Grund der niedrigen ADP Konzentration unterhalb des $K_{m,app}$-Wertes (Tabelle 5.2) der IP6K2 und ca. 4 mal geringerer Enzymkonzentration der weiter gereinigten Kinase (Abbildung 5.8 C und D) wurden die Inkubationszeiten auf 4h (Abbildung 5.8 A und B) bzw. 16h (Abbildung 5.8 C und D) erhöht. Bei der Inkubation von affinitätschromatographisch gereinigter Kinase ohne Substrat (InsP_6) wurde nach 4 h eine maximale ATP Synthese von 8,6 +/- 2,5 µM gemessen (Abbildung 5.8 A; offene Kreise). Bei der Dephosphorylierung des Substrats (+InsP_6) entstanden hingegen in der gleichen Zeit 12,0 +/- 2,3 µM ATP (Abbildung 5.8 A; geschlossene Kreise), obwohl die Ins(2,3,4,5,6)P_6 Synthese nur maximal 2,9 +/- 0,9 µM betrug (Abbildung 5.8 A; Quadrate).

Die Auftragung der Differenzen aus der ATP Synthese mit Substrat (+$InsP_6$) und ohne Substrat (-$InsP_6$) macht deutlich, dass der resultierende Verlauf der ATP-Zunahme (Abbildung 5.8 B, Δ ATP) dennoch nahezu identisch zur Zunahme der Masse von Ins(2,3,4,5,6)P_5 ist. Dies zeigt, dass trotz einer hohen „Hintergrund ATP-Synthese" ein stöchiometrischer $InsP_6$ abhängiger Phosphattransfer auf ADP stattfand. Dennoch galt es zu überprüfen, woher die hohe ATP Synthese trotz fehlendem $InsP_6$ stammte. Der Grund kann eine Adenylatkinase sein, die die Reaktion 2 ADP = ATP+AMP katalysiert und entweder durch die Enzympräparation eingeschleppt wurde oder eine bisher unbekannte Nebenaktivität der IP6K2. Die zusätzliche Reinigung der Enzympräparation sollte Aufschluss darüber geben und zeigt, dass die $InsP_6$ unabhängige ATP-Synthese um das ca. 6,5 fache auf 1,3 +/- 0,2 µM minimiert werden konnte (Abbildung 5.8 C, offene Kreise). Die Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 hingegen blieb mit 2,7 +/- 0,6 µM vergleichbar (Abbildung 5.8 C, Quadrate). Die ATP Synthese in Gegenwart der Substratdephosphorylierung betrug 3,6 +/- 0,1 µM (Abbildung 5.8 C, geschlossene Kreise). Die Stöchiometrie der ATP-Zunahme über die Zeit zeigte jedoch erneut einen nahezu identischen Verlauf zur Ins(2,3,4,5,6)P_5 Bildung und $InsP_6$ Abnahme, was klar für einen Phosphattransfer von $InsP_6$ auf ADP spricht (Abbildung 5.8 D).
Der Vergleich der Ins(2,3,4,5,6)P_5 Synthese durch identische, aber verschieden gereinigte Enzympräparationen zeigt, dass die Verlängerung der Zeit die verminderte Enzymkonzentration in den Ansätzen kompensieren kann (vgl. Abbildung 5.8 A/B und C/D). Die spezifische IP6K2 Aktivität war also unverändert. Hingegen konnte die $InsP_6$ unabhängige ATP Synthese durch die zusätzliche Enzymreinigung bei identischer spezifischer IP6K2 Aktivität um das 6,5 fache reduziert werden. Dies schließt weitgehend aus, dass die IP6K2 eine intrinsische Adenylatkinaseaktivität besitzt und bedeutet, dass die $InsP_6$ unabhängige ATP Synthese von einer initial mitgereinigten Adenylatkinase stammt und somit unspezifisch war.

5.2.5 Die IP6Ks phosphorylieren sowohl das MINPP1 Produkt Ins(1,2,4,5,6)P_5 als auch ihr eigenes Produkt Ins(2,3,4,5,6)P_5

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei $InsP_5$ Enantiomere identifiziert werden, die jeweils das Produkt von $InsP_6$ bei verschiedenartiger enzymatisch katalysierter Dephosphorylierung sind. Ins(1,2,4,5,6)P_5 ist das Abbauprodukt der Phosphatase MINPP1, wohingegen das Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 durch einen IP6K katalysierten Phosphattransfer von $InsP_6$ auf ADP entsteht (5.2.4). In Kontrollversuchen zur Klärung der jeweiligen Enantiomerie (5.2.2) konnte gezeigt werden, dass die IP6K2 ihr eigenes Dephosphorylierungsprodukt sehr schnell in Gegenwart von ATP wieder rephosphorylieren kann (Abbildung 5.6 C). Mit Hilfe unseres IPx-Standards war es möglich, die Produkte der Rephosphorylierung entsprechend als $InsP_6$ bzw. 5PP-$InsP_5$ zu identifizieren. Dies gibt zum ersten Mal einen Hinweis auf eine weitere bisher unbekannte Reaktivität der IP6K als Hydroxylgruppen Kinase für $InsP_5$ Isomere.
Ob die IP6K nur ihr eigenes Produkt Ins(2,3,4,5,6)P_5 rephosphorylieren kann und ähnlich der

Dephosphorylierung enantioselektiv arbeitet, wurde in einem Versuch mit dem Enantiomer Ins(1,2,4,5,6)P_5 untersucht. Die jeweils enantiomerenreinen Substrate wurden in Gegenwart von ATP mit der IP6K2 für 40 min phosphoryliert. Aliquote der Reaktionen wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen und mittels MDD-HPLC analysiert. Auszüge der Chromatogramme sind in Abbildung 5.9 dargestellt.

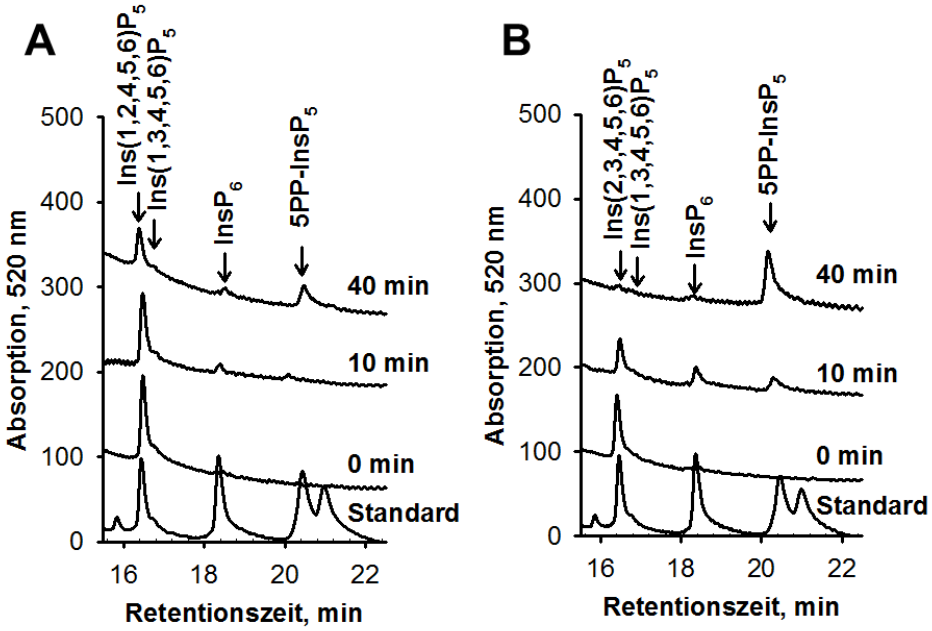


Abbildung 5.9: Phosphorylierung der enantiomerenreinen $InsP_6$ Dephosphorlierungsprodukte Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 durch die IP6K2. Dargestellt sind jeweils superponierte Chromatogramme der Phosphorylierung und anschließender Pyrophosphorylierung von Ins(1,2,4,5,6)P_5 (A) sowie von Ins(2,3,4,5,6)P_5 (B). Von unten nach oben: IPx-Standard zur Identifizierung der Isomere; 2,5 µM Ins(1,2,4,5,6)P_5 (A) bzw. Ins(2,3,4,5,6)P_5 (B) zu Beginn der Reaktion (0 min); Phosphorylierung und Pyrophosphorylierung mit 5 mM ATP durch IP6K2 nach 10 min; Phosphorylierung und Pyrophosphorylierung entsprechend nach 40 min. Beide Substrate werden über $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ phosphoryliert. Ins(2,3,4,5,6)P_5 scheint das bevorzugte Substrat zu sein.

Sowohl Ins(1,2,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.9 A, 0 min), als auch dessen Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.9 B, 0 min) wurden durch die IP6K2 zu $InsP_6$ und im Anschluss schnell zu 5PP-$InsP_5$ phosphoryliert bzw. pyrophosphoryliert (Abbildung 5.9 A und B, 10 bzw. 40 min). Die IP6K2 unterscheidet demnach bei der Phosphorylierung nicht stark zwischen den enantiomer zueinander stehenden Hydroxylgruppen der Positionen 1 und 3 des Inositolphosphatrings. Die $InsP_5$-Phosphorylierung verlief zumindest bei diesem Enantiomerenpaar nicht selektiv. Dennoch geben die superponierten Chromatogramme Evidenzen, dass Ins(1,2,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.9 A) ein weniger gutes Substrat zur Rephosphorylierung war als Ins(2,3,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.9 B). Nach 40 min wurden unter identischen Bedingungen nur ca. 50% Ins(1,2,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.9 A), aber ca. 95% Ins(2,3,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.9 B) zu $InsP_6$ bzw. 5PP-$InsP_5$ umgesetzt. Die Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter beider Reaktionen sollte Auf-

schluss über die Bevorzugung eines Enantiomers geben. Klassische Michaelis-Menten Parameter sollten durch die Auftragung der initialen Produktbildungsgeschwindigkeit gegen die entsprechende Substratkonzentration ermittelt werden. Die Entstehung zweier Produkte macht dies nicht möglich, daher wurden zur Berechnung der apparenten Parameter die initialen Geschwindigkeiten der entsprechenden Substratabnahmen ermittelt und gegen die Konzentration aufgetragen (nicht dargestellt). Die ermittelten Werte sind in Tabelle 5.4 zusammengetragen.

Tabelle 5.4: Michaelis-Menten Parameter für die Rephosphorylierung von Ins(2,3,4,5,6)P_5 und Ins(1,2,4,5,6)P_5 durch die IP6K Isoform 2.

Konstantes Substrat	Variiertes Substrat	$K_{m,\ app}$ [a)] (µM)	$V_{max,\ app}$ [a)] (nmol/min/mg)	$K_{cat,\ app}$ [a)] (min^{-1})	kat. Effizienz [b)] min^{-1} *$µM^{-1}$
ATP, 5 mM	Ins(2,3,4,5,6)P_5	4.36 +/- 1.51[c)]	136 +/- 29.2[c)]	10.2 +/- 2.19[c)]	2.34[c)]
ATP, 5 mM	Ins(1,2,4,5,6)P_5	1.65 +/- 1.16[c)]	28.4 +/- 8.43[c)]	2.13 +/- 0.63[c)]	1.29[c)]

Bedingungen zur Bestimmung der Parameter, siehe Methoden (4.3.13). [a)] für variierte Substratkonzentrationen; [b)] katalytische Effizienz wurde berechnet aus dem Verhältnis von $K_{cat,\ app}/K_{m,\ app}$; [c)] Parameter wurden aus der Substratabnahme bestimmt

Die apparenten Parameter zeigen, dass die IP6K2 eine niedrigere Affinität und höhere Umsatzgeschwindigkeit für Ins(2,3,4,5,6)P_5 hat als für Ins(1,2,4,5,6)P_5. Die Kinase besitzt für die Substratphosphorylierung mit 1,65 +/- 1,16 µM eine etwa 2,5 mal höhere Affinität für das Enantiomer Ins(1,2,4,5,6)P_5 (MINPP1 Produkt) als für ihr präferiertes InsP_6-Dephosphorylierungsprodukt Ins(2,3,4,5,6)P_5 mit 4,36 +/- 1,51 µM. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit für Ins(2,3,4,5,6)P_5 beträgt jedoch 136 +/- 29,2 nmol/min/mg und ist ca. 5 mal höher als für Ins(1,2,4,5,6)P_5 mit 28,4 +/- 8,43 nmol/min/mg. Der Vergleich der katalytischen Effizienzen zeigt, dass die Rephosphorylierung des eigenen Produktes (Ins(2,3,4,5,6)P_5) an der 1´-Hydroxylgruppe ca. 2 mal effizienter verläuft als an der 3´-Hydroxylgruppe von Ins(1,2,4,5,6)P_5 und bestätigt die bereits in Abbildung 5.9 gezeigte Bevorzugung von Ins(2,3,4,5,6)P_5.
Die maximale Umsatzgeschwindigkeit von Ins(2,3,4,5,6)P_5 entspricht in etwa der Rate der Pyrophosphorylierung von InsP_6 mit 124 +/- 9,91 nmol/min/mg (Tabelle 5.1). Auf Grund der etwa 3 mal höheren Affinität der IP6K2 für InsP_6 ($K_{m,\ app}$=1,58 +/- 0,32 µM; Tabelle 5.1) ist jedoch die Pyrophosphorylierung mit 5,91 min^{-1}*$µM^{-1}$ die etwas effizientere Kinase-Reaktion der IP6K2. Diese Daten zeigen eindeutig, dass die IP6Ks neben der Inositolphosphat Pyrophosphorylierung ebenfalls Hydroxylgruppen von Inositolphosphaten phosphorylieren können.

5.2.6 Je nach InsP_5 Isomer ist die IP6K eine Hydroxylgruppen Kinase oder auch pyrophosphorylierende Kinase

Bisher war bekannt, dass die IP6Ks pyrophosphorylierende Kinasen für InsP_6 und Ins(1,3,4,5,6)P_5 sind [95]. Im vorangegangenen Abschnitt konnten zwei weitere InsP_5 Isomere

als Substrate identifiziert werden, deren Produkte mittels IPx-Standard als $InsP_6$ und 5PP-$InsP_5$ identifiziert wurden. Dies würde bedeuten, dass die IP6Ks je nach Substrat entweder Hydroxylgruppen Kinasen oder pyrophosphorylierende Kinasen sein können. Um sicher ausschließen zu können, dass es sich bei den Produkten der identifizierten $InsP_5$ Isomere nicht ebenfalls um pyrophosphorylierte Isomere handelt (vgl. Ins(1,3,4,5,6)P_5), die zufällig identische Retentionszeiten wie $InsP_6$ oder 5PP-$InsP_5$ besitzen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.
Pyrophosphatgruppen haben auf Grund der repulsiven Wirkung der über die Anhydridbindung verknüpften Phosphate ein höheres Hydrolysepotential als Phosphoestergruppen alleine [70, 136]. Dabei kommt es nicht darauf an, ob die pyrophosphorylierten Inositolphosphate $InsP_5$ oder $InsP_6$ als Basismolekül besitzen. Beide sollten ein ähnliches Hydrolyseverhalten aufweisen. Diese Hypothese galt es zunächst zu verifizieren. Mit Hilfe rekombinanter IP6K wurde aus $InsP_6$ in Gegenwart von ATP 5PP-$InsP_5$ [23] und aus Ins(1,3,4,5,6)P_5 5PP-Ins(1,3,4,6)P_4 [14] synthetisiert. Anschließend wurden beide Produkte in saurem Milieu, bei 95°C (4.3.14) hydrolysiert (Abbildung 5.10 A und B). Als Kontrolle unter den verwendeten Bedingungen wurde $InsP_6$ unter identischen Bedingungen ohne Enzym inkubiert (Abbildung 5.10 C).
Die Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ (Abbildung 5.10 A, 0 min) zu 5PP-$InsP_5$ (Abbildung 5.10 A, 120 min) erfolgte zu >98% innerhalb von 120 min. Die Pyrophosphorylierung des $InsP_5$ Isomers Ins(1,3,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.10 B, 0 min) zu 5PP-Ins(1,3,4,6)P_4 (Abbildung 5.10 B, 120 min erfolgte zu >85% im selben Zeitraum. Wie zu erwarten war, wurde $InsP_6$ ohne entsprechendes Enzym nicht umgesetzt (Abbildung 5.10 C). Nach 120 min wurde das Protein denaturiert, pelletiert (4.3.9) und der Überstand bis zu 20 min bei 95°C hydrolysiert. Der 120 min Wert der Pyrophosphorylierung (Abbildung 5.10) wurde eingesetzt als Kontrolle vor der sauren Produkthydrolyse. Trotz unvollständiger Hydrolyse der Produkte wird deutlich, dass die Produktpeaks von 5PP-$InsP_5$ (Abbildung 5.10 A) wie auch von 5PP-Ins(1,3,4,6)P_4 (Abbildung 5.10 B) im Verlauf der Hydrolyse abnahmen und die jeweiligen Substratpeaks wieder zunehmen. Auffällig bei der Hydrolyse von 5PP-Ins(1,3,4,6)P_5 zu Ins(1,3,4,5,6)P_5 war der zusätzlich auftretende Isomerpeak von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5. Hinter der Entstehung des Isomers steht das bekannte und beschriebene Phänomen der protonenkatalysierten Phosphatmigration von Phosphatestern der Positionen 1 und 2 bei saurer Hydrolyse [137]. Eine weitere Degradation zu weniger phosphorylierten Inositolphosphaten wurde nicht beobachtet. $InsP_6$ als Kontrollisomer (Abbildung 5.10 C) blieb während der gesamten Reaktion unverändert.
Dies bestätigt zum einen, dass PP-InsPs unter den gemessenen Bedingungen zu den jeweils stabileren Inositolphosphaten degradieren und zum anderen, dass $InsP_6$ selbst sehr stabil ist und unter den gewählten Bedingungen nicht degradiert.

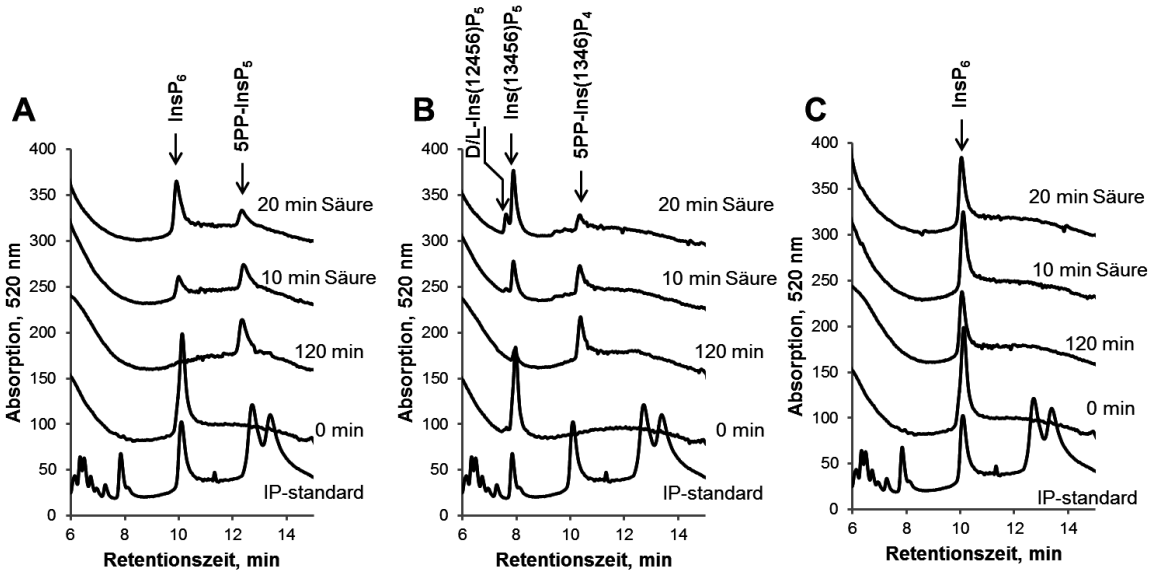


Abbildung 5.10: Partielle saure Hydrolyse von pyrophosphorylierten Insositolphosphaten und $InsP_6$. Von unten nach oben sind jeweils dargestellt: IPx-Standard zur Identifikation der Inositolphosphate; MDD-HPLC-Chromatogramm des eingesetzten Isomers zu Beginn der Reaktion (0 min); gebildete Inositolphosphate nach 120 min Inkubation mit aktiver IP6K2 (A und B) bzw. inaktiver IP6K2 (C); Inositolphosphate nach 10 min saurer partieller Hydrolyse; Inositolphosphate nach 20 min saurer partieller Hydrolyse. Die eingesetzten Substrate $InsP_6$ (A; 0 min) und Ins(1,3,4,5,6)P_5 (B; 0 min) wurden mit der IP6K2 und ATP für 120 min zu 5PP-$InsP_5$ (A, 120 min) bzw. 5PP-Ins(1,3,4,6)P_4 (B; 120 min) pyrophosphoryliert. Die inaktive Kinase zeigt gegenüber $InsP_6$ keinen Umsatz (C). Nach 120 min erfolgte die saure partielle Hydrolyse der Produkte (4.3.14). Aliquats wurden entnommen und MDD-HPLC-chromatographisch analysiert. Nach 10 min waren etwa 45% 5PP-$InsP_5$ (A) bzw. ~50% 5PP-$InsP_4$ (B) hydrolysiert. Nach 20 min waren beide pyrophosphorylierten Produkte zu etwa 85% vermindert (A und B). $InsP_6$ blieb unverändert und war hydrolysestabil (C).

Die in Abbildung 5.10 gezeigten Kontrollen beweisen, dass diese Methode geeignet ist, um die phosphorylierten Produkte der $InsP_5$ Isomere analysieren zu können. Wird ein $InsP_5$ Isomer an seiner Hydroxylgruppe zu $InsP_6$ phosphoryliert bzw. im Anschluss zu 5PP-$InsP_5$ pyrophosphoryliert, sollte bei der Hydrolyse $InsP_6$ angereichert werden. Sollten allerdings pyrophosphorylierte $InsP_5$ Isomere entstehen, die wie $InsP_6$ oder 5PP-$InsP_5$ eluieren, sollte die Hydrolyse entsprechend der Hydrolyselabilität wieder zu einer Anreichung des eingesetzten $InsP_5$ Substrates führen.

Abbildung 5.11 zeigt die partielle saure Hydrolyse der Produkte von Ins(2,3,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.11 A) und Ins(1,2,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.11 B). Die Versuche wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt und zeitgleich mittels MDD-HPLC analysiert. Die Phosphorylierung beider Enantiomere erfolgte nahezu vollständig innerhalb von 120 min (Abbildung 5.11 (A; >95%) und (B; >92%)). Die saure Partialhydrolyse der Produkte für 10 bzw. 20 min zeigt jeweils eindeutig eine Reduktion des Endproduktpeaks und eine Anreicherung des $InsP_6$ Peaks. Auf Grund der Produktidentifikation mittels IPx-Standard und der hier gezeigten partiellen Hydrolyse wurde eindeutig geklärt, dass beide Isomere (Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5)

zunächst an der jeweiligen noch freien Hydroxylgruppe zu $InsP_6$ phosphoryliert und anschließend weiter zu 5PP-$InsP_5$ pyrophosphoryliert werden. Pyrophosphorylierte Isomere, wie sie bei der Reaktion mit Ins(1,3,4,5,6)P_5 (vgl. 5PP-Ins(1,3,4,6)P_4) entstehen, werden hier nicht gebildet.

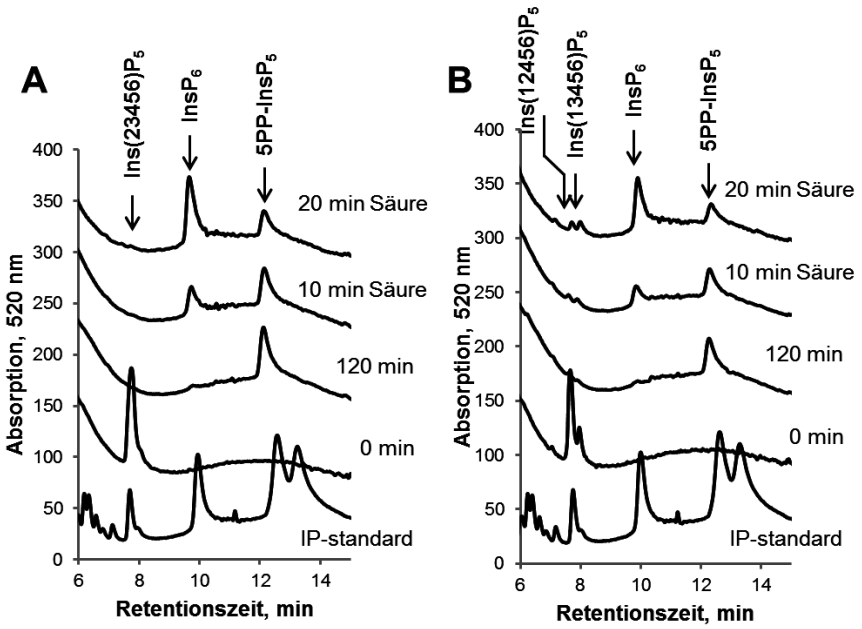


Abbildung 5.11: Partielle saure Hydrolyse der phosphorylierten Produkte von Ins(2,3,4,5,6)P_5 (A) bzw. Ins(1,2,4,5,6)P_5 (B). Die Darstellung der Chromatogramme entspricht der in Abbildung 5.10. Die eingesetzten Substrate Ins(2,3,4,5,6)P_5 (A; 0 min) und Ins(1,2,4,5,6)P_5 (B; 0 min) wurden mit der IP6K2 für 120 min phosphoryliert (A und B, 120 min). Nach der Phosphorylierung erfolgte die saure partielle Hydrolyse der Produkte (4.3.14). Aliquats wurden nach 10 und 20 min entnommen und MDD-HPLC-chromatographisch analysiert. Die Produkte wurden jeweils hydrolysiert und $InsP_6$ reicherte sich an.

5.3 Einfluss des Adenylat-Energiepotentials auf die IP6K

5.3.1 Einfluss des ATP/ADP Molenbruches als Maß des Adenylat-Energiepotential auf die Pyrophosphorylierung und Dephosphorylierung von $InsP_6$ durch die IP6K1 und IP6K2

In den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit konnte ausführlich gezeigt werden, dass die IP6Ks 5PP-$InsP_5$ sowie $InsP_6$ in Gegenwart von ADP jeweils zu $InsP_6$ bzw. Ins(2,3,4,5,6)P_5 (plus z.T. Nebenprodukten Ins(1,2,3,4,6)P_5 und D/L-Ins(1,2,3,4,5)P_5) dephosphorylieren können (5.1.3). In Gegenwart von ATP hingegen zeigen die Enzyme eine Kinaseaktivität für ihre Substrate. Sie phosphorylieren sowohl freie Hydroxylgruppen von $InsP_5$ Isomeren, wie bei Ins(2,3,4,5,6)P_5 (5.2.5), als auch bereits phosphorylierte Positionen wie bei $InsP_6$ zu Pyrophosphatgruppen (5.1.1). Bisher wurden hier nur die Einzelreaktionen in Gegenwart von nur einem Nukleotid (d.h. nur

ATP oder nur ADP) detailliert betrachtet. Jedoch zeigen die Daten, dass die entsprechenden Produkte der IP6K katalysierten Reaktionen in der entsprechenden Gegenreaktion als Substrate eingesetzt werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass die Kinasen zwei Reaktionen, Hin- und Rückreaktion, in Abhängigkeit vom vorhandenen Adenylat-Energiepotential katalysieren können.
Hinweise, dass beide Reaktionen nicht nur voneinander getrennt verlaufen, sondern auch parallel ablaufen könnten, wurden zum ersten Mal in den in Abbildung 5.1 gezeigten Versuchen gefunden: Bereits geringe Konzentrationen an ADP in Kombination mit ATP führen zu einer parallelen Dephosphorylierung bzw. Pyrophosphorylierung von $InsP_6$. Im Folgenden sollten diese Hinweise quantitativ verifiziert werden. Für die Reaktionen der Kinasen mit $InsP_6$ wurden die Nukleotide ATP und ADP jeweils zwischen 0 und 2 mM miteinander kombiniert, wobei die Summe beider Nukleotide konstant auf 2 mM gehalten wurde. Die unterschiedlichen Kombinationen sollten verschiedene Adenylat-Energiepotentiale *in vitro* simulieren und die Auswirkungen auf die jeweilige Produktbildungsgeschwindigkeit und Konzentrationen im Gleichgewicht (Äquilibrium) zwischen Substrat und Produkten verdeutlichen. Im Fall der IP6Ks kann sich jeweils ein Gleichgeweicht zwischen $InsP_6$ und $Ins(2,3,4,5,6)P_5$ (sowie den weniger abundanten $InsP_5$ Produkten), $InsP_6$ und 5PP-$InsP_5$ sowie zwischen $InsP_6$ und beiden Produkten ($Ins(2,3,4,5,6)P_5$ bzw. 5PP-$InsP_5$) gleichzeitig einstellen. Vereinfacht ergibt sich das Reaktionssytem:

$$\mathbf{Ins(2,3,4,5,6)P_5} \rightleftharpoons \mathbf{InsP_6} \rightleftharpoons \mathbf{5PP\text{-}InsP_5}$$

Das eingesetzte Energieniveau wurde durch den ATP Stoffmengenanteil (Xi, früher Molenbruch) an der Summe von ATP und ADP (2 mM, s.o.) repräsentiert. Der ATP Stoffmengenanteil ist als der Anteil einer Substanz/eines Stoffes an der Summe aller Bestandteile definiert [138] und wurde für ATP berechnet nach X_i=[ATP]/(Σ[ATP][ADP]) = [ATP]/2 mM. Der Wert ist dimensionslos und kann Größen zwischen 0 und 1 annehmen. Ein Wert von 0 entspricht einem niedrigen Energiepotential (2 mM ADP), wohingegen 1 einem hohen Potential mit ausschließlich ATP (2 mM) entsprach. Abbildung5.12 zeigt tabellarisch die eingesetzten ADP- und ATP-Konzentrationen mit entsprechendem, berechnetem ATP-Stoffmengenanteil (X_i). Der Graph zeigt schematisch den Verlauf des simulierten Energiepotentials. Der linke Teil der Abszisse repräsentiert ein niedriges Energiepotential (2 mM ADP, 0 mM ATP; X_i = 0), der rechte Bereich ein hohes Energiepotential (0 mM ADP, 2 mM ATP; X_i = 1) mit jeweils zugehörigem ATP-Stoffmengenanteil (X_i). In den folgenden Auftragungen einer Funktion in Abhängigkeit des Energiepotentials bzw. ATP Stoffmengenanteils wurde die Darstellung (linke Abszissenteil: niedriges Potential, rechter Abszissenteil: hohes Potential) beibehalten. Die Begriffe Adenylat-Energiepotential und ATP-Stoffmengenanteil werden äquivalent verwendet.

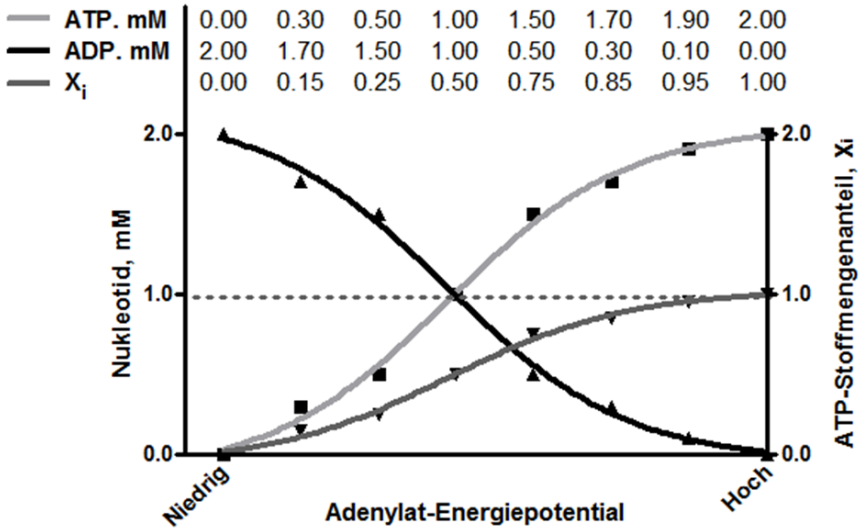


Abbildung 5.12: Graphische Darstellung des simulierten Adenylat-Energiepotentials durch den Einsatz unterschiedlicher Nukleotidkonzentrationen (ADP und ATP). Die Summe beider Nukleotide für die Pyrophosphorylierung und Dephosphorylierung von $InsP_6$ je Ansatz betrug 2 mM. Die eingesetzte Konzentration an ATP wird durch die obere Reihe beschrieben und im Graph grau dargestellt. Die Konzentration an ADP zeigt die mittlere Reihe sowie die schwarze Linie. Der ATP-Stoffmengenanteil (X_i) wurde an Hand der eingesetzten Nukleotidkonzentrationen (4.3.15) nach X_i=[ATP]/(Σ[ATP][ADP])=[ATP]/2 mM berechnet. Der ATP-Stoffmengenanteil (dunkelgrau) wird äquivalent zum Adenylat-Ernergiepotential verwendet und nimmt Werte zwischen 0 und 1 an (Maximalwert = gestrichelte Linie).

Die Isoformen 1 und 2 der IP6K wurden mit $InsP_6$ und unterschiedlichen ATP-Stoffmengenanteilen (s.o.) inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Inositolphosphat Konzentrationen (Substrat: $InsP_6$; Produkte: Ins(2,3,4,5,6)P_5 bzw. 5PP-InsP_5) HPLC-chromatographisch analysiert und gegen die entsprechenden Zeitpunkte aufgetragen (Abbildung 5.13). Beispielhaft werden hier die Umsätze der IP6K Isoform 2 in Abhängigkeit der Zeit wiedergegeben. Die Daten zeigen jeweils von links oben (Abbildung 5.13 A) nach rechts unten (Abbildung 5.13 H) den Verlauf der IP6K2 katalysierten Reaktion mit $InsP_6$ bei stetig abnehmendem ATP Stoffmengenanteil. Die Abnahme des ATP Stofmengenanteils korreliert mit einem abnehmenden Adenylat-Energiepotential.

An die Werte wurden mit GraphPad Prism 4.0 jeweils Exponentialfunktionen approximiert, mit deren Hilfe die initialen spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeiten (nmol/(min*mg)) (Approximation: *„one Phase exponential association“*), sowie die Geschwindigkeit der Substratabnahme (Approximation: *„one Phase exponential decay“*) zwischen 0 und 0,5 min berechnet wurden (4.3.15). Aus den horizontal verlaufenden Anteilen der Substrat bzw. Produkttransienten wurden die Konzentrationen der Produkte und des Substrates im Gleichgewicht (Äquilibrium) ermittelt (4.3.15). Sowohl die spezifischen initialen Geschwindigkeiten wie auch die Gleichgewichtskonzentrationen wurden für beide Isoformen unter identischen Bedingungen ermittelt und jeweils gegen den ATP-Stoffmengenanteil aufgetragen (Abbildung 5.14 und Abbildung 5.15).

Die Umsätze von $InsP_6$ zeigen deutlich, dass bei einem ATP-Stoffmengenanteil von X_i=1 (Abbildung 5.13 A) bereits nach ca. 10-15 min nahezu alles $InsP_6$ (schwarze Punkte) zu 5PP-$InsP_5$ (weiße Quadrate) umgesetzt wird und sich ein Gleichgewicht zwischen Substrat und Produkt bei 0,05 +/- 0,04 µM ($InsP_6$) bzw. 2,45 +/- 0,04 µM (5PP-$InsP_5$) einstellt. Die 800 fach höhere ATP Konzentration über $InsP_6$ führt zu einem 98%igen Umsatz des Substrates. Eine Reduktion des ATP-Stoffmengenanteils um nur 5% auf X_i=0,95 (Abbildung 5.13 B) hat bereits starke Auswirkungen, nicht nur auf die Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 5.14 B), sondern auch auf die Konzentrationen im Äquilibrium (Abbildung 5.15 B). Das Gleichgewicht zwischen $InsP_6$ und 5PP-$InsP_5$ liegt nun mit 0,40 +/- 0,04 µM ($InsP_6$) und 2,10 +/- 0,04 µM (5PP-$InsP_5$) (Abbildung 5.13 B) ca. 30% näher beieinander als bei X_i=1. Zusätzlich entsteht Ins(2,3,4,5,6)P_5 (schwarze Dreiecke) bis zu einer Äquilibriumskonzentration von 0,01 +/- 0,002 µM (Abbildung 5.13 B). Trotz einer immer noch 760 fach höheren ATP Konzentration über $InsP_6$ wird weniger Substrat umgesetzt; etwa 84% $InsP_6$ werden zu 5PP-$InsP_5$ pyrophosphoryliert, aber bereits 0,4% werden dephosphoryliert. Dies verdeutlicht, dass parallel zu ATP vorhandene, geringe ADP Konzentrationen nicht nur die IP6K2 vermittelte $InsP_6$ Pyrophosphorylierung mindern, sondern auch die $InsP_6$ Dephosphorylierung initiieren. Mit stetig steigendem ADP Anteil (verringerter ATP-Stoffmengenanteil; niedrigeres Energiepotential) verringert sich einerseits immer weiter die Bildung von 5PP-$InsP_5$ und erhöht sich andererseits Bildung von Ins(2,3,4,5,6)P_5 bis zwischen einem ATP-Stoffmengenanteil von X_i=0,5 und 0,25 die Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 sogar die von 5PP-$InsP_5$ übersteigt (Abbildung 5.13 E und F).

Die Gleichgewichtskonzentrationen zwischen $InsP_6$ und 5PP-$InsP_5$ ligen bei hohen X_i-Werten auf der Seite von 5PP-$InsP_5$ und nähern sich bis zu einem Wert zwischen X_i=0,85 und 0,75 an (Abbildung 5.13 C und D). Niedrigere X_i-Werte verändern das Äquilibrium zu Gunsten von $InsP_6$ (Abbildung 5.13 E-F). Bei Werten zwischen 0,5 und 0,25 dominieren $InsP_6$ und Ins(2,3,4,5,6)P_5 das Äquilibrium (Abbildung 5.13E und F). Bei einem ATP-Stoffmengenanteil von <0,3 dominiert die Dephosphorylierung von $InsP_6$ das enzymatische Geschehen. Ein Äquilibrium wurde in der Messzeit nicht erreicht, da die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung zu gering ist (Abbildung 5.13 G und H).

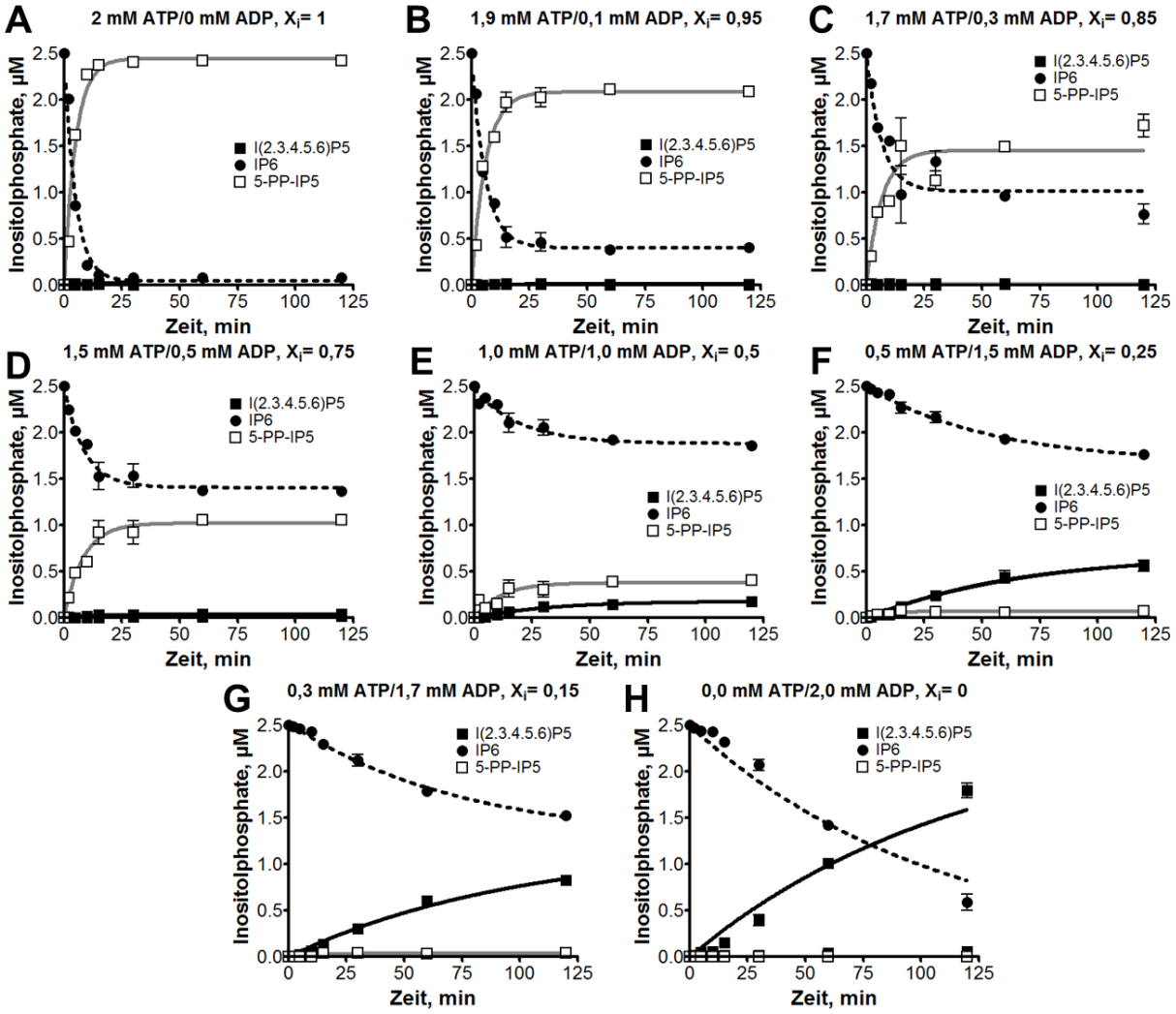


Abbildung 5.13: IP6K2 katalysierter Umsatz von $InsP_6$ bei verschiedenen [ATP] und [ADP] Kombinationen. Unter identischen Bedingungen wurden 2,5 µM $InsP_6$ mit 53 nM IP6K2 für 120 min inkubiert. Variiert wurde das Verhältnis von ATP zu ADP, wobei die Summe beider Nukleotide konstant auf 2 mM gehalten wurde. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen +/- SEM. Zusätzlich zu den Nukleotidkombinationen steht über jedem Graphen der nach X_i=[ATP]/(Σ[ATP][ADP])=[ATP]/2 mM berechnete ATP-Stoffmengenanteil und repräsentiert das jeweilige im Reaktionsansatz simulierte Adenylat-Energiepotential. Es nimmt von links oben X_i=1 (A) nach rechts unten X_i=0 (H) ab. Aufgetragen sind jeweils die Substrat- bzw. Produktkonzentrationen gegen die entsprechenden Zeitpunkte der Probenentnahme bei festgelegtem Adenylat-Energiepotential. Das initiale Substrat (schwarze Kreise) war $InsP_6$ und wurde in Abhängigkeit des X_i zu 5PP-$InsP_5$ (weiße Quadrate) pyrophosphoryliert und/oder zu Ins(2,3,4,5,6)P_5 (schwarze Dreiecke) dephosphoryliert. Aus den gezeigten Graphen wurde sowohl die initiale Geschwindigkeit in nmol/(min*mg) der Substratabnahme, als auch die Geschwindigkeit der Produktzunahmen zwischen 0 und 0,5 min berechnet (Darstellung der Werte in Abhängigkeit von X_i, siehe Abbildung 5.14 B). Die Äquilibriumskonzentrationen von $InsP_6$, 5PP-$InsP_5$ und Ins(2,3,4,5,6)P_5 wurden aus den Extremwerten von approximierten Exponentialfunktionen ermittelt (Maximalkonzentration der Produkte bzw. Minimalkonzentrationen des Substrates im Gleichgewicht). Die Auftragung der Werte aus den hier exemplarischen Darstellung der IP6K2 in Abhängigkeit von X_i ist in Abbildung 5.15 B dargestellt. Die der Isoform 1 in Abbildung 5.14 A und Abbildung 5.15 A.

Wie bereits beschrieben, wurde der Umsatz von $InsP_6$ in Abhängigkeit des Energiepotentials für die Isoformen 1 und 2 der IP6K untersucht. Die Darstellung der Ergebnisse als Auftragung der Substrat- bzw. Produktkonzentrationen gegen die Zeit ist beispielhaft nur für die Isoform 2 der IP6K (Abbildung 5.13) dargestellt. In Abbildung 5.14 sind die für die Isoformen 1 und 2 ermitteten Produktbildungsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit des Adenylat-Energiepotentials bzw. ATP-Stoffmengenanteils ([ATP]/([ATP]+[ADP])) zusammengetragen. Es wird deutlich, dass die Isoform 1 (Abbildung 5.14 A) unter den gemessenen Bedingungen eine etwa 5 fach geringere spezifische maximale Geschwindigkeit sowohl für die Phosphorylierung (22,2 +/- 1,4 nmol/min/mg) als auch für die Dephosphorylierung (0,58 +/- 0,06 nmol/min/mg) von $InsP_6$ aufweist als die Isoform 2 mit 104 +/- 14,6 nmol/min/mg bzw. 3,00 +/- 0,74 nmol/min/mg (Abbildung 5.14 B). Beide Isoformen reagieren jedoch stark auf den Einfluss des sinkenden Energiepotentials. Die halbmaximale Geschwindigkeit der $InsP_6$ Pyrophosphorylierung durch die Isoform 1 (Abbildung 5.14 A) bzw. 2 (Abbildung 5.14 B) wird bei einem ATP-Stoffmengenanteil von 0,70 bzw. 0,87 erreicht. Die halbmaximale Geschwindigkeit der $InsP_6$ Dephosphorylierung hingegen wird bei 0,81 (IP6K1) bzw. 0,33 (IP6K2) erreicht. Der Vergleich der Werte macht deutlich, dass die IP6K2 mit der Bildung von 5PP-$InsP_5$ sensitiver auf Veränderungen des Adenylat-Energiepotentials reagiert als die IP6K1 (s.o.). Die $InsP_6$ Dephosphorylierung durch die beiden Isoformen hingegen zeigt deutlichere Unterschiede. Physiologische Werte des ATP-Stoffmengenanteils liegen zwischen 0,72 und 0,90 [139], was bedeutet, dass die IP6K1 ihre halbmaximale Aktivität zur $InsP_6$ Dephosphorylierung bereits bei physiologischen Werten erreicht, wohingegen die halbmaximale Aktivität der IP6K2 erst bei pathologischen ATP-Stoffmengen- anteilen erreicht wird. Die Daten zeigen, dass die IP6K1 für die $InsP_6$ Dephosphorylierung klar das Adenylat-Energiepotential sensitivere Enzym ist.

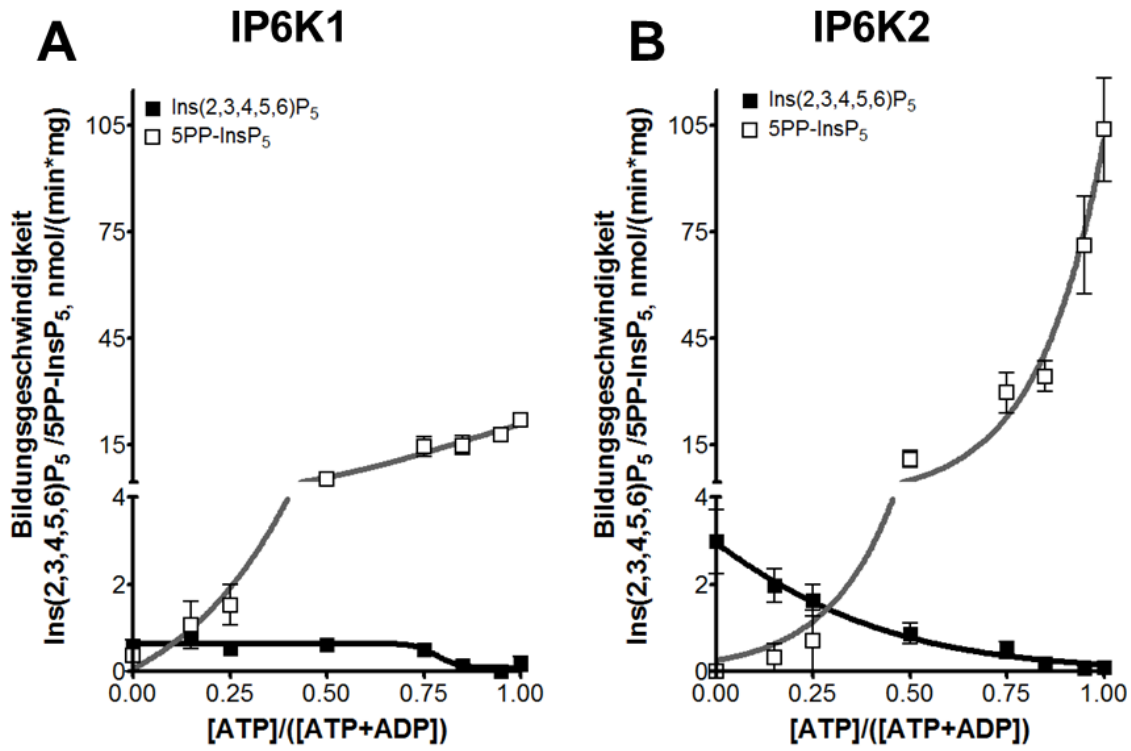


Abbildung 5.14: $InsP_6$ Pyrophosphorylierung und Dephosphorylierung in Abhängigkeit des Adenylat-Energiepotentials. Die IP6K Isoformen 1 (A) und 2 (B) wurden bei verschieden ATP zu ADP Verhältnissen (Abbildung 5.12) identisch mit $InsP_6$ inkubiert. Die jeweiligen Produktbildungsgeschwindigkeiten für 5PP-$InsP_5$ (weiße Quadrate) bzw. Ins(2,3,4,5,6)P_5 (schwarze Quadrate) ausgehend von $InsP_6$ wurden berechnet und gegen den entsprechenden ATP-Stoffmengenanteil ([ATP]/([ATP]+[ADP])) aufgetragen. Der Stoffmengenanteil repräsentiert von links nach rechts, die Höhe des Adenylat-Energiepotentials. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen +/- SEM. Entnommen aus und modifiziert nach [132] .

Die Verschiebung der Gleichgewichtskonzentrationen aller drei Reaktanden, z.T. ermittelt aus Abbildung 5.13, wurden in Abbildung 5.15 A und B gegen den ATP-Stoffmengenanteil aufgetragen. Sie zeigen für 5PP-$InsP_5$ im Äquilibrium bei hohem Energiepotential (>0,4) einen ähnlichen Verlauf. Bis zu einem Stoffmengenanteil von 0,78 sind die Gleichgewichtskonzentrationen zu Gunsten des 5PP-$InsP_5$ verschoben. Bei 0,78 liegen sowohl 5PP $InsP_5$ und $InsP_6$ identisch bei ca. 1,2 µM. Mit sinkendem Adenylat-Energiepotential (ATP-Stoffmengenanteil <0,78) liegt das Äquilibrium auf Seiten des eingesetzten Substrates $InsP_6$. Die Konzentration des Produktes 5PP-$InsP_5$ im Gleichgewicht nimmt deutlich bis auf 0 ab. Die Konzentration des Dephosphorylierungsproduktes Ins(2,3,4,5,6)P_5 nimmt mit sinkendem Energiepotential zu. Ab einem ATP-Stoffmengenanteil von ca. 0,2 übersteigt bei der IP6K1 katalysierten Reaktion (Abbildung 5.15 A) die Äquilibriumkonzentration von Ins(2,3,4,5,6)P_5 die von 5PP-$InsP_5$ und steht nur noch mit $InsP_6$ im Äquilibrium, wobei die Verschiebung noch immer deutlich auf Seiten des $InsP_6$ liegt. Bei der IP6K2 katalysierten Reaktion (Abbildung 5.15 B) übersteigt Ins(2,3,4,5,6)P_5 das 5PP-$InsP_5$ bereits bei einem ATP-Stoffmengenanteil von ~0,4. Bei Werten bis

0,13 nähern sich die Konzentrationen im Gleichgewicht zwischen Ins(2,3,4,5,6)P_5 und $InsP_6$ an, bis dann unter einem ATP-Stoffmengenanteil von 0,13 das Gleichgewicht zum Ins(2,3,4,5,6)P_5 hin verschoben ist (Abbildung 5.15 B).

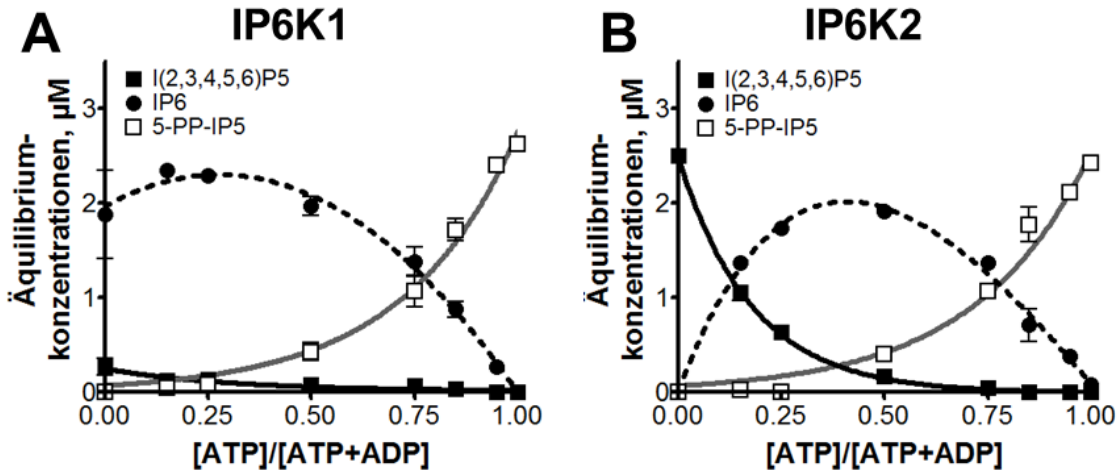


Abbildung 5.15: Gleichgewichtskonzentrationen von $InsP_6$ und dessen Produkte 5PP-$InsP_5$ und Ins(2,3,4,5,6)P_5 in Abhängigkeit des Adenylat-Energiepotentials. Die IP6K Isoformen 1 (A) und 2 (B) wurden bei verschieden ATP zu ADP Verhältnissen mit $InsP_6$ bis zur Einstellung der Gleichgewichtskonzentrationen inkubiert. Die Konzentrationen im Äquilibrium von Ins(2,3,4,5,6)P_5 (schwarze Quadrate), $InsP_6$ (schwarze Punkte) und 5PP-$InsP_5$ (weiße Quadrate) wurden ermittelt und gegen das entsprechende Adenylat-Energiepotential aufgetragen. Das Adenylat-Energiepotential wird durch den ATP-Stoffmengenanteil ([ATP]/([ATP]+[ADP])) repräsentiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen +/- SEM.

5.3.2 Etablierung von enzymatischen Systemen zur Erhöhung und Erniedrigung des Adenylat-Energiepotentials während der IP6K katalysierten Reaktionen

Bisher wurden in den betrachteten Reaktionen die Nukleotid Konzentrationen bzw. ATP/ADP Verhältnisse vorgegeben. Das Adenylat-Energiepotential der Reaktion wurde somit zu Beginn der Reaktion eingestellt und während der Reaktion nicht verändert.
In den folgenden Versuchen wurden Systeme etabliert, die es ermöglichen, das Energiepotential während der laufenden Reaktion zu variieren. Es sollte untersucht werden, ob die IP6Ks dynamisch auf Veränderungen des Adenylat-Energiepotentials reagieren oder ob die $InsP_6$ Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung nur durch das zu Beginn eingestellte Adenylat-Energiepotential getrieben wird. Als ATP verbrauchendes System wurde zum $InsP_6$ pyrophosphorylierenden Reaktionsansatz eine Kombination aus Hexokinase (HK) und Glukose zugegeben. Wie viele Enzyme der Glykolyse ist die Hexokinase ein hoch effizientes Enzym zur Phosphorylierung ihres Substrats. In Gegenwart von ATP phosphoryliert die HK Glukose zu Glukose-6-phosphat (G-6-P), wobei ADP entsteht (1). In Vorversuchen wurden verschiedene Bedingungen etabliert und es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Hexokinase-

Reaktion (Glukosephosphorylierung) stöchiometrisch verläuft (nicht gezeigt). Die Aktivität der HK wurde so hoch eingestellt, dass diese nicht der zeitlich begrenzende Faktor der betrachteten IP6K2 katalysierten Reaktion darstellt, d.h. dass der ATP-Verbrauch binnen Sekunden erfolgt.

$$\text{Glukose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{G-6-P} + \text{ADP} \qquad (1)$$

Als ATP aus ADP generierendes System wurde eine Kombination aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase verwendet. Die Pyruvatkinase (PK) überträgt das Phosphat von PEP auf ADP (2). Als Produkt entsteht neben Pyruvat das ATP, welches in der IP6K2 katalysierten Reaktion als Phosphatdonor zur $InsP_6$ Pyrophosphorylierung dient. Auch diese Reaktion verläuft wie die Hexokinase-Reaktion stöchiometrisch (nicht gezeigt) und bei genügend hoher PK Konzentration in Sekundenschnelle.

$$\text{PEP} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{Pyruvat} + \text{ATP} \qquad (2)$$

Wird in einem Reaktionsansatz zur $InsP_6$ Pyrophosphorylierung Glukose in einer bestimmten Konzentration zugegeben, ermöglicht die Zugabe von HK (1) eine schnelle Umkehr von einem hohen Energiepotential (z.B. nur ATP) zu einem niedrigen Energiepotential durch die Konversion von ATP zu ADP in Höhe der Glukosekonzentration. Diese Umkehr erzeugt nun Bedingungen unter denen 5PP-$InsP_5$ und $InsP_6$ dephosphoryliert werden könnte. Das Gegenteil wird durch die Reaktion (2) erreicht. Auch die Dephosphorylierung von $InsP_6$ könnte durch die Zugabe von PEP und PK in die entgegengesetzte Richtung (Re-Phosphorylierung) getrieben werden.

5.3.3 Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ mit nachfolgender Erniedrigung des Energiepotentials führt zur Umkehr der Kinasereaktion

Die IP6K2 katalysierte $InsP_6$ Pyrophosphorylierung zu 5PP-$InsP_5$ erfolgte in Gegenwart von 5 mM ATP und unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose für 60 min. Nach 60 min wurden z den Ansätzen jeweils HK zur schnellen Reduktion von ATP gegeben und für weitere 120-200 min inkubiert (4.3.16). Zu jedem Zeitpunkt wurden sowohl die Nukleotide (Abbildung 5.16) mittels Ionentauscher HPLC (4.3.12) als auch die Inositolphosphate (Abbildung 5.17) mittels MDD-HPLC [127] quantifiziert (4.3.11).
Auf Grund der zuvor gezeigten stöchiometrisch ablaufenden HK-Reaktion (vgl. (1) 5.3.2) ermöglicht die Verwendung unterschiedlicher Glukose Konzentrationen im Ansatz (0-5 mM) die gezielte Einstellung eines neuen Adenylat-Energiepotentials während der Reaktion. Das Adenylat-Energiepotential kann somit verringert oder partiell bzw. vollständig invertiert werden. 0 mM Glukose haben trotz HK keinen Einfluss auf das Energiepotential und dienen als

Kontrolle, so dass ein unspezifischer Einfluss der HK ausgeschlossen werden kann (Abbildung 5.16 A). 5 mM Glukose sollten auf Grund der 1:1 Stöchiometrie zu 5 mM ATP im Ansatz zu einem vollständigen ATP Verbrauch (zu 5 mM ADP) und somit zu einer vollständigen Umkehr des Energiepotentials führen, was auch zu beobachten war (Abbildung 5.16 E). Intermediäre Glukosekonzentrationen in den Ansätzen erzeugten entsprechend der Glukose äquimolare Mengen an ADP aus ATP (Abbildung 5.16 B-D, Tabelle 5.6).
Allgemein zeigen die Nukleotidanalysen bis 60 min zum einen, dass das eingesetzte ATP nur zu etwa 92-94% rein vorlag (~6-8% ist ADP) und zum anderen, dass Glukose in den verwendeten Konzentrationen ohne Zugabe von HK keinen Einfluss auf die Nukleotide hat (Abbildung 5.16 A-E). Unabhängig von der Glukosekonzentration unterliegen die Nukleotidkonzentrationen und somit die zugehörigen ATP-Molenbrüche nicht signifikanten Schwankungen zwischen 0,92 und 0,94 (Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: Nukleotidkonzentrationen und ATP-Stoffmengenanteil (X_i) während der Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (vgl. Abbildung 5.16, <60 min).

Ansatz	[Glukose], mM	[ATP], mM 60 min	[ADP], mM 60 min	ATP-Stoffemengenanteil, [ATP]/([ATP]+[ADP]) 60 min	Dargestellt in
1	0,00	4,61 +/- 0,00	0,39 +/-0,00	~ 0,92	Abbildung 5.16 A
2	1,25	4,70 +/- 0,01	0,30 +/- 0,01	~ 0,94	Abbildung 5.16 B
3	2,50	4,71 +/- 0,02	0,29 +/- 0,02	~ 0,94	Abbildung 5.16 C
4	3,75	4,68 +/- 0,06	0,32 +/- 0,06	~ 0,94	Abbildung 5.16 D
5	5,00	4,65 +/- 0,03	0,35 +/- 0,03	~ 0,93	Abbildung 5.16 E

Wie zu erwarten war, zeigt die Zugabe von HK zum Ansatz ohne Glukose (Abbildung 5.16 A) ebenfalls keine Veränderung der Nukleotidkonzentrationen, so dass ein unspezifischer HK Einfluss auszuschließen ist. Erst die Kombination von Glukose mit HK bewirkt, wie zu erwarten war, den Verbrauch von ATP zu ADP (Abbildung 5.16 B-E). In allen Fällen wird deutlich, dass ein rascher Verbrauch von ATP in weniger als 2 min erfolgt und sich bereits 20 min nach der Zugabe von HK ein neues Gleichgewicht zwischen ATP und ADP einstellt, welches für den Rest des Reaktionsverlaufes bestehen bleibt (Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6: Nukleotidkonzentrationen und ATP-Stoffmengenanteil (X_i) im neu eingestellten Gleichgewicht 20 min nach Zugabe von HK und nach der Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ für 60 min (vgl. Abbildung 5.16, 80 min).

Ansatz	[Glukose], mM	[ATP], mM 80 min	[ADP], mM 80 min	ATP-Stoffmengenanteil, [ATP]/([ATP]+[ADP]) 80 min	Dargestellt in
1	0,00	4,55 +/- 0,06	0,45 +/- 0,06	~ 0,91	Abbildung 5.16 A
2	1,25	3,53 +/- 0,41	1,47 +/- 0,41	~ 0,71	Abbildung 5.16 B
3	2,50	2,25 +/- 0,73	2,75 +/- 0,73	~ 0,45	Abbildung 5.16 C
4	3,75	1,75 +/- 0,36	3,25 +/- 0,36	~ 0,35	Abbildung 5.16 D
5	5,00	0,43 +/- 0,37	4,57 +/- 0,37	~ 0,09	Abbildung 5.16 E

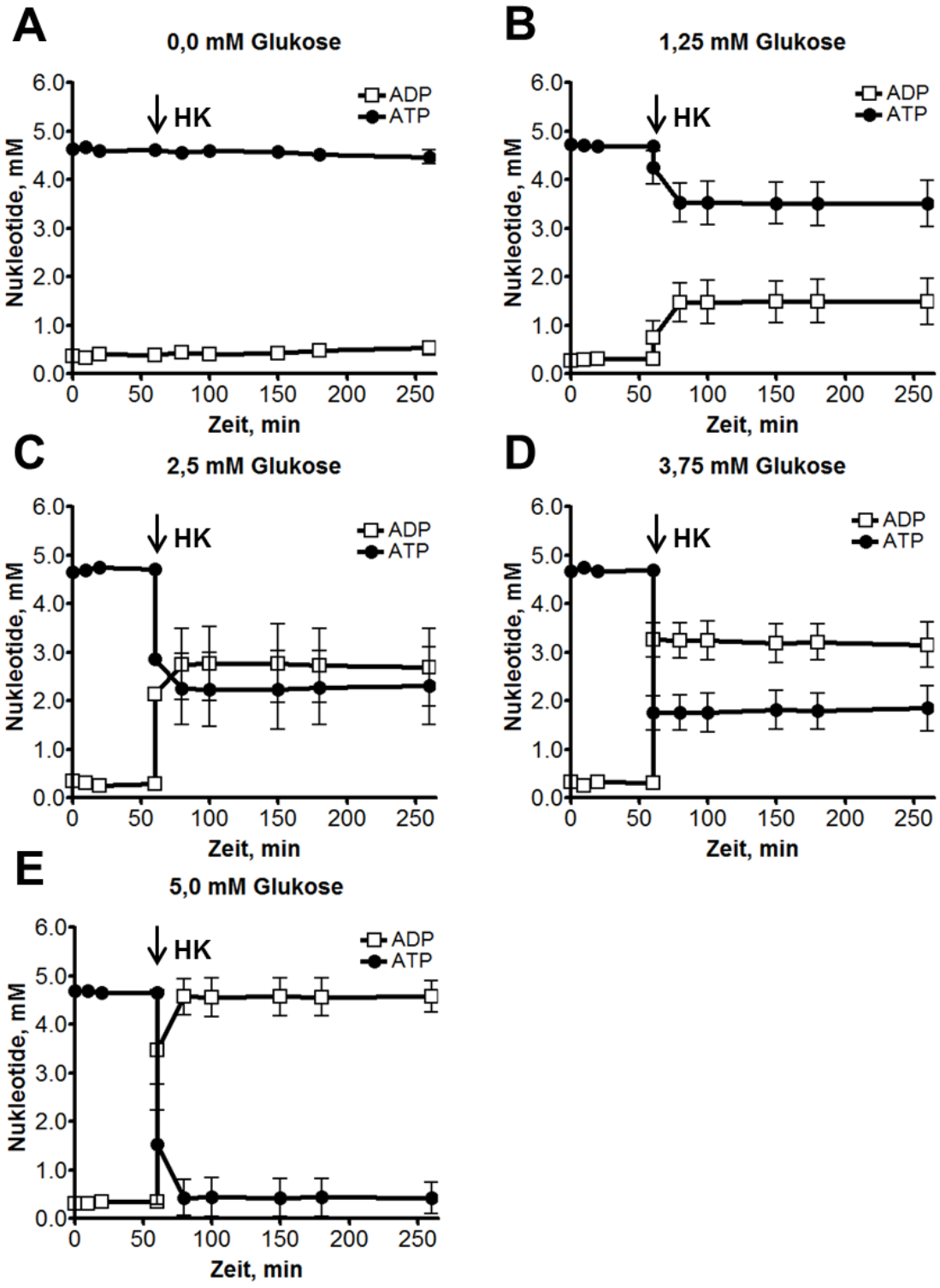


Abbildung 5.16: Nukleotidkonzentrationen der $InsP_6$ Pyrophosphorylierung mit nachfolgender Adenylat-Energiepotentialumkehr während der Reaktion. In Gegenwart von 5 mM ATP und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen zwischen 0 und 5 mM (A-E) wurde $InsP_6$ mit IP6K2 für insgesamt 260 min inkubiert. Zum Zeitpunkt 60 min wurde Hexokinase (1 mU/µL) direkt in den Reaktionsansatz gegeben. Dargestellt sind die Konzentrationen an ATP (schwarze Kreise) sowie ADP (weiße Quadrate) über den betrachteten Reaktionszeitraum (Mittelwerte aus n=3 +/- SEM).

Die zugehörigen Inositolphosphatanalysen sind in Abbildung 5.17 dargestellt. Allen Reaktionsverläufen ist gemein, dass bei einem ATP-Molenbruch zwischen 0,92-0,94 ca. 85% $InsP_6$ innerhalb der ersten 60 min zu 5PP-$InsP_5$ pyrophosphoryliert wird (vgl. Tabelle 5.5, Abbildung 5.16). Die Gabe von HK zum Ansatz ohne Glukose (Abbildung 5.17 A) zeigt keinen Einfluss auf die fortlaufende Reaktion. 5PP-$InsP_5$ erreicht nach etwa 80 min ein Maximum (86,96 +/- 4,55%) und bleibt mit $InsP_6$ über den betrachteten Zeitraum im Gleichgewicht (Abbildung 5.17 A). Die Änderung des Energiepotentials nach der Zugabe von HK (Abbildung 5.16 B-E) führt in allen Fällen zu einer sofortigen Abnahme von 5PP-$InsP_5$ und einer gleichzeitigen Zunahme von $InsP_6$. Bei hoher erzeugter Adenylat-Energiepotentialmkehr (d.h. bei hoher ATP zu ADP Konversion) entsteht zusätzlich Ins(2,3,4,5,6)P_5.
1,25 mM Glukose im Ansatz (Abbildung 5.17 B) erzeugen nach Zugabe von HK eine Erniedrigung des ATP-Molenbruchs auf ~0,71 (Tabelle 5.6). Nach etwa 40 min stellt sich zwischen 5PP-$InsP_5$ und $InsP_6$ ein neues Gleichgewicht ein, welches zu Gunsten von $InsP_6$ verschoben ist. Geringe Mengen Ins(2,3,4,5,6)P_5 sind ebenfalls zu beobachten, dessen Gleichgewichtskonzentration jedoch sehr nahe bei Null liegt. Die weiteren Daten zeigen, dass sich die Konzentrationen von 5PP-$InsP_5$ im Gleichgewicht nach der Zugabe von HK bei mehr Glukose deutlich vermindert (Abbildung 5.17), bis sie schließlich Null erreicht (Abbildung 5.17 E). Im Gegensatz dazu steigt die Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 nach Zugabe von HK, bis sie ab einer Glukosekonzentration von 3,75 mM (Abbildung 5.17 D, X_i=0,35) die im Gleichgewicht liegende 5PP-$InsP_5$ Konzentration übersteigt. Die Gleichgewichtskonzentrationen von Ins(2,3,4,5,6)P_5 stellt sich nach Zugabe von HK bei dieser Glukosekonzentration im betrachteten Zeitraum jedoch noch nicht ein (Abbildung 5.17 C-E), sodass die Verteilung der Äquilbria nur näherungsweise abgeschätzt werden kann.
Die Daten zeigen klar, dass je nach verwendeter Glukosekonzentration auf Grund des neuen, rasch eingestellten Adenylat-Energiepotentials die IP6K2 dynamisch auf diese Veränderung reagiert und sich die Phosphorylierungsaktivität in eine Dephosphorylierungsaktivität verändert. Das zuvor gebildete 5PP-$InsP_5$ wird so schnell zu $InsP_6$ und $InsP_6$ langsamer zu Ins(2,3,4,5,6)P_5 dephosphoryliert.

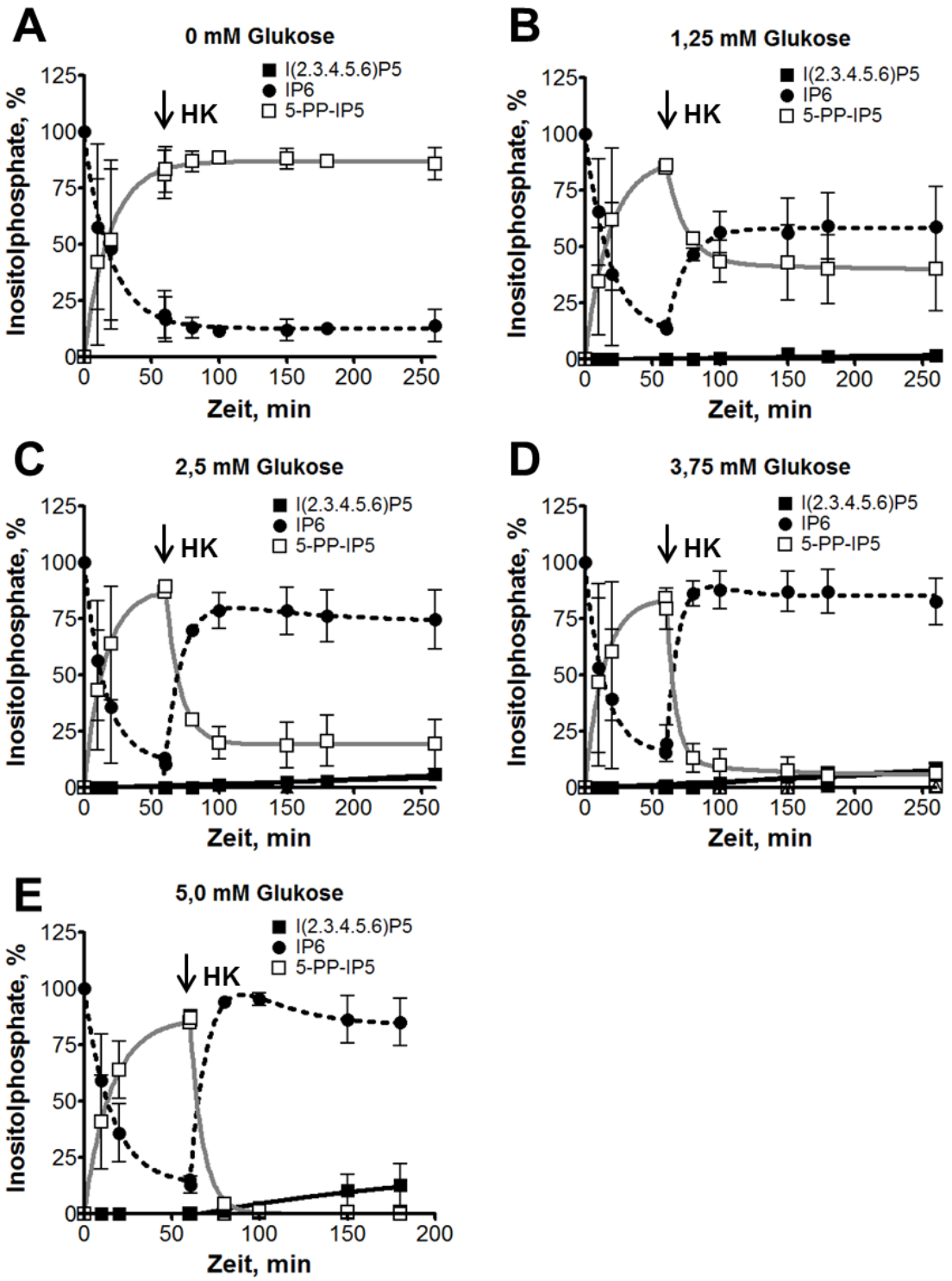


Abbildung 5.17: Inositolphosphate der $InsP_6$ Pyrophosphorylierung mit nachfolgender Adenylat-Energiepotentialumkehr während der Reaktion. In Gegenwart von 5 mM ATP und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen zwischen 0 und 5 mM (A-E) wurde $InsP_6$ mit IP6K2 für insgesamt 260 min inkubiert. Zum Zeitpunkt 60 min wurde Hexokinase (1 mU/µL) direkt in den Reaktionsansatz gegeben (hervorgehoben durch den Pfeil mit der Beschriftung HK für Hexokinase). Dargestellt sind die auf 100% normierten Konzentrationen an Ins(2,3,4,5,6)P_5 (schwarze Quadrate), $InsP_6$ (Kreise, gestrichelte Linie) und 5PP-$InsP_5$ (weiße Quadrate, graue Linie) (100% entsprechen 5 bzw. 7,5 µM) über den betrachteten Reaktionszeitraum (Mittelwerte aus n=3 +/- SEM).

5.3.4 Dephosphorylierung von $InsP_6$ zu $Ins(2,3,4,5,6)P_5$ mit nachfolgender Erhöhung des Energiepotentials führt zur Rephosphorylierung des Produkts

Im vorherigen Abschnitt konnte die rasche Umkehrbarkeit der Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ bei fallendem Energiepotential und die langsamere Dephosphorylierung von $InsP_6$ bei diesen Bedingungen gezeigt werden.
Im Folgenden soll nun die Unkehr der IP6K2 katalysierten Dephosphorylierung von $InsP_6$ zu $Ins(2,3,4,5,6)P_5$ bei steigendem Adenylat-Energiepotential untersucht werden. Um das Potential wie zuvor dynamisch während der Reaktion verändern zu können wurde das ADP zu ATP konvertierende System aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase (PK) statt Glukose und Hexokinase (s.o.) verwendet (5.3.2 (2)).
$InsP_6$ wurde für 180 min in Gegenwart von 5 mM ADP dephosphoryliert. In 5 verschiedenen Ansätzen wurden jeweils unterschiedliche PEP-Konzentrationen zwischen 0 und 5 mM vorgelegt (Abbildung 5.18). Nach 180 min wurde PK zugegen, so dass aus ADP innerhalb von 15 min entsprechend der vorgelegten PEP Konzentration ATP generiert wurde und sich ein neues Gleichgewicht einstellen konnte. Die Reaktion wurde im Anschluss für weitere 120 min inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden sowohl die Nukleotide mittels Ionentauscher HPLC (4.3.12) (nicht gezeigt), als auch die Inositolphosphate (Abbildung 5.18) mittels MDD-HPLC [127] quantifiziert 4.3.11). Aus den Nukleotidanalysen wurden die jeweiligen ATP-Stoffmengenanteile berechnet und in Tabelle 5.7 zusammengetragen.
Auf Grund der unveränderten ATP-Stoffmengenanteile zu Beginn der Reaktionen (Wert von 0,00 bei <180 min), trotz unterschiedlichen PEP Konzentrationen (Tabelle 5.7) kann wie bei der Glukose auch, ein unspezifischer Einfluss von PEP auf die Nukleotidkonzentrationen und somit das Energiepotential ausgeschlossen werden. Die Gabe von PK zum Ansatz ohne PEP nach 180 min (Tabelle 5.7, Ansatz 1) zeigt einen unveränderten ATP-Molenbruch während der restlichen Reaktion, so dass auch hier wie bei der Hexokinase-Reaktion ein unspezifischer Einfluss der Pyruvatkinase auf die IP6K2 Reaktion ausgeschlossen werden kann.
Ferner wirken sich steigende PEP Konzentrationen nicht auf die betrachtete $InsP_6$ Dephosphorylierung aus (Abbildung 5.18 A-E, 0-180 min), so dass auch hier eine Wirkung von PEP direkt auf die IP6K2 ausgeschlossen werden kann (Abbildung 5.18 A). Veränderungen der Inositolphosphate können also nur an der IP6K2 katalysierten $InsP_6$ Dephosphorylierung bzw. an deren Umkehr bei veränderten Energiepotential liegen.
Die Nukleotidanalysen erlauben die Berechnung der jeweiligen ATP-Molenbrüche während der Reaktionen. Auf Grund des fehlenden ATPs betrug dieser zu Beginn der Reaktionen bis zum Zeitpunkt 180 min für jeden Ansatz Null (Tabelle 5.7). Nach Zugabe von PK stellte sich während der Reaktion in Gegenwart von PEP rasch ein neuer ATP-Stoffmengenanteil (ATP/ADP Gleichgewicht) zwischen 0,18 (bei 1,25 mM PEP) und 0,94 (bei 5 mM PEP) ein (Tabelle 5.7). Es zeigt sich, dass auch die neue Gleichgewichtseinstellung dieses Systems, auf Grund der Stöchiometrie durch die vorgelegte PEP Konzentration gesteuert werden kann.

Tabelle 5.7: Aus den Nukleotidanalysen berechnete ATP-Stoffmengenanteile (X_i) während der Dephosphorylierung von $InsP_6$ (bis 180 min) und im neu eingestellten Gleichgewicht 15 min nach Zugabe von PK (Reaktionszeitpunkt 195 min). Die Tabelle ist eine Zusammenfassung der Energiepotentiale vor und nach PK Zugabe in Analogie zu Tabelle 5.5 und 5.6 bzw. Abbildung 5.16 für HK und Glukose.

Ansatz	[Phosphoenol-pyrophat], mM	ATP-Stoffmengenanteil, [ATP]/([ATP]+[ADP]) 180 min	Behandlung	ATP-Stoffmengenanteil, [ATP]/([ATP]+[ADP]) 195 min
1	0,00	0,00	Zugabe von Pyruvatkinase (PK)	0,00
2	1,25	0,00		~ 0,18
3	2,50	0,00		~ 0,44
4	3,75	0,00		~ 0,71
5	5,00	0,00		~ 0,94

Die zugehörigen Inositolphosphatanalysen sind in Abbildung 5.18 dargestellt. Wie bereits erwähnt, war allen Ansätzen gemein, dass $InsP_6$ in den ersten 180 min bei einem ATP-Stoffmengenanteil von 0 (Tabelle 5.7) zu Ins(2,3,4,5,6)P_5 dephosphoryliert wurde. Anders als bei der $InsP_6$ Pyrophosphorylierung, bei der innerhalb von 60 min etwa 85% umgesetzt wurden, (Abbildung 5.17) wurde $InsP_6$ nur zu etwa 50% innerhalb von 180 min dephosphoryliert (Abbildung 5.18). Die Zugabe von PK ohne PEP (Abbildung 5.18 A) führt zu einer fortlaufenden $InsP_6$ Dephosphorylierung, die nach 300 min bei ca. 60% lag. Bei vorgelegten 1,25 mM PEP bewirkte die PK Zugabe innerhalb von 15 min eine Erhöhung des Energiepotentials von 0 auf 0,18 (Tabelle 5.7). Die Synthese von ATP (5.3.2 (2)) führte zu einer raschen Wiederabnahme des gebildeten Produktes Ins(2,3,4,5,6)P_5 und gleichzeitigen Zunahme von $InsP_6$ (Abbildung 5.18 B). Trotz der nur geringen Energiepotentialerhöhung konnte bereits die Bildung von 5PP-$InsP_5$ beobachtet werden. Mit steigender PEP Konzentration, d.h. mit höherem Energiepotential, nahm nach PK Zugabe die Konzentration des Dephosphorylierungsproduktes Ins(2,3,4,5,6)P_5 immer stärker ab (Abbildung 5.18 B-E). Im Vergleich zur Abnahme des pyrophosphorylierten Produkts 5PP-$InsP_5$ bei Erniedrigung des Energiepotentials (Abbildung 5.17) erfolgte die Abnahme von Ins(2,3,4,5,6)P_5 bei Erhöhung des Energiepotentials jedoch bedeutend langsamer. Die gebildete Menge an $InsP_6$ hingegen nahm bei mittleren ATP-Stoffmengenanteilen von 0,44 bzw. 0,71 (Abbildung 5.18 C und D) zu, flachte bei >0,71 ab und nahm bei höheren Energiepotentialen wieder deutlich ab. Dies entspricht der schnellen Weiterphosphorylierung des neu gebildeten $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ (Abbildung 5.18 C-E). Die maximale Energiepotentialumkehr von 0 auf 0,94 (Abbildung 5.18 E) bewirkte eine maximale Abnahme des aus $InsP_6$ zuvor gebildeten Produktes Ins(2,3,4,5,6)P_5 (<180 min) auf 0 µM und eine maximale Zunahme von 5PP-$InsP_5$ (>180 min). $InsP_6$ hingegen nahm trotz steigendem Energiepotential ab, da sich rasch ein Gleichgewicht zwischen $InsP_6$ und dessen pyrophosphorylierten Produkt also 5PP-$InsP_5$

einzustellen begann (Abbildung 5.18). $InsP_6$ wurde unter diesen Umständen so schnell weiterphosphoryliert, dass es sich als Zwischenprodukt der Ins(2,3,4,5,6)P_5 Phosphorylierung nicht anreicherte.

Die Inositolphosphatanalysen zeigen, dass die IP6K2 auch unter diesen Bedingungen dynamisch auf die Veränderung des Adenylat-Energiepotentials reagieren kann indem sie das Dephosphorylierungsprodukt von $InsP_6$, Ins(2,3,4,5,6)P_5, rasch zurück über $InsP_6$ weiter zu 5PP-$InsP_5$ rephosphoryliert. Die Rephosphorylierung von Ins(2,3,4,5,6)P_5 zu 5PP-$InsP_5$ erfolgt z.T. so schnell, dass sich kein $InsP_6$ als Intermediat ansammelt und der Eindruck einer direkten "Durchphosphorylierung" von Ins(2,3,4,5,6)P_5 zu 5PP-$InsP_5$ entsteht (Abbildung 5.18).

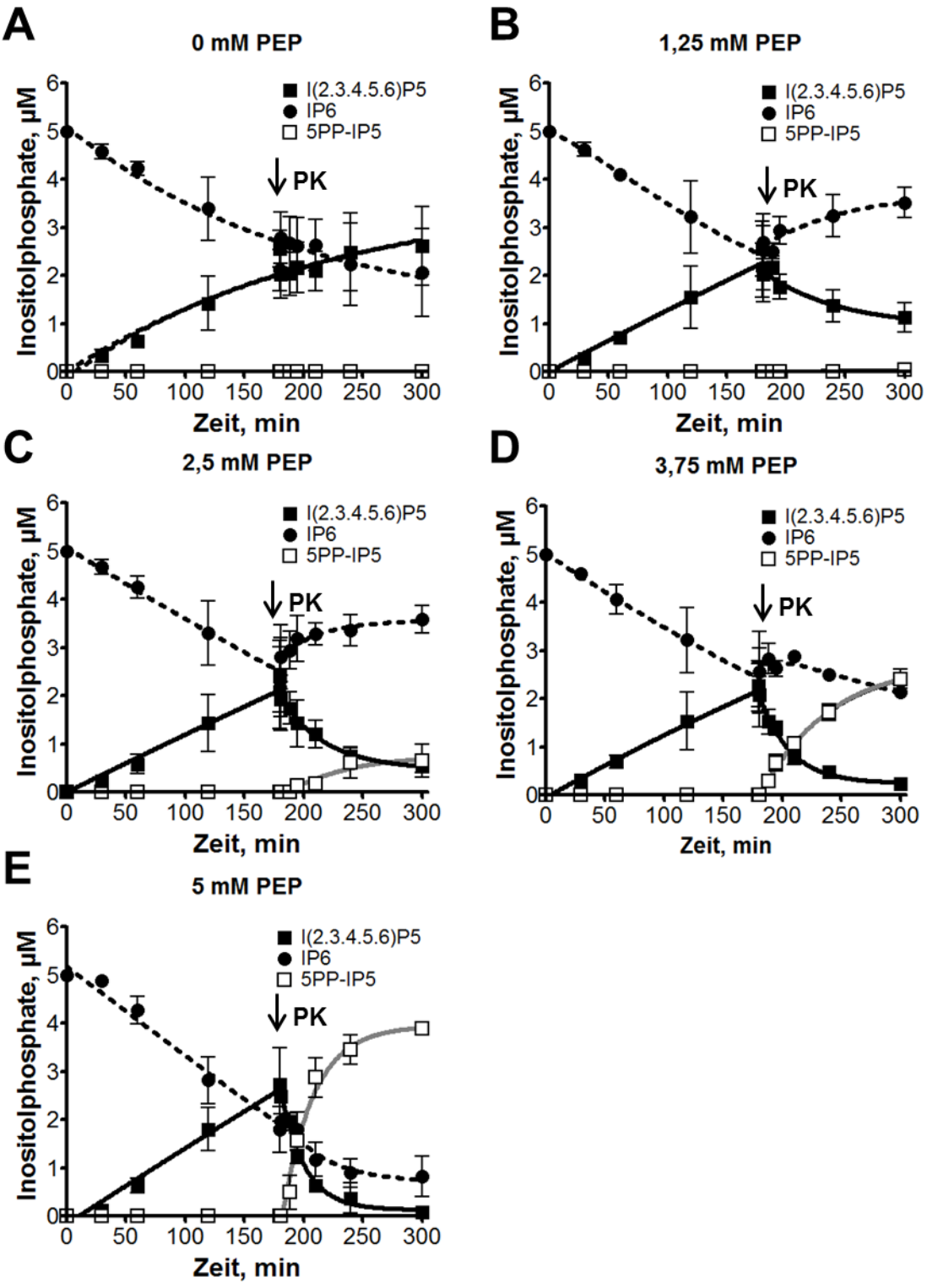


Abbildung 5.18: Inositolphosphate der $InsP_6$ Dehosphorylierung mit nachfolgender Adenylat-Energiepotentialumkehr während der Reaktion. In Gegenwart von 5 mM ADP und unterschiedlichen PEP Konzentrationen zwischen 0 und 5 mM (A-E) wurde $InsP_6$ mit IP6K2 für insgesamt 300 min inkubiert. Zum Zeitpunkt 180 min wurde Pyruvatkinase (14 mU/µL) direkt zu den Reaktionsansätzen gegeben (hervorgehoben durch den Pfeil mit der Beschriftung PK für Pyruvatkinase). Dargestellt sind die Konzentrationen an Ins(2,3,4,5,6)P_5 (schwarze Quadrate), $InsP_6$ (Kreise, gestrichelte Linie) und 5PP-$InsP_5$ (weiße Quadrate, graue Linie) über den betrachteten Reaktionszeitraum (Mittelwerte aus n=3 +/- SEM).

5.3.5 Inhibition der IP6K durch TNP *in vitro* und in Zelllinien

N2-(*m*-Trifluorobenzyl), N6-(*p*-nitrobenzyl)purine (TNP) ist ein Purinbasenanalogon und wurde 2002 zum ersten Mal als Inhibitor der Inositoltrisphosphat Kinase (IP3K) beschrieben [130]. 2009 untersuchten Padmanabhan et al. die Wirkung des Inhibitors auf die IP6K und fanden eine deutlich höhere Selektivität (~1000 mal höher) für die Inhibition der IP6K im Vergleich zur IP3K [131]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die inhibitorische Wirkung von TNP als kompetitives Purinbasenanalogon genutzt. Auf Grund der in dieser Arbeit neu identifizierten $InsP_6$ Dephosphorylierung der IP6K, sollte untersucht werden, ob TNP außer als ATP Kompetitor ähnlich gut als ADP Kompetitor bei der Dephosphorylierung wirkt.
$InsP_6$ wurde in Gegenwart von 5 mM ATP durch die IP6K2 zu 5PP-$InsP_5$ pyrophosphoryliert (5.1.1). Zu den Ansätzen wurden 15 min vor Beginn der Reaktion unterschiedliche Konzentrationen an TNP (0-10 µM) gegeben. Die ermittelten Geschwindigkeiten der Pyrophosphorylierung in Gegenwart von TNP wurden auf die Kontrollreaktion mit 0,5% DMSO (0 µM TNP) normalisiert. Steigende TNP Konzentrationen inhibierten in der Tat die Bildungsgeschwindigkeit von 5PP-$InsP_5$ mit einem IC_{50}-Wert von 0,73 +/- 0,13 µM (Abbildung 5.19). Unter identischen Bedingungen wurde $InsP_6$ in Gegenwart von 5 mM ADP dephosphoryliert und die Geschwindigkeit der Ins(2,3,4,5,6)P_5 Bildung bei steigender Inhibitor Konzentration wie zuvor auf die ungehemmte Reaktion normalisiert. TNP konkurrierte auch hierbei mit ADP um die Nukleotid Bindungsstelle des Enzyms und inhibierte die Dephosphorylierung mit einem leicht höheren aber nicht signifikant verschiedenen IC_{50}-Wert von 1,12 +/- 0,16 µM (Abbildung 5.19). Dies zeigt, dass beide Reaktionen der IP6K, die Phosphorylierung von $InsP_6$ in Gegenwart von ATP, sowe die Dephosphorylierung von $InsP_6$ in Gegenwart von ADP durch die Verwendung von TNP *in vitro* inhibiert werden können. TNP konkuriert mit beiden Nukleotiden, ATP und ADP, um die Bindungsstelle am Enzym.
Die Inhibition der IP6K wurde als nächstes in Zellen untersucht. Verwendet wurden humane Lungenkarzinomzellen (H1299) sowie Glattmuskelzellen aus dem Samenleiter von syrischen Goldhamstern (DDT_1 MF-2). Zu den Zellen wurden jeweils unterschiedliche TNP Konzentrationen (0-30 µM) gegeben und nach identischer Inkubation für je 120 min (4.4.3) die 5PP-$InsP_5$ Mengen nach Extraktion (4.4.4) mittels MDD-HPLC analysiert. Als Kontrolle diente die Behandlung der Zellen mit 0,1% DMSO (Abbildung 5.19). Die Bildung von 5PP-$InsP_5$ nach 120 min war in H1299 Zellen bei einer TNP Konzentration von 10,26 +/- 0,97 µM zur Hälfte reduziert. Bei DDT_1 MF-2 Zellen lag der IC_{50}-Wert von TNP bei 6,72 +/- 1,26 µM (Abbildung 5.19). Die Versuche belegen zum einen die Membranpermeabilität von TNP wie in [131] postuliert und zum anderen die Inhibition der zellulären IP6K, wobei jedoch größere exrazellulärer TNP Konzentrationen für die Hemmung der IP6K nötig sind.

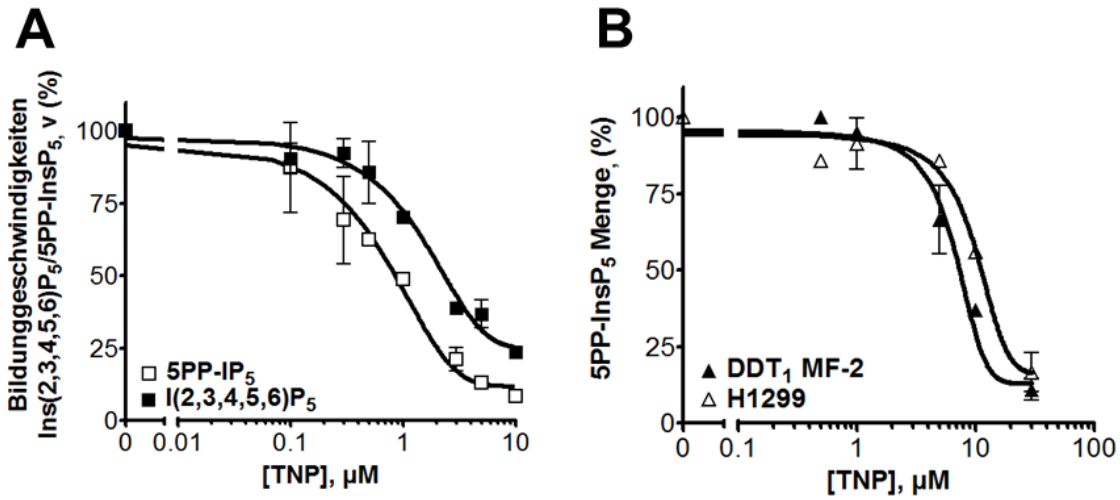


Abbildung 5.19: Inhibition der IP6K durch TNP *in vitro* und in Tumorzelllinien. Dargestellt ist die Inhibition der IP6K2 katalysierten $InsP_6$-Pyrophosphorylierung (weiße Quadrate) mit 5 mM ATP und die Inhibition der IP6K2 katalysierten $InsP_6$-Dephosphorylierung (schwarze Quadrate) mit 5 mM ADP durch TNP mit rekombinanter Kinase, *in vitro* (A). Die Geschwindigkeiten der Reaktionen wurden auf die Kontrolle mit 0 µM TNP (0,5% DMSO) normiert (A). Die MDD-HPLC quantifizierten Mengen an 5PP-$InsP_5$ sind sowohl bei DDT_1 MF-2 Zellen (schwarze Dreiecke) als auch bei H1299 Zellen (weiße Dreiecke) ebenfalls auf die Mengen bei 0 µM TNP (0,1% DMSO) normiert (B). Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Messungen +/- SEM. Entnommen aus und modifiziert nach [132].

5.3.6 Viabilität von H1299 und DDT_1 MF-2 Zellen bei Adenylat-Energiepotentialreduktion und IP6K Inhibition

Das Ziel der in 5.3.7 folgenden Versuche war die Reduktion des zellulären Adenylat-Energiepotentials durch carbonyl cyanide m-cholorophenylhydrazon (CCCP) mit und ohne Inhibition der IP6K durch TNP. Damit sollten die zuvor *in vitro* gezeigten Energiepotential abhängigen Mechanismen auch in vitalen Zellen belegt werden. Hierzu wurden die verwendeten Zellen vor der Behandlung mit CCCP (4.4.2), TNP (4.4.3) oder beiden Hemmstoffen in Minimalmedium mit reduzierter Glukosekonzentration oder z.T. ohne Glukose vorinkubiert (vgl. 5.3.7-5.3.9). Um ausschließen zu können, dass die Zellen auf Grund der harschen Bedingungen während der Messungen sterben und somit die Ergebnisse verfälschen könnten, wurde deren Vitalität über die Messzeit mittels Trypan-Blau Ausschluss Test überprüft (4.4.6).
Die bereits während der Messungen standardmäßig durchgeführten Zellzahlbestimmungen ergaben keine signifikanten Änderungen der Anzahl während der Behandlung, was gegen ein Absterben durch Apoptose spricht. Unterstützt wird dies durch den aktiven Ausschluss von Trypanblau. Es wurden alle Zellen unter identischen Bedingungen (siehe nachfolgende Ergebnisse, 5.3.7-5.3.9) und zu den entsprechenden Zeitpunkten mit Trypanblau gefärbt (4.4.6). Die Zählung der gefärbten, d.h. nekrotischen Zellen ergab eine Zellviabilität von >98% nach 60 min und ~95% nach 120 min (nicht gezeigt), sodass mit Sicherheit davon ausgegangen werden kann,

dass 95% der Zellen die gewählte Behandlung über den gemessenen Zeitraum ohne Apoptose bzw. Nekrose tolerieren.

5.3.7 $InsP_6$ wird in H1299 Zellen zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 dephosphoryliert

In vitro konnte ausführlich gezeigt werden, dass IP6K in Gegenwart von ADP bzw. bei Erniedrigung des Energiepotentials 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ und $InsP_6$ weiter zum Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 dephosphorylieren kann. Um die Relevanz der *in vitro* erhobenen Daten *in vivo* zu validieren, wurde bei humanen Lungenkarzinomzellen (H1299) das Adenylat-Energiepotential moduliert und die Inositolphosphate analysiert.
In Vorarbeiten (nicht gezeigt) stellte sich auf Grund von Nukleotidanalysen (4.3.12) der mitochondriale Protonenentkoppler carbonyl cyanide m-cholorophenylhydrazon (CCCP) mit einer Konzentration von 10 µM als vielversprechendster Inhibitor der ATP Synthese mit nachfolgender Abnahme des zellulären Adenylat-Energiepotentials heraus. Bei dessen Einsatz musste vermutlich auf Grund des Warburg Effektes [140, 141], der besagt, dass Tumorzellen einen Großteil Ihrer Energie aus der Glykolyse ohne nachfolgende oxidative Phosphorylierung erhalten, die Glukosekonzentration des Mediums auf 2,5 mM reduziert werden (4.4.2). Um auftretende Änderungen der Inositolphosphate durch die Reduktion des Energieniveaus mit einer Veränderung der Aktivität der IP6Ks korrelieren zu können, wurden die Zellen in weiteren Ansätzen zusätzlich mit 10 µM des IP6K Inhibitors TNP [131] inkubiert. Die Inhibition der zellulären IP6Ks unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen wurde in den vorausgehenden Kontrollen bestätigt (Abbildung 5.19 B). Der Verlauf der CCCP induzierten ATP Depletion wurde mittels HPLC basierter Nukleotidanalyse überprüft und die Inositolphosphate während der Beobachtungszeit mit der MDD-HPLC quantifiziert. Zu jedem Zeitpunkt wurde aus den Nukleotidanalysen der ATP-Stoffmengenanteils nach [ATP]/[ATP]+[ADP] berechnet und mit den entsprechenden Inositolphosphaten gegen die betrachteten Zeitpunkte aufgetragen (Abbildung 5.20).
Nach einer Vorinkubationsphase in Minimalmedium für 2 h (4.4.2/4.4.3) wurden die Zellen zur Kontrolle zum Zeitpunkt 0 min mit 0,2% DMSO versetzt und für 120 min inkubiert (Abbildung 5.20 A). Die Analysen zeigen, dass sich weder der ATP Molenbruch (0,80 +/- 0,01) noch die Inositolphosphate, $InsP_6$ oder D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5, während dieser Inkubationszeit signifikant änderten. Vergleichbares zeigt die Behandlung der Zellen mit dem IP6K Inhibitor TNP (in 0,2% DMSO). Die Zellen wurden 30 min (-30 min, Abbildung 5.20B) vor der ersten Aufarbeitung und Analyse (Zeitpunkt 0 min, Abbildung 5.20) mit 10 µM TNP versetzt und über den betrachteten Zeitraum von maximal 120 min inkubiert 5.20. Der ATP-Stoffmengenanteil (Energiepotential) lag über den gesamten Zeitraum ebenfalls nahezu unverändert bei etwa 0,78 +/- 0,01. $InsP_6$ und D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 änderten sich ebenfalls nicht signifikant (5.20B). Dies zeigt unter anderem, dass TNP das zelluläre Energiepotential nicht verändert.
Die Verwendung von 10 µM CCCP als Protonenentkoppler zur Inhibition der ATP Neusyn-

these über die oxidative Phosphorylierung führte innerhalb von 30 min nach dessen Zugabe zu einer deutlichen Reduktion des Energieniveaus von 0,81 +/- 0,00 auf 0,71 +/- 0,00 (Abbildung 5.20 C). Dieses reduzierte Niveau blieb über den restlichen Beobachtungszeitraum erhalten. Die Konzentration von $InsP_6$ fiel von ~57,6 +/- 11,8 µM zu Beginn des Versuches (0 min) auf ca. 90% (53,3 +/- 16 µM) 120 min nach CCCP Zugabe ab. Das Dephosphorylierungsprodukt D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 hingegen zeigte einen deutlichen Anstieg um das ~3 fache auf 2,3 +/- 0,5 µM innerhalb von 120 min nach CCCP Behandlung der Zellen. Um den Anstieg von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 mit der Aktivität der zellulären IP6Ks zu korrelieren, wurden die Zellen vor der ATP Depletion durch CCCP für 30 min mit dem IP6K Inhibitor TNP vorinkubiert (Abbildung 5.20 D). Wie zu erwarten, erfolgte die Reduktion des Energieniveaus nahezu identisch zur alleinigen CCCP Behandlung ebenfalls innerhalb der ersten 30 min nach CCCP Zugabe (Abbildung 5.20 C). Der starke Anstieg des Dephosphorylierungsprodukts D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 sowie der Abfall von $InsP_6$ hingegen blieben aus. Der geringe verbleibende Anstieg von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 beruhte vermutlich auf der nicht vollständigen Inhibition der zellulären IP6Ks bei der eingesetzten TNP Konzentration von 10 µM (vgl. IC_{50}=10,26 +/- 0,97 µM, Abbildung 5.19 B).

Diese Daten zeigen deutlich, dass eine Reduktion des zellulären Adenylat-Energiepotentials zu einem markanten Anstieg von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 führt. Eine spezifische, partielle Inhibition der zellulären IP6Ks bei identischer Energiepotentialreduktion hingegen führt zu deutlich verringerten Mengen an D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5, was zeigt, dass die IP6Ks die Veränderung des Energiepotentials spüren bzw. "*sensen*" und in mehr Dephosphorylierung von $InsP_6$ "umsetzen".

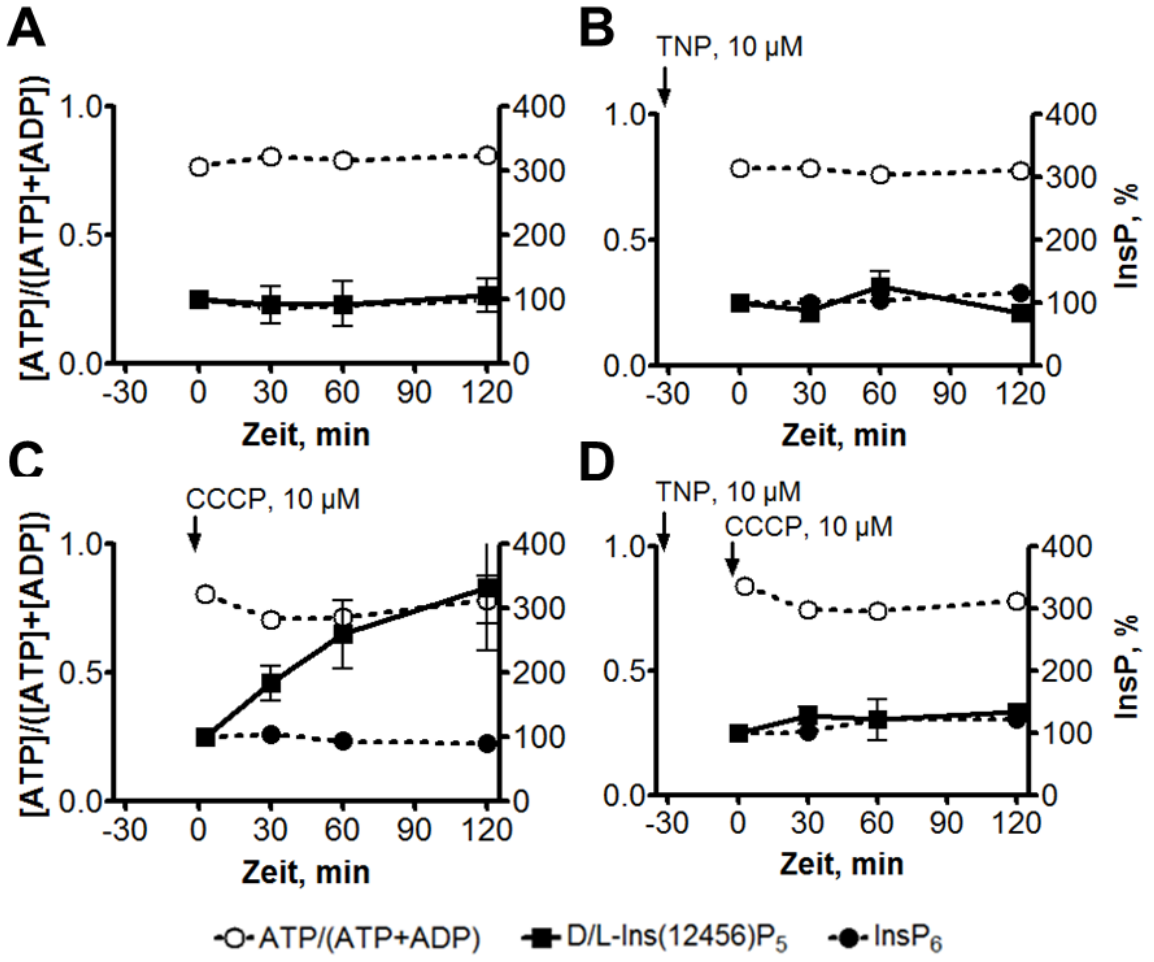


Abbildung 5.20: ATP-Stoffmengenanteil als Adenylat-Energiepotential und Insositolphosphate von H1299 Zellen als Antwort auf die ATP Depletion durch CCCP. Dargestellt sind jeweils die Werte des berechneten ATP-Stoffmengenanteils ([ATP]/([ATP]+[ADP]) aus den Nukleotidanalysen (linke y-Achse, weiße Punkte, gestrichelte Linie), sowie die normierten Inositolphosphat Konzentrationen (c(InsPx)0 min=100%; rechte Achse). Der ATP-Stoffmengenanteil ist repräsentativ für das zelluläre Adenylat-Enerdiepotential. Die schwarzen Quadrate stehen für das Dephosphorylierungsprodukt D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 und die schwarzen Punkte mit gestrichelter Linie repräsentieren $InsP_6$. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei voneinander unabhängigen Versuchen +/- SEM. Gezeigt sind zum einen die Verteilung der InsPs sowie des ATP-Molenbruchs (Energiepotential) in Zellen, die zur Kontrolle über den betrachteten Zeitraum von 120 min nur mit 0,2% DMSO behandelt wurden (A), zum anderen nur mit dem IP6K Inhibitor TNP (10 µM) (B) oder nur mit dem Protonenentkoppler CCCP (10 µM) (C). Die zelluläre Verteilung bei der Verwendung einer Kombination aus beiden Substanzen, TNP und CCCP, zeigt (D). Entnommen aus und modifiziert nach [132].

5.3.8 MINPP1 ist nicht an der zellulären energieabhängigen $InsP_6$ Dephosphorylierung beteiligt

Die Dephosphorylierung von $InsP_6$ erfolgt, wie bereits erwähnt, durch zwei verschiedene Klassen von Enzymen. Die Phosphatase MINPP1 katalysiert die Dephosphorylierung zum, in dieser Arbeit identifizierten Enantiomer, Ins(1,2,4,5,6)P_5 (vgl. 5.2.3) und die, in dieser Arbeit aus-

führlich charakterisierten, IP6Ks erzeugen das Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 (vgl. 5.2.2). Durch die Identifizierung des entsprechenden Enatiomers kann der Abbauweg von InsP_6 genau einem Enzym zugeordnet werden. HPLC-chromatographisch lassen sich beide Enantiomere allerdings nicht voneinander unterschieden, so dass die Zuordnung des unter 5.3.7 in H1299 Zellen gebildeten Produktes noch nicht eindeutig ist. Das Ausbleiben des 3 fachen Anstiegs von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 nach der ATP Depletion bei gleichzeitiger IP6K Inhibition (Abbildung 5.20 C), deutet allerdings bereits stark darauf hin, dass es sich bei der Zunahme des beobachteten D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 fast ausschließlich um das Produkt der IP6Ks handeln sollte und nicht um das der MINPP1.
Um diese Befunde weiter zu untermauern, wurden in weiteren Untersuchungen H1299 Zellen verwendet, bei denen die Expression der MINPP1 stabil mittels lentiviral transduzierter shRNA deutlich herunterreguliert wurde. Zur Verfügung gestellt wurden die Zellen sowie die mit einem *scrambled* Vektor transduzierten Kontrollzellen von Frau Dr. Sabine Windhorst [133]. In diesen Zellen sind Veränderungen des D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 Spiegels praktisch ausschließlich auf Veränderungen des Enantiomers Ins(2,3,4,5,6)P_5 und somit auf die IP6K vermittelte InsP_6-Dephosphorylierung zurückzuführen.
Anders als bei nicht lentiviral transduzierten H1299 Zellen (5.3.7) wurde bei den folgenden Messungen komplett auf Glukose im Medium verzichtet. Die Vorinkubation in glukosefreiem Medium sollte die glykolytische Energiegewinnung (Warburg-Effekt: [140, 141]) der Tumorzelllinien stark vermindern, so dass die ATP Depletion durch CCCP weniger stark kompensiert werden kann und die Reduktion des Adenylat-Energiepotentials ausgeprägter verläuft. Auch bei diesen Bedingungen wurden Vitalitätsprüfungen der Zellen, wie oben beschrieben (5.3.6), durchgeführt und ein ähnlicher Prozentsatz vitaler Zellen (~95%) am Ende der Veruchszeit gefunden.
Als Kontrolle dienten, mit *scrambled* Vektor transduzierten, H1299 Zellen (H1299 Scr) [133], die ebenfalls mit 0,2% DMSO zur Kontrolle und dem IP6K Inhibitor TNP (in 0,2% DMSO) inkubiert wurden. Wie bei nicht transduzierten Zellen (5.3.7), zeigten die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) (Abbildung 5.21 A) sowie die Behandlung mit TNP (Abbildung 5.21 B) keine signifikanten Änderungen weder des Energiepotentials noch der Inositolphosphatspiegel, so dass auch hier ein unspezifischer Einfluss von DMSO oder TNP auszuschließen ist. Die CCCP Gabe zu H1299 Scr (Abbildung 5.21 C) ohne Glukose im Medium bewirkte eine deutlich stärkere Reduktion des Energiepotentials im Vergleich zu H1299 Zellen in Gegenwart von 2,5 mM Glukose (Abbildung 5.20 C). Innerhalb von 30 min fiel das Potential um das 5 fache von zu Beginn 0,78 +/- 0,01 auf 0,15 +/- 0,02 und reduzierte sich weiter bis auf einen Wert von 0,09 +/- 0,00 nach 120 min. InsP_6 fiel wie wie bei H1299 Zellen zuvor auch (vgl. 5.3.7) auf ~90% ab und das Dephosphorylierungsprodukt D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 stieg sogar um das 4 fache an. Die gleichzeitige, partielle Inhibition der zellulären IP6Ks durch TNP (Abbildung 5.21 D) führte zu einem deutlich reduzierten, nur noch etwa 2,5 fachen Anstieg von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5. Die Produktbildung war

etwa um 60% reduziert, was etwa der gemessenen verbleibenden Aktivität zellulärer IP6K bei 10 µM TNP entspricht (vgl. 5.3.5).

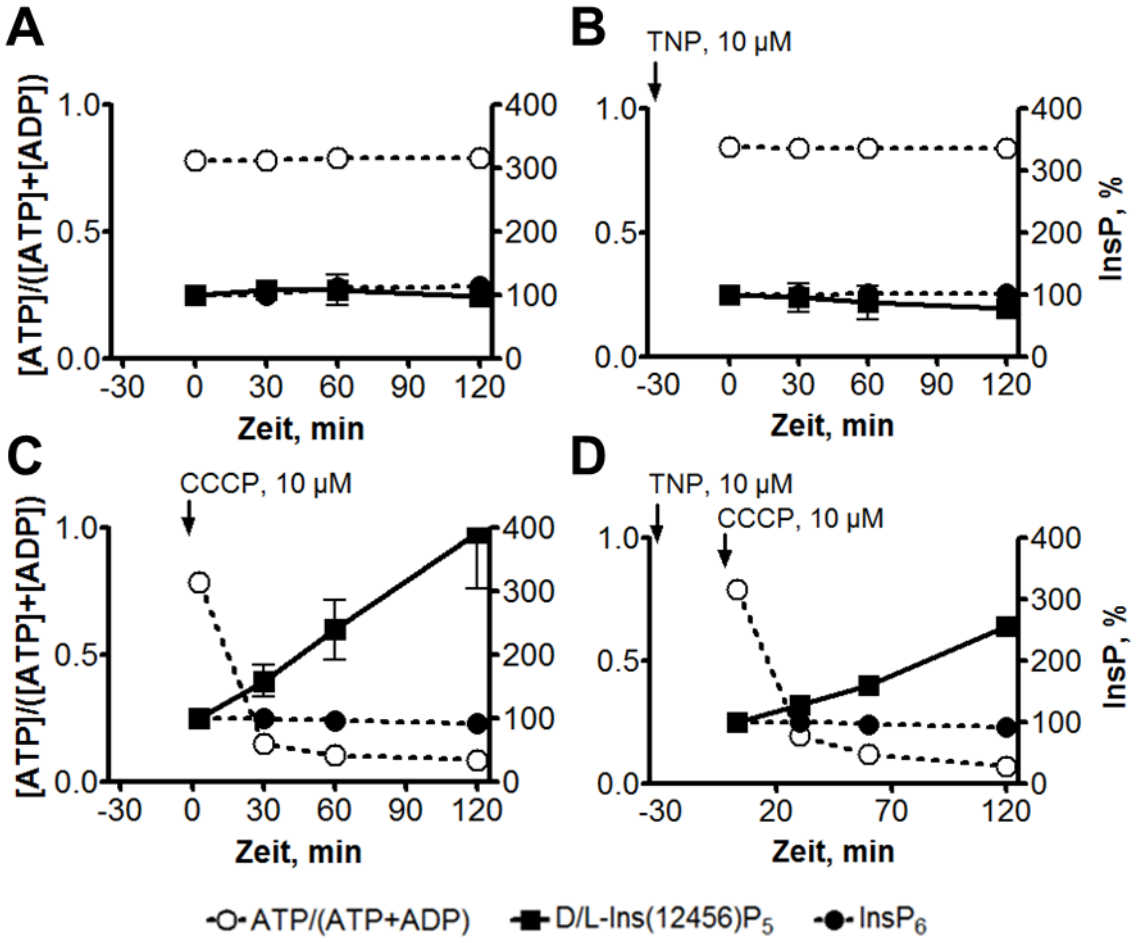


Abbildung 5.21: ATP-Stofmengenanteil als Adenylat-Energiepotential und Insositolphosphate von *scrambled* transduzierten H1299 Zellen als Antwort auf die CCCP induzierte ATP Depletion ohne Glukose. Dargestellt sind jeweils die Werte des berechneten ATP-Stoffmengenanteils ([ATP]/([ATP]+[ADP]) aus den Nukleotidanalysen (linke y-Achse, weiße Punkte, gestrichelte Linie), sowie die normierten Inositolphosphat Konzentrationen (c(InsPx)0 min=100%; rechte Achse). Der ATP-Stoffmengenanteil entspricht auch hier dem Adenylat-Energiepotential der Zelle. Die schwarzen Quadrate repräsentieren D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 und die schwarzen Punkte mit gestrichelter Linie stehen für $InsP_6$. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei voneinander unabhängigen Versuchen +/- SEM. Gezeigt sind die Verteilung der InsPs sowie des ATP-Stoffmengenanteils (Energiepotential) in *scrambled* transduzierten H1299 Zellen ohne Glukose, die zur Kontrolle mit 0,2% DMSO (A), dem IP6K Inhibitor TNP (10 µM) (B) oder nur dem Protonenentkoppler CCCP (10 µM) (C) behandelt wurden. Die zelluläre Verteilung bei der Verwendung beider Substanzen, TNP und CCCP, zeigt (D). Z.T. Entnommen aus und modifiziert nach [132].

Die H1299 Zellen, bei denen die MINPP1 durch RNAi stabil herunterreguliert wurde (H1299 MINPP1kd [133]) wurden identisch (s.o.) behandelt (Abbildung 5.22). Auch hier hatten 0,2% DMSO (Abbildung 5.22 A) und TNP in 0,2% DMSO (Abbildung 5.22 B) analog wie bei nor-

malen H1299 Zellen (Abbildung 5.20 A und B) und den H1299 Scr Zellen (Abbildung 5.21 A und B) keinen Einfluss auf den ATP Molenbruch oder die Inositolphosphate. Die Inhibition der ATP-Synthese durch CCCP (Abbildung 5.22 C) hatte wie bei den H1299 Scr Zellen (Abbildung 5.21 C), einerseits eine drastische Reduktion des ATP Molenbruchs zur Folge (Abbildung 5.22 C) und andererseits einen 3 fachen Anstieg des $InsP_5$ Isomers. In den MINPP1 *knock down* Zellen ist die gefundene $InsP_6$-Dephosphorylierung zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 nun klar dem Anstieg des Enantiomers Ins(2,3,4,5,6)P_5 als Produkt der IP6Ks zuordenbar. Auch hier führte die gleichzeitige, partielle Inhibition der zellulären IP6Ks durch TNP (Abbildung 5.22 D) zu einem stark reduzierten nur noch etwa 0,25 fachen Anstieg des Ins(2,3,4,5,6)P_5 (Reduktion der Produktbildung um ~75%) verglichen mit dem Anstieg ohne TNP Hemmung (5.22C).

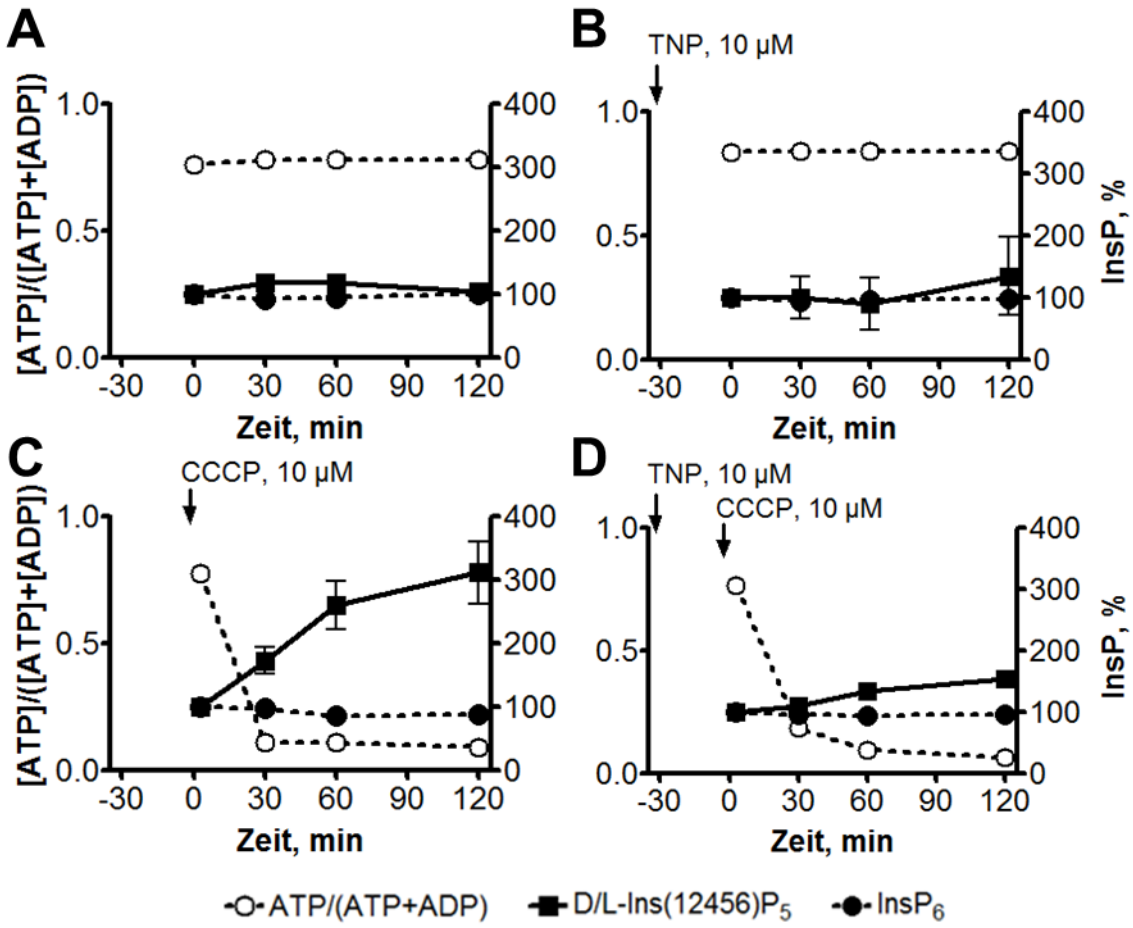


Abbildung 5.22: ATP-Stofmengenanteil als Adenylat-Energiepotential und Insositolphosphate von H1299 MINPP1 *knock down* Zellen als Antwort auf die CCCP induzierte ATP Depletion ohne Glukose. Dargestellt sind jeweils die Werte des berechneten ATP-Stoffmengenanteils ([ATP]/([ATP]+[ADP]) aus den Nukleotidanalysen (linke y-Achse, weiße Punkte, gestrichelte Linie), sowie die normierten Inositolphosphatkonzentrationen (c(InsPx)0 min=100%; rechte Achse). Der berechnete ATP-Stoffmengenanteil aus den Nukleotidanalysen entspricht auch hier dem Adenylat-Energiepotential der Zelle (vgl. Abbildung 5.20 und Abbildung 5.21). Ins(2,3,4,5,6)P_5 (schwarze Quadrate) und $InsP_6$ (schwarze Punkte, gestrichelte Linie) entsprechen den Mittelwerten aus drei voneinander unabhängigen Versuchen +/- SEM. Gezeigt sind die Verteilung der InsPs sowie des ATP-Stoffmengenanteils (Energiepotential) in H1299 Zellen, mit herunterregulierter $InsP_6$ Phosphatase MINPP1, ohne Glukose (H1299 MINPP1 *knock down*). Die Zellen wurden mit 0,2% DMSO (A), dem IP6K Inhibitor TNP (10 µM) (B) oder nur dem Protonenentkoppler CCCP (10 µM) (C) behandelt. Die zelluläre Verteilung bei der Verwendung beider Substanzen, TNP und CCCP, zeigt (D). Z.T. Entnommen aus und modifiziert nach [132].

Diese Daten zeigen, dass trotz des *knock downs* der $InsP_6$ Phosphatase MINPP1 und somit deutlich reduziertem MINPP1 katalysierten $InsP_6$ Abbau [133], bei einer CCCP induzierten Reduktion des Energiepotentials (ATP-Stoffmengenanteil) ein $InsP_5$ mit der Isomerie D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 gebildet wird. Das Fehlen der MINPP1 bedeutet, dass der Anstieg nahezu ausschließlich vom Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 stammen muss und auch, dass die MINPP1 an diesem Anstieg

nicht beteiligt ist. Dieses Enantiomer (Ins(2,3,4,5,6)P_5) ist das in dieser Arbeit identifizierte Produkt der energiepotentialabhängigen IP6K katalysierten InsP_6 Dephosphorylierung und konnte somit auch in H1299 Zellen (bzw. durch H1299 MINPP1 *knock down* Zellen) eindeutig eindeutig identifiziert und zugeordnet werden.

5.3.9 5PP-InsP_5, InsP_6 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 reagieren auf Veränderungen des Energiepotentials in DDT_1 MF-2 Zellen

Die mit humanen Lungenkarzinomzellen (H1299) erhobenen Daten sollten mit einer weiteren Zelllinie validiert werden. Die bisher verwendeten Zellen besitzen wenig 5PP-InsP_5 [19], so dass unter den beschriebenen Bedingungen (4.4.2) in H1299 Zellen nur die InsP_6 Dephosphorylierung durch die Ins(2,3,4,5,6)P_5 Zunahme untersucht werden konnte. Von Glattmuskelzellen aus dem Samenleiter von syrischen Goldhamstern (DDT_1 MF-2) hingegen ist bekannt, dass sie einen aktiven PP-InsP Stoffwechsel und zusätzlich hohe 5PP-InsP_5 Konzentrationen besitzen [142, 143]. Diese Zellen wären also geeignet, um dort den Einfluss einer Energiereduktion sowohl auf Ins(2,3,4,5,6)P_5 als auch auf 5PP-InsP_5 zu untersuchen. Für den hohen PP-InsP Stoffwechsel ist das Zusammenspiel der InsP_6 pyrophosphorylierenden Kinasen sowie deren Gegenspieler, die NaF hemmbaren DIPPs (Abbildung 1.5) von Bedeutung [51, 142].
Mit diesen DDT_1 MF-2 Zellen wurden identische Versuche wie mit H1299 Zellen (5.3.7) durchgeführt. In Gegenwart von 2,5 mM Glukose wurden die Zellen mit 0,2% DMSO als Kontrolle bzw. mit TNP (in 0,2% DMSO) behandelt. Auch hier konnte ein unspezifischer Einfluss des Lösungsmittels DMSO (Abbildung 5.23 A) und von TNP (Abbildung 5.23 B) auf den ATP Molenbruch und somit das zelluläre Energieniveau ausgeschlossen werden. Die Inositolphosphate InsP_6 und 5PP-InsP_5 blieben über den betrachteten Versuchszeitraum (120 min) in Gegenwart von 0,2% DMSO relativ konstant, wohingegen Ins(2,3,4,5,6)P_5 im gleichen Zeitraum und im Vergleich zu H1299 Zellen (Abbildung 5.20 A) deutlichen, aber nicht signifikanten Schwankungen unterlag (Abbildung 5.23 A). Ein Trend der Schwankungen in eine bestimmte Richtung (Zunahme oder Abnahme des Enantiomers) war jedoch nicht zu beobachten. Auch bei TNP behandelten Zellen unterlag das Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 nicht signifikanten Schwankungen (Abbildung 5.23 B), die allerdings mit denen von DMSO behandelten Zellen vergleichbar waren (Abbildung 5.23 A). Es kann somit auch hier ein unspezifischer Einfluss des Lösungsmittels und von TNP auf die Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 ausgeschlossen werden.
Wie zu erwarten war, hatte die Zugabe von TNP zu DDT_1 MF-2 Zellen jedoch eine Reduktion der 5PP-InsP_5 Konzentration zur Folge. Das zelluläre 5PP-InsP_5 wurde auf Grund der TNP vermittelten IP6K Inhibition (5.3.5) von 8,12 +/- 1,02 µM (100%) auf 0,50 +/- 0,50 µM (6%) innerhalb des betrachteten Zeitraums (120 min) trotz eines unveränderten ATP-Stoffmengenanteil von 0,81 +/- 0,00, vermindert (Abbildung 5.23 B). Diese Daten unterstreichen noch einmal die spezifische Wirkung von TNP als Inhibitor von zellulärer IP6K.
Die Inkubation von DDT_1 MF-2 Zellen mit 10 µM CCCP führte zu einer deutlich stärkeren

Verminderung des ATP Molenbruchs im Vergleich zu H1299 Zellen in Gegenwart von identischer Glukosekonzentration mit 2,5 mM (Abbildung 5.20 C). Nach CCCP Gabe fiel der ATP-Stoffmengenanteil innerhalb von 120 min kontinuierlich von 0,87 +/- 0,05 auf 0,57 +/- 0,04 ab (Abbildung 5.23 C). Die stärkere Reduktion des Energiepotentials im Vergleich zu H1299 Zellen weist bereits auf zelltypspezifische Unterschiede hin. Mit der Reduktion des Stoffmengenanteils ging eine etwa 2 fache Erhöhung des Ins(2,3,4,5,6)P_5 Enantiomers von 0,85 +/- 0,46 µM auf 1,90 +/- 0,55 µM, sowie ebenalls von InsP_6 allerdings um den Faktor 1,2 einher. Die Menge an 5PP-InsP_5 reduzierte sich im betrachteten Zeitraum bereits ohne IP6K Inhibition auf nahezu Null (Abbildung 5.23 C).
Die Behandlung der Zellen mit CCCP und gleichzeitiger IP6K Inhibition durch TNP hatte die gleichen Auswirkungen wie bei H1299 Zellen (vgl. 5.3.7). Die Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 war hierdurch im Vergleich zur alleinigen CCCP Behandlung vermindert und InsP_6 änderte sich kaum. Anders als bei H1299 Zellen konnten bei DDT_1 MF-2 auch Aussagen über das 5PP-InsP_5 getroffen werden. 5PP-InsP_5 nahm bei der gleichzeitigen Behandlung mit CCCP und TNP in DDT_1 MF-2 im betrachteten Zeitraum wieder deutlich auf einen Wert nahe Null ab (Abbildung 5.23 D).
Im Vergleich zu den H1299 Zellen (Abbildung 5.20 Cund D), behandelt unter identischen Bedingungen, reagieren DDT_1 MF-2 Zellen (Abbildung 5.23 C und D) sensitiver auf die Inhibition durch CCCP. Die mit der Reduktion des Energiepotentials einhergehende Ins(2,3,4,5,6)P_5 Synthese in DDT_1 MF-2 Zellen war hingegen gegenüber der von H1299 Zellen trotz stärkerer Energiepotentialreduktion geringer (Abbildung 5.20/5.23). Dennoch zeigen die Daten, dass eine Energiepotentialeduktion auch in DDT_1 MF-2 Zellen trotz vermutlich zelltypspezifischen Effekten zu einer Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 führt, die durch den Einsatz des spezifischen IP6K Inhibitors TNP hemmbar ist.
Der Nachweis von 5PP-InsP_5 in DDT_1 MF-2 Zellen war unter den hier gezeigten Bedingungen möglich und zeigt ebenfalls, dass eine Energiepotentialreduktion zu verminderten 5PP-InsP_5 Konzentrationen führt, die für eine gesteigerte IP6K katalysierte 5PP-InsP_5 Dephosphorylierung spricht (Abbildung 5.23 C). Ob die verringerte Bildung von 5PP-InsP_5 jedoch ausschließlich auf die Aktivität der IP6K zurückzuführen ist, konnte in diesen Ansätzen nicht eindeutig geklärt werden. Sicher ist, dass eine Energiepotentialreduktion zu einer deutlich verminderten 5PP-InsP_5 Konzentration aber auch zu einer deutlichen Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 führt.

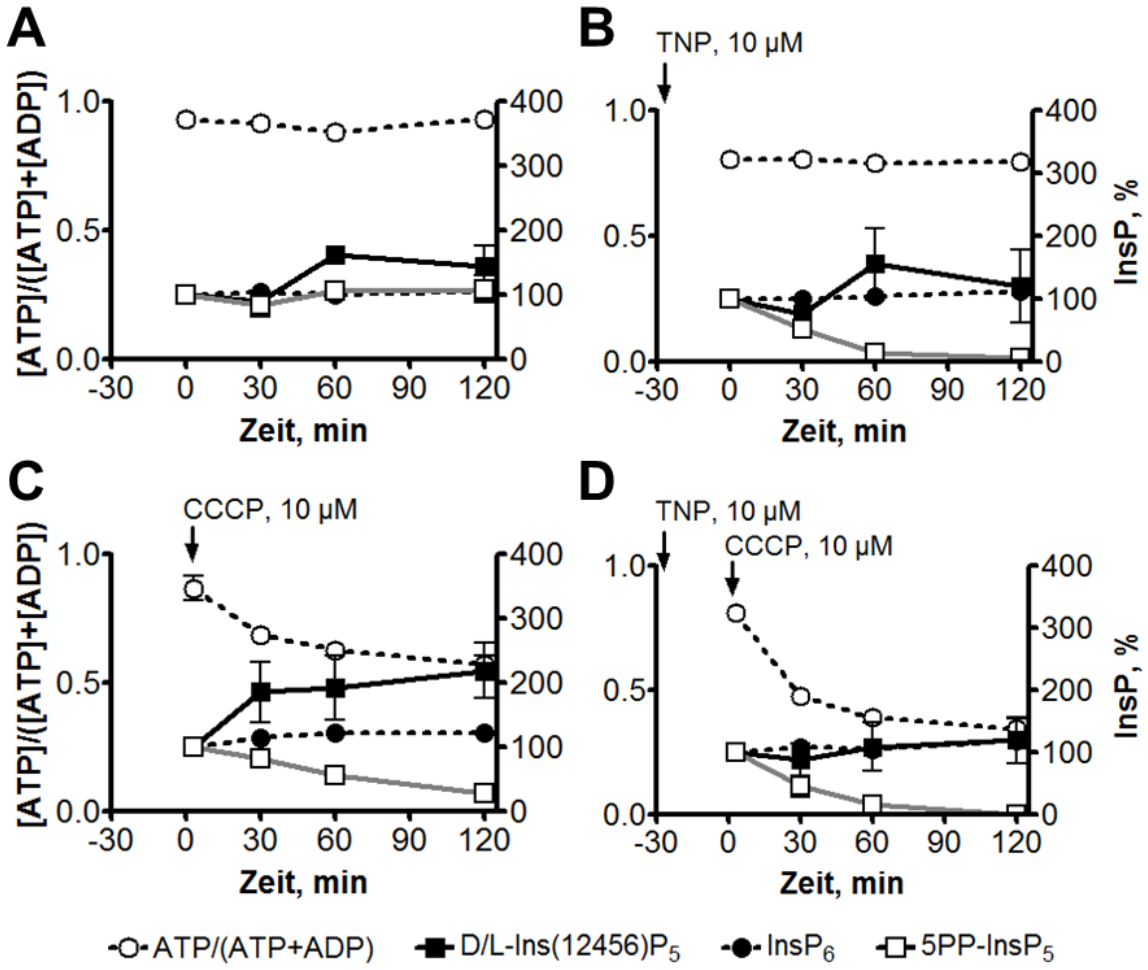


Abbildung 5.23: ATP-Stofmengenanteil als Adenylat-Energiepotential und Insositolphosphate von DDT_1 MF-2 Zellen als Antwort auf die ATP Depletion durch CCCP. Auf der linken Achse ist jeweils der gemessene ATP-Stoffmengenanteil (weiße Kreise, gestrichelte Linie) dargestellt. Die auf 100% (Zeitpunkt 0 min) normierten Inositolphosphate D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 (schwarze Quadrate,), $InsP_6$ (schwarze Kreise, gestrichelte Linie) und 5PP-$InsP_5$ (weiße Quadrate, graue Linie) sind jeweils auf der rechten Achse wiedergegeben. D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 entspricht auf Grund von 5.3.8 wahrscheinlich auch nur dem Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit 2,5 mM Glukose für 2 h vorinkubiert. Nach 1,5 h der Vorinkubation wurde teils TNP zu den Zellen gegeben (-30 min) (B und D). Zum Zeitpunkt 0 min wurde teils CCCP zu den Zellen gegeben (C und D). Als Kontrolle dient die Behandlung der Zellen mit 0,2% DMSO (Zugabe bei 0 min) (A). Die Werte entsprechen jeweils Mittelwerten +/- SEM aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Entnommen aus und modifiziert nach [132].

6 Diskussion

6.1 Kinetik der Inositolhexakisphosphat Kinasen

6.1.1 Die IP6Ks als ATP abhängige Inositolpyrophosphat bildende Enzyme

Die humanen Inositolhexakisphosphat Kinasen (IP6Ks) sind Bisubstratenzyme und gehören zu den Inositolpyrophosphat bildenden Kinasen. Sie nutzen die beiden zellulär am häufigsten vorkommenden Inositolphosphate, Ins(1,3,4,5,6)P_5 bzw. InsP_6, und pyrophosphorylieren mit Hilfe von ATP jeweils die Positionen 5 zu 5PP-Ins(1,3,4,6)P_4 bzw. 5PP-InsP_5 [47, 48, 95]. In der vorliegenden Arbeit wurden die kinetischen Parameter der Reaktion mit InsP_6 als bevorzugtes Substrat zur Pyrophosphorylierung unter den hier verwendeten Bedingungen nachgemessen (Tabelle 1.1). Jede der drei humanen Isoformen wurde kloniert, rekombinant hergestellt, gereinigt und unter identischen Bedingungen (4.3.8) vermessen. Wie zu erwarten war, pyrophosphorylieren alle drei Isoformen InsP_6 unter ATP Verbrauch zu 5PP-InsP_5.
Ein Vergleich der Affinitäten für InsP_6 mit Literaturwerten (Tabelle 6.1) zeigt, dass die in dieser Arbeit ermittelten apparenten $K_{m,app}$-Werte für InsP_6 mit den Literaturdaten sehr gut übereinstimmen. Alle Messungen liegen im Bereich der z.T. stark variierenden publizierten Werte [47, 95] (Tabelle 6.1). Die in dieser Arbeit ermittelten apparenten Affinitäten für ATP hingegen sind bei der Isoform 1 und 2 im Vergleich zu den Literaturdaten leicht erhöht ($K_{m,app}$-Wert niedriger). Ein Vergleich der Isoform 3 mit Literaturdaten ist auf Grund der fehlenden Literaturdaten für ATP nicht möglich (Tabelle 6.1).
Die publizierten spezifischen, maximalen Geschwindigkeiten (V_{max}) der IP6K Isoformen variieren von Publikation zu Publikation sehr stark (Tabelle 6.1). Obwohl sie bei der Isoform 1 um das 4,5 fache (0,31-1,41 µmol/min/mg) und der Isoform 2 um das 28,5 fache (0,07-2,0 µmol/min/mg) auseinander liegen, liegen die in dieser Arbeit für die Enzyme ermittelten maximalen, spezifischen Geschwindigkeiten z.T. noch unterhalb der publizierten Werte. Dies äußert sich ebenfalls in dem berechneten Quotienten aus der maximalen, spezifischen Geschwindigkeit (V_{max}) und den K_m-Werten (Tabelle 6.1). Dieser Quotient soll näherungsweise die katalytische Effizienz der Kinasen beschreiben. Auf Grund von nicht publizierten K_{cat}-Werten der Kinasen zur Berechnung der korrekten katalytischen Effizienz bietet dieser Quotient die Möglichkeit die Effizienzen der Literaturdaten mit denen dieser Arbeit zu vergleichen (katalytische Effizienz wird berechnet als K_{cat}/K_m; K_{cat} wird berechnet aus der maximalen, spezifischen Geschwindigkeit und der eingesetzten Enzymkonzentration). Auf Grund dieses Wertes wird deutlich, dass laut

publizierten Daten die IP6K1 bei vergleichenden Messungen mit der Isoform 2 [47, 95] die katalytisch effizientere Isoform ist. Der Vergleich der ermittelten katalytischen Effizienzen aller drei Isoformen dieser Arbeit (Tabelle 5.1 und Tabelle 6.1) zeigen hingegen, dass die IP6K2 die effizientere Isoform darstellt.

Allgemein lässt sich sagen, dass die ermittelten spezifischen Aktivitäten der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und somit auch der katalytischen Effizienzen im Vergleich zu den Literaturdaten deutlich reduziert sind.

Ein Grund für die Unterschiede ist wahrscheinlich die Durchführung der kinetischen Messungen. Zum einen wurden die Messungen in den publizierten Studien bei einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt, wohingegen in dieser Arbeit nach physiologischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 7,2 gemessen wurde. In Vorarbeiten wurde eine pH-Wert Abhängigkeit der Kinasen mit einer Abnahme der Aktivität bei höheren pH-Werten festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede im Bereich von 7,0-7,2 sind zwar gering, tragen aber dennoch zu unterschiedlichen Umsatzgeschwindigkeiten bei. Der Hauptunterschied liegt jedoch vermutlich in der Verwendung von unterschiedlichen Salzkonzentrationen in den Assays. Während die publizierten Werte in nahezu salzfreien Assays (bis auf $MgCl_2$ und NaF mit zusammen ca. 10 mM) gemessen wurden, sind die in dieser Arbeit ermittelten Werte bei höheren Salzkonzentrationen von insgesamt etwa 70 mM gemessen worden (4.3.8). Diese Bedingungen entsprechen mehr den physiologischen Konzentrationen und spiegeln so das tatsächliche Verhalten der Kinasen *in vivo* eher wieder, als unter salzfreien Bedingungen. Um den physiologischen Bedingungen noch näher zu kommen, sollten in zukünftigen Messungen die Salzkonzentrationen etwa verdoppelt werden.

Tabelle 6.1: Kinetische Parameter der IP6K Isoformen 1, 2 und 3 für die Pyrophosphorylierung von $InsP_6$.

Isoform	Km $InsP_6$ (µM)	Km ATP (mM)	Vmax (µmol/min*mg)	Vmax/Km[a)] (l/min*mg)	Ref
IP6K1	1,2 +/-0,03[b)]		0,31 +/-0,09[b)]	0,26	[95]
	0,6[c)]	1,1[c)]	0,76[c)]	1,27	[47]
	0,7[d)]	1,35[d)]	1,41[d)]	2,01	[68]
	1,3 +/- 0,5[e)]	0,7 +/- 0,4 [e)]	0,03 +/- 0,01 [e)]	0,02	diese Arbeit
IP6K2	0,4 +/- 0,1[b)]		0,07+/-0,02[b)]	0,16	[95]
	3,0[c)]	1,0[c)]	2,0[c)]	0,67	[47]
	1,6 +/- 0,3 [e)]	0,3 +/- 0,1 [e)]	0,12+/-0,01 [e)]	0,075	diese Arbeit
IP6K3	0,9		0,6	0,67	[48]
	0,6 +/- 0,4 [e)]	1,8 +/- 0,8 [e)]	0,005 +/- 0,001 [e)]	0,008	diese Arbeit

[a)] Wert berechnet als Näherung für die katalytische Effizienz; [b)] Kinasen wurden bakteriell als His-tag Fusionsprotein exprimiert und gereinigt; [c)] Kinasen wurden als GST Fusionsprotein in einem eukaryotischen System exprimiert und gereinigt; [d)] Die Kinase wurde aus Ratten Gehirn gereinigt und in [47] als IP6K1 beschrieben. [e)] Gerundete Werte der in dieser Arbeit ermittelten und in Tabelle 5.1 zusammengetragenen Parameter

6.1.2 Die IP6 Kinasen sind ADP abhängige 5PP-$InsP_5$ und $InsP_6$ dephosphorylierende Enzyme

Es stellte sich heraus, dass alle drei Isoformen der IP6K ihr Substrat $InsP_6$ nicht nur zu 5PP-$InsP_5$ umsetzten, sondern in Gegenwart von ADP oder einem Gemisch aus ATP und ADP ebenfalls zu einem $InsP_5$ Enantiomer dephosphorylieren können (Abbildung 1.2), das als Ins(2,3,4,5,6)P_5 identifiziert wurde (Abbildung 1.6). Das Phosphat der Position 1 am Inositolphosphat wurde dabei nicht wie bei klassischen Phosphatasen als anorganisches Phosphat (P_i) freigesetzt, sondern auf das bei der Reaktion nötige ADP übertragen, so dass stöchiometrisch zum Dephosphorylierungsprodukt ATP entstand (Abbildung 1.8). Auch bei dieser Reaktion war die Isoform 2 der IP6K im Vergleich zu den weiteren Isoformen 1 und 3 das katalytisch effizientere Enzym (Tabelle 4.1).
Nicht nur die Dephosphorylierung von $InsP_6$ wurde in dieser Arbeit neu entdeckt, sondern es konnte auch die Dephosphorylierung von 5PP-$InsP_5$ in einer analogen Phosphattransferreaktion auf ADP bestätigt werden (Abbildung 5.1.4). Diese Reaktion wurde bereits in einer frühen Studie an einer isolierten IP6K Aktivität aus Rattenhirn mit einem Km-Wert von 1,97 µM für 5PP-$InsP_5$ beschrieben [68]. Die spezifische Geschwindigkeit der Reaktion betrug 2,64 µmol/min/mg [68] und liefert mit ~1,3 l/min*mg einen V_{max}/K_m Quotienten, der etwa mit dem V_{max}/K_m Quotienten der Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ durch die IP6K1 ebenfalls unter salzfreien Bedingungen gleichkommt (Tabelle 6.1). Aufgegriffen wurde diese Beobachtung 13 Jahre später von Zhang et al. [69], der eine chemische Synthese von 5PP-$InsP_5$ publizierte und nur die korrekte Bildung des Produkts mit Hilfe der Dephosphorylierung zu $InsP_6$ durch die IP6K1 überprüfte [69].
In der vorliegenden Arbeit wurde wegen des limitiert vorliegenden Substrates die Dephosphorylierung von 5PP $InsP_5$ nur mit der Isoform 2 durchgeführt und ein K_m-Wert zwischen 0,17 und 0,28 µM ermittelt (5.1.4). Die spezifische Geschwindigkeit der Isoform 2 für die 5PP-$InsP_5$ Dephosphorylierung lag zwischen 45,5 und 49,8 nmol/min*mg und ist mit einer katalytischen Effizienz zwischen 13,3 und 19,9 min^{-1}*μM^{-1} zugleich die katalytisch effizienteste Reaktion der IP6K2 bei der Betrachtung aller in der vorliegenden Arbeit untersuchten Reaktionen unter vergleichbaren Bedingungen. Auf Grund der 5PP-$InsP_5$ Dephosphorylierung durch die Isoforme 1 [68, 69] und der hier gezeigten Isoform 2, aber auch auf Grund der vergleichbaren Phosphorylierungsreaktionen und der Homologie von ca. 60% [48] zwischen den Isoformen, kann davon ausgegangen werden, dass auch die Isoform 3 die Dephosphorylierung von 5PP-$InsP_5$ zu $InsP_6$ unter der Synthese von ATP katalysiert.
Neben der Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolasen (DIPPs) zur Spaltung der PP-InsP Isomere [53, 54] und der MINPP1 als einzige bisher bekannte $InsP_6$ Phosphatase offenbaren die Daten dieser Arbeit nun neue bisher in Ihrer physiologischen Relevanz unbekannte und vom Adenylat-Energiepotential abhängige Abbauwege sowohl für 5PP-$InsP_5$ als auch für $InsP_6$. Diese Reaktionen können einzig durch die humanen IP6K Isoformen katalysiert und

dem vorhandenen ATP/ADP Verhältnis (repräsentiert durch den ATP-Stoffmengenanteil) gesteuert werden.

6.2 Enantiomerenzuordnung von $InsP_5$ Isomeren

6.2.1 Die selektive Bildung der Enantiomere Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 charakterisiert zwei voneinander getrennte $InsP_6$ Abbauwege in Zellen

In dieser Arbeit wurden zwei $InsP_5$ Enantiomere identifiziert, die auf unterschiedlichem Wege aus dem gleichen Substrat $InsP_6$ gebildet werden. Ins(1,2,4,5,6)P_5 ist das Produkt der, in Lysosomen und im ER lokalisierten und bisher einzigen $InsP_6$ Phosphatase, MINPP1 [39, 133]. Es entsteht durch die Dephosphorylierung der Ringposition 3 an $InsP_6$ und dient als gutes Substrat zur Rephosphorylierung durch die IPMK (Abbildung 5.2.3). Das entsprechende Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 ist hingegen das Hauptprodukt der IP6K katalysierten zytosolischen $InsP_6$ Dephosphorylierung, einem energiepotentialabhängigen Phosphattransfer von der Position 3 an $InsP_6$ auf ADP. Es existieren also zwei voneinander getrennte zelluläre Abbauwege von $InsP_6$ (Abbildung 6.1). Einer für exogen aufgenommenes $InsP_6$ in Endosomen/Lysosomen (s.u. bzw. [133]) und einer ür zytosolisches $InsP_6$ wie hier entdeckt.
Bekannt ist, dass sich $InsP_6$ wie auch ein fluoreszierendes Analogon [144] als Metall Komplex (Me^{2+}-Komplex) an die Glykokalix der äußeren Zellmembran anlagern und rezeptorunabhängig endozytiert werden [133, 144]. Das in die Zelle aufgenommene $InsP_6$, wie auch dessen Analogon, wird über den endosomalen Weg zum Lysosomen transportiert und durch die MINPP1 degradiert [133]. Auf Grund der Tatsache, dass es sich bei dieser Degradation um den Abbau von extrazellulär aufgenommenem $InsP_6$ handelt, der durch die MINPP1 zu Ins(1,2,4,5,6)P_5 führt, kann dieser Weg als exogener $InsP_6$ Abbauweg bezeichnet werden. Ob sich dieser MINPP1 katalysierte, über Endozytose verlaufende Abbauweg im weiteren Verlauf mit dem zytosolischen Inositolphosphatkatabolismus überschneidet und somit der Zelle als Inositolphosphat- oder Inositolquelle dienen kann, ist bisher jedoch noch nicht ausreichend geklärt.
Im Gegensatz dazu wird freies, zytoplasmatisches $InsP_6$ durch die im Zytoplasma und im Nukleus lokalisierten IP6K Isoformen [48] zu Ins(2,3,4,5,6)P_5 degradiert. Der Abbau dieses $InsP_6$ ist energiepotentialabhängig und verläuft unabhängig vom exogenen, MINPP1 katalysierten Weg (5.3.8). Wie Ins(2,3,4,5,6)P_5 weiter genutzt wird, ist bisher noch unklar. Es ist jedoch wahrscheinlich dass die ATP Synthese des zytosolischen $InsP_6$ Abbaus durch die IP6K für die Energieregeneration der gesamten Zelle keine Rolle spielt. Der Vergleich der Inositolphosphatkonzentrationen mit den Adeninnukleotid-Konzentrationen zeigt, dass $InsP_6$ als häufigstes Isomer nur in mikromolaren (10-100 µM [19]) und die Nukleotide hingegen in millimolaren (1-5 mM [145]) Mengen vorliegen. Die ATP Synthese aus $InsP_6$ wäre also zu gering um nennenswerte Mengen ATP im Gesamtpool der Zelle zu generieren. Anders könnte sich die Situation in Pflanzen darstellen. Diese besitzen bis zu millimolare Konzentrationen an $InsP_6$ in z.B. Wurzel-

knollen und Karyopsen. Allerdings fehlt dort noch ein klarer Nachweis von IP6K homologen Proteinen aus sequenzierten Genomen (unveröffentlichte Recherche und perönliche Mitteilung von Prof. Dr. Mayr). Die Synthese von ATP in tierischen Zellen durch den $InsP_6$/ADP Phosphattransfer kann sich, wenn überhaupt, nur lokal begrenzt an/in Organellen mit lokal hoher $InsP_6$ Konzentration auswirken.
Allerdings könnte von Ins(2,3,4,5,6)P_5 als Signalmolekül wirken und die Synthese des Enantiomers einen bisher unbekannten zellulären Signalmechanismus für niedriges zelluläres Adenylat-Energiepotential darstellen. Bei unbehandelten Zellen ist dieses Isomer in geringen Konzentrationen vorhanden (0,7-1,2 µM, 5.3.7-5.3.9) und steigt rapide nach der Verminderung des adenylat-Energiepotentials auf ein vielfaches an (vgl. Abbildung 5.10-5.14 C). Der Anstieg eines Moleküls auf einen Reiz oder eine Stimulation ist typisch für Signalmoleküle [146] und kann ebenfalls bei Ins(1,4,5)P_3 als bekanntester bzw. anerkannter sekundärer Botenstoff beobachtet werden [147]. Es bleibt also in weiteren Untersuchungen abzuwarten, wie bzw. ob das neu identifizierte $InsP_5$ Isomer Signalcharakter bei der Regulation des zellulären Energiehaushaltes aufweist.

6.2.2 Ins(2,3,4,5,6)P_5 ist kein Artefakt, sondern wurde bereits enantioselektiv nachgewiesen

Bis heute ist wenig über das in dieser Arbeit identifizierte Produkt der IP6K katalysierten $InsP_6$ Dephosphorylierung zu Ins(2,3,4,5,6)P_5, bekannt. Auf Grund der bisher aufwendigen oder fehlenden enantioselektiven Analysen wurde auf eine Unterscheidung der Enantiomere Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 in den meisten Studien weitestgehend verzichtet. So wurde bei Analysen von Inositolphosphaten das entsprechende Enantiomer nur als D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 bezeichnet. Dies macht es schwierig bzw. unmöglich, Aussagen darüber zu treffen, bei welchen Stimulationen oder Signalwegen das Produkt der IP6K katalysierten $InsP_6$ Dephosphorylierung oder das Produkt der MINPP1 beteiligt sein könnte.
Allerdings ist dennoch eine Studie bekannt, bei der das Enantiomer eindeutig zugeordnet werden konnte. In eukaryotischen Zellen wurde Ins(2,3,4,5,6)P_5 eindeutig in Epstein-Barr-Virus transduzierten B-Lymphozyten identifiziert [148]. Wie in dieser Arbeit auch wurde ein enantioselektiver Assay verwendet, um bei der Analyse von $InsP_5$ Isomeren in den B-Lymphozyten das Enantiomer zuordnen zu können. Anders als in dieser Arbeit verwendeten die Autoren eine Ins(1,2,4,5,6)P_5-3-Kinase aus dem Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* [149] und zeigten, dass das isolierte $InsP_5$ ein racemisches Gemisch aus beiden Enantiomeren darstellt. Das Vorhandensein beider Enantiomere untermauert die Dephosphorylierung von $InsP_6$ sowohl durch die MINPP1 als auch durch die IP6K als nebeneinander ablaufende Degradationsprozesse. Der Grund für den Nachweis beider Enantiomere liegt in der Inositolphosphatanalyse aus Zellextrakten. Bei Gesamtzellextrakten vermischen sich die Isomere aus den einzelnen Organellen (auf Grund der Lyse) und machen eine distinkte Zuordnung der Isomere zu ein-

zelnen Organellen unmöglich (vgl. MINPP1 Produkt in ER/Lysosomen; IP6K Produkt im Zytoplasma/Nukleus). Die Autoren der Studie vermuteten allerdings bereits, dass das Auftreten des Enantiomers Ins(2,3,4,5,6)P_5 möglicherweise durch eine Dephosphorylierung von InsP_6 erfolgt [148], was nun unter anderem durch diese Arbeit nun bestätigt wurde.
In einer weiteren Studie wurde Ins(2,3,4,5,6)P_5 in Pflanzen identifiziert [150]. Detailliert durchgeführte InsP_5 Analysen zeigen, dass in Setzlingen von keimenden Mungobohnen, D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 das Hauptisomer/Enantiomer darstellt [150]. Verschiedene NMR (*nuclear magnetic resonance*) Techniken der isolierten Enantiomere und ihrer Abbauprodukte ermöglichten die Zuordnung, dass das isolierte D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 ein Gemisch aus beiden Enantiomeren ist, von dem 79% der L-Konfiguration [150], also dem Ins(2,3,4,5,6)P_5, entsprechen. Bisher wurde jedoch noch keine pflanzliche IP6K kloniert oder isoliert. Allerdings sprechen phylogenetische Stammbäume für die IP6K als eine evolutionär hoch konservierte Kinase [151] und Genomanalysen zeigen, dass vielversprechende homologe Sequenzen zur Hefe IP6K (kcs1) unter anderem im pflanzlichen Genom einer Reispflanze (*Oryza sativa*) existieren [151]. Interessanterweise wurde bei keimenden Samen der Gold-Kiefer (*Pinus Ponderosa*) nachgewiesen, dass dort die Energieladung (AEC; *adenylate energy charge*) auf Grund von übermäßigem ATP Konsum durch Proteinbiosynthese, erniedrigt ist [152]. Unter der Annahme, dass in keimenden Mungobohnen ebenso wie bei keimenden Samen der Gold-Kiefer die AEC durch verstärkte Proteinbiosynthese reduziert ist und bei den Mungobohnen eine zu IP6K vergleichbare Aktivität vorhanden ist, würde nicht nur die Daten dieser Arbeit untermauern. Sondern es würde ebenalls bestätigen, dass das Ins(2,3,4,5,6)P_5 als Hauptenantiomer der Energiepotential getriebenen InsP_6-Dephosphorylierung anzusehen ist und dass hier vielleicht ein phylogenetisch konservierter Mechanismus der Energiepotential abhängigen InsP_6-Dephosphorylierung vorliegen könnte.

6.2.3 Neue Synthesewege zum InsP_6

InsP_6 ist vor Ins(1,3,4,5,6)P_5 das am häufigsten vorkommende Inositolphosphat [153, 154, 155]. Es liegt an verschiedene Proteine gebunden vor und vermittelt unter anderem die Stabilität aber auch Aktivität der entsprechenden Proteine [19]. Die Synthese des vollständig phosphorylierten Isomers InsP_6 erfolgt nach derzeitigem Anabolismusmodell ausschließlich durch eine einzige Kinase, die IP52K (IPPK) (Abbildung 1.4 bzw. Abbildung 1.5). Sie phosphoryliert die 2´-OH Gruppe des Ins(1,3,4,5,6)P_5 zu InsP_6 [37, 156]. Neben Ins(1,3,4,5,6)P_5 als Hauptsubstrat, phosphoryliert die Kinase weitere InsP_4 Isomere *in vitro* ebenfalls hoch spezifisch an der Position 2 [157, 158, 159](und eigene unveröffentlichte Daten). Bis auf dessen Lokalisation [37, 83, 160] und katalytische Aktivität (s.o.) ist über die Regulation der Kinase zur Synthese von InsP_6 *in vivo*, aus dem fast äquimolar zu InsP_6 vorkommenden Ins(1,3,4,5,6)P_5 sehr wenig bekannt.
Nicht nur die Identifikation der IP6Ks als Hydroxylgruppenkinasen von InsP_5 Isomeren (5.2.6),

sondern ebenfalls die hier neu identifizierte und eingesetzte Aktivität der IPMK zur Phosphorylierung von Ins(1,2,4,5,6)P_5 (5.2.1) liefert nun weitere Wege der $InsP_6$ bzw. direkten 5PP-$InsP_5$ Synthese aus $InsP_5$ Isomeren unabhängig von der IPPK (Abbildung 6.1). Das einzige bisher untersuchte $InsP_5$ Isomer als Substrat der IP6K ist Ins(1,3,4,5,6)P_5. Dieses Isomer wird, wie $InsP_6$, an der Position 5 pyrophosphoryliert (Abbildung 1.5) und bei längeren Inkubationszeiten sogar zu einem zweiten Produkt weiter phosphoryliert [95]. Die Produkte zeigen zum einen, dass die Kinase relativ spezifisch für die Pyrophosphorylierung des 5-Phosphats von Ins(1,3,4,5,6)P_5 ist und zum anderen, dass die IP6K zur Phosphorylierung der Hydroxlgruppe an Position 2 nicht in der Lage ist. Überaschenderweise war dies bei der Reaktion mit den $InsP_5$ Isomeren Ins(1,2,4,5,6)P_5 und Ins(2,3,4,5,6)P_5 anders (5.2.5). Beide Isomere wurden in dieser Arbeit als Dephosphorylierungsprodukte von $InsP_6$ identifiziert (5.2.2/5.2.3) und dienten der IP6K als Substrate zur Re-Phosphorylierung (5.2.5). Auf Grund der bisher publizierten Studien [14, 95] war zu erwarten, dass auch diese Isomere an der Position 5 zu 5PP-Ins(1,2,4,6)P_4 bzw. 5PP-Ins(1,2,4,6)P_4 pyrophosphoryliert werden würden. Allerdings konnte auf Grund der sauren Produkthydrolysen eindeutig gezeigt werden, dass beide $InsP_5$ Isomere jeweils über $InsP_6$ zu 5PP-$InsP_5$ phosphoryliert bzw. pyrophosphoryliert wurden (Abbildung 5.11). Dies bedeutet auch, dass die IP6Ks zusätzlich zu ihrer pyrophosphorylierenden Aktivität in dieser Arbeit als Hydroxlgruppen Kinasen für vereinzelte $InsP_5$ Isomere charakterisiert werden konnten.
Die IPMK ist wie der Name Inositol Polyphosphat Multikinase bereits korrekt benennt, ein Enzym des Inositolphosphat Metabolismus mit mehr als einem Substrat. Sie wurde als Kinase charakterisiert, die die Positionen 3 von Ins(1,4,5)P_3 und 6 von Ins(1,3,4,5)P_4 phosphoryliert, so dass Ins(1,3,4,5,6)P_5 entsteht [32]. Während dieser Arbeit wurde auf Grund der Spezifität der Kinase zur Phosphorylierung der Position 3, die IPMK als mögliches enantioselektives Enzym zur Identifizierung der Enantiomere D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 eingesetzt. Die identifizierte Aktivität der IPMK zur Phosphorylierung der Position 3 von Ins(1,2,4,5,6)P_5 zu $InsP_6$ und nicht der Position 1 von Ins(2,3,4,5,6)P_5 (Abbildung 5.4) wurde letztendlich zur Enantiomerenanalyse von D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 eingesetzt (5.2.2 bzw. 5.2.3).
Die bisher unbekannte, hier identifizierte und verwendete Aktivität der IPMK bietet jedoch nicht nur ein hervorragendes Werkzeug zur enantioselektiven Analyse von Isomeren, sondern eröffnet ebenfalls einen weiteren Weg der IPPK-unabhängigen $InsP_6$ Synthese aus alternativen, von Ins(1,3,4,5,6)P_5 verschiedenen, $InsP_5$ Isomeren (Abbildung 6.1). Um zu klären, ob diese Aktivität jedoch im lebenden Organismus eine Rolle spielt bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Dass die IPMK neben der Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P_3 noch weitere Substrate besitzt, wurde bereits gezeigt [161] und deutet darauf hin, dass auch die $InsP_5$ Phosphorylierung eine physiologische Relevanz besitzen könnte.

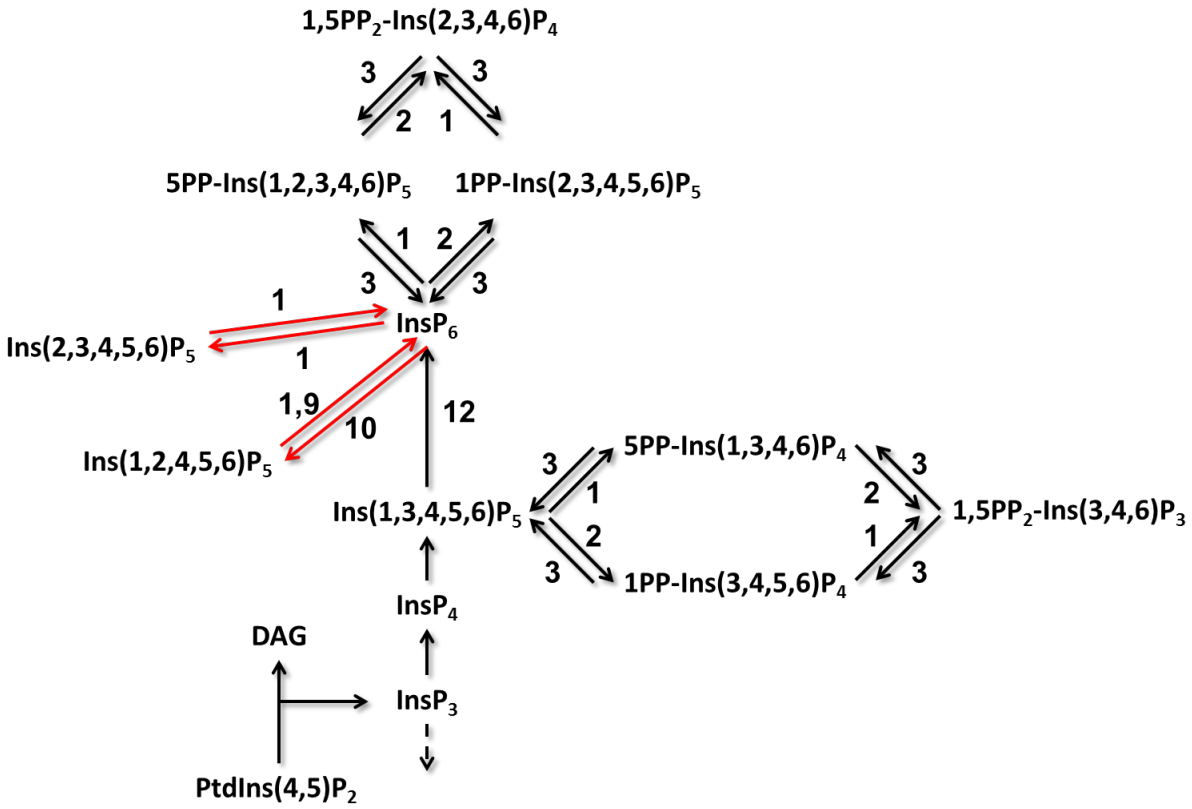


Abbildung 6.1: Modifizierter Inositolphosphat Metabolismus. In Anlehnung an Abbildung 1.6 sind die in dieser Arbeit identifizierten, neuen Synthesewege zum $InsP_6$ wie auch Abbauwege vereinfacht wiedergegeben. Die Nummerierung der Kinasen entspricht denen in Abbildung 1.5 und 1.6 mit IP6K (1); PPIP5K (2); DIPPs (3); IPMK (9); MINPP1 (10) und IPPK (12). Die Abbildung wurde modifiziert nach [10, 19, 28, 45] und mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten ergänzt (rote Pfeile).

6.3 Die IP6K Isoformen sind Sensoren des intrazellulär herrschenden Adenylat Energiepotentials

Die ermittelten Michaelis-Menten Parameter der humanen IP6K Isoformen zeigen, dass $InsP_6$ als "zentrales" Molekül sowohl pyrophosphoryliert, aber auch in Gegenwart von ADP zu $Ins(2,3,4,5,6)P_5$ dephosphoryliert werden konnte (Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2). Das Produkt der $InsP_6$ Pyrophosphorylierung, 5PP-$InsP_5$, wurde in Gegenwart von ADP in der effektivsten Reaktion der IP6K2 (Abbildung 5.3) durch einen 5PP-$InsP_5$/ADP Transfer [68, 69] zu $InsP_6$ und langsamer weiter zu $Ins(2,3,4,5,6)P_5$ degradiert (Abbildung 5.7). Das entstandene $InsP_5$, aber auch dessen Enantiomer $Ins(1,2,4,5,6)P_5$, konnten jeweils mit ATP „zurück" zu $InsP_6$ und 5PP-$InsP_5$ rephosphoryliert werden (Abbildung 5.9). Zusätzlich zeigen die Daten, dass von beiden Enantiomeren das Produkt der IP6K katalysierten Dephosphorylierung, $Ins(2,3,4,5,6)P_5$, das bevorzugte Substrat zur Rephosphorylierung vor $Ins(1,2,4,5,6)P_5$ ist.
Bei Reaktionen der IP6K Isoformen mit $InsP_6$ als "zentralem" Substrat und vorgegebenen Kom-

binationen aus [ATP] und [ADP] (ATP-Stoffmengenanteil mit [ATP]/([ATP]+[ADP])) (5.3.1) wurden feste Nukleotid Äquilibria als Adenylat-Energiepotentiale simuliert. Die Daten (Abbildung 5.4) zeigen, dass durch verschieden eingestellte Adenylat-Energiepotentiale $InsP_6$ entweder zu 5PP-$InsP_5$ pyrophosphoryliert oder zu Ins(2,3,4,5,6)P_5 dephosphoryliert wird. Je nach Adenylat-Energiepotential stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Ins(2,3,4,5,6)P_5, $InsP_6$ und 5PP-$InsP_5$ ein, das das vorherrschende Nukleotidverhältnis, also das vorherrschende Energiepotential wiederspiegeln (Abbildung 5.5). Physiologische ATP/ADP Verhältnisse liegen zwischen 2,5 und 9,4 [139] und entsprechen einem ATP-Stoffmengenanteil (bzw. Adenylat-Energiepotential) zwischen 0,72 und 0,90. Bei hohen physiologischen Werten herrschen also Bedingungen, bei denen die Pyrophosphorylierung von $InsP_6$ deutlich bevorzugt vor der Dephosphorylierung verläuft (Abbildung 5.4). Allerdings stellt sich schon bei einem intermediären physiologischen ATP-Stoffmengenanteil von ~0,8 ein relativ ausgeglichenes Äquilibrium zwischen $InsP_6$ und 5PP-$InsP_5$ ein und die Geschwindigkeit der $InsP_6$ Dephosphorylierung durch die IP6K1 erreicht bereits ihr Halbmaximum (Abbildung 5.4 A). Bei der „unteren physiologischen Grenze“ des Stoffmengenanteils von ATP ist das Äquilibrium bereits auf die Seite von $InsP_6$ verschoben und die Geschwindigkeit der $InsP_6$ Dephosphorylierung durch die IP6K1 hat schon ihr Maximum erreicht (Abbildung 5.4 A). Eine weitere Erniedrigung des Energiepotentials hat demnach zumindest auf die Synthesegeschwindigkeit von Ins(2,3,4,5,6)P_5 durch die Isoform 1 keinen weiteren Einfluss. Der enorm hohe, bereits unter physiologischen Bedingungen erreichbare Wert der halbmaximalen Dephosphorylierung der IP6K1 charakterisiert dieses Enzym als die sensitivere Isoform zur Energiepotential abhängigen Dephosphorylierung von $InsP_6$.
Unter Berücksichtigung der höheren Adenylat-Energiepotential-Sensitivität der IP6K1 könnte diese Isoform für die beobachtete maximale $InsP_6$ Dephosphorylierung in Zellen maßgeblich sein. Eine geringe ATP-Depletion durch CCCP in H1299 erniedrigte den ermittelten ATP-Stoffmengenanteil in den mittleren bis unteren physiologischen Bereich von 0,8 auf 0,7 (Abbildung 5.10). Die Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 stieg dabei um das ~3 fache an. Im selben Zeitraum hat eine Erniedrigung des Molenbruchs um das 6 fache von ~0,8 auf ~0,2 in vergleichbaren Zellen (H1299Scr und MINPP1kd; Abbildung 5.11 und 5.12) keine entsprechende Steigerung der Ins(2,3,4,5,6)P_5 Synthese zur Folge. Dies spricht für eine bereits bei einem ATP Molenbruch von ~0,7 erreichte maximale Ins(2,3,4,5,6)P_5 Synthesegeschwindigkeit und somit für die IP6K1 als Hauptverantwortliche Isoform zur Dephosphorylierung von $InsP_6$ in H1299 Zellen.
Untermauert wird diese These durch Beobachtungen bei IP6K1 *knock out* oder *silencing* Experimenten die ebenfalls bei kcs1 (IP6K) Deletionen in Hefen auftraten. Die Deletion der IP6K1 hatte nicht nur eine Reduktion der pyrophosphorylierten Produkte zur Folge, sondern ebenfalls eine Reduktion von Ins(1,3,4,5,6)P_5 [45, 95]. Außer dass Ins(1,3,4,5,6)P_5 ebenfalls ein Substrat der IP6K ist (Abbildung 1.5) fehlte bisher eine Erklärung in diesen Experimenten, warum bei der Deletion der IP6K1, dessen Substrat ebenfalls reduziert werden sollte. Vermutet wurde

allerdings, dass die beobachtete Reduktion nicht auf Ins(1,3,4,5,6)P_5 zurückzuführen ist, sondern auf ein weiteres Isomer, dass identische oder nahezu identische Retentionszeiten wie Ins(1,3,4,5,6)P_5 besitzt. Die in dieser Arbeit identifizierte IP6K katalysierte Ins(2,3,4,5,6)P_5 Synthese, liefert die Erklärung. Wie unser IPx-Standard beweist (vgl. Chromatogramme, z.B. Abbildung 1.4), sind die Retentionszeiten von Ins(1,3,4,5,6)P_5 und D/L-Ins(1,2,4,5,6)P_5 nahezu identisch, sodass sich die Peaks der Isomere z.T. überschneiden. Werden weniger flache bzw. zur Isomerentrennung optimierte Elutionsgradienten, als die in dieser Arbeit verwendeten, genutzt, ist es gut möglich, dass die Isomere komplett übereinanderliegen und eine Unterscheidung unmöglich machen. Was die Autoren dann gesehen hätten, ist nicht die Reduktion von Ins(1,3,4,5,6)P_5 sondern wie von denen bereits vermutet von einem anderen InsP_5 Isomer [45] Dies würde mit dem in dieser Arbeit identifizierten Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 als überlagertes Isomer und fehlendes Produkt bei fehlender kcs1/IP6K Phosphatase Aktivität durch Depletion übereinstimmen.

Auch wenn die IP6K1 die energiepotentialsensitivere Isoform darstellt, konnten alle drei Isoformen InsP_6 und dessen Produkte, abhängig von dem ATP/ADP Verhältnis, dephosphorylieren und rephosphorylieren (Abbildung 6.2). Bei Messungen mit der Isoform 2 und InsP_6 als Substrat (5.3.3 bzw. 5.3.4), sowie bei Einsatz von Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase oder Glukose und Hexokinase zur Energiepotentialänderung während der Reaktion veränderte die IP6K je nach neu eingestelltem Energiepotential die Produktkonzentrationen im Äquilibrium. Diese Daten beweisen, dass die Kinasen auf veränderte ATP/ADP Verhältnisse bzw. Adenylat-Energiepotentiale mit einer veränderten Aktivität und so mit einer Änderung des Inositolphosphat Äquilibriums reagieren. Auch die Reduktion von 5PP-InsP_5 und die Zunahme von Ins(2,3,4,5,6)P_5 in ATP depletierten DDT_1 MF-2 Zellen (Abbildung 5.13 C) untermauern die These der IP6Ks als Sensoren des Energiepotentials nicht nur in menschlichen Zellen.

Die PPIP5K als zweite Inositolpyrophosphat bildende Kinase nutzt ebenfalls InsP_6 und pyrophosphoryliert, allerdings anders als die IP6K, die Position 1 von InsP_6 [24, 50]. Es bot sich also an, diese Kinase unter ähnlichen Bedingungen zu untersuchen. Eigene Messungen (nicht gezeigt) sowie von Weaver et al. [162] unter vergleichbaren Bedingungen zeigen, dass die PPIP5K vom Energiepotential in Ihrer Aktivität relativ unbeeinflußt ist.

Die Substrat- und Produkt-Dephosphorylierung und Rephosphorylierung ist demnach nicht durch die energiereichen Substrate oder Produkte getrieben, sondern ist ein ausschließliches Charakteristikum der IP6Ks und ihrer Sensoreigenschaften für das Adenylat-Energiepotential aus ATP und ADP.

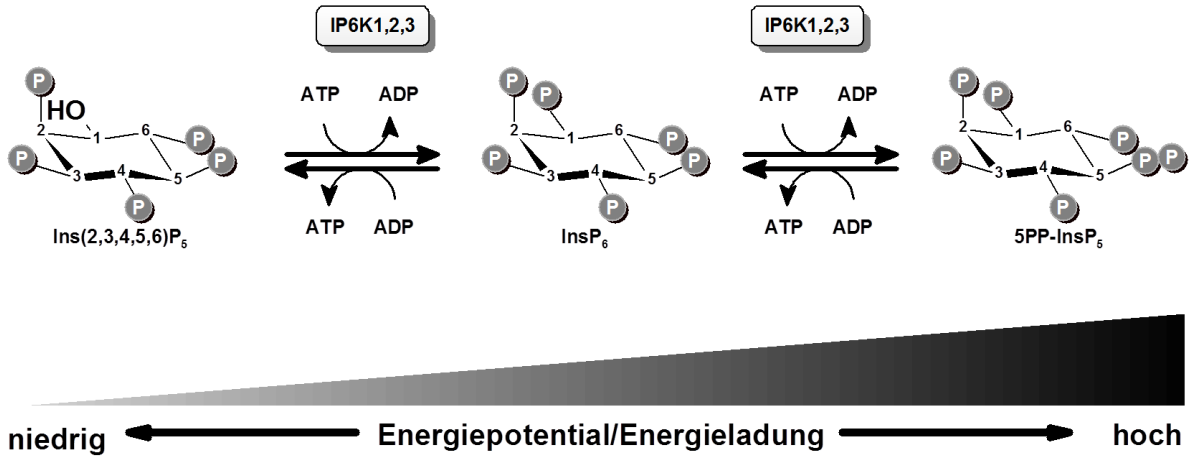


Abbildung 6.2: Abhängigkeit der IP6K Isoformen 1, 2 und 3 vom Energiepotential. Die erarbeiteten Daten dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass die IP6Ks auf das vorherrschende Adenylat-Energiepotential reagieren. Je nachdem ob ein hohes Potential (charakterisiert durch viel ATP) oder niedriges Potential (hier charakterisiert durch viel ADP) vorliegt, ist das Gleichgeweicht zu Gunsten von 5PP-$InsP_5$, $InsP_6$ oder Ins(2,3,4,5,6)P_5 verschoben. Das jeweilige Isomeren-Verhältnis spiegelt das vorherrschende Adenylat-Energiepotential wieder und rückt die IP6K in die Rolle eines zellulären ATP/ADP Sensors, der Isoformabhängig aus dem Nukleotidverhältnis "langlebigere" Signale in Form von Ins(2,3,4,5,6)P_5, $InsP_6$ oder 5PP-$InsP_5$ bilden kann.

6.4 Ausblick

6.4.1 Ins(2,3,4,5,6)P_5 bzw. 5PP-$InsP_5$ als Signalmoleküle für ein niedriges bzw. hohes Adenylat-Energiepotential?

Ins(2,3,4,5,6)P_5 ist einerseits das Hauptenantiomer der IP6K katalysierten $InsP_6$ Dephosphorylierung in Gegenwart von ADP (Abbildung 5.2.2). Andererseits wurde dieses $InsP_5$ Enantiomer in Gegenwart von ATP durch die IP6K auch wieder rasch rephosphoryliert (5.2.5). Die Synthese des Enantiomers erfolgt jedoch nicht ausschließlich in Gegenwart von nur ADP und die Rephosphorylierung nicht ausschließlich in Gegenwart von nur ATP. Die Synthesegeschwindigkeit, aber auch die Gleichgewichtseinstellung zwischen $InsP_6$ und Ins(2,3,4,5,6)P_5 wurde vielmehr vom Verhältnis aus ATP und ADP bestimmt (5.3.1). Ähnlich erfolg die Synthese und die Dephosphorylierung von 5PP-$InsP_5$ nicht nur in Gegenwart von nur einem Nukleotid. Auch dort bestimmt das Nukleotidverhältnis das Äquilibrium mit $InsP_6$ und Ins(2,3,4,5,6)P_5 oder 5PP-$InsP_5$. Untermauert wird die Energiepotential abhängige Synthese und Rephosphorylierung der Isomere durch die konsistenten, dynamischen Veränderungen der ATP/ADP Verhältnisse während der IP6K katalysierten Reaktionen mit $InsP_6$ (5.3.3 und 5.3.4). Das veränderbare Vorkommen aller drei Inositolphosphat-Reaktanden, durch den Sensor IP6K (s.o.), als Antwort auf eine sich rasch verändernde Stellgröße wie dem Adenylat-Energiepotential, könnten sowohl Ins(2,3,4,5,6)P_5 als auch 5PP-$InsP_5$ als potentielle Regler der Effektor-abhängigen Stellgröße (Energiepotential) charakterisieren.

Wie bereits erwähnt, ist über das Enantiomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 bisher nur sehr wenig bekannt. Da aber ausgeschlossen werden kann, dass die geringen Mengen ATP, die beim InsP_6/ADP Phosphattransfer entstehen (5.2.4), Auswirkungen auf das Nukleotid-Gesamtniveau der Zelle haben, fällt die ATP Synthese als *„rescue"* Mechanismus zur Regenration von nennenswerten ATP Mengen außer Betracht. Vielmehr spricht dies wieder für das InsP_5 Enantiomer als Signalmolekül bei der integrierenden Regelung des Adenylat-Energiepotentials im Sinne einer Signaltransduktion zur Rückstellung auf ein höheres Niveau (Hypothese bereits z.T. veröfentlicht und beschrieben in [19])
Wie viele Inositolphosphat Isomere oder Diphosphoinositolphat Isomere inhibieren ebenfalls alle InsP_5 Isomere die Bindung von Proteinen mit PH-Domänen an PtdInsPs [102, 103]. Kristallstrukturanalysen zeigen eine direkte Bindung ausgewählter InsP_5 Isomere an die PH Domäne von z.B. Pleckstrin [102]. Direkte Untersuchungen zur Inhibition der PtdInsP bindenden PH-Domänen von ebenfalls Pleckstrin (CPH), aber auch Akt oder Grb1 wurden mittels Plasmonresonanzmessungen mit PtdInsP-haltigen Vesikeln durchgeführt [103]. Die Daten zeigen, dass jedes InsP_5 Isomer die Bindung der getesteten Proteine an PtdInsPs unterschiedlich stark inhibieren kann. So wird beispielhaft die Rekrutierung von CPH, Akt und Grb1 durch Ins(1,2,3,4,5)P_4 zu 34%, 27% und 64% gehemmt. Im Gegensatz dazu inhibiert das in dieser Arbeit identifizierte Isomer Ins(2,3,4,5,6)P_5 CPH, Akt und Grb1 zu 40%, 81% und 9%. Andere Isomere unterscheiden sich ebenfalls deutlich in iher Selektivität für die Zielproteine [103].
Diese Studie zeigt in Verbindung mit Literaturdaten, dass das IP6K katalysierte InsP_6 Dephosphorylierungsprodukt durchaus inhibitorisches Potential für einige Proteine mit PH-Domäne besitzt und somit als Botenstoff oder Regler über die Aktivität dieser Proteine agieren könnte. Die gesteigerte Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 auf Grund eines sinkenden ATP/ADP Verhältnisses könnte dem sinkenden Energiepotential der Zelle durch die Modulation von bisher nicht untersuchten Proteinen mit PH-Domänen und regulatorischen Eigenschaften entgegenwirken. Die IP6K1, wie auch die Isoform 2, kommen auf Grund der Michaelis Menten Parameter als wahrscheinlichste Isoformen der InsP_6 Dephosphorylierung *in vivo* in Frage. In Anbetracht dessen und deren zytosolischer bzw. nukleärer Lokalisation [48] könnte Ins(2,3,4,5,6)P_5 ebenfalls als niedermolekularer Transkriptionsregulator wirken. Möglicherweise aktiviert oder inhibiert Ins(2,3,4,5,6)P_5 die Transkription von Genen direkt durch eine Bindung an entsprechende Transkriptionsfaktoren oder indirekt über die Reduktion nukleärer InsP_6 oder 5PP-InsP_5 Spiegel. Von InsP_6 ist bekannt, dass es im Gegensatz zu InsP_4 oder InsP_5, ATP abhängige *chromatin-remodeling* Komplexe (wichtig für die Transkription) moduliert bzw. inhibiert [163, 164]. Hypothetisch könnte ein niedriges Energieniveau die nukleäre IP6K2 zur Synthese von Ins(2,3,4,5,6)P_5 aus dem inhibierenden InsP_6 treiben und somit die hemmende Wirkung von InsP_6 aufheben. Das dabei lokal synthetisierte ATP könnte den ATP-abhängigen *chromatin-remodeling* Komplexen zur Verfügung stehen und z.B. mit der Transkription energieliefernder Gene dem Abfall des Energieniveaus entgegenwirken.

Über 5PP-InsP_5 ist mehr als über Ins(2,3,4,5,6)P_5 bekannt. So konnte in Hefen z.B. eine transkriptionsregulierende Wirkung gezeigt werden [75]. GCR1 ist dort ein Transkriptionsfaktor glykolytischer Enzyme und gleichzeitg ein Angriffsziel (*target*) von 5PP-InsP_5. Phosphoryliert liegt GCR1 an GCR2 gebunden vor und transkribiert zusammen mit RAP1 die Enzyme der Glykolyse (Abbildung 6.3; [86]). 5PP-InsP_5 pyrophosphoryliert den bereits präphosphorylierten Transkriptionsfaktor GCR1 (vgl. 1.4.1). Die Protein-Protein Wechselwirkung mit GCR2 wird somit unterbunden und die Transkription der glykolytischen Enzyme kommt zum Erliegen. Glykolytische Enzyme metabolisieren Glukose und generieren Energie in Form von ATP. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei hoher Energie (hohem Adenylat-Energiepotential) bevorzugt 5PP-InsP_5 gebildet wurde bzw. das Gleichgewicht auf dessen Seite verschoben war. D.h. für 5PP-InsP_5 könnte in Hefen ein direkter regulatorischer Zusammenhang der glykolytischen Energie-homöostase auf Transkriptionsebene bestehen [75]. Die Transkription von Enzymen der Glykolyse erzeugt mehr Energie in Form von ATP mit der Folge einer Erhöhung des ATP/ADP Verhältnisses. Die IP6K als Sensor erfasst langfristig und über die Zeit integrierend die Veränderung des Adenylat-Energienpotentials und reagiert mit der Pyrophosphorylierung von freiem InsP_6 zu 5PP-InsP_5. Das Signal für hohen Energiehaushalt 5PP-InsP_5 überträgt das ß-Phosphat auf GCR1 und die Interaktion mit GCR2 wird unterbunden. Die Folge ist eine verminderte bzw. komplett herunterregulierte Transkription glykolytischer Enzyme. Der fortlaufende zelluläre Metabolismus verbraucht die Energie in Form von ATP (führt zu ADP) und das Verhältnis ATP/ADP sinkt. Der Sensor, IP6K, reduziert die 5PP-InsP_5 Bildung bzw. fördert dessen Dephosphorylierung. Die verminderte 5PP-InsP_5 Konzentration verringert die Übertragung des inhibitorischen ß-Phosphates auf GCR1. GCR1 und GCR2 können so wieder interagieren und der reaktivierte Transkriptionskomplex exprimiert erneut glykolytische Enzyme mit der Folge eines steigenden Energieniveaus.
Durch den beschriebenen Regulationsmechanismus wäre bereits 5PP-InsP_5 als alleiniges Isomer in der Lage als Regulator der Energiehomöstase zu dienen. Zusammen mit Ins(2,3,4,5,6)P_5 als hypothetischem Gegenspieler könnte allerdings deutlich effektiver auf Schwankungen des ATP/ADP Verhältnisses reagiert werden. Dafür spräche auch, dass wegen der langsameren Bildung von Ins(2,3,4,5,6)P_5 eine bessere Zeitintegration der Schwankungen des Energieniveaus ermöglicht. Die einzige Schwachstelle bzw. wage Komponente des Modells ist die Art der Regulation des Transkriptionsfaktors durch enzymunabhängige Phosphorylierung mit unbekannter Dephosphorylierung (1.4.1). Dass allerdings eine Transkriptionsregulation durch 5PP-InsP_5 stattfindet, steht relativ sicher außer Frage.

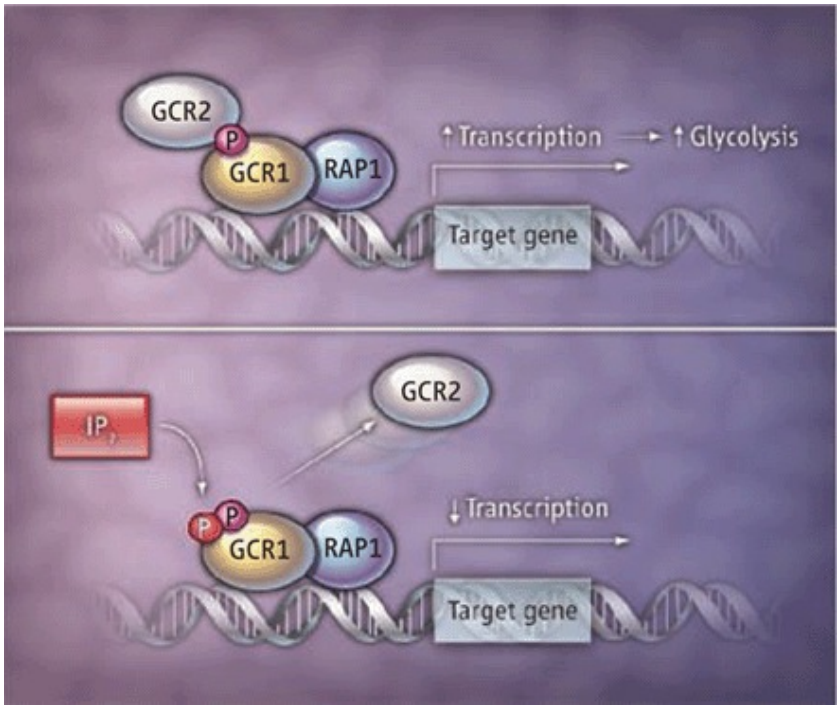


Abbildung 6.3: Schematische Regulation der Transkription glykolytischer Enzyme durch 5PP-InsP$_5$ in Hefen. GCR1 ist ein Tanskriptionsaktivator und bildet zusammen mit RAP1 und GCR2 einen aktiven DNA bindenden Transkriptionskomplex. Die Pyrophosphorylierung von Präphosphoryliertem GCR1 durch 5PP-InsP$_5$ unterbindet die Zusammenlagerung des aktiven Komplexes und die Transkription kommt zum erliegen [75]. Das Bild wurde entnommen aus [86].

6.4.2 Einordnung der IP6K als Energiesensor bei der Insulinsekretion und peripheren Sensitivität

Die Energieabhängigkeit bzw. Sensoreigenschaft der IP6K wurde hier ausführlich untersucht und diskutiert. Dabei spielt die IP6K möglicherweise nicht nur in der Aufrechterhaltung der basalen zellulären Adenylat-Energiehomöostase eine wichtige Rolle. Wie bereits beschrieben partizipiert 5PP-InsP$_5$ an der Exozytose (1.4.2) und fördert die Insulinsekretion aus pankreatischen ß-Zellen [57]. Eine Deletion der IP6K1 hingegen hat in entspechenden *knock out* Mäusen keinen kompletten Verlust der Insulinsekretion zur Folge [58]. Sie besitzen, im Vergleich zu WT (Wildtyp) Mäusen, nur reduzierte Insulin-Konzentrationen im Plasma [58].
Die IP6K und dessen Sensoraktivität lässt sich nun wie folgt einordnen:
Unter physiologischen Bedingungen führt eine erhöhte postprandiale Blutglukosekonzentration zu vermehrter Aufnahme der Glukose in pankreatische ß-Zellen. Verantwortlich ist ein niedrigaffiner Glukosetransporter (GLUT2), dessen K_m-Wert bei etwa 30 mM liegt [165]. Die vermehrte Glukoseaufnahme führt zu erhöhter Metabolisierung und anschließend hohem ATP/ADP Verhältnis. Es kommt zum Schließen der ATP gesteuerten K^+-Kanäle und nachfolgender Depolarisation mit Ca^{2+} Einstrom. Der Ca^{2+} Einstrom bewirkt letztendlich die Insulinsekretion als Antwort auf die Blutglukose (Abbildung 6.4).

Die IP6K spürt als Sensor die Erhöhung des Energiepotentials und reagiert mit einer Verschiebung des Isomerengleichgewichts zwischen Ins(2,3,4,5,6)P_5, InsP_6 und 5PP-InsP_5 zu Gunsten von 5PP-InsP_5 (Abbildung 6.2). Damit liefert 5PP-InsP_5 als (regulatorisches) Produkt der IP6K (Sensor) ein Signal für vermehrte Glukosemetabolisierung und unterstützt die Insulinsekretion (Abbildung 6.4). An welcher Stelle 5PP-InsP_5 jedoch die Sekretion von Insulin fördert, ist bisher noch nicht bekannt und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.
In peripheren Geweben sollte die IP6K ebenfalls mit der Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den Isomeren in Abhängigkeit des ATP/ADP Verhältnisses reagieren. Dies könnte sich allerdings auf manche Signalwege die auch energieunabhängig beginnen und ablaufen, kontraproduktiv auswirken. Das Beispiel des Insulinrezeptorsignalweges (1.7) als Antwort auf Insulin zeigt, dass Akt/PKB durch z.B. 5PP-InsP_5 an der Membranrekrutierung und somit Aktivierung gehemmt werden kann [64, 107]. Dies würde bedeuten, dass je nach vorherrschendem zellulärem Energiepotential der Signalweg unterschiedlich bzw. bei hohem Potential durch hohe 5PP-InsP_5 Konzentrationen nicht mehr ablaufen kann. Bei niedrigen Konzentrationen (niedrigem Potential) hingegen würde der Weg nach der Insulinbindung verstärkt verlaufen. Interessanterweise konnte ebenfalls eine hemmende Wirkung des Dephosphorylierungsproduktes Ins(2,3,4,5,6)P_5 auf die Rekrutierung von Akt/PKB identifiziert werden [103]. Die Tatsache, dass beide Isomere die Rekrutierung des Signalenzyms Akt/PKB inhibieren können, könnte der Zelle einen immer wieder relativ konstanten, auf Insulin abgestimmten, vom Energiepotential unabhängigen Signalweg ermöglichen. Rasch schwankende ATP/ADP Verhältnisse würden durch die langsamere Bildung von 5PP-InsP_5 bzw. Ins(2,3,4,5,6)P_5 gedämpft werden. Sollte dennoch eine Änderung in den Konzentrationen aller drei Reaktanden erfolgen würden sich die Isomerspezifischen Effekte durch vergleichbare hemmende Eigenschaften (auf Akt/PKB) kompensieren.

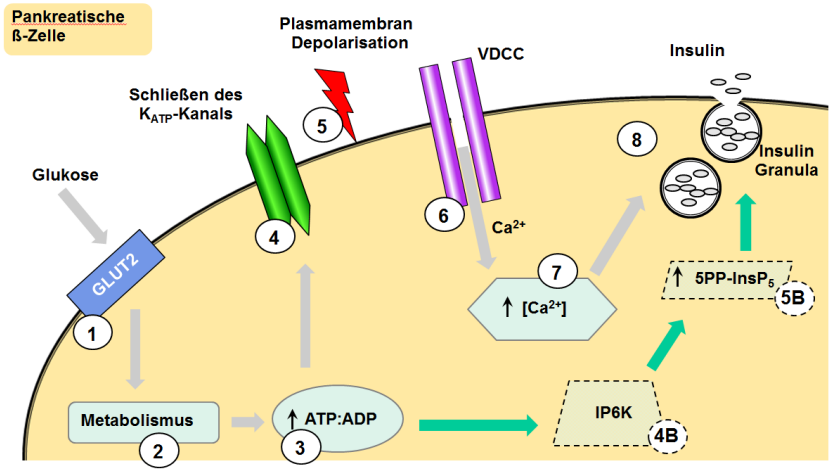


Abbildung 6.4: Vereinfachte Darstellung der Glukoseabhängigen Insulinsekretion. Glucose wird über GLUT2 aufgenommen (1) und zu Reduktionsäuqivalenten im Mitochondrium metabolisiert (2). Durch die direkt gekoppelte ATP Synthese wird das ATP/ADP Verhältnis erhöht (3) und es kommt zum Schließen der ATP-sensitiven K^+-Kanäle (4). Die Folge ist eine Depolarisation der Plasmamembran (5) und ein Ca^{2+}-Einstrom über geöffnete *voltage dependend Ca^{2+} channels* (VDCC) (6). Die dadurch erreichte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (7) stimuliert die Insulinsekretion aus den Insulin Speichergranula (8). Die Erhöhung des ATP/ADP Verhältnisses kann zusätzlich durch die IP6K wahrgenommen werden (4B) was zu einer vermehrten 5PP-$InsP_5$-Synthese führt (5B) von dem bekannt ist, dass es die Insulinsekretion unterstützt [57]. Entnommen aus [166] und modifiziert.

6.4.3 Die IP6K als potentes Ziel für zukünftige Diabetes Typ II Therapeutika

Die Beobachtung der IP6K als Energiesensor und dessen Produkte als Regulatoren machen die Kinase besonders interessant bei der Behandlung von Diabetes Typ II. Der honigsüße Durchfluss (Diabetes mellitus) ist eine Stoffwechselstörung, die sich bei Nichtbehandlung in einer Hyperglykämie äußert. Geschätzt leiden weltweit etwa 380 Millionen Erwachsene an Diabetes allgemein (Stand 2013). Die vorhergesagte Prävalenz an Erkrankungen für das Jahr 2035 beträgt etwa 590 Millionen [167]. Für diese rasant wachsende Zahl an Diabeteserkrankunken ist vor allem der Lebensstil und die damit assoziierte Zunahme des Typ II Diabetes verantwortlich [168].

Erkrankte des Typ I Diabetes produzieren auf Grund einer autoimmunbedingten Zerstörung der pankreatischen ß-Zellen kein eigenes Insulin und müssen dieses substituieren [169]. Die Erkrankung tritt meist vor dem 30. Lebensjahr auf und wird daher auch als juveniler Diabetes bezeichnet.

Erkrankte des Typ II Diabetes, auch als adipöser oder Alters-Diabetes bezeichnet, leiden an einer Insulinresistenz der Zellen in peripheren Geweben. Muskel und Fettzellen reagieren nicht angemessen auf das ausgeschüttete Insulin und es kommt zu einer verminderten Glukoseaufnahme aus dem Blut mit der Folge einer Hyperglykämie [170] .

Mäuse mit einem IP6K1 *knock out* zeigen, wie bereits erwähnt, eine verminderte Insulin Konzentration im Blut, was durch den Verlust der IP6K (bzw. 5PP-$InsP_5$) als unterstützendem, nicht

aber essentiellen Faktor der Sekretion zu erklären ist (s.o.). Interessant ist allerdings, dass die Mäuse trotz verminderter Insulinsekretion normale Blutglukosekonzentrationen und Glukosetoleranzen im Vergleich zu WT Mäusen aufweisen [58], was bedeutet, dass die Mäuse "normal" auf die postprandiale Glukoseerhöhung reagieren. Im Zellmodell, mit Zellen des peripheren Gewebes, konnte gezeigt werden, dass der Verlust der IP6K dort ebenfalls zu verringerten 5PP-InsP_5 Mengen führt und aber die Akt/PKB Inhibition vermindert. Die Zellen reagierten deutlich sensitiver auf Insulin als vergleichbare WT Zellen. Der Grund war eine gesteigerte Signalkaskade des weniger gebundenen Insulins [107]. Die somit gesteigerte Sensitivität konnte anscheinend die verminderte Insulinsekretion durch den *knock out* kompensieren. Hieraus könnte eine Arbeitshypothese für zukünftige Studien abgeleitet werden:
Die Inhibition der humanen IP6K könnte ähnliche Effekte im Menschen hervorrufen. Dabei könnte die Insulinsensitivität in Zellen des peripheren Gewebes durch die IP6K Inhibition erhöht werden, sodass die Zellen wieder angemessen auf das ausgeschüttete Insulin eines Typ II Diabetikers reagieren. Ein Inhibitor könnte so zumindest als unterstützende Therapie zur Behandlung des Typ II Diabetes eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

[1] SCHERER, J. *Über eine neue, aus dem Muskelfleisch gewonnene Zuckerart.* Justus Liebigs Ann Chem 73:322–328, **1850**

[2] PRINGSHEIM, N., PFEFFER, W. und STRASBURGER, E. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik.* Borntraeger **1871**

[3] POSTERNAK, S. *Sur la matiere phospho-organique de reserve des plantes a chlorophylle. Procede de preparation.* Comptes Rendus 137:202–204, **1903**

[4] POSTERNAK, S. *Sur un nouveau principe phosphor-organique dórigine végétale, la phytine.* Comples rendues de la Société de biologie **1903**

[5] ANDERSON, R.J. *Concerning the organic phosphoric acid of cottonseed meal II: Fifth Paper on Phytin.* The Journal of biological chemistry 17:141–150, **1914**

[6] NEUBERG, C. *Notiz über Phytin.* Biochemische Zeitschrift 16:143, **1909**

[7] POSTERNAK, S. *Sur la synthese de lÂŽacide inosito-hexaphosphorique.* Helvetica Chimica Acta 4:150–165, **1921**

[8] STREB, H., IRVINE, R.F., BERRIDGE, M.J. und SCHULZ, I. *Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-triphosphate.* Nature 306:67–69, **1983**

[9] STREB, H. und SCHULZ, I. *Regulation of cytosolic free Ca2+ concentration in acinar cells of rat pancreas.* The American journal of physiology 245(3):G347–57, **1983**

[10] IRVINE, R.F. und SCHELL, M.J. *Back in the water: the return of the inositol phosphates.* Nature Reviews Molecular Cell Biology 2:327–338, **2001**

[11] MAYR, G.W., RADENBERG, T., THIEL, U., VOGEL, G. und STEPHENS, L.R. *Phosphoinositol diphosphates: non-enzymic formation in vitro and occurrence in vivo in the cellular slime mold Dictyostelium.* Carbohydrate Research 234:247–262, **1992**

[12] MENNITI, F.S., MILLER, R.N., PUTNEY, J.W. und SHEARS, S.B. *Turnover of inositol polyphosphate pyrophosphates in pancreatoma cells.* The Journal of biological chemistry 268(6):3850–3856, **1993**

[13] STEPHENS, L., RADENBERG, T., THIEL, U., VOGEL, G., KHOO, K.H., DELL, A., JACKSON, T.R., HAWKINS, P.T. und MAYR, G.W. *The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate(s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate(s).* The Journal of biological chemistry 268(6):4009–4015, **1993**

[14] DRASKOVIC, P., SAIARDI, A., BHANDARI, R., BURTON, A., ILC, G., KOVACEVIC, M., SNYDER, S.H. und PODOBNIK, M. *Inositol hexakisphosphate kinase products contain diphosphate and triphosphate groups.* Chemistry & biology 15(3):274–286, **2008**

[15] RECOMMENDATIONS 1973. *IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and CBN, I.-I. C- o. B. N. (1973) Nomenclature of Cyclitols.* Biochemical Journal 153:23–31, **1973**

[16] MAYR, G.W. *Inositol phosphates: structural components, regulators and signal transducers of the cell - a review.* Topics in Biochemistry 7:1–17, **1988**

[17] 1988, R. *NC-IUB. Numbering of atoms in myo-inositol. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB).* Biochemical Journal 258:1–2, **1989**

[18] AGRANOFF, B.W. *Cyclitolconfusion.* Trends in biochemical sciences 3:N283–285, **1978**

[19] WUNDENBERG, T. und MAYR, G.W. *Synthesis and biological actions of diphosphoinositol phosphates (inositol pyrophosphates), regulators of cell homeostasis.* Biological chemistry 393(9):979–998, **2012**

[20] 1996, R. *IUPAC-IUB. Commission on biochemical nomenclature. Nomenclature of phosphorous-containing compounds of biochemical importance.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Seiten 2222–2230, **1996**

[21] LAUSSMANN, T., PIKZACK, C., THIEL, U., MAYR, G.W. und VOGEL, G. *Diphospho-myo-inositol phosphates during the life cycle of Dictyostelium and Polysphondylium.* European journal of biochemistry / FEBS 267(8):2447–2451, **2000**

[22] ALBERT, C., SAFRANY, S.T., BEMBENEK, M.E., REDDY, K.M., REDDY, K., FALCK, J., BRÖCKER, M., SHEARS, S.B. und MAYR, G.W. *Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in Dictyostelium discoideum and mammalian cells.* The Biochemical journal 327 (Pt 2:553–560, **1997**

[23] MULUGU, S., BAI, W., FRIDY, P.C., BASTIDAS, R.J., OTTO, J.C., DOLLINS, D.E., HAYSTEAD, T.A., RIBEIRO, A.A. und YORK, J.D. *A conserved family of enzymes that phosphorylate inositol hexakisphosphate.* Science (New York, NY) 316:106–109, **2007**

[24] LIN, H., FRIDY, P.C., RIBEIRO, A.A., CHOI, J.H., BARMA, D.K., VOGEL, G., FALCK, J.R., SHEARS, S.B., YORK, J.D. und MAYR, G.W. *Structural analysis and detection of biological*

inositol pyrophosphates reveal that the family of VIP/diphosphoinositol pentakisphosphate kinases are 1/3-kinases. The Journal of biological chemistry 284(3):1863–1872, **2009**

[25] BALLA, T. *Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation.* Physiological reviews 93(3):1019–1137, **2013**

[26] SHAH, Z.H., JONES, D.R., SOMMER, L., FOULGER, R., BULTSMA, Y., D'SANTOS, C. und DIVECHA, N. *Nuclear phosphoinositides and their impact on nuclear functions.* The FEBS journal 280(24):6295–6310, **2013**

[27] BERRIDGE, M.J. *Discovery of the Second Messenger Inositol Trisphosphate.* Messenger 1(1):3–15, **2012**

[28] ABEL, K., ANDERSON, R.A. und SHEARS, S.B. *Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism.* Journal of cell science 114:2207–2208, **2001**

[29] TAKAZAWA, K., PERRET, J., DUMONT, J.E. und ERNEUX, C. *Molecular Cloning and Expression of a Human Brain Inositol 1,4,5-Triphosphate 3-Kinase.* Biochemical and biophysical research communications 174(2):529–535, **1991**

[30] TAKAZAWA, K., PERRET, J., DUMONT, J.E. und ERNEUX, C. *Molecular cloning and expression of a new putative inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase isoenzyme.* Biochemical Journal 278 (Pt 3):883–886, **1991**

[31] ERNEUX, C., ROECKEL, N., TAKAZAWA, K., MAILLEUX, P., VASSART, G. und MATTEI, M.G. *Localization of the Genes for Human Inositol 1,4,5-Triphosphate 3-Kinase A (ITPKA) and B (ITPKB) to Chromosome Regions 15q14-q21 and 1q41-q43 , Respectively , by in Situ Hybridization.* Genomics 14:546–547, **1992**

[32] NALASKOWSKI, M.M., DESCHERMEIER, C., FANICK, W. und MAYR, G.W. *The human homologue of yeast ArgRIII protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization.* Biochemical Journal 366:549–556, **2002**

[33] SAIARDI, A., NAGATA, E., LUO, H.R., SAWA, A., LUO, X., SNOWMAN, A.M. und SNYDER, S.H. *Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-triphosphate and an inositol pyrophosphate.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(5):2306–2311, **2001**

[34] SAIARDI, A., CAFFREY, J.J., SNYDER, S.H. und SHEARS, S.B. *Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in Saccharomyces cerevisiae.* FEBS letters 468(1):28–32, **2000**

[35] WILSON, M.P. und MAJERUS, P.W. *Isolation of Inositol 1,3,4-Triphosphate 5/6-Kinase, cDNA Cloning, and Expression of the Recombinant Enzyme.* The Journal of biological chemistry 271(20):11904–11910, **1996**

[36] YANG, X. und SHEARS, S.B. *Multitasking in signal transduction by promiscuous human Ins(3,4,5,6)P4 1-kinase/Ins(1,3,4)P3 5/6-kinase.* Biochemical Journal 351 (Pt 3):551–555, **2000**

[37] VERBSKY, J.W., WILSON, M.P., KISSELEVA, M.V., MAJERUS, P.W. und WENTE, S.R. *The synthesis of inositol hexakisphosphate. Characterization of human inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase.* The Journal of biological chemistry 277(35):31857–31862, **2002**

[38] MAJERUS, P.W., KISSELEVA, M.V. und NORRIS, F.A. *The role of phosphatases in inositol signaling reactions.* The Journal of biological chemistry 274(16):10669–10672, **1999**

[39] ALIS, N., CRAXTON, A. und SHEARS, B. *Hepatic Ins(1,3,4,5)P4 3-Phosphatase Is Compartmentalized Inside Endoplasmic Reticulum.* The Journal of biological chemistry 268(9):6161–6167, **1993**

[40] NOGIMORI, K., HUGHES, P.J., GLENNON, M.C., HODGSON, M.E., PUTNEY, J.W. und SHEARS, S.B. *Purification of an Inositol (1,3,4,5)-Tetrakisphosphate 3-Phosphatase Activity from Rat Liver and the Evaluation of Its Substrate Specificity.* The Journal of biological chemistry 266(25):16499–16506, **1991**

[41] MILANO, S.K., KIM, Y.M., STEFANO, F.P., BENOVIC, J.L. und BRENNER, C. *Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding.* The Journal of biological chemistry 281(14):9812–9823, **2006**

[42] MONTPETIT, B., THOMSEN, N.D., HELMKE, K.J., SEELIGER, M.A., BERGER, J.M. und WEIS, K. *A conserved mechanism of DEAD-box ATPase activation by nucleoporins and InsP6 in mRNA export.* Nature 472(7342):238–242, **2011**

[43] MA, Y. und LIEBER, M.R. *Binding of inositol hexakisphosphate (IP6) to Ku but not to DNA-PKcs.* The Journal of biological chemistry 277(13):10756–10759, **2002**

[44] STUART, J.A., ANDERSON, K.L., FRENCH, P.J., KIRK, C.J. und MICHELL, R.H. *The intracellular distribution of inositol polyphosphates in HL60 promyeloid cells.* The Biochemical journal 303 (Pt 2):517–525, **1994**

[45] BARKER, C.J. und BERGGREN, P.O. *New horizons in cellular regulation by inositol polyphosphates: insights from the pancreatic β-cell.* Pharmacological reviews 65(2):641–669, **2013**

[46] SCHELL, M.J., LETCHER, A.J., BREARLEY, C.A., BIBER, J., MURER, H. und IRVINE, R.F. *PiUS (Pi uptake stimulator) is an inositol hexakisphosphate kinase.* FEBS letters 461(3):169–172, **1999**

[47] SAIARDI, A., ERDJUMENT-BROMAGE, H., SNOWMAN, A.M., TEMPST, P. und SNYDER, S.H. *Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases.* Current Biology 9(22):1323–1326, **1999**

[48] SAIARDI, A., NAGATA, E., LUO, H.R., SNOWMAN, A.M. und SNYDER, S.H. *Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase.* The Journal of biological chemistry 276(42):39179–39185, **2001**

[49] FRIDY, P.C., OTTO, J.C., DOLLINS, D.E. und YORK, J.D. *Cloning and characterization of two human VIP1-like inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol pentakisphosphate kinases.* The Journal of biological chemistry 282(42):30754–30762, **2007**

[50] WANG, H., FALCK, J.R., HALL, T.M.T. und SHEARS, S.B. *Structural basis for an inositol pyrophosphate kinase surmounting phosphate crowding.* Nature Chemical Biology 8:111–116, **2011**

[51] THOMAS, M.P. und POTTER, B.V.L. *The enzymes of human diphosphoinositol polyphosphate metabolism.* The FEBS journal 281(1):14–33, **2013**

[52] MCLENNAN, A.G. *The Nudix hydrolase superfamily.* Cellular and molecular life sciences : CMLS 63(2):123–143, **2006**

[53] SAFRANY, S.T., CAFFREY, J.J., YANG, X., BEMBENEK, M.E., MOYER, M.B., BURKHART, W.A. und SHEARS, S.B. *A novel context for the 'MutT' module, a guardian of cell integrity, in a diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase.* The EMBO journal 17(22):6599–6607, **1998**

[54] CAFFREY, J.J., SAFRANY, S.T., YANG, X. und SHEARS, S.B. *Discovery of Molecular and Catalytic Diversity among Human Diphosphoinositol-Polyphosphate Phosphohydrolases. An expanding Nudt family.* The Journal of biological chemistry 275(17):12730–12736, **2000**

[55] MORRISON, B.H., BAUER, J.A., LUPICA, J.A., TANG, Z., SCHMIDT, H., DIDONATO, J.A. und LINDNER, D.J. *Effect of inositol hexakisphosphate kinase 2 on transforming growth factor beta-activated kinase 1 and NF-kappaB activation.* The Journal of biological chemistry 282(21):15349–15356, **2007**

[56] VERBSKY, J. und MAJERUS, P.W. *Increased levels of inositol hexakisphosphate (InsP6) protect HEK293 cells from tumor necrosis factor (alpha)- and Fas-induced apoptosis.* The Journal of biological chemistry 280(32):29263–29268, **2005**

[57] ILLIES, C., GROMADA, J., FIUME, R., LEIBIGER, B., YU, J., JUHL, K., YANG, S.N., BARMA, D.K., FALCK, J.R., SAIARDI, A., BARKER, C.J. und BERGGREN, P.O. *Requirement of inositol pyrophosphates for full exocytotic capacity in pancreatic beta cells.* Science (New York, NY) 318(5854):1299–1302, **2007**

[58] BHANDARI, R., JULURI, K.R., RESNICK, A.C. und SNYDER, S.H. *Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 reveals inositol pyrophosphate regulation of insulin secretion, growth,*

and spermiogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(7):2349–2353, **2008**

[59] YORK, S.J., ARMBRUSTER, B.N., GREENWELL, P., PETES, T.D. und YORK, J.D. *Inositol diphosphate signaling regulates telomere length.* The Journal of biological chemistry 280(6):4264–4269, **2005**

[60] SAIARDI, A., RESNICK, A.C., SNOWMAN, A.M., WENDLAND, B. und SNYDER, S.H. *Inositol pyrophosphates regulate cell death and telomere length through phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(6):1911–1914, **2005**

[61] LEE, Y.S., HUANG, K., QUIOCHO, F.A. und OÂŽSHEA, E.K. *Molecular basis of Cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate.* Nature Chemical Biology 4(1):25–32, **2008**

[62] LEE, Y.S., MULUGU, S., YORK, J.D. und O'SHEA, E.K. *Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates.* Science (New York, NY) 316(5821):109–112, **2007**

[63] BURTON, A., AZEVEDO, C., ANDREASSI, C., RICCIO, A. und SAIARDI, A. *Inositol pyrophosphates regulate JMJD2C-dependent histone demethylation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(47):18970–18975, **2013**

[64] PRASAD, A., JIA, Y., CHAKRABORTY, A., LI, Y., JAIN, S.K., ZHONG, J., ROY, S.G., LOISON, F., MONDAL, S., SAKAI, J., BLANCHARD, C., SNYDER, S.H. und LUO, H.R. *Inositol hexakisphosphate kinase 1 regulates neutrophil function in innate immunity by inhibiting phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate signaling.* Nature immunology 12(8):752–760, **2011**

[65] PESESSE, X., CHOI, K., ZHANG, T. und SHEARS, S.B. *Signaling by higher inositol polyphosphates. Synthesis of bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate (ÏnsP8") is selectively activated by hyperosmotic stress.* The Journal of biological chemistry 279(42):43378–43381, **2004**

[66] CHOI, J.H., WILLIAMS, J., CHO, J., FALCK, J.R. und SHEARS, S.B. *Purification, sequencing, and molecular identification of a mammalian PP-InsP5 kinase that is activated when cells are exposed to hyperosmotic stress.* The Journal of biological chemistry 282(42):30763–30775, **2007**

[67] CHOI, K., MOLLAPOUR, E. und SHEARS, S.B. *Signal transduction during environmental stress: InsP8 operates within highly restricted contexts.* Cellular signalling 17(12):1533–1541, **2005**

[68] VOGLMAIER, S.M., BEMBENEKT, M.E., KAPLIN, A.I., DORMANT, G., OLSZEWSKIT, J.D., PRESTWICHT, G.D. und SNYDER, S.H. *Purified inositol hexakisphosphate kinase is an ATP synthase: Diphosphoinositol pentakisphosphate as a high-energy phosphate donor.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93:4305–4310, **1996**

[69] ZHANG, H., THOMPSON, J. und PRESTWICH, G.D. *A Scalable Synthesis of the IP7 Isomer, 5-PP-Ins (1,2,3,4,6)P5.* Organic Letters 11(7):1551–1554, **2009**

[70] HAND, C.E. und HONEK, J.F. *Phosphate transfer from inositol pyrophosphates InsP5PP and InsP4(PP)2: a semi-empirical investigation.* Bioorganic & medicinal chemistry letters 17(1):183–188, **2007**

[71] MANNING, G., PLOWMAN, G.D., HUNTER, T. und SUDARSANAM, S. *Evolution of protein kinase signaling from yeast to man.* Trends in biochemical sciences 27(10):514–520, **2002**

[72] MANNING, G., WHYTE, D.B., MARTINEZ, R., HUNTER, T. und SUDARSANAM, S. *The protein kinase complement of the human genome.* Science (New York, NY) 298(5600):1912–1934, **2002**

[73] SAIARDI, A., BHANDARI, R., RESNICK, A.C., SNOWMAN, A.M. und SNYDER, S.H. *Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates.* Science (New York, NY) 306(5704):2101–2105, **2004**

[74] BHANDARI, R., SAIARDI, A., AHMADIBENI, Y., SNOWMAN, A.M., RESNICK, A.C., KRISTIANSEN, T.Z., MOLINA, H., PANDEY, A., WERNER, J.K., JULURI, K.R., XU, Y., PRESTWICH, G.D., PARANG, K. und SNYDER, S.H. *Protein pyrophosphorylation by inositol pyrophosphates is a posttranslational event.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(39):15305–15310, **2007**

[75] SZIJGYARTO, Z., GAREDEW, A., AZEVEDO, C. und SAIARDI, A. *Influence of inositol pyrophosphates on cellular energy dynamics.* Science (New York, NY) 334(6057):802–805, **2011**

[76] AZEVEDO, C., BURTON, A., RUIZ-MATEOS, E., MARSH, M. und SAIARDI, A. *Inositol pyrophosphate mediated pyrophosphorylation of AP3B1 regulates HIV-1 Gag release.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(50):21161–21166, **2009**

[77] GINISTY, H., SICARD, H., ROGER, B. und BOUVET, P. *Structure and functions of nucleolin.* Journal of cell science 112 (Pt 6):761–772, **1999**

[78] FUJIKI, H., WATANABE, T. und SUGANUMA, M. *Cell-surface nucleolin acts as a central mediator for carcinogenic, anti-carcinogenic, and disease-related ligands.* Journal of cancer research and clinical oncology 140(5):689–699, **2014**

[79] GINISTY, H., SERIN, G., GHISOLFI-NIETO, L., ROGER, B., LIBANTE, V., AMALRIC, F. und BOUVET, P. *Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the assembly of the primary processing complex.* The Journal of biological chemistry 275(25):18845–18850, **2000**

[80] VALDEZ, B.C., HENNING, D., SO, R.B., DIXON, J. und DIXON, M.J. *The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(29):10709–10714, **2004**

[81] KIM, Y.K., LEE, K.J., JEON, H. und YU, Y.G. *Protein kinase CK2 is inhibited by human nucleolar phosphoprotein p140 in an inositol hexakisphosphate-dependent manner.* The Journal of biological chemistry 281(48):36752–36757, **2006**

[82] LEE, W.K., LEE, S.Y., KIM, W.I., RHO, Y.H., BAE, Y.S., LEE, C., KIM, I.Y. und YU, Y.G. *Characterization of the InsP6-dependent interaction between CK2 and Nopp140.* Biochemical and biophysical research communications 376(2):439–444, **2008**

[83] BREHM, M.A., WUNDENBERG, T., WILLIAMS, J., MAYR, G.W. und SHEARS, S.B. *A non-catalytic role for inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase in the synthesis of ribosomal RNA.* Journal of cell science 126(Pt 2):437–444, **2013**

[84] NAKATSU, F. und OHNO, H. *Adaptor Protein Complexes as the Key Regulators of Protein Sorting in the Post-Golgi Network.* Cell Structure and Function 28:419–429, **2003**

[85] ITO, T., CHIBA, T., OZAWA, R., YOSHIDA, M., HATTORI, M. und SAKAKI, Y. *A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(8):4569–4574, **2001**

[86] IRVINE, R.F. und DENTON, R.M. *Pyro-technic control of metabolism.* Science (New York, NY) 334(6057):770–771, **2011**

[87] FLEISCHER, B., XIEI, J., MAYRLEITNERS, M., SHEARS, S.B., PALMER, D.J. und FLEISCHER, S. *Golgi Coatomer Binds, and Forms K+-selective Channels Gated by, Inositol Phosphates*.* The Journal of biological chemistry 269(27):17826–17832, **1994**

[88] YE, W., ALI, N., BEMBENEK, M.E., SHEARS, S.B. und LAFER, E.M. *Inhibition of Clathrin Assembly by High Affinity Binding of Specific Inositol Polyphosphates to the Synapse-specific Clathrin Assembly Protein AP-3.* The Journal of biological chemistry1 270(4):1564–1568, **1995**

[89] VOGLMAIER, S.M., KEEN, J.H., MURPHY, J.E., FERRIS, C.D., PRESTWLCH, G.D., SNYDER, S.H. und THEIBERT, A.B. *Inositol Hexakisphosphate Receptor Identified as the Clathrin*

Assembly Protein AP-2. Biochemical and biophysical research communications 187(1):158–163, **1992**

[90] NORRIS, F.A., UNGEWICKELL, E. und MAJERUS, P.W. *Inositol Hexakisphosphate Binds to Clathrin Assembly Protein 3 (AP-3/AP180) and Inhibits Clathrin Cage Assembly in Vitro.* The Journal of biological chemistry 270(1):214–217, **1995**

[91] GAIDAROV, I., CHEN, Q., FALCK, J.R., REDDY, K.K. und KEEN, J.H. *A Functional Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate/Phosphoinositide Binding Domain in the Clathrin Adaptor AP-2 Subunit. Im plications for the endocytic pathway.* Journal of Biological Chemistry 271(34):20922–20929, **1996**

[92] HAO, W., TAN, Z., PRASAD, K., REDDY, K.K., CHEN, J., PRESTWICH, G.D., FALCK, J.R., SHEARS, S.B. und LAFER, E.M. *Regulation of AP-3 Function by Inositides: Identification of Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate as a Potent Ligand.* Journal of Biological Chemistry 272(10):6393–6398, **1997**

[93] CHAUDHARY, A., GU, Q.M., THUM, O., PROFIT, A.A., QI, Y., JEYAKUMAR, L., FLEISCHER, S. und PRESTWICH, G.D. *Carbohydrates, Lipids, and other natural products: Specific Interaction of Golgi Coatomer Protein alpha -COP with Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate.* Journal of Biological Chemistry 273(14):8344–8350, **1998**

[94] COLLINS, B.M., MCCOY, A.J., KENT, H.M., EVANS, P.R. und OWEN, D.J. *Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex.* Cell 109(4):523–535, **2002**

[95] SAIARDI, A., CAFFREY, J.J., SNYDER, S.H. und SHEARS, S.B. *The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis.* The Journal of biological chemistry 275(32):24686–24692, **2000**

[96] DUBOIS, E., SCHERENS, B., VIERENDEELS, F., HO, M.M.W., MESSENGUY, F. und SHEARS, S.B. *In Saccharomyces cerevisiae, the inositol polyphosphate kinase activity of Kcs1p is required for resistance to salt stress, cell wall integrity, and vacuolar morphogenesis.* The Journal of biological chemistry 277(26):23755–23763, **2002**

[97] SAIARDI, A., SCIAMBI, C., MCCAFFERY, J.M., WENDLAND, B. und SNYDER, S.H. *Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(22):14206–14211, **2002**

[98] LEMMON, M.A. und FERGUSON, K.M. *Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains.* The Biochemical journal 350 (Pt 1):1–18, **2000**

[99] MCLAUGHLIN, S. und MURRAY, D. *Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics.* Nature 438(7068):605–611, **2005**

[100] LEMMON, M.A. *Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides.* Biochemical Society Transactions 32(5):707–711, **2004**

[101] KOJIMA, T., FUKUDA, M., WATANABE, Y., HAMAZATO, F. und MIKOSHIBA, K. *Characterization of the pleckstrin homology domain of Btk as an inositol polyphosphate and phosphoinositide binding domain.* Biochemical and biophysical research communications 236(2):333–339, **1997**

[102] JACKSON, S.G., ZHANG, Y., HASLAM, R.J. und JUNOP, M.S. *Structural analysis of the carboxy terminal PH domain of pleckstrin bound to D-myo-inositol 1,2,3,5,6-pentakisphosphate.* BMC structural biology 7:80, **2007**

[103] JACKSON, S.G., AL-SAIGH, S., SCHULTZ, C. und JUNOP, M.S. *Inositol pentakisphosphate isomers bind PH domains with varying specificity and inhibit phosphoinositide interactions.* BMC structural biology 11(1):11, **2011**

[104] PICCOLO, E., VIGNATI, S., MAFFUCCI, T., INNOMINATO, P.F., RILEY, A.M., POTTER, B.V.L., PANDOLFI, P.P., BROGGINI, M., IACOBELLI, S., INNOCENTI, P. und FALASCA, M. *Inositol pentakisphosphate promotes apoptosis through the PI 3-K/Akt pathway.* Oncogene 23(9):1754–1765, **2004**

[105] KOMANDER, D., FAIRSERVICE, A., DEAK, M., KULAR, G.S., PRESCOTT, A.R., PETER DOWNES, C., SAFRANY, S.T., ALESSI, D.R. und VAN AALTEN, D.M.F. *Structural insights into the regulation of PDK1 by phosphoinositides and inositol phosphates.* The EMBO journal 23(20):3918–39128, **2004**

[106] LUO, H.R., HUANG, Y.E., CHEN, J.C., SAIARDI, A., IIJIMA, M., YE, K., HUANG, Y., NAGATA, E., DEVREOTES, P. und SNYDER, S.H. *Inositol Pyrophosphates Mediate Chemotaxis in Dictyostelium via Pleckstrin Homology Domain-PtdIns (3,4,5)P3 Interactions.* Cell 114:559–572, **2003**

[107] CHAKRABORTY, A., KOLDOBSKIY, M.A., BELLO, N.T., MAXWELL, M., POTTER, J.J., JULURI, K.R., MAAG, D., KIM, S., HUANG, A.S., DAILEY, M.J., SALEH, M., SNOWMAN, A.M., MORAN, T.H., MEZEY, E. und SNYDER, S.H. *Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain.* Cell 143(6):897–910, **2010**

[108] MANNING, B.D. und CANTLEY, L.C. *AKT/PKB signaling: navigating downstream.* Cell 129(7):1261–1274, **2007**

[109] TANIGUCHI, C.M., EMANUELLI, B. und KAHN, C.R. *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action.* Nature reviews Molecular cell biology 7(2):85–96, **2006**

[110] NALASKOWSKI, M.M. und MAYR, G.W. *The families of kinases removing the Ca2+ releasing second messenger Ins(1,4,5)P3.* Current Molecular Medicine 4:277–290, **2004**

[111] BERTSCH, U., DESCHERMEIER, C., FANICK, W., GIRKONTAITE, I., HILLEMEIER, K., JOHNEN, H., WEGLÖHNER, W., EMMRICH, F. und MAYR, G.W. *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.* The Journal of biological chemistry 275(3):1557–1564, **2000**

[112] BERTSCH, U., HAEFS, M., MO, M., DESCHERMEIER, C., FANICK, W., KITZEROW, A., OZAKI, S., MEYER, H.E. und MAYR, G.W. *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, **1999**

[113] BARKER, C.J., ILLIES, C., GABOARDI, G.C. und BERGGREN, P.O. *Inositol pyrophosphates: structure, enzymology and function.* Cellular and molecular life sciences : CMLS 66(24):3851–3871, **2009**

[114] NORBIS, F., BOLL, M., STANGE, G., MARKOVICH, D., VERREY, F., BIBER, J. und MURER, H. *Identification of a cDNA/Protein Leading to an Increased Pi-uptake in Xenopus laevis Oocytes.* The Journal of Membrane Biology 156:19–24, **1997**

[115] MORRISON, B.H., TANG, Z., JACOBS, B.S., BAUER, J.A. und LINDNER, D.J. *Apo2L/TRAIL induction and nuclear translocation of inositol hexakisphosphate kinase 2 during IFN-beta-induced apoptosis in ovarian carcinoma.* The Biochemical journal 385(Pt 2):595–603, **2005**

[116] NAGATA, E., SAIARDI, A., TSUKAMOTO, H., OKADA, Y., ITOH, Y., SATOH, T., ITOH, J., MARGOLIS, R.L., TAKIZAWA, S., SAWA, A. und TAKAGI, S. *Inositol hexakisphosphate kinases induce cell death in Huntington disease.* The Journal of biological chemistry 286(30):26680–26686, **2011**

[117] LUO, H.R., SAIARDI, A., NAGATA, E., YE, K., YU, H., JUNG, T.S., LUO, X., JAIN, S., SAWA, A. und SNYDER, S.H. *GRAB: a physiologic guanine nucleotide exchange factor for Rab3A, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase.* Neuron 31(3):439–451, **2001**

[118] LEENDERS, A.G., LOPES DA SILVA, F.H., GHIJSEN, W.E. und VERHAGE, M. *Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals.* Molecular biology of the cell 12(10):3095–3102, **2001**

[119] CHAKRABORTY, A., KOLDOBSKIY, M.A., SIXT, K.M., JULURI, K.R., MUSTAFA, A.K., SNOWMAN, A.M., VAN ROSSUM, D.B., PATTERSON, R.L. und SNYDER, S.H. *HSP90 regulates cell survival via inositol hexakisphosphate kinase-2.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(4):1134–1139, **2008**

[120] MILLER, G.J., WILSON, M.P., MAJERUS, P.W. und HURLEY, J.H. *Specificity determinants*

in inositol polyphosphate synthesis: crystal structure of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase. Molecular cell 18(2):201–212, **2005**

[121] GOKHALE, N.A., ZAREMBA, A. und SHEARS, S.B. *Receptor-dependent compartmentalization of PPIP5K1, a kinase with a cryptic polyphosphoinositide binding domain.* The Biochemical journal 434(3):415–426, **2011**

[122] GOKHALE, N.A., ZAREMBA, A., JANOSHAZI, A.K., WEAVER, J.D. und SHEARS, S.B. *PPIP5K1 modulates ligand competition between diphosphoinositol polyphosphates and PtdIns(3,4,5)P3 for polyphosphoinositide-binding domains.* The Biochemical journal 453(3):413–426, **2013**

[123] HANAHAN, D. *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* Journal of molecular biology 166:557–580, **1983**

[124] MIROUX, B. und WALKER, J.E. *Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.* Journal of molecular biology 260(3):289–298, **1996**

[125] SCHMIDT, T.G. und SKERRA, A. *One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the SStrep tagänd immobilized recombinant core streptavidin.* Journal of chromatography A 676:337–345, **1994**

[126] LAEMMLI, U.K. *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.* Nature 227:680–685, **1970**

[127] MAYR, G.W. *A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens.* The Biochemical journal 254(2):585–591, **1988**

[128] BENNETT, T.P. *Membrane Filtration for determining Protein in the Presence of Interfering Substances.* Nature 213:1131–1132, **1967**

[129] KIIANITSA, K., SOLINGER, J.A. und HEYER, W.D. *NADH-coupled microplate photometric assay for kinetic studies of ATP-hydrolyzing enzymes with low and high specific activities.* Analytical Biochemistry 321(2):266–271, **2003**

[130] CHANG, Y.T., CHOI, G., BAE, Y.S., BURDETT, M., MOON, H.S., LEE, J.W., GRAY, N.S., SCHULTZ, P.G., MEIJER, L., CHUNG, S.K., CHOI, K.Y., SUH, P.G. und RYU, S.H. *Purine-Based Inhibitors of Inositol-1,4,5-triphosphate-3-kinase.* Chembiochem : a European journal of chemical biology 3(9):897–901, **2002**

[131] PADMANABHAN, U., DOLLINS, D.E., FRIDY, P.C., YORK, J.D. und DOWNES, C.P. *Characterization of a selective inhibitor of inositol hexakisphosphate kinases: use in defining biological*

roles and metabolic relationships of inositol pyrophosphates. The Journal of biological chemistry 284(16):10571–10582, **2009**

[132] WUNDENBERG, T., GRABINSKI, N., LIN, H. und MAYR, G.W. *Discovery of InsP6-kinases as InsP6 dephosphorylating enzymes provides a new mechanism of cytosolic InsP6 degradation driven by the cellular ATP/ADP ratio.* Biochemical Journal in press, **2014**

[133] WINDHORST, S., LIN, H., BLECHNER, C., FANICK, W., BRANDT, L., BREHM, M.A. und MAYR, G.W. *Tumour cells can employ extracellular Ins(1,2,3,4,5,6)P(6) and multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1 (MINPP1) dephosphorylation to improve their proliferation.* The Biochemical journal 450(1):115–125, **2013**

[134] SHEARS, S.B. *Kinetic consequences of the inhibition by ATP of the metabolism of inositol (1,4,5) triphosphate and inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate in the liver. Different effects upon the 3- and 5-phosphatases.* Cellular signalling 2(2):191–195, **1990**

[135] SHEARS, S.B., ALI, N., CRAXTON, A. und BEMBENEK, M.E. *Synthesis and Metabolism of Bis-diphosphoinositol Tetrakisphosphate in Vitro and in Vivo.* The Journal of biological chemistry 270(18):10489–10497, **1995**

[136] MUNNIK, T., DE VRIJE, T. und IRVINE, R.F. *Identification of Diacylglycerol Pyrophosphate as a Novel Metabolic Product of Phosphatidic Acid during G-protein Activation in Plants.* Journal of Biological Chemistry 271(26):15708–15715, **1996**

[137] TOMLINSON, R.V. und BALLOU, C.E. *Complete Characterization of the Myo-inositol Polyphosphates from Beef Brain Phosphoinositide.* The Journal of biological chemistry 236:1902–1906, **1961**

[138] MC NAUGHT, A.D. *XML on-line corrected version: http://goldbook.iupac.org (2006-) created by Nic, M., Jirat, J., Kosata; updates complied by Jenkins, A. ISBN 0-9678550-9-8 doi:10.1351/goldbook. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book").* Blackwell Scientific Publications, Oxford

[139] BEIS, I. und NEWSHOLME, E.A. *The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates.* The Biochemical journal 152(1):23–32, **1975**

[140] WARBURG, O., WIND, F. und NEGELEIN, E. *The Metabolism of Tumors in the Body.* The Journal of General Physiology 8:519–530, **1927**

[141] WARBURG, O. *On the Origin of Cancer Cells.* Science 123(3191):309–314, **1956**

[142] SAFRANY, S.T. und SHEARS, S.B. *Turnover of bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate in a smooth muscle cell line is regulated by beta2-adrenergic receptors through a cAMP-mediated, A-kinase-independent mechanism.* The EMBO journal 17(6):1710–1716, **1998**

[143] SAFRANY, S.T. *Protocols for Regulation and Study of Diphosphoinositol Polyphosphates.* Molecular Pharmacology 66(6):1585–1591, **2004**

[144] RILEY, A.M., WINDHORST, S., LIN, H.Y. und POTTER, B.V.L. *Cellular internalisation of an inositol phosphate visualised by using fluorescent InsP5.* Chembiochem : a European journal of chemical biology 15(1):57–67, **2014**

[145] GRIBBLE, F.M., LOUSSOUARN, G., TUCKER, S.J., ZHAO, C., NICHOLS, C.G. und ASHCROFT, F.M. *A novel method for measurement of submembrane ATP concentration.* The Journal of biological chemistry 275(39):30046–30049, **2000**

[146] ALBERTS, B.J.A. und LEWIS, J. *General Principles of Cell Communication. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26813/. Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science 4th editio, **2002**

[147] PATTNI, K. und BANTING, G. *Ins(1,4,5)P3 metabolism and the family of IP3-3Kinases.* Cellular signalling 16(6):643–654, **2004**

[148] MCCONNELL, F.M., STEPHENS, L.R. und SHEARS, S.B. *Multiple isomers of inositol pentakisphosphate in Epstein-Barr-virus-transformed (T5-1) B-lymphocytes.* Biochemical Journal 280 (Pt 2):323–329, **1991**

[149] STEPHENS, L.R. und IRVINE, R.F. *Stepwise phosphorylation of myo-inositol leading to myo-inositol hexakisphosphate in Dictyostelium.* Nature 346:580–583, **1990**

[150] STEPHENS, L.R., HAWKINS, P.T., STANLEY, A.F., MOORE, T., POYNER, D.R., MORRIS, P.J., HANLEY, M.R., KAY, R.R. und IRVINE, R.F. *myo-Inositol pentakisphosphates.* Biochemical Journal 275 (Pt 2):485–499, **1991**

[151] FASSETTI, F., LEONE, O., PALOPOLI, L., ROMBO, S.E. und SAIARDI, A. *IP6K gene identification in plant genomes by tag searching.* BMC proceedings 5 Suppl 2(Suppl 2):S1, **2011**

[152] CHING, T.M. und CHING, K.K. *Content of adenosine phosphates and adenylate energy charge in germinating ponderosa pine seeds.* Plant physiology 50(5):536–540, **1972**

[153] GRASES, F., SIMONET, B.M., PRIETO, R.M. und MARCH, J. *Phytate levels in diverse rat tissues: influence of dietary phytate.* British Journal of Nutrition 86(02):225–231, **2001**

[154] BUNCE, C.M., FRENCH, P.J., ALLEN, P., MOUNTFORD, J.C., MOOR, B., GREAVES, M.F., MICHELL, R.H. und BROWN, G. *Comparison of the levels of inositol metabolites in transformed haemopoietic cells and their normal counterparts.* The Biochemical journal 289 (Pt 3):667–673, **1993**

[155] SHAMSUDDIN, A.M. *Metabolism and Cellular Functions of IP6: A Review.* Anticancer Research 19:3733–3736, **1999**

[156] IVES, E.B., NICHOLS, J., WENTE, S.R. und YORK, J.D. *Biochemical and functional characterization of inositol 1,3,4,5, 6-pentakisphosphate 2-kinases.* The Journal of biological chemistry 275(47):36575–26583, **2000**

[157] PHILLIPPY, B.Q., ULLAH, A.H. und EHRLICH, K.C. *Purification and Some Properties of Inositol 2-Kinase from Immature Soybean Seeds.* The Journal of biological chemistry 269(45):28393–28399, **1994**

[158] STEVENSON-PAULIK, J., BASTIDAS, R.J., CHIOU, S.T., FRYE, R.A. und YORK, J.D. *Generation of phytate-free seeds in Arabidopsis through disruption of inositol polyphosphate kinases.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(35):12612–12617, **2005**

[159] GONZÁLEZ, B., BAÑOS SANZ, J.I., VILLATE, M., BREARLEY, C.A. und SANZ-APARICIO, J. *Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase is a distant IPK member with a singular inositide binding site for axial 2-OH recognition.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(21):9608–9613, **2010**

[160] BREHM, M.A., SCHENK, T.M.H., ZHOU, X., FANICK, W., LIN, H., WINDHORST, S., NALASKOWSKI, M.M., KOBRAS, M., SHEARS, S.B. und MAYR, G.W. *Intracellular localization of human Ins(1,3,4,5,6)P5 2-kinase.* The Biochemical journal 408(3):335–345, **2007**

[161] MAAG, D., MAXWELL, M.J., HARDESTY, D.A., BOUCHER, K.L., CHOUDHARI, N., HANNO, A.G., MA, J.F., SNOWMAN, A.S., PIETROPAOLI, J.W., XU, R., STORM, P.B., SAIARDI, A., SNYDER, S.H. und RESNICK, A.C. *Inositol polyphosphate multikinase is a physiologic PI3-kinase that activates Akt/PKB.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(4):1391–1396, **2011**

[162] WEAVER, J.D., WANG, H. und SHEARS, S.B. *The kinetic properties of a human PPIP5K reveal that its kinase activities are protected against the consequences of a deteriorating cellular bioenergetic environment.* Bioscience Reports **2012**

[163] SHEN, X., XIAO, H., RANALLO, R., WU, W.H. und WU, C. *Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates.* Science (New York, NY) 299(5603):112–114, **2003**

[164] STEGER, D.J., HASWELL, E.S., MILLER, A.L., WENTE, S.R. und O'SHEA, E.K. *Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates.* Science (New York, NY) 299(5603):114–116, **2003**

[165] WU, L., FRITZ, J.D. und POWERS, A.C. *Different Functional Domains of GLUT2 Glucose Transporter Are Required for Glucose Affinity and Substrate Specificity.* Endocrinology 139(10):4205–4212, **1998**

[166] MUOIO, D.M. und NEWGARD, C.B. *Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes.* Nature reviews Molecular cell biology 9(3):193–205, **2008**

[167] IDF. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas . http://www.idf.org/diabetesatlas*. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation 6th editio, **2013**

[168] ZIMMET, P., ALBERTI, K.G.M.M. und SHAW, J. *Global and societal implications of the diabetes epidemic.* Nature 414:782–787, **2001**

[169] VAN BELLE, T.L., COPPIETERS, K.T. und VAN HERRATH, M.G. *Type 1 Diabetes : Etiology , Immunology , and Therapeutic Strategies.* Physiological reviews 91:79–118, **2011**

[170] DONATH, M.Y. und SHOELSON, S.E. *Type 2 diabetes as an inflammatory disease.* Nature reviews Immunology 11(2):98–107, **2011**

Wisschenschaftliche Publikationen

Während der Arbeit veröffentlichte wissenschaftliche Publikationen:

WUNDENBERG, T. and MAYR, G.W. *Synthesis and biological actions of diphosphoinositol phosphates (inositol pyrophosphates), regulators of cell homeostasis.* Biological Chemistry 393(9):979-998, **2012**

BREHM, M.A., **WUNDENBERG, T.**, WILLIAMS, J., MAYR, G.W. and SHEARS, S.B. *A non-catalytic role for inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase in the synthesis of ribosomal RNA.* Journal of Cell Science 126:437-444, **2013**

WUNDENBERG, T., GRABINSKI, N., LIN, H. and MAYR, G.W. *Discovery of $InsP_6$-kinases as $InsP_6$ dephosphorylating enzymes provides a new mechanism of cytosolic $InsP_6$ degradation driven by the cellular ATP/ADP ratio.* Biochemical Journal in press, **2014**

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den _____

Torsten Wundenberg